

Universidad de La Habana  
Facultad de Biología  
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"

**Actividad antiviral de un extracto liofilizado del  
fruto de *Punica granatum* L.  
frente al virus de la Influenza**

**Tesis de Doctor en Ciencias de la Salud**

***Autora: Blanca del Rosario Peña Núñez, MSc.***

**Asesores: Lic. Gloria del Barrio Alonso, Profesora Titular, DrC.  
Dr. Francisco Morón Rodríguez, Profesor Titular, DrC.**

**La Habana  
2007**

## SÍNTESIS.

Se preparó un liofilizado a partir del extracto hidroalcohólico de los frutos maduros de la especie vegetal *Punica granatum* L. (BLBu), que se normalizó tanto en los parámetros de calidad de la materia prima como en su preparación y conservación. El tamizaje fitoquímico del mismo arrojó la presencia de diversos compuestos con potencial antiviral, de ellos, los flavonoides que representan el 73%. Se evaluó la acción antiviral del BLBU frente a la Influenza A/ Mississippi/1/85 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) en embriones aviares de 9 -11 días, inoculados por la vía alantoidea. La amantadina se utilizó como antiviral de referencia. El extracto, suministrado una hora antes ó una hora posterior al reto viral, redujo la infectividad de 1, 10 y 100 DIE<sub>50</sub> de la cepa de virus influenza *in ovo*. Se evaluó su espectro de acción antiinfluenza, frente a diferentes tipos y subtipos del virus, inoculado una hora posterior a la infección a 1, 10 y 100 DIE<sub>50</sub>. El BLBU presentó acción antiviral frente a todas las cepas de influenza, tanto las del tipo H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>, H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> y la influenza B. Se determinó la acción virucida directa del BLBU y se ratificó la acción antiviral irreversible, con reducciones de los títulos infectivos virales en más de 3 log<sub>10</sub> los que representaron índices de neutralización mayores de cien, para todas las cepas de influenza estudiadas. A dichas cepas de influenza se les realizó la electroforesis de las proteínas estructurales por (SDS – PAGE), y como parte del mecanismo antiviral virucida, el BLBU no alteró el patrón electroforético de las proteínas virales, corroborado por los densitogramas correspondientes y los pesos moleculares estimados a las bandas de interés, no obstante, la prueba de hemaglutinación fue negativa para todas las cepas estudiadas. La actividad virucida *in vitro* del BLBU se verificó al evaluar la capacidad de inhibir la fragmentación del ADN celular que le provocó el virus Influenza A/ Japan /10/99(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) a la Línea celular MDCK. Este extracto, protegió de este daño citopático a las MDCK tratadas con el BLBU, en función de la concentración que se empleó para el tratamiento. Se diseñó un modelo de gripe experimental en ratones Balb/C, con el empleo del virus Influenza A /Sydney/5/97 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) y con éste evaluar la actividad antiviral del BLBU *in vivo*. Los ratones, infectados vía intranasal con 10DIE<sub>50</sub> del virus Influenza A /Sydney/5/97 y tratados a diferentes concentraciones del extracto, por la vía oral o intranasal, mostraron una ganancia de peso corporal acorde a la especie. En estos animales el período de duración de los síntomas clínicos se acortó y los títulos infectivos del virus influenza, disminuyeron en más de 2 log<sub>10</sub>. Se observó la recuperación del tejido pulmonar en los ratones enfermos y tratados con el BLBU, en contraste con los que sólo recibieron el virus, que mostraron las alteraciones histopatológicas y el conjunto de signos y síntomas que les produce este virus.

### **Agradecimientos.**

- A Pepe, por ser el primero.
- Al Colectivo de Virología de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana, que derrochó esfuerzos en el estudio de las plantas medicinales y en ésta investigación. En especial a mi gran amigo Manlio, donde quiera que estés, tu empeño y servicio técnico, no quedó en el olvido.
- A mis asesores, que han puesto sus conocimientos y empeño en el éxito de este trabajo.
- Al Instituto de Medicina Tropical Dr. Pedro Kourí, que en todo momento puso su autoridad y recursos al servicio de ésta investigación. A mis colegas del Departamento de Virología del IPK, en particular a la Dra G. Guzmán, al colectivo del Laboratorio de Gripe y en especial la Dra. S. Oropesa, Baby, Cuca y Fela. A los compañeros del Bioterio, a la Dra. Gladys Ramos, que con gran dedicación me adiestró en el manejo de los animales en condiciones controladas. En el Dpto. de Anatomía Patológica de ésta institución, a la Dra. V. Capó y el incansable Efraín, que luego me dejaron en las certeras manos del Dr. E. Arteaga. A los Dres. A. Goyenechea, Clara Savón, Pedro Más, J. R. Bravo y el Lic. Luis Sarmiento, que también pusieron su sabiduría y recursos al servicio del BLBU.
- A todos mis alumnos, especialmente a los que trabajaron y aún siguen el BLBU.
- A la Dra. Migdalia Miranda y Lic. Yamilet Martínez, del IFAL, UH. por su asesoramiento en el estudio de los productos naturales. A muchos colegas y amigos de la Facultad de Biología, U. H., que de diferentes maneras pusieron sus conocimientos al servicio de esta investigación. Muy especial a Nancy Cápiro, Isis, Erick, X. Xiques, Tony, Clarita, Angelito, Yoyi, Rina, Ana, Gloria M., Ana María y Missouri, siempre prestos a colaborar desinteresadamente.
- Al Dr. Joaquín Díaz Brito, MAESTRO y EJEMPLO DE CIENTÍFICO CONSAGRADO, que también cree en el BLBU.
- Al Dr. Mario Luis Rodríguez, quién personalmente dio fe de la eficacia y bondades del BLBU.
- A **todas, todas, todas** las personas, que de alguna manera han puesto su grano de arena para que este trabajo sea realidad.

## Abreviaturas

- **BLBu**: extracto liofilizado de los frutos de *Punica granatum* L. (granada).
- **O. M. S.**: Organización Mundial de la Salud (WHO).
- **PBS**: solución balanceada de fosfato (pH 7,2).
- **DIE<sub>50</sub>**: Dosis infectiva media por embrión.
- **CENPALAB**: Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Cuba.
- **INHEM**: Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, Cuba.
- **CIM**: Centro de Inmunología Molecular, Cuba.
- **IPK**: Instituto de Medicina Tropical Dr Pedro Kourí, Cuba.
- **IMEFA**: Industria Médico Farmacéutica
- **V/V**: Volumen/Volumen
- **TA**: Temperatura ambiente
- **HA**: Hemaglutinina viral.
- **NA**: Neuraminidasa viral.
- **p.i.**: posterior a la infección.
- **a.i.**: antes de la infección.
- **SDS**: Dodecil sulfato de sodio
- **PAGE**: Electroforesis en gel de poliacrilamida.
- **CC<sub>50</sub>**: Concentración citotóxica media.
- **k Da**: kilodaltons.
- **PME**: Peso Molecular estimado.
- **MTT**: bromuro de 3-(4-5 dimetil tiazol 2- il)-2,5 difeniltetrazolio.
- **MINSAP**: Ministerio de Salud Pública, Cuba.
- **stock**: se refiere al virus que se prepara a partir de las cepas de referencia conservadas en el cepario, que se titula y conserva para la experimentación.

I.- Introducción.....	1
Novedad científica.....	5
Importancia teórica.....	6
Importancia práctica.....	6
II.1- Influenza.....	8
II.1.1- La enfermedad.....	8
II.1.2 - Virus influenza: Taxonomía. Composición Química y Morfología.....	9
II.2- Antivirales.....	19
II.2.1- Antivirales a partir de plantas.....	20
II.3- <i>Punica granatum</i> L. ....	26
II.3.1- Descripción botánica y Composición química de la granada.....	26
II.3.2- Usos en la medicina tradicional y Propiedades medicinales estudiadas.....	27
III. - Materiales y métodos.....	30
III.1 - Material vegetal.....	30
III.1.1 - Obtención y estandarización del extracto de granada.....	30
III.2- Sistemas Hospederos.....	31
III.2.1 Embriones de pollo .....	31
III.2.2- Línea Celular MDCK.....	31
III.2.3- Ratones.....	31
III.3 - Virus influenza.....	32
III.3.1- Preparación del stock de virus influenza.....	32
III.3.2- Título hemaglutinante (HA) y Título Infeccioso del virus influenza (DIE <sub>50</sub> ).....	33
III.4 - Otros Reactivos y Materiales utilizados.....	33
III. 5 - Ensayos antivirales en embriones de pollo ( <i>in ovo</i> ).....	34
III.5.1- Ensayo de la toxicidad del extracto BLBu.....	34
III. 5. 2- Evaluación <i>in ovo</i> de la acción antiviral del BLBu.....	34
III.5.3- E valuación del espectro anti-influenza del BLBu <i>in ovo</i> . ....	35
III.6- Estudio de la actividad virucida directa ( <i>in vitro</i> ) del BLBu. ....	35
III.6.1- Evaluación preliminar de la actividad virucida directa. ....	35
III.6.2- Acción virucida directa del BLBu a diferentes condiciones de tratamiento. ..	36
III.6.3- Evaluación de la infecciosidad de diferentes cepas de influenza por la acción virucida directa del BLBu. ....	37
III.6.4- Acción virucida directa del BLBu sobre las proteínas del virus influenza.....	37
III.7 – Acción del BLBu frente a la apoptosis inducida por el virus Influenza A en células MDCK.....	39
III .7. 1- Ensayo de citotoxicidad del BLBu sobre las células MDCK.....	39
III.7. 2- Estudio de la fragmentación del ADN en la línea celular MDCK tratadas con el BLBu.....	40
III.7.3- Inducción de la apoptosis por el virus Influenza A/Japan /10/99 (H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ) en la línea celular MDCK. ....	40
III.8- Estudio de la acción antiviral del extracto vegetal liofilizado (BLBu) en el modelo experimental de gripe en ratones de la línea Balb/C. ....	42
III.8.1- Montaje y evaluación del biomodelo. ....	42
III.8.2- Evaluación de la actividad antiviral del BLBu en el modelo de ratón. ....	44
III.9- Análisis estadístico de los datos. ....	45
IV.- Resultados.....	47
IV.1- Parámetros de calidad del BLBu. ....	47
IV.1.1-Tamizaje fitoquímico y Normalización de los extractos de granada.....	47
IV.2- Ensayos Antivirales en embriones de pollo.....	48

IV.2.1- Toxicidad del BLBu en embriones de pollo. ....	48
IV.3- Actividad virucida directa del BLBu frente al virus Influenza A. ....	55
IV. 3.1- Acción directa del BLBu sobre las proteínas del virus influenza A. ....	57
IV.4- Acción del BLBu sobre la apoptosis inducida por el virus influenza A en la línea celular MDCK. ....	63
IV.5- Actividad antiviral del BLBu en el biomodelo experimental de gripe en ratones de la línea Balb/C. ....	67
IV.5.1-Montaje y evaluación del biomodelo experimental de gripe del ratón. ....	67
IV.5.1- Evaluación del BLBu en el biomodelo experimental de gripe. ....	71
V. - Discusión .....	77
V. 1- Parámetros de calidad del extracto liofilizado de granada. ....	77
V. 2- Acción antiviral del BLBu en embriones de pollo. ....	80
V.2.1- Estudios antivirales del extracto BLBu en embriones de pollo.....	81
V.2.2- Actividad virucida directa del BLBu frente al virus influenza A. ....	84
V.2.3- Acción del BLBu sobre la apoptosis inducida por influenza A en las células MDCK. ....	88
V.3 - Acción antiviral del BLBu en el modelo experimental de gripe en el ratón. ....	92
V.4 - Valoración de la utilidad del biomodelo experimental de gripe.....	95
VII - Conclusiones.....	100
VIII - Recomendaciones. ....	101
VIII - Bibliografía. ....	102
IX - EVENTOS.	
X - PUBLICACIONES.	
XI - PREMIOS.	
XII - LOGROS CIENTÍFICOS.	

## **I.- Introducción.**

La influenza, comúnmente conocida como gripe, es una enfermedad aguda epidémica del aparato respiratorio, que se caracteriza por un comienzo súbito, cuya presentación más grave es la bronconeumonía. Se transmite por contacto directo, de persona a persona, a través de las gotitas de saliva que se proyectan al toser, estornudar, hablar y que son transportadas por el aire, las manos y los objetos de uso corriente. El agente causal de esta enfermedad, es el virus del mismo nombre, el que se ha clasificado dentro de la familia *Orthomyxoviridae*, cuyos tipos fundamentales son el A, B y C. Los virus influenza A, son los de más amplio rango de hospederos naturales, además del hombre, han sido aislados de numerosas especies animales: caballos, cerdos, aves, focas, ballenas (van Regenmortel *et al.*, 2000; Fauquet, 2005). La gran variabilidad antigénica que presentan, ha dificultado su tratamiento y control (Ostheraus y De Jong *et al.*, 1999; Osterholm, 2005; WHO, 2006).

De acuerdo con el modo de diseminación del virus influenza, las epidemias que este agente causa se propagan con gran rapidez, facilitadas en gran medida por la urbanización de las zonas rurales, el crecimiento demográfico y las condiciones de hacinamiento en que viven gran cantidad de personas en las grandes ciudades (Glezen, 1996). Por esos motivos, las epidemias anuales que este virus origina, repercuten en la vida cotidiana de las naciones, en las que eleva el ausentismo laboral y escolar, ocasionan trastornos en los servicios públicos vitales, aumentan el número de hospitalizaciones y la mortalidad en los grupos que fundamentalmente afecta: niños y ancianos.

En Cuba, la influenza y neumonía ocupa el cuarto lugar como causa de muerte y el primer lugar, entre las causas de carácter infeccioso (MINSAP, 2005) y a nivel mundial, constituyen importantes causas de morbimortalidad. En los Estados Unidos de Norteamérica, las estadísticas brindadas por el centro de control de las Enfermedades de Atlanta (CDC), el 31 de marzo de 2006, indicaron que de 12,298 muestras procesadas por ese centro durante el primer trimestre de ese año, el 89.8% fue positivo a influenza A, tipo (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) y la influenza B. A la situación anterior se suma que una pandemia de gripe se espera con gran expectación (Osterholm,

2005). La influenza A (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>), procedente de las aves, logró cruzar las barreras de especies y ha causado la muerte de numerosas personas (Nishimura *et al.*, 2000; Brown, 2005; Osterholm, 2005). A pesar de esto último, la problemática actual de la gripe se centra en las epidemias anuales, causadas en el humano por los subtipos de influenza A (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>), (H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) y (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).

En la prevención de las infecciones por los virus influenza A y B, la principal estrategia es la vacunación sistemática y repetida de la población susceptible; pero las variaciones antigénicas del virus, obligan a modificar anualmente la composición de las cepas que integraran la vacuna (Solórzano *et al.*, 2000). Esto se explica porque la severidad de la gripe en los humanos se relaciona con cepas de nueva circulación frente a estados inmunológicos incapaces de neutralizar al virus (Oropesa *et al.*, 2000).

Para el tratamiento de la influenza, diferentes firmas farmacéuticas han logrado antivirales, ellos son la amantadina, la rimantadina, el oseltamivir (Tamiflú®), el zanamivir (Relenza®) y la ribavirina (VADEMECUM, 2005). No obstante, existe el inconveniente del surgimiento de cepas virales resistentes a estos antivirales y de los efectos adversos que estos medicamentos puedan originar durante el tratamiento (Belshe *et al.*, 1989; Ostheraus, 1999; Lipatov, 2004; Yen *et al.*, 2005; De Jong *et al.*, 2005). Por esa razón la ribavirina, que es un antiviral de amplio espectro, resulta ineficaz para tratar la influenza A (Shigeta, 1998). Por otra parte, alrededor del 30% de las personas infectadas con la influenza del tipo (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>) y que fueron tratadas con los fármacos anteriormente mencionados, generaron cepas resistentes a los mismos. Se aislaron cepas de virus influenza, del tipo (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>) resistentes al tratamiento con el oseltamivir. Estos aislamientos se lograron a partir de los casos de niños vietnamitas enfermos con la influenza aviar y que fueron tratados con este fármaco (De Jong *et al.*, 2005; Yen *et al.*, 2005). No obstante lo argumentado con anterioridad, la terapia antigripal ha devenido realidad y ha experimentado avances importantes.

Las plantas medicinales son consideradas alternativas a los medicamentos sintéticos, en particular en países con economías dependientes, por estar íntimamente asociadas a la vida del hombre y ser una medicina más económica, que está al alcance de todos (Cápiro, 2004). Estas plantas poseen una serie de sustancias

químicas conocidas como metabolitos secundarios. Estos compuestos, a los cuales se les atribuyen alguna acción farmacológica, pueden actuar en el extracto total o aislados, cuando se les purifica y formula de manera adecuada (Miranda, 1995). Los productos de la llamada medicina verde, representan actualmente la práctica habitual del 79% de la población mundial y la mayoría de los fármacos sintéticos que se comercializan, son directa o indirectamente, de origen vegetal (Cápiro 2004).

En los últimos años, las investigaciones de antivirales a partir de las plantas se ha intensificado y hay quienes opinan que la utilización de extractos totales de plantas, ejercen acciones más beneficiosas sobre el organismo humano, que la exhibida por un compuesto aislado. Los productos naturales, por lo general, producen menos reacciones secundarias indeseables y la acción curativa deseada se puede lograr, al estar varios principios activos presentes. Serían la forma natural de los conocidos cocteles, que tanto uso tienen hoy día para el tratamiento de otras enfermedades infecciosas, con los que se trata de evitar el surgimiento de cepas resistentes a los fármacos y combinar varios mecanismos de acción farmacológica.

La búsqueda de principios activos a partir de plantas con actividad antiinfluenza es sumamente amplia (Serkedjieva *et al.*, 1990; 1992; 1993; 1995; 1998; 2000). Numerosas compañías privadas y corporaciones, protegen los resultados de sus investigaciones e invenciones sobre principios activos, los procesos de preparación de los extractos y las formulaciones farmacéuticas obtenidos a partir de los extractos vegetales (Shimamura y Hara, 1991; Tempesta, 1993; Bombardelli *et al.*, 1995; Hagiwara y Kikuchi, 1995; Serkedjieva *et al.*, 2000).

*Punica granatum* L., es una especie vegetal que pertenece a la familia de las Punicaceae, orden Myrtales (Roig y Mesa, 1974; Morton, 1981; Fitoterapia, 2003). En Cuba, se conoce comúnmente como granada al fruto y a la planta. A estos últimos, se les atribuyen la capacidad antioxidante *in vivo* e *in vitro* (Dass *et al.*, 1999; Chimdambara *et al.*, 2002; Noda *et al.*, 2002; Suddesh y Vijayalakshmi, 2005 y Sánchez-Lamar *et al.*, 2005) así como propiedades antitumorales, hipoglucemiantes, entre otras (Kim, 2002; Adams, 2006).

En la medicina tradicional de países del continente americano, tales como Colombia, Brasil, Venezuela, Curazao, Puerto Rico e Islas Turcas, entre otros, la decocción de la

cáscara del fruto de la granada, es utilizada para tratar la diarrea y la disentería. La corteza de esta planta, después de su decocción, es eficaz para expulsar lombrices y tenias (Morton, 1981). En la región de Yucatán, México, la decocción de las flores y la cáscara del fruto, se utilizan para gargarismos y aliviar la inflamación de la boca y la garganta (Tramil, 1990-1992). En La India, las flores macho o abortivas de la granada, son usadas en la medicina popular para el tratamiento de la Diabetes Mellitus (Jafri *et al.*, 2000). En la medicina tradicional cubana, la granada es utilizada para curar úlceras y con la cáscara de la fruta se tratan las afecciones pulmonares. Existen referencias que en Cienfuegos, con el fruto maduro completo, se preparan remedios contra las afecciones en el pulmón y para combatir el catarro y la gripe (Roig y Mesa, 1974; Iglesias, 1990).

Una patente japonesa, cita a la granada con propiedades antivirales. Se refiere a un producto preparado con la corteza de la raíz y la cáscara del fruto de esta planta, al que les encontraron un principio activo que sirve para el tratar por vía oral a los pacientes con lesiones herpéticas (Hozumi *et al.*, 1995).

En la investigación de antivirales, es fundamental estudiar la toxicidad, la eficacia del futuro medicamento y evaluar su acción *in vitro* e *in vivo*, en diferentes biomodelos, cuando se dispone de ellos. Esto se justifica por la diversidad de virus y hospedantes, para lo que es imposible utilizar una prueba antiviral única en la investigación de nuevas sustancias antivirales. El embrión de pollo ha sido muy utilizado para evaluar antivirales contra influenza (Serkedjieva y Manolova, 1992; Nagai *et al.*, 1992). Los cultivos celulares, en particular las Líneas de células VERO y MDCK, resultan muy útiles para las evaluaciones iniciales y para los estudios de mecanismos de acción de los antivirales (Watanabe, 1994; Caballero, 2001; Casadelvalle, 2004). EL biomodelo experimental de gripe en el ratón, constituye un excelente medio para evaluar antivirales, puesto que los daños que origina el virus influenza en el ratón son similares a los que origina en el humano y es, por tal razón un valioso instrumento para las evaluaciones preclínicas *in vivo* de los candidatos a medicamentos antivirales (Walker *et al.*, 1994; Cook *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 2000; Ottolini *et al.*, 2005).

Los aspectos comentados con anterioridad, sugieren la necesidad de ampliar y profundizar la investigación científica sobre las propiedades antivirales de *Punica*

*granatum* L., ( granada) y en particular su fruto, por lo que el presente trabajo de tesis se desarrolló tomando como base la Hipótesis siguiente:

**Hipótesis:**

**El extracto hidroalcohólico liofilizado (BLBu) preparado con el fruto de *Punica granatum* L., posee acción antiviral frente a la infección provocada por diferentes tipos y subtipos del virus influenza.**

Para aceptar o refutar esta hipótesis se diseñó una investigación con el siguiente

**Objetivo general:**

Evaluar la acción antiviral del BLBu, frente a diferentes tipos y subtipos del virus influenza *in ovo*, *in vitro* e *in vivo*.

Para cumplimentar este objetivo general, el trabajo se estructuró en los siguientes

**Objetivos específicos:**

- Normalizar el material vegetal (frutos de granada), el extracto hidroalcohólico y el hidroalcohólico liofilizado (BLBu).
- Evaluar la acción antiinfluenza del BLBu, *in ovo* e *in vitro* mediante diversos protocolos de tratamiento.
- Establecer un biomodelo experimental de gripe en ratones Balb/C.
- Evaluar la acción antiviral del BLBu en el modelo experimental de gripe en ratones Balb/C.

**Novedad científica.**

Por primera vez para la Ciencia:

- Se refiere la actividad antiviral de la especie vegetal *Punica granatum* L., frente a la familia viral *Orthomyxoviridae*.
- Se demostró que el extracto liofilizado BLBU, protege a las células MDCK de la apoptosis que les provoca el virus influenza.
- Se evidenció el espectro de acción antiviral antiinfluenza del extracto liofilizado preparado con el fruto de *Punica granatum* L. (BLBu) *in ovo*, *in vivo* e *in vitro*.

En Cuba:

- Se validó un modelo experimental de gripe de ratón en estudios de antivirales, por lo que puede considerarse una novedad de implicaciones prácticas.

**Importancia teórica:**

- La tesis aporta conocimientos acerca de las propiedades bio-activas de la especie vegetal *Punica granatum* L.
- Se aportan nuevos datos de las propiedades antiapoptóticas del fruto de *Punica granatum* L., en su mecanismo de acción antiviral.

**Importancia práctica:**

- La información que aporta esta tesis avala científicamente el posible uso de la granada, como medicamento herbario para tratar la influenza o gripe.
- Los aspectos teóricos y prácticos de esta tesis sirven de información para la elaboración de un medicamento natural, que supla la carencia de fármacos en estados de emergencia nacional.
- Se validó un modelo de gripe en ratones, que sirve de punto de referencia a otras investigaciones de medicamentos antivirales en Cuba.
- Se validó una metodología para el estudio antiviral de los extractos de plantas, a través de la combinación de diferentes modelos *in ovo*, *in vitro* e *in vivo*.
- La información que aporta esta tesis puede ser utilizada en cursos de pregrado y postgrado de Medicina Natural y Tradicional.

Los resultados de este trabajo forman parte de seis publicaciones nacionales y cinco internacionales. Han sido presentados en más de 12 eventos científicos nacionales e internacionales.

Las diferentes fases del trabajo han formado parte de 8 Trabajos de Diploma y 2 Tesis de Maestría.

Varios resultados presentados en la tesis forman parte de:

- Trabajo relevante del Forum de Ciencia y Técnica a nivel provincial, 1997.

- Premio al Mejor Resultado en la Dirección de Salud Humana, 2002/03, Facultad de Biología, Universidad de la Habana.
- Seis logros científicos de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana.

## **II.- Revisión bibliográfica.**

### **II.1- Influenza.**

**II.1.1- La enfermedad:** la influenza o gripe, es una enfermedad infecciosa causada por el virus de éste mismo nombre, que afecta al sistema respiratorio del hombre. Se transmite por contacto directo, de una persona enferma a otra sana, a través de las gotitas de saliva, que se proyectan al toser, estornudar, conversar y que son transportadas por el aire, las manos y los objetos de uso corriente. Se caracteriza por un período de incubación corto y la instalación brusca del cuadro clínico. Esta enfermedad presenta un conjunto de signos y síntomas tales como: cefalea, debilidad, malestar general, tos, escalofríos, fiebre elevada, mialgia, artralgia y su presentación más grave es la bronconeumonía. Pueden ocurrir manifestaciones gastrointestinales, hemorragias, meningitis, polineuritis, fallo multiórgano, como parte de las complicaciones (Oropesa *et al.*, 2000; Field, 2001; Rosete *et al.*, 2002). Cuando esta enfermedad cursa sin complicaciones, la recuperación comienza a partir del cuarto día, pero síntomas como fatiga, tos y debilidad general, pueden persistir durante semanas (Walker *et al.*, 1994). La recuperación total suele ocurrir entre las dos y cuatro semanas de comenzado el cuadro clínico.

En Cuba y en muchos otros países, las infecciones respiratorias agudas (I. R. A.) y la influenza en particular, tienen alta incidencia y morbimortalidad. Representan un serio problema de salud pública, al incrementar la demanda de los servicios médicos, las incapacidades laborales y escolares, así como las muertes que originan cada año, principalmente en los grupos de los extremos de la vida (Rosete *et al.*, 2002; Anuario Estadístico, 2005; Osterholm, 2005). Se han descrito cinco grandes pandemias por el virus influenza, entre las que se destaca la ocurrida de 1911 a 1919, que ocasionó más de 20 millones de muertes. En el pasado siglo dos pandemias más tuvieron lugar, la de 1957, conocida como asiática y la de 1968, identificada como Hong Kong (Nakajima *et al.*, 1982). En ambos casos, a pesar de que surgieron de manera súbita y que las cepas que las originaron eran muy patógenas, dejaron un saldo de muertes menor que la primera. En 1997, ocurrió un brote de influenza originada por una variante emergente, del tipo A (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>), que afectó a personas residentes en Hong Kong. Estos casos detectados en humanos por primera vez, alcanzaron la cifra de 18

enfermos y ocho fallecidos con esta nueva variante del virus (Nishimura *et al.*, 2000). Los autores refieren que las medidas de control y prevención local fueron rigurosas, pues resultaron eliminadas un millón de aves domésticas. También se reforzaron las medidas de vigilancia epidemiológica con estudios en patos, perros y gatos, que estuvieron en contacto con las aves infectadas. A inicios de 2006, los datos oficiales de la Organización Mundial de la Salud, informaron que el número total de casos en humanos enfermos con la tipo A (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>), alcanzó la cifra de 235 a finales de 2005 y de ellos, ocurrieron 83 defunciones (W. H. O, 2006). Esta nueva variante de Influenza se ha diseminado por numerosos países (Brown, 2005; WHO, 2006) con el peligro que se extienda como pandemia de incalculables consecuencias para la salud humana y animal (Scholtissek, 1994; Glezen, 1996; Brown, 2005; Osterholm, 2005). Numerosos especialistas plantean que el principal problema que ha impedido un control eficaz del virus influenza, es su gran capacidad de variación (Fields, 2001; Osterholm, 2005) ya que surgen nuevos subtipos del virus capaces de burlar la respuesta inmune hospedera y ante las que la población no puede responder adecuadamente (Webster *et al.*, 1992; Lipatov *et al.*, 2004; Yen, 2005).

### **II.1.2. -Virus influenza: Taxonomía. Composición Química y Morfología.**

La familia *Orthomyxoviridae* (orden Mononegavirales), a la que pertenecen los virus influenza, posee cinco géneros: Influenza A, B, C, Isavirus y Thogotovirus (Fauquet, 2005). Son un grupo de agentes con genoma ARN segmentado, de cadena sencilla, polaridad negativa y con envoltura lipoproteica. Estos virus se dividen en los tipos: A, B y C, en base a las diferencias antigénicas de sus nucleoproteína y proteína de la matriz. Los virus del tipo A son los que presentan mayor variabilidad antigénica y rango hospedero, pues han sido aislados de diversas especies animales (cerdos, caballos, ballenas, focas, aves acuáticas y domésticas). Los tipos se subdividen en subtipos, atendiendo a las diferencias antigénicas de las glicoproteínas de superficie: la hemaglutinina y la neuraminidasa. Los tipos B y C, pertenecientes a esta familia de virus, a pesar que afectan al humano y a otras especies animales, presentan menos variabilidad antigénica que los del tipo A (van Regenmortel *et al.*, 2000; Field, 2001; Fauquet, 2005).

Composición química: ARN (0,8%); Proteínas (70 -75 %); Lípidos (18-37%); Carbohidratos (5-9%). (Field, 2001; Fauquet, 2005). El virión posee una masa molecular de  $2.5 \times 10^{-6}$  g, su densidad en una solución de sacarosa de  $1.19 \text{ g/cm}^3$   $S_{20w}$  y para las partículas no filamentosas, de  $700-900 \text{ g/cm}^3$   $S_{20w}$  (Barret e Inglis, 1985).

Propiedades físico-químicas: el virus Influenza es relativamente estable, por lo que puede almacenarse a  $4^\circ\text{C}$  durante semanas, y por períodos prolongados a  $-70^\circ\text{C}$  o liofilizado. Los viriones son muy sensibles a la acción del calor, radiaciones ultravioletas y al tratamiento con solventes orgánicos (formaldehído), detergentes y agentes oxidantes (Mahy y Kangro ,1996).

Morfología: los virus influenza, son pleomórficos, aunque predomina la forma esférica, poseen un diámetro que oscila entre 80 y 120 nm y un centro denso al paso de los electrones de 70 nm. La nucleocápsida es de simetría helicoidal, presenta envoltura lipoproteica, a la que se incorporan proteínas virales.

Genoma: Los tipos A y B presentan 8 segmentos de ARN y el C solamente 7, con un peso de  $4 \times 10^6$  kDa y un total de 10-13 kb. Estos segmentos contienen de 900 a 2350 nucleótidos, secuencias conservadas y parcialmente complementarias en los extremos terminales 5' y 3' (van Regenmortel *et al.*, 2000; Fields ,2001).

Proteínas Virales.

Hemaglutinina (HA): esta proteína es un trímero codificado por el segmento cuatro del genoma viral (Käsermann y Kempf ,1996; Flint, 2001), cada cadena posee unos 560 aminoácidos y una masa molecular de 61 kDa. Las tres sub unidades que conforman el trímero son idénticas y con una estructura en lazo que comienza en la membrana o peplos, se proyecta a  $135 \text{ \AA}$  hacia el exterior y se pliega para entrar de nuevo a la membrana del virus (Carr y Kim, 1994; Käsermann y Kempf ,1996). La HA es originada a partir del precursor  $HA_0$ , que al escindirise por acción de las proteasas celulares , da lugar a dos sub unidades las cuales quedan unidas por puentes disulfuro. Esta activación proteolítica es un paso crítico para la actividad de fusión de la HA y por tanto determina la infectividad viral (Kostolansky *et al.*, 1988; Käsermann y Kempf, 1996; Kido *et al.*, 1996; Fields, 2001). Cada una de estas sub unidades, consta de dos regiones que difieren estructuralmente: la cadena HA1 que es un

dominio globular en la región distal de la molécula y que contiene el sitio de unión al receptor y los determinantes antigénicos del virión y la sub unidad HA2, una estructura en forma de tallo, rica en alfa-hélice, la cual se extiende 76 Å hacia el exterior de la membrana. La unión de la HA al receptor celular tiene lugar por una zona conservada en forma de bolsa, de pocos aminoácidos, situada en el extremo distal de HA1 (Sakar *et al.*, 1989; Bizebard *et al.*, 1995). En el caso de HA2 se le responsabiliza con la fusión a la membrana celular a través del llamado péptido de fusión de 25 residuos de aminoácidos, el cual se encuentra hacia el interior de la molécula y que es expuesto para la fusión, tras los cambios de conformación que sufre la HA durante este proceso (Webster *et al.*, 1982; Carr y Kim, 1994). Estos cambios en la conformación de HA son favorecidos por valores de pH cercanos a 5 (Käsermann y Kempf, 1996).

La hemaglutinina está considerada una de las tres principales proteínas del virus Influenza, está representada de forma mayoritaria en el virión y constituye el principal determinante antigénico, para dar lugar a la respuesta de anticuerpos neutralizantes (Horisberger, 1980). Posee la propiedad de aglutinar glóbulos rojos de diferentes especies animales *in vitro* y éste fenómeno, llamado hemaglutinación, se utiliza para detectar y cuantificar al virus (Kilbourne, 1975; Lennette, 1992; Burleson, *et al.*, 1992).

Neuraminidasa (NA): esta es otra de las proteínas de superficie del virus influenza, cuya estructura la conforma un tetrámero o espícula en forma de bloques, unidos a la partícula viral por un tallo delgado. Cada bloque tiene un sitio catalítico, por lo que cada espícula posee cuatro sitios activos (Webster *et al.*, 1982, Kingsbury, 1996; Flint, 2001). Aparece en menor cuantía que la HA y se le atribuye actividad hidrolasa (Kingsbury, 1996; Fields, 2001). La neuraminidasa es imprescindible para que ocurra la escisión de la HA por parte de las proteasas celulares durante la infección, pues ayuda a eliminar los ácidos neuramínicos de la célula hospedante y cuyos residuos interfieren con este proceso, lo cual constituye un paso fundamental para la replicación del virus. Otra importante función de la neuraminidasa es la relacionada con su actividad hidrolasa, que se encarga de facilitar la liberación de la progenie viral de la célula hospedera. Este proceso ocurre por la destrucción de ácidos siálicos

celulares, que son receptores del virus y así evitar la agregación del virus en las fases finales del ciclo replicativo (Maeno, 1994; Kingsbury, 1996; Morris *et al.*, 1999; Fields, 2001).

Proteína M1: es una proteína no glicosilada de la cubierta viral, específica para los tipos de influencias A y B, que permite la diferenciación de estos y su estructura es invariable para los subtipos de influenza. Según Kingsbury, 1996, las ribonucleoproteínas (RNPs) recién sintetizadas en el núcleo se asocian a ella en su viaje al citoplasma, por lo que M1 es fundamental para el transporte del núcleo al citoplasma de las RNPs. Así, a la M1 se le atribuye participación en el desnudamiento, transporte nuclear y ensamblaje de las RNPs (Bui *et al.*, 1996; Kingsbury, 1996).

Proteína M2: es una glicoproteína integral de membrana, a la cual se le conocen importantes funciones en el ciclo replicativo viral, ya que es capaz de formar un canal selectivo de protones que funciona durante el desnudamiento y liberación del virus del endosoma. Se sabe además que permite la regulación del pH de la célula infectada (Käsermann y Kempf, 1996) y que contribuye con el proceso de maduración viral, al modificar el pH en los viriones y en las vesículas de trans-Golgi (Chizhnikov *et al.*, 1996; Käsermann y Kempf, 1996). Según estos autores, tanto M2 como HA, funcionan en la formación de canales iónicos que se producen durante el desnudamiento del virus del endosoma. A esta proteína M2 se le considera el blanco de la acción quimioterapéutica de la amantadina y sus derivados (Lin *et al.*, 1997; Fields, 2001). Aunque en las influencias B y C se les nombra diferente (NB y CM2), poseen propiedades bioquímicas similares y les atribuyen también una actividad canal, para el caso de la influenza C.

Polimerasas: las ARNp son un complejo enzimático, que lo conforman las proteínas PB1, PB2 y PA. De las tres, PB1 es la subunidad catalítica de las ARNp y bajo ciertas condiciones, es capaz de catalizar la síntesis de ARN *in vitro* (Toyoda *et al.*, 1996). PB2 ha mostrado actividad *in vitro* de unión a la caperuza, y se conoce que para la fragmentación del ARN celular que da lugar a los cebadores (primers) en el proceso de síntesis de ARNm, se requiere la presencia de PB1, PB2 y PA. (Shi *et al.*, 1996).

NS1 y NS2: son proteínas abundantes en las células infectadas con influenza A, pero no en los viriones, aunque algunos autores refieren la presencia de NS2 en estos últimos (Murphy y Webster, 1996). A la proteína NS1, se le atribuye la regulación de la exportación nuclear de ARNm, así como la inhibición del procesamiento del pre-ARNm

#### **II.1.2.1- Ciclo replicativo.**

El ciclo replicativo se inicia cuando la HA se adhiere al ácido siálico, receptor para este virus, que se localiza en la superficie de las células susceptibles (Fields, 2001). Se conoce que la fusión es facilitada por un pH medianamente ácido, cercano a cinco (Kostolansky *et al.*, 1988). La entrada del virus ocurre por endocitosis mediante el receptor e involucra tanto a HA como a M2 (Käsermann y Kempf, 1996). El pH medianamente ácido en el interior del endosoma induce cambios conformacionales en la HA, la que proyecta el péptido de fusión que interactúa con la membrana blanco para lograr la fusión de las membranas viral y la del endosoma, lo que conduce a la liberación de la nucleocápsida al interior del citoplasma (Carr y Kim, 1994). Para el desnudamiento de la nucleocápsida, donde ocurre la disociación de la proteína M1 y las ribonucleoproteínas y el pH bajo contribuye de alguna manera a éste evento (Bui *et al.*, 1996). Así, las ribonucleoproteínas (RNP<sub>s</sub>), penetran el núcleo a través de los poros de la membrana para dar comienzo al proceso de formación de ARNm, formados a partir de los cebadores originados de la escisión del ARN hospedero. En este momento el complejo de polimerasas virales ejerce un papel crucial (Shih y Krug, 1996; Kinsbury, 1996). Según Kinsbury, 1996, las cadenas de ARNm son alargadas hasta alcanzar un intervalo de Uridina (15-20 nucleótidos) antes del extremo 5' y se adiciona la cola de poly A para dejar formados los ARNm virales. En cuanto a la replicación del ARN del genoma viral hay formación de copias completas, pero no de cebadores y no se produce poliadenilación. Los segmentos de ARN genómicos, luego de ser sintetizados, se asocian con las nuevas moléculas de NP, son transportados del núcleo al citoplasma y allí se unen a las tres polimerasas para formar las RNPs, que finalmente se asocian a la proteína M1, y éstas se unen finalmente a la superficie interna de la membrana plasmática celular, modificada por

las tres proteínas integrales de membrana del virus: HA, NA y M2, las cuales se sitúan en la parte más externa de la superficie celular a través del aparato de Golgi. De esta manera, los viriones conformados están listos para salir de la célula a través del proceso de gemación (Kingsbury, 1996).

#### **II.1.2.2- Variación antigénica.**

Los virus influenza se pueden clasificar, en base al tipo de ribonucleoproteína y de receptores virales, en tres tipos de partículas:

- Tipo A. Dentro de éste se han descrito 14 tipos de HA y 9 de NA, con reacción serológica cruzada mínima. Las combinaciones entre estas dos moléculas van a determinar la aparición de un nuevo subtipo viral, además que pueden aparecer nuevas formas de ellas, lo que resulta en un mayor número de combinaciones. Entre las cepas que infectan al hombre se han encontrado cuatro tipos de HA y dos de NA correspondientes a los subtipos H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> y el H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>. (van Regenmortel *et al.*, 2000 ; Lipatov *et al.*, 2004; WHO, 2006 )
- Tipo B. En él no existen subgrupos de HA y NA definidos hasta el momento.
- Tipo C. No se han identificado variaciones antigénicas.

Los cambios antigénicos radican principalmente en la HA y la NA conocidos por shift y drift. El shift (salto antigénico), informado entre las variaciones mayores, implica cambios radicales entre los subtipos, se basa en la recombinación ó intercambio de genes entre cepas diferentes que infectan simultáneamente una misma célula, a menudo en las de especies animales que sirven de reservorio del virus. Puesto que afecta un segmento del genoma, con la aparición de nuevas HA y NA, contra las que el hombre puede estar desprotegido, y así se originan las pandemias por un nuevo virus. El drift (deriva) se refiere a daños menores que ocurren al azar en los subtipos, e involucra la alteración de unos cuantos aminoácidos en HA o NA. Estos pequeños cambios resultan en alteraciones tipo antigénico para dar lugar a una nueva cepa ó subtipo. Las variaciones antigénicas que sufre el virus Influenza es el principal problema para el control de la enfermedad que éste causa, ya que no se cuenta hoy día con una vacuna que pueda proteger contra cualquier cepa, y constituye también

un obstáculo a vencer en la búsqueda de drogas antivirales (Webster *et al.*, 1992; Osterholm, 2005; Brown, 2005).

### **II.1.2.3- Rango Hospedero y cultivo del virus.**

Los virus influenza A, infectan de manera natural a humanos, otras especies de mamíferos y a varias de aves (Osterholm, 2005), mientras que la influenza B parece afectar solamente a humanos. En cuanto al tipo C, éste ha sido aislado de humanos y de cerdos (Murphy *et al.*, 1995; Fields, 2001).

El embrión de pollo ha sido referido como el sistema hospedero idóneo para realizar el aislamiento y el cultivo del virus influenza en el laboratorio (Williams y Robertson, 1993). Así como en la evaluación de antivirales contra influenza (Serkedjieva y Manolova, 1992; Nagai *et al.*, 1992). El virus puede ser detectado en los líquidos alantoideos y en la membrana corialantoidea de los embriones infectados (Lennette, 1992; Mahy y Kangro, 1996; Nishimura *et al.*, 2000).

Los cultivos celulares, en particular la línea VERO y la MDCK, son muy útiles para evaluar antivirales y para los estudios de interacción virus - célula y la apoptosis que induce el virus influenza en estas líneas celulares (Watanabe, 1994; Caballero, 2001; Casadelvalle, 2004). Cuando las células MDCK, son inoculadas a baja multiplicidad de infección, se puede evidenciar la fragmentación del ADN celular como parte del daño que el virus les provoca, así como otras alteraciones propias del proceso de apoptosis (Price *et al.*, 1997; Fujimoto *et al.*, 2000; Ohyama *et al.*, 2003).

Para el cultivo del virus influenza y el estudio de antivirales, se han utilizados los fragmentos de órganos embrionarios o adultos de diferentes animales. Estos fragmentos son mantenidos en condiciones de laboratorio *in vitro*, para evitar la proliferación celular, como por ejemplo, la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (Burleson *et al.*, 1992; Lennette, 1992; Williams y Robertson, 1993). También han sido utilizados animales de diversas especies: hurones, hámsters, curieles, ratas y ratones. (Kilbourne, 1975; Burleson *et al.*, 1992; Neiryneck *et al.*, 1999). En 1997, F. Calvi, observó en ratas infectadas con influenza A, diversas alteraciones tales como: edemas e inflamación de la mucosa de la laringe y la tráquea y refirió también,

edema por infiltración de células mononucleares y neutrófilos en los pulmones de los animales infectados (Calvi, 1997).

Los ratones de laboratorio no sufren de forma natural la infección del virus influenza, pero son muy sensibles a la infección experimental con este virus (Cook, 1965). Hay autores que recomiendan la adaptación de las cepas de influenza al tejido del pulmón de ratón mediante los pases seriados del virus por la vía intranasal, sobre todo para trabajos que exijan altos títulos hemaglutinantes e infectivos (Lobodzinska y Krisanova, 1966). En este biomodelo, cuando el virus se multiplica con elevados títulos infectivos, los animales presentan las lesiones típicas de la neumonía que provoca el virus influenza en los humanos. La neumonía viral en ratones se caracteriza por degeneración temprana del epitelio ciliado de la tráquea y los bronquios. Otros investigadores también han concluido que entre el cuarto y el sexto día del comienzo de la gripe, puede observarse en los ratones, cierta recuperación clínica y sólo persisten lesiones vasculares focales (Drobyshevskaya *et al.*, 1962; Sidwell *et al.*, 1994 y Sidwell *et al.*, 1998). Otros estudios han señalado que el virus influenza provoca en los ratones la pérdida peso corporal y la muerte de estos fundamentalmente. (Cook *et al.*, 1998; Sidwell *et al.*, 1998; Nierynck *et al.*, 1999). Otro daño que también origina el virus influenza en las células del tracto respiratorio de los ratones, es la ruptura del ADN o apoptosis de estas (Mori *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1998). Esta evidencia constituye un aspecto importante para el estudio de las bases de la patogénesis y la terapéutica de la enfermedad. El biomodelo de la gripe en el ratón, constituye una excelente réplica de los daños que origina el virus influenza en el humano, caracterizado por bronquiolitis, neumonía intersticial aguda y daños alveolares difusos (Walker *et al.*, 1994).

#### **II.1.2.4. Epidemiología. Profilaxis y Tratamiento de la influenza.**

La influenza es una de las enfermedades infecciosas más antiguas que se conocen, suele presentarse en brotes aislados, epidemias anuales y pandemias; en cuanto a estas últimas, las más notorias del siglo XX fueron las de 1918, 1957 y 1968 (Fields, 2001).

La morbilidad y mortalidad asociadas con la circulación del virus influenza, hacen de la influenza o gripe, una enfermedad infecciosa que ocupa el centro de atención de las autoridades sanitarias de muchas naciones, por el impacto social y económico que origina (Nicholson, 1996; Osterholm, 2005). Su comportamiento más usual es la de presentarse en ondas epidémicas sucesivas y sus infecciones ocurren de manera horizontal de un sujeto enfermo a uno sano. A nivel mundial constituye un importante problema de salud, en el que están implicados los individuos en edades extremas de la vida (Osterholm, 2005).

Basándose en datos de estudios filogenéticos, se ha sugerido que las aves acuáticas son el principal reservorio de estos virus, en las que éste se perpetúa y circula a bajos niveles, sin causar patogénesis y a partir de las cuales transmiten el virus a las aves domésticas y a los mamíferos, incluido el hombre. Los cerdos actúan como hospedero intermediario, en el que se producen intercambio de segmentos del genoma viral entre los de cepas aviarias y humanas, lo que da lugar a nuevos subtipos del virus. (Webster *et al.*, 1982; Webster *et al.*, 1992).

La influenza o gripe en Cuba, como en otras latitudes, sucede en forma de epidemias, aunque se presentan también casos esporádicos todo el año. En el mes de septiembre generalmente, se presenta un primer incremento del número de enfermos, cuyo pico máximo se alcanza en los meses de octubre y noviembre. Puede haber un incremento en enero, con el máximo entre febrero y marzo (González *et al.*, 1989; Armas *et al.*, 1993; Oropesa *et al.*, 2000). De acuerdo al Informe brindado por el MINSAP, la influenza y la neumonía, constituyen la cuarta causa de muerte en Cuba (Anuario Estadístico, 2005). Resulta de interés un caso documentado de neumonía hemorrágica viral en Cuba, del que se aisló el virus influenza como agente causal (Oropesa *et al.*, 2000). La cepa que lo originó era similar a la de referencia A/Johannesburg/33/94(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).

Profilaxis y Tratamiento de la influenza (gripe): sin importar cuál sea la latitud o régimen social, por su alta morbilidad y mortalidad, se alerta constantemente de lo catastrófico que resultaría la circulación a nivel global de la variante de gripe aviar, de alto poder patógeno y elevada mortalidad para los humanos, lo que justifica la

búsqueda de formas eficaces de tratamiento y control de la enfermedad (Glezen, 1996; Barreto, 1998; Osterholm, 2005; WHO, 2006).

La principal estrategia en la prevención de la influenza, es la vacunación sistemática y repetida de la población susceptible. Las variaciones antigénicas que experimenta el virus que la causa, obliga a modificar anualmente la composición de las cepas que integran la vacuna, (Solórzano *et al.*, 2000). La severidad de la influenza en los humanos se relaciona con cepas de nueva circulación frente a estados inmunológicos incapaces de neutralizar al virus (Oropesa *et al.*, 2000). Una vacuna ideal sería aquella que pudiera combinar las sub unidades del virus influenza y así combinar las diferentes HA y NA que afectan al hombre. Estas se recomiendan por lo seguras, eficaces y baratas; además, estimulan la respuesta inmune humoral y celular más eficazmente (Johansson *et al.*, 2002). La eficacia de la vacuna en uso actualmente depende de numerosos factores: la edad de la persona vacunada, el estado de su sistema inmune, el grado de similitud entre los virus contenidos en la vacuna y aquellos en circulación y el momento de exposición al virus. Cuando ocurre dentro del mes posterior a la inmunización, se ha observado que la eficacia media de la vacuna es de alrededor del 70%. (Ostheraus y de Jong, 1999; Brown, 2005).

Los fármacos antivirales y las vacunas podrían coadyuvar a la profilaxis y terapéutica de la influenza de manera más exitosa. Esto se ajusta a grupos de alto riesgo no vacunados y aquellos que ofrecen una respuesta inmune deficiente ante la vacuna (Kostolansky *et al.*, 1988; Nicholson, 1996; Brown, 2005; W H O 2006). Por lo que la búsqueda de antivirales es un objetivo primordial a nivel mundial (Osterholm, 2005; W H O, 2006). Con este fin, diferentes firmas farmacéuticas han licenciado antivirales, el oseltamivir, el zanamivir, la amantadina y la rimantadina y la ribavirina. No obstante, existe el inconveniente del surgimiento de cepas resistente a dichos medicamentos y los efectos adversos que se han referido para todos ellos. (Ostheraus y de Jong, 1999; Lipatov, 2004; Yen, 2005; De Jong, 2005)

La aparición de cepas resistentes a la amantadina y la rimantadina ha sido bien documentada (Belshe *et al.*, 1989). Se conoce que estos dos medicamentos son ineficaces para tratar la influenza tipo (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>), ya que alrededor del 30% de las personas tratadas con estos fármacos, generan cepas resistentes (De Jong *et al.*,

2005; Yen, 2005). Otro de los antivirales autorizados para tratar la influenza es la ribavirina, con amplio espectro de acción antiviral, sin embargo, algunos estudios refieren su ineficacia frente a Influenza A (Shigeta, 1998). Otros medicamentos utilizados actualmente en el tratamiento y prevención de la influenza o gripe son el Zanamivir (Relenza®) y el Oseltamivir (Tamiflú®), capaces de inhibir la acción de la neuraminidasa del virus, lo que explica la eficacia antiviral que se les adjudica (Hayden, 1996). No obstante, hay referencias de que se han aislado cepas emergentes de la nueva variante de influenza (H<sub>5</sub> N<sub>1</sub>), resistentes al tratamiento con el Oseltamivir, en los casos de niños vietnamitas tratados con el fármaco (De Jong *et al.*, 2005; Yen *et al.*, 2005).

En conclusiones, la terapia antiviral ha devenido realidad y ha experimentado avances importantes, a pesar que los virus utilizan las mismas vías metabólicas y los precursores que la célula para su replicación y los diversos mecanismos de resistencia que despliegan para evadir los tratamientos con antivirales (Tempesta, 1994; Shigeta, 1999; Barreto *et al.*, 1998; Yen, 2005).

## **II.2. Antivirales.**

En las investigaciones preclínicas para la búsqueda de antivirales, es fundamental evaluar la toxicidad, la eficacia y selectividad del futuro medicamento y realizar el estudio de su acción *in vitro* e *in vivo*, en diferentes biomodelos, cuando se disponen de ellos. (Mahy y Kangro, 1996). Dada la diversidad de virus y hospederos es imposible disponer de una prueba antiviral única para la investigación de nuevas sustancias con esta propiedad. Un antiviral debe ejercer su acción de manera que inhiba selectivamente algún paso o evento del ciclo replicativo del virus en cuestión (Berghe *et al.*, 1984; Shigeta, 1999). Los requisitos que debe cumplir un fármaco antiviral son:

- Compuesto soluble en agua, polar y capaz de penetrar a la célula infectada.
- La concentración efectiva del compuesto en la reducción de la infectividad viral no puede tener acción citotóxica, citostática ni inmunosupresora.
- Su efecto debe ser específico para el virus y no tener actividad mutagénica.

En resumen, un antiviral es un producto capaz de reducir *in vivo* ó *in vitro*, directa o indirectamente, la infectividad de un virus en la célula hospedera. Numerosos

antivirales ejercen su acción al actuar directamente sobre la partícula es decir, en el ambiente extracelular y se dice que la acción es virucida *in vitro*. Esto se puede determinar por tratamiento de la célula antes o durante la fase de adsorción viral y verificando la integridad de la partícula viral desde el punto de vista químico e infeccioso. La actividad virucida podría producirse también intracelularmente, cuando el antiviral penetra a la célula hospedera y actúa en el ciclo replicativo viral (Hu, 1989). El mayor obstáculo de los antivirales ha sido la posibilidad de diferenciar los procesos vitales de la célula de los virales. La demostración de la actividad antiviral en los cultivos celulares, no es suficiente para asegurar su eficacia en el humano (Hirsch y Kaplan, 1990). Hay investigadores que han indicado dos direcciones fundamentales para actuar los agentes antivirales: por estimulación de las defensas específicas e inespecíficas del hospedante y por limitación de la replicación del virus. La búsqueda de antivirales puede seguir diferentes vías o estrategias que incluyan la minuciosa selección tras un programa de tamizaje de numerosos compuestos naturales, elegidos por su empleo popular; la síntesis de análogos de compuestos antivirales y/o la predicción de estructuras con actividad a partir de datos obtenidos por técnicas de resonancia magnética nuclear, difracción de rayos x, etc (Berghe *et al.*, 1984; Caballero, 2001).

### **II.2.1. Antivirales a partir de plantas.**

Para encontrar compuestos antivirales a partir de plantas, los primeros pasos consisten en el muestreo de extractos vegetales contra determinados virus, para luego proceder al aislamiento de principios activos puros contra el virus y la evaluación de la eficacia de dichos compuestos en biomodelos (Hu, 1989).

Las plantas medicinales poseen una serie de sustancias químicas naturales que le confieren valores que son bien reconocidos (Morón y Levy, 2002). Estos compuestos suelen actuar de manera sinérgica y se les denominan principios activos (Miranda, 1995). Se sabe que las propiedades medicinales de las plantas son responsabilidad de los metabolitos secundarios, que son productos de la asimilación del nitrógeno (Rodés ,1992). Estos compuestos a los cuales se les atribuye alguna acción farmacológica, tales como los alcaloides, taninos, flavonoides, lectinas,

antraquinonas, etc. pueden ejercer su acción en el extracto total o de manera aislada, cuando se les purifica y formula de manera adecuada (Berghe *et al.*,1984). En la Guía Metodológica para la investigación de las plantas medicinales, vigente en Cuba desde 1992, la búsqueda de principios activos a partir de plantas se divide en etapas que incluyen: la caracterización fitoquímica preliminar de la planta, previa al estudio farmacológico; el establecimiento de las especificaciones de calidad del material vegetal y sus extractos; las especificaciones de calidad del medicamento herbario y el aislamiento y elucidación estructural del principio activo (Guía Metodológica Para la Investigación Fitoquímica en Plantas Medicinales, 1992; Miranda,1995). Sin embargo, algunos autores opinan que la utilización de extractos totales de plantas ejerce un efecto más beneficioso sobre el organismo humano que la acción del compuesto aislado, puesto que producen menos efectos secundarios indeseables y el efecto farmacológico se puede potenciar al estar presentes varios principios activos. Como desventajas señalan que el principio activo pudiese actuar a menor concentración de la necesitada, al estar inmerso entre otras sustancias le pueden restar la acción farmacológica que se desea (Berghe *et al.*, 1984; Serkedjieva *et al.*, 2000).

Otro aspecto no menos importante en cuanto al uso de las plantas medicinales, es la evaluación del riesgo – beneficio y las interacciones clínicas que pueden tener lugar entre medicamentos herbarios con otros fármacos indicados con otros fines (Morón *et al.*, 2002).

Para la búsqueda de antivirales a partir de plantas (Berghe *et al.*,1984) recomiendan los pasos siguientes:

1. Selección inicial, colecta e identificación de la planta.
2. Preparación de extractos crudos para el tamizaje antiviral.
3. Estudio de extractos para conocer su actividad antiviral *in vitro*.
4. Recolecta y confirmación de la actividad antiviral *in vitro* de las plantas seleccionadas. Bioensayo para el aislamiento de principios activos.
5. Determinación de la actividad antiviral *in vitro* y evaluación toxicológica de los principios activos puros.
6. Elucidación de la estructura del producto activo.
7. Confirmación de la actividad antiviral mediante ensayos *in vivo*.

8. Reaislamiento en gran escala y síntesis. Estudio del mecanismo de acción del principio activo sobre la replicación viral.
9. Evaluación farmacológica clásica, formulación y toxicología del antiviral.
10. Ensayos clínicos.

La búsqueda de nuevos medicamentos antivirales requiere una rigurosa identificación y caracterización del material. Cuando este requisito no se cumple, puede que no se observe el efecto deseado y se refieran datos erróneos en cuanto al extracto/planta que se evalúa y se produzcan graves intoxicaciones o muertes (Morón y Levy, 2002).

#### **II.2.2.1- Plantas con actividad antiinfluenza.**

La mayoría de los extractos naturales activos contra el virus influenza son de origen vegetal. El principio activo, responsable de la acción contra el virus, es por lo general algunos de los compuestos que el tamizaje fitoquímico detecta. En estudios realizados a la especie *Camellia sinensis* O. Kuntze, esta especie vegetal es referida como poseedora de un potente inhibidor del virus influenza y el de la poliomielitis (Yamazaky y Togaya, 1980). Productos del cultivo del micelio del hongo *Cortinellus shiitake*, constituidos por polisacáridos complejos tipo citoquinas y otros metabolitos, resultaron útiles en el tratamiento de la influenza, la hepatitis y el cáncer (Iizuka, 1980; Iizuka y Hiroaki, 1982). Un medicamento antigripal que fue patentado y preparado a partir de un grupo de plantas, entre ellas *Croscomaeflora lemoine*, proporcionó un principio activo que inactivó al virus influenza cuando este fue replicado en embriones de pollo. Dicho preparado antiviral mostró baja toxicidad en dicho hospedero y el efecto antiviral resultó dependiente de la concentración y del tiempo de aplicación (Inoi *et al.*, 1985). Berghe y cols., estudiaron diferentes especies de plantas, tales como *Chellidonium majus* L. y *Colchicum autumnales* L., con propiedades inhibitorias del virus influenza (Berghe *et al.*, 1984). En otra investigación, se evaluaron extractos de ajo, frente a diferentes tipos del virus influenza, que resultaron altamente eficaces contra la influenza B (Tsai *et al.*, 1985). En los estudios de Shimamura y Hara, ellos encontraron y patentaron un componente del té, capaz de prevenir la infección con el virus influenza, el cual no tuvo efectos colaterales adversos y fue efectivo a bajas concentraciones. El principio activo aislado

fue un polifenol del tipo de las catequinas y flavonas. Estas sustancias mostraron capacidad para desactivar la hemaglutinina y la neuraminidasa del virus (Shimamura y Hara, 1990). Ivancheva y cols., analizaron fitoquímicamente tres plantas medicinales búlgaras: *Geranium macrorrhizum* L., *Geranium sanguineum* L. y *Epilobium hirsutum* L. y detectaron como sus principales constituyentes los polifenoles, del tipo flavonoides y taninos y encontraron un efecto inhibitorio de un extracto y de una mezcla polifenólica preparado a partir de *Epilobium hirsutum* L. que mostró actividad frente a la replicación del virus Influenza (Ivancheva *et al.*, 1992). Serkedjieva y Manolova investigaron un complejo polifenólico aislado de *Geranium sanguineum* L., que resultó capaz de inhibir la replicación de los virus influenza A y B, *in vitro*, *in ovo* e *in vivo* y protegió a los ratones de la infección letal con este virus (Serkedjieva y Manolova, 1992). Por otra parte, M. Tempesta, informó la potente actividad antiviral de los polímeros de proantocianidina, aislados de la planta croton o de plantas del género *Calophyllum*, que fueron activos contra las influencias A, B y C. Estos polímeros solubles en agua, mostraron actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* y una estructura química tipo flavonoide (Tempesta, 1993). Bombardelli y cols., presentaron una invención relacionada con el novedoso extracto de *Piliostigma Thonningii* Schum, que mostró acción antiviral contra influenza y otros virus. En la patente, aparecen el proceso de preparación, formulación del producto y sus usos terapéuticos, especialmente en procesos bronco-pulmonares (Bombardelli *et al.*, 1995). En 1995, J. Serkedjieva estudió el efecto de un complejo polifenólico sobre la cepa InfluenzaA/Rostock (H<sub>7</sub>N<sub>1</sub>) en fibroblastos de embrión de pollo y observó la inhibición de la síntesis proteica del virus, con la consecuente inhibición de la expresión de glicoproteínas de membrana de origen viral, la HA y NA (Serkedjieva, 1995). En otra investigación, estudiaron un flavonoide aislado de las hojas de una planta *Scutellaria baicalensis*, frente a dos cepas de influenza A, replicada en embrión de pollo y en células MDCK respectivamente. Se observó una inhibición de la actividad de neuraminidasa viral (Nagai *et al.*, 1992). Por otra parte, Nagai y cols., estudiaron otro flavonoide de esta misma planta, que produjo la inhibición de la fusión de la membrana viral a la membrana lisosomal (Nagai *et al.*, 1995a). Zgorniak y cols., investigaron la infusión liofilizada de flores de la planta *Verbascum thapsiforme*

Schrad, contra el virus influenza *in vitro*, los resultados arrojaron una disminución de los títulos infectivos virales entre uno y tres logaritmos. El tamizaje fitoquímico de dicho liofilizado detectó la presencia de flavonoides, ácidos fenólicos, saponinas, aminoácidos y azúcares libres (Zgorniak *et al.*, 1991). Petica y cols., realizaron un experimento *in vivo* en el que administraron virus Influenza A/PR/8/34/ (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) por la vía intranasal a ratones y por la misma vía, suministraron con fines terapéuticos un extracto acuoso de flavonoides obtenidos de diferentes plantas. Notaron una evolución favorable de la bronconeumonía, con recuperación completa de los animales tratados y no observaron efectos tóxicos en estos (Petica *et al.*, 1994). Serkedjieva y cols., estudiaron la preparación SHS-174, una infusión liofilizada de diferentes partes de tres plantas superiores, este preparado inhibió la replicación de diferentes cepas de influenza A *in vitro* e *in vivo*. Estos autores plantearon que el análisis químico del SHS-174 reveló la presencia de flavonoides, saponinas, triterpenos, ácidos fenólicos, taninos, polisacáridos, los que podrían estar implicados en la acción antiviral detectada (Serkedjieva *et al.*, 1990). En otro estudio, Serkedjieva y Zgorniak, evaluaron la actividad antiviral combinada de la infusión antes referida y derivados de la amantadina frente a cepas A/(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) y A/(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>). Las combinaciones tuvieron un efecto inhibitorio sinérgico mayor que las sustancias individuales (Serkedjieva y Zgorniak, 1993). Un extracto de *Sanicula europea* L., probado frente a la cepa Influenza A/PR/8/34 en células MDCK, inhibió la síntesis de ARN polimerasa ARN dependiente viral, lo cual sugiere que esta planta tiene principios activos contra el virus influenza. Otros trabajos refieren a los polisacáridos: sizofirano, escleroglucano y pendulano, de alto peso molecular y baja toxicidad, capaces de inhibir la infección por el virus influenza (Hagiwara y Kikuchi, 1992). El escleroglucano, producido por *Sclerotium glaucanicum* y pendulano, producido por *Porodisculus pendulus*, dieron lugar a las formas farmacéuticas (tableta y granulado) eficaces para el tratamiento de la gripe y herpes (Hagiwara y Kikuchi, 1994). En otra investigación, el destilado gaseoso de la planta de *Houttuynia cordata* Thumb, compuesta de tres componentes mayoritarios: metil-n-nonil-cetona, lauril aldehído y capril aldehído, mostró actividad contra el virus influenza. Ellos encontraron la acción virucida y baja toxicidad de estos aceites esenciales, quizás por interferir con la membrana viral

(Hayashi *et al.*, 1995). Una patente japonesa, refiere a la granada con propiedades antivirales. A la corteza de la raíz y a la cáscara del fruto de esta planta, les encontraron un principio activo que sirve para el tratar por vía oral a los pacientes con lesiones herpéticas (Hozumi *et al.*, 1995). Hayashi y cols., estudiaron un principio activo extraído del alga verde-azul *Spirulina platensis*. El polisacárido sulfatado aislado inhibió el virus influenza A, entre otros virus envueltos y en particular, inhibió su penetración a la célula hospedera (Hayashi *et al.*, 1996). El tratamiento con un extracto del cactus *Opuntia streptacantha*, suministrado antes de la infección del virus influenza, inhibió la replicación de este virus intracelularmente e inactivó extracelularmente al virus. Otros investigadores que estudiaron un extracto acuoso de hojas de la planta *Sanicula europea* L., refirieron que dicho extracto inhibió la síntesis de ARN viral *in vitro*, al afectar la actividad de ARN polimerasa viral y no tuvo efectos tóxicos e inhibió la multiplicación de la cepa Influenza A/PR/8/34(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>). Este extracto no presentó acción virucida directa cuando se evaluó frente a la cepa Influenza A/Victoria/1/75(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) en la línea celular MDCK, pero indujo la formación de placas pequeñas en el cultivo de células y no afectó a Influenza B /Lee/40 también estudiada (Turan *et al.*, 1996). Otro extracto vegetal, el SP-303, fue probado frente al virus influenza en las células MDCK. En los ensayos de citotoxicidad, este polímero polifenólico aislado de un extracto de plantas de la familia *Euphorbiaceae*, presentó menor índice de citotoxicidad que el ribavirin, utilizado como control. No obstante, el SP-303, fue capaz de inhibir cepas A y B de influenza (Wyde *et al.*, 1993). En 1998, Serkedjieva y Hay evaluaron la acción antiviral del extracto polifenólico aislado de *Geranium sanguineum* L.. Cuando este extracto se administró 30 minutos después de la infección, mostró actividad antiinfluenza en dependencia de la concentración. Otros extractos naturales, preparados a partir de invertebrados y algas marinas, resultaron activos contra el virus influenza en este estudio (Serkedjieva *et al.*, 2000).

La búsqueda de principios activos en extractos naturales, particularmente con los preparados a partir de plantas con actividad antiinfluenza, es sumamente amplia. Numerosas compañías privadas y corporaciones, protegen los resultados de sus investigaciones e invenciones sobre principios activos, así como los procesos de preparación de estos extractos y las formulaciones farmacéuticas a partir de los

extractos vegetales. En un simposio de la fundación Ciba, los allí presentes definieron a la Shaman Pharmaceuticals, como una compañía empeñada en el desarrollo de la farmacia tradicional, que sienta sus bases en el descubrimiento de los procesos de aislamiento de principios activos de las plantas tropicales, con una historia de uso en la Medicina Tradicional (King y Tempesta, 1994). Como resultado de esta tendencia, se han integrado la etnobotánica, la medicina y los productos naturales, para lograr en corto tiempo y a bajo costo, la identificación de principios activos, con cualidades prometedoras en la terapia de enfermedades virales. En este sentido, el empleo de plantas medicinales y medicamentos herbarios ha tenido un marcado y ascendente auge en el ámbito mundial a partir que la OMS, llamó en 1997, a introducir recursos medicinales tradicionales, ya que el uso de las plantas es una de las formas de la medicina tradicional más universal, pues aparece en todas las culturas (Morón y Levy, 2002).

### **II.3. *Punica granatum* L.**

*Punica granatum* L. es una especie vegetal que pertenece a la familia de las Punicaceae, orden Myrtales. Sus nombres vernáculos, son: granada (fruto y el árbol), granadero, granado (árbol), pomegranate (árbol) entre otros (Roig y Mesa, 1974; Morton, 1981; Fitoterapia, 2003). En Cuba, se conoce comúnmente como granada. Es cultivada en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo.

#### **II.3.1. Descripción botánica y Composición química de la granada.**

Es un arbusto de hasta 7 m. Sus hojas son ovales, elípticas u oblongas, de 1 a 8 cm, obtusas o agudas. Las flores son solitarias o numerosas con pétalos escarlatas o blancos, sub-orbiculares, de 2.5 cm. El fruto es globoso de 6 a 14 cm. Las semillas están cubiertas por un anillo rojo, jugoso y dulce (Tramil, 1992; Fitoterapia, 2003). Según Morton, el fruto posee una corteza delgada con coloraciones que van del amarillo-verdoso a rojizo, con 5 a 8 compartimentos donde se encuentran las semillas, incluidas en una pulpa carnosa y jugosa de sabor agridulce. En el lugar opuesto a la inserción forma una pequeña corona, cuya testa es coreácea (Morton, 1981).

Composición química: la corteza de la granada, contiene al menos tres alcaloides: pelleterina, isopelleterina y metilpelleterina. La corteza de la raíz contiene metilpelleterina y la hoja posee taninos, granatinas A y B, corilagina y un tanino elágico denominado punicafolina. Las flores son ricas en sitosterol y ácido ursólico. En cuanto al fruto de la granada, es rico en vitamina C, antocianinas, tiamina y riboflavina. Su almacenamiento prolongado conduce a la disminución de los dos primeros compuestos y cambios de color. La corteza de este fruto contiene ácido elágico y ácido gálico en un 0.55 % y un 0.09 % respectivamente. Cuando el fruto entero se analiza en cuanto a componentes químicos (Fitoterapia, 2003), se refiere la presencia de elagitaninos y punicalagin, taninos a los que se les atribuye importantes propiedades biológicas, en enfermedades tumorales (Adams *et al.*, 2006).

### **II.3.2. Usos en la medicina tradicional y Propiedades medicinales estudiadas.**

En la medicina tradicional de países del continente americano, tales como Colombia, Brasil, Venezuela, Curazao, Puerto Rico e Islas Turcas, la decocción de la cáscara del fruto de la granada es utilizada ampliamente para tratar la diarrea y la disentería. En Islas Turcas, la cáscara de la granada se reduce a polvo y, luego de ingerida, corta la diarrea de inmediato (Morton 1981). Este autor también refiere que en Cienfuegos, Cuba, el polvo de la cáscara tostada es aplicado para curar úlceras y con la cáscara además se preparan remedios contra afecciones pulmonares. La corteza de la planta, después de su decocción, es eficaz para expulsar lombrices y tenias. En la región de Yucatán, la decocción de las flores y la cáscara del fruto se utilizan para gargarismos y aliviar la inflamación de la boca y la garganta. En La India, las flores macho o abortivas de la granada son usadas en la medicina popular para el tratamiento de la diabetes mellitus (Jafri *et al.*, 2000).

Estudios científicos de extractos preparados con diferentes partes de la granada y muy en particular su fruto, brindan datos de gran utilidad. En un muestreo de varias plantas medicinales de la India, el extracto metanólico de esta planta, mostró capacidad para evitar la fertilidad en ratas, con un 50 % de efectividad en los animales tratados, con respecto a sus controles (Prakash, 1986). Popularmente se le atribuye a la granada su uso como anticonceptivo.

Extractos preparados de diversas partes de la granada, avalan las propiedades antibióticas que se le atribuyen esta planta (Prashant *et al.*, 2001). La actividad antimicrobiana *in vitro* para *E. coli*, *S. aureus* y *A. níger*, de un extracto total de la planta a la concentración de 62.5 mg/mL también ha sido demostrada (TRAMIL, 1995). En el Instituto Osvaldo Cruz de Brasil, se realizó un estudio de 13 plantas utilizadas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas referidas como medicinales y utilizadas en la medicina tradicional de ése país. La granada resultó bactericida y eficaz frente a *S. aureus* (Barbieri, 2002). En otro estudio, un extracto de la granada resultó eficaz frente a *S. aureus* y su enterotoxina, ya que fue capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria y la producción de la toxina por parte de ésta (Braga *et al.*, 2005). Zhang y cols., evaluaron un tanino del pericarpio del fruto de granada que resultó efectivo contra Herpes simple tipo 2, que bloquea la replicación y la adsorción del virus (Zhang *et al.*, 1995). En otras investigaciones, se encontró que la corteza y el fruto de la granada son útiles para la preparación de una droga cruda, que contiene un antiviral de amplio espectro y efectivo para tratar la infección por el virus herpes (Hozumi *et al.*, 1995).

En 1995, se evaluó la toxicidad de los extractos acuosos del fruto de granada, tal como son utilizados en la medicina folklórica en Brasil para combatir los helmintos. Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo en ratones. No se detectó mutagénesis en las células de la médula ósea del fémur de los animales tratados con el extracto de granada, cuando se administró vía oral (intragástricamente) durante tres días, incluso a dosis de 1 y 2 mg/Kg de peso. La toxicidad aguda (LD<sub>50</sub>) fue de 4 g/Kg peso corporal de los ratones (Amorin, 1995). Huklery y cols, también encontraron actividad para inhibir helmintos en extractos de este fruto (Huklery *et al.*, 1993). Otros autores, han estudiado la toxicidad y las propiedades antivirales antes y después de la liofilización, de un extracto preparado con los frutos de la granada. Esta planta, que es de amplio uso en la medicina tradicional cubana, tiene estudios preclínicos de prometedores resultados (Caballero, 2001; Casadelvalle, 2004).

A los extractos del fruto de la granada, se le atribuyen la capacidad antioxidante *in vivo* e *in vitro* (Dass *et al.*, 1999; Chimdambara *et al.*, 2002; Noda *et al.*, 2002; Suddesh y Vijayalakshmi, 2005 y Sánchez-Lamar *et al.*, 2005). Quizás relacionado

con las propiedades antioxidantes, está el hecho que se le han encontrado al fruto propiedades moduladoras de la respuesta inmune. Esto se verificó cuando se suministró a conejos 100 mg/Kg, por la vía oral, el fruto reducido a polvo en suspensión acuosa y se observó la estimulación de la migración de los linfocitos, así como de los componentes solubles y celulares del sistema inmune (Gracious *et al.*, 2001).

A los extractos del fruto de la granada, se les ha investigado la posible acción preventiva y también como adyuvante, en los tratamientos del cáncer de mama. Al respecto, se ha verificado su papel como inhibidor natural de los estrógenos. Se refiere también que extractos de esta planta poseen la capacidad de inhibir la apoptosis que se observa en las células cancerosas de las mamas de los murinos (Kim, 2002). Otros estudios acerca de las propiedades del jugo del fruto de la granada, han arrojado que posee derivados de los taninos, capaces de suprimir la señal inflamatoria propia de las células del cáncer de colón y se ha notificado que estos taninos, inducen la apoptosis de dichas células, a través de a modulación de los factores de la transcripción en las mismas (Adams, 2006).

Estos estudios hablan a favor de las bondades y potencialidades que atesoran las plantas medicinales y en particular la granada, para el desarrollo de nuevos fármacos.

### **III- Materiales y métodos.**

#### **III.1- Material vegetal.**

Las frutas maduras de *Punica granatum* L. (granada) fueron colectadas a partir de plantas en estado adulto, en determinadas localidades del municipio de San Antonio de los Baños, provincia de La Habana, en los meses de julio y agosto correspondientes a los años 1998, 2001 y 2003. Las frutas se conservaron en refrigeración hasta la preparación del liofilizado. Una muestra de dicha especie vegetal radica en el herbario del Jardín Botánico Nacional (No 40619 HAJB).

#### **III.1.1 – Obtención y estandarización del extracto de granada.**

Las frutas de granada se cortaron en pequeños fragmentos, los que mezclados, constituyeron el material vegetal con el que se preparó, mediante un procedimiento estandarizado, el extracto hidroalcohólico que posteriormente se sometió al proceso de rotoevaporación y posterior liofilización (Iglesias 1990). A continuación se describe brevemente la marcha experimental:

1500 gr de frutas → Macerar en etanol + agua bidestilada V/V → Filtrar → Dejar en reposo (15 días) → decantar y rotoevaporar → liofilizar → conservar en refrigeración. El rendimiento del extracto fue del 10%.

La liofilización se realizó en el Departamento de Crioconservación del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) y los procedimientos fundamentales y la evaluación de las propiedades físico –químicas y biológicas del liofilizado se establecieron durante esta etapa de trabajo.

Los parámetros de calidad y el tamizaje fitoquímico del extracto liofilizado de *P. granatum* L. (BLBu) se determinaron de acuerdo a las normas establecidas para extractos vegetales (NRSP-309, 1992; NRSP-312, 1992 y Guía Metodológica para la Investigación Fitoquímica en Plantas Medicinales, 1992). Los ensayos para el tamizaje fitoquímico fueron: Molish (glucósidos y mucílagos); Draggendorf (Alcaloides); Mayer (Alcaloides); Baljet (coumarinas); Borntrager (quinonas); Shinoda (flavonoides); Espumas (saponinas); Fehling (carbohidratos); Antocianidinas (antocianinas); Cloruro Férrico (Compuestos Fenólicos); Ninhidrina (aminoácidos); Kedde (glicósidos cardiotónicos). Se determinó el contenido de flavonoides (Ogbeide

y Parvez, 1991). La toxicidad del BLBu se estudió tomando en consideración experiencias previas (Morton, 1981). La capacidad hemaglutinante y hemolítica del extracto liofilizado se llevó a cabo tomando en consideración lo recomendado para los estudios de extractos vegetales (Wyde *et al.*, 1993).

Para el trabajo experimental se preparó una solución madre de 500mg/mL del BLBu en agua bidestilada, se esterilizó a través de filtros Millipore de 0,2  $\mu$ m, se dispensó en alícuotas y se conservó a 4°C, hasta su utilización.

### **III.2-Sistemas Hospederos.**

#### **III.2.1 Embriones de pollo:**

Se emplearon embriones de pollo, de 9 a 11 días de incubación, libres de gérmenes patógenos específicos suministrados por el CENPALAB, Cuba. Se incubaron a las condiciones estándares: 37°C y humedad relativa de 80%, previo a los experimentos con virus. Para los estudios antivirales la temperatura de incubación fue de 35°C. La viabilidad se chequeó diariamente al ovoscopio.

#### **III.2.2.Línea Celular MDCK.**

Línea celular MDCK, de riñón de perro (ATCC-L34), fue suministrada por el Laboratorio de Control de la Calidad, Centro de Inmunología Molecular, Cuba. Para su mantenimiento se utilizó el medio de cultivo Dulbecco's, suplementado con suero bovino fetal (5%) y HEPES 25mMm +glutamina 25 g/L + albúmina humana fracción V (0,2 %) + amino ácidos no esenciales (100X) al 1%, penicilina 1000UI/ mL y estreptomicina 1000UI/mL. Se sembraron a razón de  $2 \times 10^5$  cel /mL e incubaron a 37°C, 95% humedad relativa y 5% atmósfera CO<sub>2</sub>.

#### **III.2.3-Ratones.**

Se utilizaron ratones de la Línea Balb/C (hembras), de 15 -18 g de peso, de 4 semanas de edad y calidad certificada por el CENPALAB. Luego de una cuarentena de dos días, los animales se ubicaron en grupos de 10 en respectivas cajas T3 con tapas filtro, colocados en cabinas de presión negativa, marca TECNIPLAST, para evitar la posibilidad de contaminación adicional. Se alimentaron con pienso comercial aprobado para la especie y tomaron agua potable a libre consumo. La temperatura ambiente de 25±1° C; humedad relativa 60% y un fotoperíodo de 12 h luz /12 h

oscuridad. Todas las manipulaciones de los ratones y las muestras utilizadas en los ensayos antivirales, se realizaron en un gabinete de seguridad Clase II (STI TEUFRANCE), de acuerdo a las recomendado en estos casos (Kruse *et al.*, 1991) y tomando en consideración las regulaciones cubanas acerca de la protección de los animales, contenidas en el Código Práctico para el Uso de los Animales de Laboratorio, CENPALAB; bajo la supervisión del Jefe del Bioterio del IPK.

### III.3 - Virus influenza.

Las cepas de virus influenza y su procedencia utilizadas en esta investigación se refieren en la tabla 1.

Tabla1. Cepas de virus influenza utilizadas en los diferentes experimentos.

Cepa	Procedencia
A/Mississippi/1/ 85(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	INHEM y Cepario del Instituto Finlay, Cuba.
A/URSS 3/85(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	INHEM y Cepario del Instituto Finlay, Cuba.
A/Victoria /3/75(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	Centro de Biología Molecular. Madrid, España.
A/Habana /299/ 88(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )*	INHEM y Cepario del Instituto Finlay, Cuba.
A/ Singapur / 6/ 86(H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )	Cepario del Instituto Finlay, Cuba.
A/Chile /2/83 (H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )	Cepario del Instituto Finlay, Cuba.
A/Holguín/ 7/93 (H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )*	INHEM y Cepario del Instituto Finlay, Cuba.
B/ Ann Arbor /1/ 86	Cepario del Instituto Finlay, Cuba.
A/Japan/10/99 (H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	Centro de Inmunología Molecular, Cuba.
A/Sidney /5/97(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	Cepario de Instituto de Medicina Tropical ,Cuba

\* Aislamientos cubanos.

#### III.3.1.- Preparación del stock de virus influenza.

Todas las cepas de virus influenza referidas en la tabla 1 y que se utilizaron en los diferentes experimentos, se prepararon de acuerdo a los procedimientos recomendados por diversos autores (Lennette *et al.*, 1985; Mahy y Kangro, 1996; Ji-Yong Zhou *et al.*, 2006). A partir del virus procedente del cepario, a cada una de las cepas virales se le realizó el pase viral en embriones de pollo de 9 a 11 días de incubación, por la vía alantoidea. Para la titulación del virus influenza, se prepararon diluciones del virus, que se inocularon por la misma vía a grupos de 30 embriones por dilución y se incubaron a 35°C y 80% humedad relativa, durante 48 ó 72 horas, según la cepa viral. A cada líquido alantoideo colectado, se les detectó la presencia de Hemaglutinina viral (Burlleson *et al.*, 1992). Con los datos obtenidos se calcularon los respectivos títulos infectivos (Reed y Muench, 1938). Se preparó el stock de virus

correspondiente a cada cepa, se dispensaron estérilmente en alícuotas y se conservaron a  $-70^{\circ}$  C, hasta su uso.

### **III.3.2- Título hemaglutinante (HA) y Título Infeccioso del virus influenza (DIE<sub>50</sub>).**

El título hemaglutinante viral (u HA) se calculó de acuerdo a los procedimientos normalizados para ésta técnica (Burleson *et al.*, 1992; Mahy y Kangro, 1996). Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (fondo en U) y como diluyente PBS pH 7.2; como sistema indicador, una suspensión de glóbulos rojos de gallo al 5% en PBS. Criterio de lectura: se consideró como muestras HA (+), las que presentaron hemaglutinación total (enrejado característico) y HA (-) cuando se observó ausencia total de ésta y en su lugar estaban los glóbulos rojos compactados en el fondo del pocillo. El título coincidió con la dilución más alta con hemaglutinación total.

El título infeccioso viral (DIE<sub>50</sub>) se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench y recomendado por otros autores (Reed y Muench, 1938; Burleson *et al.*, 1992, Mahy y Kangro, 1996; Ji-Yong Zhou *et al.*, 2006). Este método, permite establecer el punto final de dilución de la preparación viral donde el 50% de los embriones que están infectados, con presencia de hemaglutinina o sea HA (+), nos indican la dosis infecciosa media por embrión (DIE<sub>50</sub>). El recíproco de este número, da el título infeccioso viral en términos de dosis infecciosas por unidad de volumen.

### **III.4 -Otros Reactivos y Materiales utilizados.**

- Clorhidrato de amantadina: (tabletas de 100 mg) usada como control positivo en los ensayos antivirales, de la Empresa MEDSOL, Cuba.
- MTT: Metilbromuro de 3-(4-5 dimetil tiazol-2- il) -2,5 difenil tetrazolio (Thyazoly Blue), SIGMA.
- Proteinasa K y agarosa: Se utilizaron en la digestión de las células y los geles de electroforesis de ácidos nucleicos respectivamente (BDH y FMC, Bethesda).
- La acrilamida y la N -N etilen- bis- acrilamida (SIGMA). Azul de Bromofenol, betamercaptoetanol, SDS y Azul de Coomasie, Firma comercial Merck.
- Patrones de peso molecular para la electroforesis de proteínas (Laboratorio de Control de la Calidad del Instituto de Sueros y Vacunas C. J. Finlay, Cuba).

- Medio de cultivo de células Dulbecco. Solución de Albúmina Bovina (BSA), albúmina Humana fracción V) SIGMA.
- Placas de cultivo de células y materiales desechables (COSTAR).
- EDTA 10 mM; Buffer Tris –HCL 10mM y Buffer: TBE (Tris –base pH8.0, ácido bórico 0.89mM, EDTA 20 nM); TE 1X (Tris HCL 10mM +EDTA1 mM, pH8.00).
- Éter etílico, formol, hematoxilina de Harris y eosina (calidad reactivo),
- Soluciones tampón PBS pH 7.2 y HEPES (GIBCO).

### **III. 5 - Ensayos antivirales en embriones de pollo (*in ovo*).**

#### **III.5.1- Ensayo de la toxicidad del extracto BLBu.**

Se inocularon embriones de pollo (30 embriones/dilución), por la vía alantoidea, con 100 µL de las diluciones: 1, 2 y 3 mg/mL del BLBu y 25, 50 y 150 mg/mL de la amantadina (antiviral control), todas preparadas en agua bidestilada estéril. Se inocularon 100µL del agua bidestilada estéril /embrión como control negativo del experimento y todos se incubaron a 35°C y 80% humedad relativa, durante siete días. Se examinó la viabilidad de cada embrión diariamente en el ovoscopio. Los embriones muertos se cuantificaron en cada concentración ensayada y se incluyeron en los cálculos de embriotoxicidad. Las concentraciones del BLBu y de la amantadina, con resultados de toxicidad similares a los del agua, expresadas por los porcentos de sobrevivencia de los embriones, fueron seleccionadas para realizar los ensayos antivirales (Shihman y Yeung, 1988).

#### **III. 5. 2- Evaluación *in ovo* de la acción antiviral del BLBu.**

La evaluación antiviral del BLBu a diferentes tiempos y concentraciones, se realizó frente al reto de 1, 10 y 100 DIE<sub>50</sub> de la cepa InfluenzaA/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>). Se emplearon 1 y 2 mg/mL del extracto liofilizado, suministrado una hora antes de la infección (a.i.) ó una hora posterior a la infección (p.i.) a razón de 200 µL/ embrión, por la vía alantoidea. Por cada dilución se emplearon grupos de 30 embriones, para el tratamiento y el control (+) de virus. En este último, el antiviral se sustituyó por PBS pH 7.2. El clorhidrato de amantadina (antiviral de referencia) se diluyó en agua, a la concentración sub-tóxica calculada. Se procedió de manera similar que con extracto en estudio. Los embriones se incubaron a 35 °C y 80% de humedad relativa, durante

48 horas y se procedió a la colecta de los líquidos alantoideos. Se evaluó la presencia o no de hemaglutinina (HA) a cada muestra. Se calcularon los títulos infectivos  $DIE_{50}$  y los índices de reducción de la infectividad. Se realizó el análisis estadístico de los resultados.

### **III.5.3 – Evaluación del espectro anti-influenza del BLBu *in ovo*.**

Se inocularon a grupos de 20 ó 30 embriones / dilución, por la vía alantoidea:

Influenza A/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), A/URSS/3/85(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), A/Habana/299/88(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>),

A/Holguín/24/7/93(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>), A/Singapur/6/86(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>), B/Ann Arbor/1/86 y

A/Chile/2/83(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>). Transcurrida una hora posterior a la inoculación se les administró

2 mg/mL del extracto por la misma vía, a razón de 100  $\mu$ L / embrión, se incubaron a

35°C y 80% de humedad relativa durante 48 ó 72 horas, según la cepa empleada. Se

calcularon los respectivos títulos infectivos virales y los índices de reducción de la

infectividad.

### **III.6- Estudio de la actividad virucida directa (in vitro) del BLBu.**

#### **III.6.1- Evaluación preliminar de la actividad virucida directa.**

Para determinar el rango de concentración virucida directa del extracto y utilizarlos en

los experimentos posteriores, se seleccionó como prototipo la cepa Influenza

A/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>). Para ello se mezclaron v / v 100  $\mu$ L cada una de las

concentraciones del extracto (desde 50 hasta 250  $\mu$ g/mL) con 100  $\mu$ L de virus

influenza (8u HA). Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) durante

60 minutos. Se les determinó la presencia de HA viral. Para estudiar el tiempo

mínimo de acción del extracto sobre el virus, se mezcló (v / v): 250  $\mu$ g/ mL de BLBu y

virus influenza (8u HA) se incubó la mezcla a temperatura ambiente. Se determinó la

presencia de hemaglutinina, desde 0 hasta 60 minutos y se verificó el título HA para

cada muestra. Los resultados de este estudio, se tomaron como referencia para

determinar el tiempo, temperatura y concentración mínima para la acción virucida

directa del BLBu.

### III.6.2– Acción virucida directa del BLBu a diferentes condiciones de tratamiento.

La interacción del tiempo, concentración y temperatura mínima para la acción virucida directa del extracto se realizó mediante el diseño que aparece en la Tabla 2.

**Tabla 2. Variantes de ensayo virucida directa (*in vitro*) del extracto de granada (BLBu) frente a la Influenza A/Mississippi/ 1/85 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).**

Tratamiento	Concentración ( µg / mL)	Tiempo (minutos)	Temperatura (° C)
1	1 000	60	*TA
2	1 000	60	37
3	1 000	60	4
4	1 000	30	TA
5	1 000	30	37
6	1 000	30	4
7	1 000	15	TA
8	1 000	15	37
9	1 000	15	4
10	200	60	TA
11	200	60	37
12	200	60	4
13	200	30	TA
14	200	30	37
15	200	30	4
16	200	15	TA
17	200	15	37
18	200	15	4
19	125	60	TA
20	125	60	37
21	125	60	4
22	125	30	TA
23	125	30	37
24	125	30	4
25	125	15	TA
26	125	15	37
27	125	15	4

\*TA: temperatura ambiente (25± 1°C).

La presencia o no de la hemaglutinina del virus en cada una de las muestras tratadas, fueron medidas por la técnica HA (Burlleson *et al.*, 1992). Los valores medios de los títulos hemaglutinantes encontrados indicaron la acción virucida. Se procesaron estadísticamente los resultados.

### **III.6.3- Evaluación de la infecciosidad de diferentes cepas de influenza por la acción virucida directa del BLBu.**

Para este estudio se seleccionaron las cepas: Influenza A/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>); Influenza A/URSS/3/85(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>); Influenza A/Singapur/6/86(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) y la Influenza A/Chile/2/83(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>). Se mezclaron V/V de 4 mg/mL del extracto y 10 DIE<sub>50</sub> de virus respectivamente, para una concentración final de 2mg/mL. Estas mezclas fueron incubadas a 37°C, durante una hora e inoculadas por la vía alantoidea (200µL/embrión), a grupos de 30 embriones/dilución. Los embriones se incubaron a 35 °C y a 80% de humedad relativa, durante 48 horas. Se colectaron los líquidos alantoideos y se les determinó el título HA y las respectivas DIE<sub>50</sub> (Reed y Muench 1938; Burlleson *et al.*, 1992).

### **III.6.4-Acción del BLBu sobre las proteínas del virus influenza.**

Para el estudio electroforético de las proteínas virales, las cepas de influenza seleccionadas con títulos infectivos equivalentes a 8u HA y 100 DIE<sub>50</sub>, fueron previamente concentradas por ultracentrifugación a 150, 000 g por 30 minutos, (ultracentrífuga Beckman L7-65), luego de una clarificación previa a 10,000 r. min<sup>-1</sup>, en una centrífuga Beckman, modelo J-6B (Barret e Inglis, 1985).

Para el tratamiento del virus concentrado con el BLBu, se mezclaron volúmenes iguales del virus y una solución de BLBu 4 mg/mL (concentración final de 2 mg/mL) y las mezclas se incubaron 25°C y 37°C, por una hora. Las electroforesis de las proteínas totales (Laemmli, 1970) de las muestras preparadas anteriormente, se realizaron según estos autores. Se utilizó dodecil sulfato de sodio (SDS) como detergente aniónico, para facilitar la separación de las proteínas por su masa molecular. Se empleó el gel separador al 10 % y el gel concentrador al 5 %. La concentración de acrilamida fue del 30 y 8 % respectivamente. El tiempo de polimerización de los geles fue 45 minutos y sus dimensiones: 6 cm de altura, 8 cm de

ancho, 0.1 cm de grosor para el gel separador y 1 cm para el gel concentrador. A 100  $\mu$ L de las muestras se les incorporó  $\beta$ -mercaptoetanol y se calentaron 5-10 minutos. Se emplearon los patrones de masa molecular de 27.0 a 74.9 k Da, donados por el Laboratorio de Control de la Calidad del Instituto Finlay, Cuba. Estos fueron:

Proteína.....	Masa Molecular (KDa).
Proteína 70K (Vacuna VAMENGOC-BC).....	74.9.
Albúmina de suero bovina.....	67.0.
Cadena pesada de IgG humana.....	50.0.
Proteínas P1 ó P40 (VAMENGOC-BC).....	41.8.
Cadena ligera de IgG humana.....	27.0.

En los geles se aplicaron 20  $\mu$ L de las muestras, el extracto BLBu y el líquido alantoideo sin infectar y 10  $\mu$ L de los patrones de masa molecular. Los parámetros de la corrida fueron: corriente constante de 35 mA, voltaje variable de 100-240 V y tiempo de corrida una hora y 45 minutos aproximadamente. Se utilizó una fuente LKB-EPS 500/400. Luego de la corrida, los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie una hora, a temperatura ambiente y luego decolorados.

Densitometría: Los geles decolorados fueron leídos en un microdensitómetro láser LKB Bromma, modelo 2202 Ultrascan, con un registrador integrador acoplado. Se empleó una velocidad de 40 mm/minuto y una sensibilidad igual a uno.

Para la determinación de las masas moleculares a cada corrida electroforética, se realizó un gráfico de log de las masas moleculares de los patrones contra los respectivos valores de tiempo de retención (RT) en segundos, como medida de la movilidad relativa de cada banda, medidos con el densitómetro. La masa molecular de las proteínas virales se determinó interpolando en los gráficos correspondientes los valores RT de cada banda proteica (Chávez *et al.*; 1990).

Para determinar la concentración de las proteínas de las muestras virales tratadas y sin tratar, se utilizó el método de Lowry y los valores obtenidos sirvieron para calcular los  $\mu$ g de proteína de cada una de las bandas de las corridas electroforéticas (Lowry *et al.*; 1951). La curva de calibración se preparó con albúmina de suero bovina (BSA) a una concentración de 0.2 mg/mL. Para las lecturas se utilizó un espectrofotómetro marca Phillips.

### **III.7 – Acción del BLBu frente a la apoptosis inducida por el virus Influenza A en células MDCK.**

#### **III .7. 1- Ensayo de citotoxicidad del BLBu sobre las células MDCK.**

Para determinar si el extracto vegetal en estudio tenía algún efecto tóxico sobre la línea celular MDCK, se empleó la técnica del MTT propuesta por Mossman y modificada por Watanabe y Rodríguez (Mosman, 1983; Watanabe, 1994 y Rodríguez *et al.*, 1997).

Toxicidad del extracto de granada: Este estudio de citotoxicidad en las MDCK requirió la preparación de una solución madre de 10 mg/mL del extracto vegetal. A partir de ésta última se realizaron diluciones de trabajo a concentraciones de: 25, 50, 100, 200, 250, 500, 700 y 1000 µg / mL respectivamente. Las células MDCK fueron tratadas con las diluciones del extracto antes referidas, en pocillos separados y con 8 réplicas por dilución. Se observaron diariamente bajo el microscopio óptico para detectar algún efecto citotóxico. Transcurridos 5 días de incubación con las respectivas diluciones de tratamiento, se añadió 10 µL del reactivo de MTT a cada pocillo. Las placas de cultivo se incubaron durante 3 horas a 37<sup>0</sup>C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> y humedad relativa de 95%. Posteriormente se eliminó el medio de cultivo de los pozos, se añadieron 100 µL por pozo de isopropanol – ácido y se agitó la placa. La lectura se realizó en el lector de microplacas (marca Multiscan MCC/304C, de Pharmacia) a una longitud de onda de 540 nm. Se emplearon como controles del experimento, las células sin aplicación de las diluciones de extracto en estudio, con su medio de cultivo y con las mismas condiciones de incubación que las tratadas. Los resultados del estudio de citotoxicidad fueron expresados como porcentaje de la absorbancia relativas a los controles (células sin tratar), definidos como el 100%. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado con un número de n = 8. El % de viabilidad se calculó mediante la expresión siguiente:

$$\% \text{ de viabilidad} = 100 - [(1 - DO_m / DO_c) \times 100]$$

Donde: DO<sub>m</sub> es la densidad óptica de la muestra y DO<sub>c</sub> la densidad óptica del control de células.

El % de viabilidad sirvió para calcular la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>), a través del cálculo del coeficiente de determinación de la regresión (programa Excel).

### **III.7.2- Estudio de la fragmentación del ADN en la línea celular MDCK tratadas con el BLBU.**

Para conocer si el extracto BLBU era capaz de inducir la apoptosis de las células MDCK, se evaluaron los tratamientos con el extracto a las concentraciones que no resultaron citotóxicas en MDCK, es decir: 25 µg / mL, 50 µg / mL y 100 µg / mL respectivamente. Para cada concentración del extracto, las células fueron tratadas a diferentes tiempos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48 y 72 horas con las diferentes diluciones del extracto antes referidas y a razón de tres réplicas por tratamiento. El control positivo para observar la fragmentación del ADN consistió en el tratamiento con clorhidrato de amantadina (100 mg/mL) aplicado durante 24 horas, a dichas células.

### **III.7.3- Inducción de la apoptosis por el virus Influenza A/Japan /10/99 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) en la línea celular MDCK.**

La titulación del virus influenza en la línea celular MDCK fue realizada mediante el método de conteo de placas (Tobita *et al.*, 1975) con ligeras modificaciones: agar al 1% como suplemento del medio de cultivo, el tiempo en que el medio de cultivo agarizado fue retirado (36 horas) y la concentración de violeta cristal empleada en la coloración de las placas (0.5%). El título viral calculado sirvió para utilizarlo en el ensayo de baja multiplicidad y la variante de inhibición de la apoptosis, con la aplicación del extracto vegetal 1 hora posterior a la infección.

Inducción de la apoptosis: se inoculó la línea celular MDCK a baja multiplicidad de infección (0.01 m.d.i.) con la cepa de virusantes titulada y la aparición de la apoptosis fue verificada mediante electroforesis de ADN nuclear. Para analizar la integridad del material nuclear, se realizó la electroforesis en gel de agarosa (Collins *et al.*, 1997; Walter *et al.*, 1997; Alfaro *et al.*, 2000), con algunas modificaciones que consistieron en: realizar la digestión en la propia placa de cultivo y reducir el tiempo de digestión con la proteinasa K. Para el procesamiento de las muestras, se extrajo el medio celular de mantenimiento de cada pozo (unidad experimental) y las monocapas celulares fueron lavadas con PBS 1X estéril. Se adicionó 200 µl de tampón de extracción que contenía 10 µg/mL de proteinasa K (Kocher *et al.*, 1989). La digestión se llevó a cabo durante una hora 37<sup>0</sup>C, en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 94%. Las muestras fueron colectadas para el análisis del ADN.

LA extracción y purificación del ADN total de las muestras colectadas, se realizó según el protocolo siguiente: se adicionó V / V a cada una de estas una solución de fenol / cloroformo y se agitó en un rotoevaporador por 10 minutos. Se centrifugaron a 8,000 r. min<sup>-1</sup> durante 5 minutos y se transfirió la fase acuosa a otro tubo de Eppendorf. La fase acuosa se extrajo nuevamente con igual volumen de cloroformo y se hizo rotar durante 10 minutos. Se centrifugó por 5 minutos a 8000 rpm de nuevo. A dicha fase acuosa se le añadió ½ volumen de NH<sub>4</sub> Ac 10 nM pH 7.2 y 2 volúmenes de isopropanol. Las muestras obtenidas se almacenaron a -20°C de 2 a 24 horas. Para recuperar el ADN se centrifugó a 12,000 r. min<sup>-1</sup> por 15 minutos. La solución alcohólica fue eliminada y el precipitado se lavó con 200 µL de etanol al 70%. Se procedió a centrifugar a 12,000 r. min<sup>-1</sup> por 10 minutos. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente (5 -10 minutos) y se resuspendió en buffer TE 1X pH 8.00. Se realizaron las electroforesis del ADN en geles de agarosa al 1% en buffer TBE1X (TRIS –Base 0.89 mM, EDTA 20 nM). Se aplicaron 8 µl de las muestras de ADN mezclado con 2 µL de la solución de corrida (bromo fenol azul 0.01 %, EDTA 10mM). El tiempo de electroforesis fue de aproximadamente 45 minutos a 50 Volts (Kocher *et al.*, 1989). Se analizó el metabolismo celular midiendo la actividad mitocondrial por la técnica del MTT (Mossmann, 1983; Walter *et al.*, 1998; Uchide *et al.*, 2002).

### III.7.3.1- Capacidad del BLBu de inhibir la apoptosis.

La cepa de Influenza A/Japan/10/99/ (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) titulada en la Línea celular MDCK, fue utilizada a baja multiplicidad de infección (m. d. i.) y la variante de aplicación del extracto 1 hora p. i, de acuerdo al siguiente esquema de trabajo (Tabla 3).

**Tabla 3. Tratamiento de las células MDCK infectadas con influenza con el BLBu a diferentes concentraciones y tiempos de incubación.**

Tiempo de tratamiento (horas)	Concentración del BLBu (µg/mL)	Concentración del BLBu (µg/mL)	Concentración del BLBu (µg/mL)
24	25	50	100
48	25	50	100
72	25	50	100

\*se realizaron 3 réplicas de cada uno de los tratamientos.

El análisis de la fragmentación del ADN y el efecto sobre la viabilidad celular en este experimento, se verificó de manera similar a la descrita anteriormente. Se realizó el análisis estadístico de los resultados.

### **III.8- Estudio de la acción antiviral del extracto vegetal liofilizado (BLBu) en el modelo experimental de gripe en ratones de la línea Balb/C.**

#### **III.8.1- Montaje y evaluación del biomodelo.**

En el montaje y evaluación del modelo se utilizaron ratones de la línea Balb/C, embriones de pollo y la cepa de virus Influenza A/Sydney/5/97/ (H<sub>3</sub> N<sub>2</sub>), todas las labores prácticas fueron realizadas en el bioterio del IPK, con el cumplimiento estricto de las Normas de Bioseguridad vigentes allí. Las tareas en la implementación del biomodelo fueron:

Adaptación del virus al ratón: la adaptación de la cepa de influenza al tejido pulmonar del ratón fue realizada mediante pases seriados del virus en la línea de ratón seleccionada. Como inóculo inicial se empleó la cepa viral previamente evaluada: título HA: 64 u y una DIE<sub>50</sub> de  $10^{-5.75}$ .

A partir del primer pase, se prepararon macerados de pulmón a partir de los animales infectados y controles (inoculados con PBS estéril). Los macerados de pulmón se prepararon con arena sílice estéril, hasta lograr una concentración final del 10% p / v, los que constituyeron los inóculos para los pases de virus (adaptación). Del total de animales, seleccionados al azar, se creó el grupo control (10 ratones/caja), que fueron inoculados con PBS solamente. El inóculo (50 µL de la cepa viral o el PBS), se les administró a los ratones previamente anestesiados, a razón de 25 µL / fosa nasal.

Se detectó la presencia del virus influenza a las muestras de los pulmones: HA y DIE<sub>50</sub> y se destinaron porciones de tejido pulmonar para el estudio anatomopatológico.

Se verificó la ganancia de peso corporal de todos los ratones, durante siete días con una balanza marca Sartorius, de exactitud menor de 0.01g y se observó la evolución clínica de cada uno de los animales en estudio. La evaluación de los signos y síntomas clínicos se realizó de acuerdo al sistema de puntaje (Cook *et al.*, 1998), mediante el esquema que se presenta en la Tabla 4.

**Tabla 4. Categorías clínicas agrupadas de acuerdo al puntaje asignado.**

Puntaje	Signos y síntomas clínicos
1	Sano ,sin signos y síntomas de la enfermedad
2	Erizamiento ,en especial la zona del cuello y lomo
3	Erizamiento, respiración agitada, letargo (animales menos alertas)
4	Respiración forzada, temblores y letargo.
5	Paso o marcha anormal reducción de la movilidad respiración forzada, cianosis de la cola y las orejas.
6	Muerte.

La necropsia parcial de los animales (controles e inoculados), fue llevada a cabo en el gabinete de seguridad, Clase II. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical al tercer, cuarto y quinto día de evolución y se les practicó la extracción de sus pulmones, los que fueron divididos en dos grupos para el estudio virológico e histopatológico.

Estudio virológico: a todas las muestras se le determinó la dosis infectiva media de virus (DIE<sub>50</sub>) y la presencia de HA mediante los métodos antes referidos (Burlleson *et al.*, 1992).

Estudio histopatológico: para ello se examinaron 30 muestras de tejido pulmonar (de ratones inoculados y controles), las cuales fueron fijadas en formol al 4% en una cantidad 10 veces el valor del volumen del tejido pulmonar. El procesamiento de las muestras fue realizada en un procesador automático (marca Histokinette, VACUUM ROTATORY) que contiene doce vasos: 4 de alcoholes de gradación creciente (deshidratación), 4 de xiloles (aclaración) y 4 de parafinas licuadas (inhibición), durante 1 hora y media. Para la coloración de las muestras fue utilizada hematoxilina de Harris y eosina alcohólica (Borrajero *et al.*, 1983).

**Criterio de lectura:** en la muestra el núcleo de la célula se teñirá de azul, mientras que el cito plasma se verá teñido de rosado. Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio óptico (marca Olimpos, con cámara adaptada PANASONIC) y las fotografías fueron tomadas utilizando un programa ATIPLAY en formato WINDOWS NT. El examen de las preparaciones histológicas fue realizado en el

departamento de Anatomía del IPK y del HCQ J. Albarrán, sin la previa información a los patólogos acerca de la identificación de las muestras.

### III.8.2- Evaluación de la actividad antiviral del BLBu en el modelo de ratón.

Toda vez que se constató la validez y factibilidad del biomodelo experimental de gripe en la línea Balb/C, se procedió a la evaluación de la acción antiviral del extracto en estudio en este sistema experimental. Con éste fin se designaron cuatro grupos experimentales de 20 animales cada uno, seleccionados al azar. Dos grupos se emplearon para la administración del extracto (variante A y B) respectivamente (Tabla 5). Los otros dos restantes, sirvieron de control en el experimento. Al control positivo de virus, se les inoculó Influenza A/Sydney/5/ 97(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), adaptado al pulmón del ratón y previamente titulado ( $10^{-5.04}$  DIE<sub>50</sub> / 32u HA). El reto viral se realizó con el equivalente a 10 DIE<sub>50</sub>. Transcurridas 24 horas de la inoculación con el virus, se comenzó el tratamiento de los animales con el BLBu, que consistió en dosis únicas del extracto en estudio, durante cinco días. El grupo control negativo de virus (IV), fue inoculado con la mayor concentración del BLBu: 175mg / Kg peso / día. Se administró 25µL / fosa nasal del virus. Los síntomas y signos clínicos se observaron diariamente en todos los grupos de ratones y evaluados según la Tabla 4. El esquema de tratamiento aplicado, aparece en la Tabla 5.

**Tabla 5. Variantes A y B de tratamiento con el BLBu (vía intranasal u oral respectivamente) a ratones infectados con Influenza A/ Sydney/ 5/ 97(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).**

Grupo de ratones	Identificación de grupo de acuerdo a la variante de ensayo
I	Reciben por la vía intranasal * 10 DIE <sub>50</sub> (Control positivo de virus influenza).
II	(A) Reciben BLBu 175 mg/Kg de peso/día, por la vía intranasal u oral + *10DIE <sub>50</sub> .
III	(B) Reciben BLBu 50 mg/Kg/día de peso, por la vía intranasal u oral + *10 DIE <sub>50</sub> .
IV	Reciben BLBu 175mg/Kg de peso/día, por la vía intranasal u oral

\*DIE<sub>50</sub>: Dosis infectiva media en embrión de pollo.

Se colectaron las muestras de pulmones para el estudio anatomopatológico y se procesaron los títulos hemaglutinantes e infectivos virales de la muestras de pulmón de todos los animales involucrados en el experimento, así como los datos correspondientes a la variación de peso corporal.

### **III.9- Análisis estadístico de los datos.**

El procesamiento estadístico de los resultados del potencial antiviral del extracto de granada y de su espectro antiviral realizado en embriones de pollo, se llevó a cabo mediante tablas de contingencia 2 x 2 para el análisis de las variables 1, 10 y 100 DIE<sub>50</sub>. Se aplicó una prueba G de clasificación simple (Sigarroa, 1985). El análisis se realizó en el sistema MICROSTAT.

Para el estudio de la acción virucida directa del extracto se empleó un Análisis de Varianza Trifactorial modelo fijo, donde se consideraron las concentraciones 1000, 200 y 125 µg/mL, los tiempos 60, 30 y 15 minutos y las temperaturas ambiente (25 ± 1 °C), 37 y 4°C. Para comprobar las medias se empleó la prueba de Rangos Múltiples de Duncan. Antes del procesamiento estadístico se comprobó la normalidad por la Prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas por la Prueba de Bartlett.

Para la determinación de la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) se estimaron las ecuaciones de regresión entre los porcentajes de sobrevivencia y las concentraciones de extractos. A los datos muestrales se les determinó la homocidasticidad utilizando la prueba F máxima y la normalidad según la prueba de Kolmogorov-Smirnov de bondad de ajuste a la distribución. Para investigar la existencia de diferencias entre los tratamientos de inhibición de apoptosis por el BLBu, en cada experimento se utilizó un ANOVA de clasificación simple. En los casos en que se comparó la media del control con las medias de cada tratamiento se empleó la prueba de Dunnett y las medias entre tratamiento (dos a dos) y se compararon mediante la prueba t de Student (Sigarroa, 1985). Para ponderar la probabilidad de encontrar valores significativos (error tipo I) debido al azar en las comparaciones entre medias el valor de probabilidad de error (α), fue corregido según el método de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1995).

Todos los análisis se realizaron en una hoja de cálculo del programa Excel, de Windows 2000 (estadística descriptiva, homocidasticidad, ANOVA y Prueba de Dunnett).

Para el análisis estadístico del modelo de gripe en el ratón se evaluó la variación del peso corporal mediante un análisis de covarianza de clasificación simple (ANCOVA),

cuyas medias ajustadas fueron comparadas a partir de la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan (Sigarroat, 1985); las alteraciones histopatológicas del tejido pulmonar se procesaron mediante el programa Epi-Info versión 6.04 (CDC /Atlanta) en el que fueron introducidos todos los datos de las alteraciones observadas. Para el análisis de las variables se utilizó el estadístico chi cuadrado ( $\chi^2$ ), con la utilización de la corrección de Yates. Se realizó el análisis estadístico de los valores de títulos HA para los diferentes grupos utilizados en la evaluación del extracto BLBu y para los dos vías de administración. Para ello los datos se transformaron según  $\log(x+1)$  para emplear un análisis de Varianza de Clasificación Simple y se compararon las medias por la prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

#### IV- Resultados.

##### IV.1- Parámetros de calidad del BLBu.

##### IV.1.1-Tamizaje fitoquímico y Normalización de los extractos de granada.

Los resultados del control de calidad de la materia prima y los extractos preparados con las frutas de *Punica granatum* L. aparecen en la Tabla 6.

Tabla 6. Normalización\* de las frutas y los extractos de *Punica granatum* L. (granada).

Frutos de granada		Extractos de granada**		
Parámetro	Valores (%)	Parámetro	Extracto Hidroalcohólico	BLBu. Liofilizado
Humedad residual	81,00	Color	Carmelita claro	Amarillo intenso
Sustancias solubles	95,52	pH	4,3	5,5
Cenizas totales	0,53	(%)sólidos totales	0,02	0,999
Cenizas solubles en agua	0,48	Densidad relativa	1,00	1,009
Cenizas insolubles en CIH (10%)	0,42	Índice de refracción	1,375	1,339

\*Promedios de tres determinaciones. \*\* Resultados de tres lotes.

La determinación de los valores de las cenizas totales y las solubles en la materia prima resultó de gran utilidad, puesto que confirmaron la identidad y pureza del material de partida que se empleó en la preparación del extracto liofilizado. Los datos encontrados en la determinación de las sustancias insolubles en ácido clorhídrico, corroboraron estos hallazgos. Resultó muy útil conocer los valores del pH del extracto liofilizado, en el rango de 5 y 5,5. Este parámetro resulta de gran importancia para la infectividad viral, puesto que en el caso del virus influenza, el valor óptimo del pH es de alrededor de 5.5 en los eventos cruciales del ciclo de replicación, tales como adsorción y desnudamiento (Kostolansky *et al.*; 1988).

El tamizaje fitoquímico aportó datos de la presencia de metabolitos secundarios que están presentes tanto en el extracto hidroalcohólico, como en el liofilizado (BLBu). En este último, los flavonoides están presentes en un 0.73%, aspecto de gran importancia, por la actividad de estos compuestos frente a numerosos virus envueltos. Muy interesante resultó la detección de taninos y antocianinas por su actividad contra el virus influenza, de acuerdo a datos que refieren otros autores (Berghe *et al.*, 1985; Ivancheva *et al.*, 1992). En la Tabla 7, se reflejan los resultados de los componentes químicos determinados al extracto de granada BLBu.

**Tabla 7. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de las frutas de *Punica granatum* L. (granada).**

Ensayo	Metabolito	Extracto hidroalcohólico	Extracto liofilizado(BLBu)
Fehling	Carbohidratos reductores	+	+
Baljet	Cumarinas	+	N R
Espumas	Saponinas	+	+
Mucilagos	Mucílagos	+	+
Molish	Glicósidos	+	+
Cloruro férrico	Fenoles y/o taninos	+	+
Ninhidrina	Aminoácidos	-	-
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	-	-
Shinoda	Flavonoides	+	+
Antocianidinas	Antocianidinas	+	+
Buchard	Esteroides	-	-
Dragendorff	Alcaloides	+	-
Mayer	Alcaloides	-	-
Sabor	Principios amargos y astringentes	+	+
Flavonoides (totales) *	Flavonoides	0,63%	0,73%

\*Se refiere a los promedios de tres determinaciones. \*\* NR: No realizado

#### **IV.2.- Ensayos Antivirales en embriones de pollo.**

Los estudios toxicológicos del extracto de la granada (BLBu) resultaron de vital importancia para su futura evaluación como antiviral. A continuación se muestran los resultados de la embriotoxicidad de este extracto, considerando la importancia de la membrana corialantoidea y el líquido alantoideo para el desarrollo y viabilidad del embrión en el proceso de morfogénesis, así como la función que desempeñan en las etapas del desarrollo embrionario.

##### **IV.2.1- Toxicidad del BLBu en embriones de pollo.**

El estudio de embriotoxicidad aguda por la vía alantoidea, del BLBu y la amantadina (antiviral de referencia), arrojó los resultados que se muestran en la Tabla 8. Las concentraciones que produjeron una mortalidad menor del 25% en los embriones evaluados, posterior a las 72 horas en los exámenes de viabilidad, se seleccionaron para los estudios antivirales en embriones de pollo, o sea, 12,5 mg/mL para la amantadina y 2 mg/mL para el extracto BLBu.

**Tabla 8. Toxicidad del extracto liofilizado de la granada (BLBu) y la amantadina para los embriones de pollo.**

Sustancia a evaluar	Concentración (mg/mL) /embrión	Mortalidad (M/T)**	Mortalidad (%)*
Extracto liofilizado de granada	3	58/95	61.05
	2	18/95	18.94
	1	3/96	3.12
Clorhidrato de amantadina	50	60/95	63.15
	25	35/94	37.23
	12.5	5/95	5.26
Agua (vehículo)	0	2/94	2.15

\*Cada valor del % de mortalidad representa la media relativa a tres experimentos.

\*\*embriones muertos del total de embriones tratados.

El tratamiento que empleó 2mg /mL / embrión del BLBu, presentó una viabilidad superior al 80%. El control del vehículo en que se diluyó el extracto y la amantadina, en que solamente se inoculó el agua bidestilada estéril, 200 µ L / embrión, presentó un valor de mortalidad del 2,15%, lo que a nuestro juicio se debió fundamentalmente a los traumas propios de la inoculación y el traslado de los embriones de pollo, entre otros factores.

#### **IV.2.1.1 Acción antiviral preliminar del BLBu *in ovo* frente a diferentes (DIE<sub>50</sub>) del virus Influenza A/Mississippi/1/85 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).**

La medida de la reducción de la infectividad del virus en embriones de pollo, cuyo título infectivo de partida fue de 10<sup>-4,97</sup> DIE<sub>50</sub>, luego del tratamiento con el extracto vegetal y comparado con la amantadina, constituyó una determinación preliminar que sirvió de pauta para continuar o no el estudio de las propiedades antivirales del extracto. Se produjo la reducción de más dos log<sub>10</sub> de la infecciosidad del virus influenza en el embrión de pollo. Cuando el extracto vegetal BLBu, se administró posterior al reto viral, a diferentes dosis de virus infeccioso, quedó demostrada la propiedad antiviral del mismo y la capacidad de inhibir la replicación del virus influenza. El embrión de pollo es un sistema experimental muy sensible a la infección con este virus. Las Tablas 9 y 10 respectivamente, aportan los datos que permiten arribar a tales conclusiones.

**Tabla 9. Embriones con presencia de la hemaglutinina (porcientos HA) \* detectados después del tratamiento con el BLBu (2mg/mL) y la amantadina (12,5mg/mL), frente al reto con influenza A/Mississippi/1/85 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).**

DIE <sub>50</sub>	Control positivo de virus.		Embriones tratados con amantadina		Embriones tratados con el BLBu.	
	(HA +)	(HA-)	(HA +)	(HA-)	(HA +)	(HA-)
<b>1</b>	47,5%	52,5%	40%	60%	30%	70%
<b>10</b>	45%	55%	55%	45%	35,5%	64,5%
<b>100</b>	52,5%	47,5%	45%	55%	47,5%	52,5%

\*Se refiere a los resultados de tres réplicas.

En la Tabla 9, se aprecia que cuando el reto consistió en 100 DIE<sub>50</sub>, de virus influenza, a pesar que se detectaron embriones negativos a la detección de la hemaglutinina del virus, la acción antiviral fue menos marcada y no significativa en el análisis estadístico.

**Tabla 10. Reducción de los títulos infectivos del virus influenza tratada con amantadina y el extracto BLBu una hora posterior a la infección.**

Cepa A/ Mississippi /1/85 (H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	Log del título infectivo (DIE <sub>50</sub> )	Índice de reducción
Control	4,97	----
Tratada con amantadina	3,05	83.20
Tratada con BLBu	2,31	457.10

#### **IV.2.1.2- Acción antiviral del BLBu en embriones de pollo una hora posterior y una hora antes del reto con la Influenza A/Mississippi/1/85 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).**

En los estudios de antivirales, es de gran utilidad investigar si esta acción contra el virus se ejerce previa y/o posterior al inicio de la infección.

Como se aprecia en la Figura 1, cuando se suministró el extracto de granada, BLBu, una hora posterior a la infección (p. i.) a ambas concentraciones, se manifestó una acción antiviral con significación estadística, a excepción del tratamiento frente a 100 DIE<sub>50</sub> (Figura1 y laTabla 11).

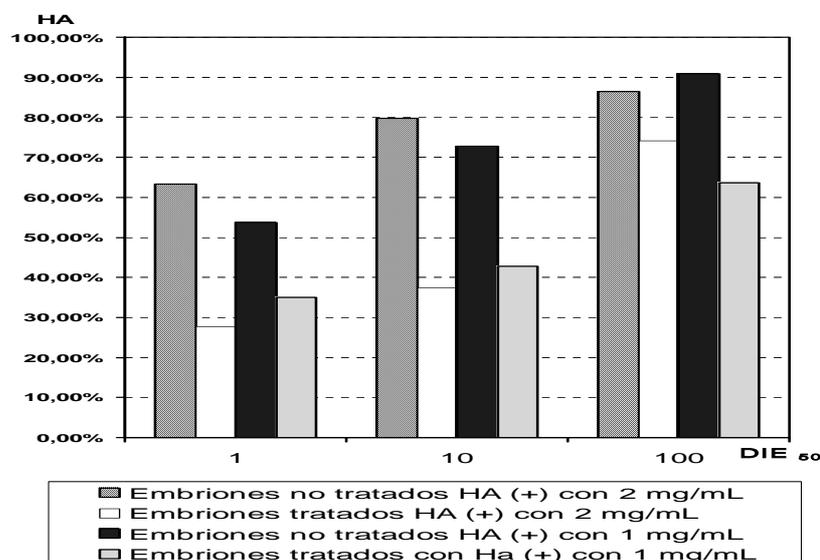


Figura 1. Porcentaje de embriones HA (+) tratados con 1 y 2 mg/mL del extracto una hora posterior a la infección frente a la cepa Influenza A/Mississippi/1/85 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) y sus respectivos controles.

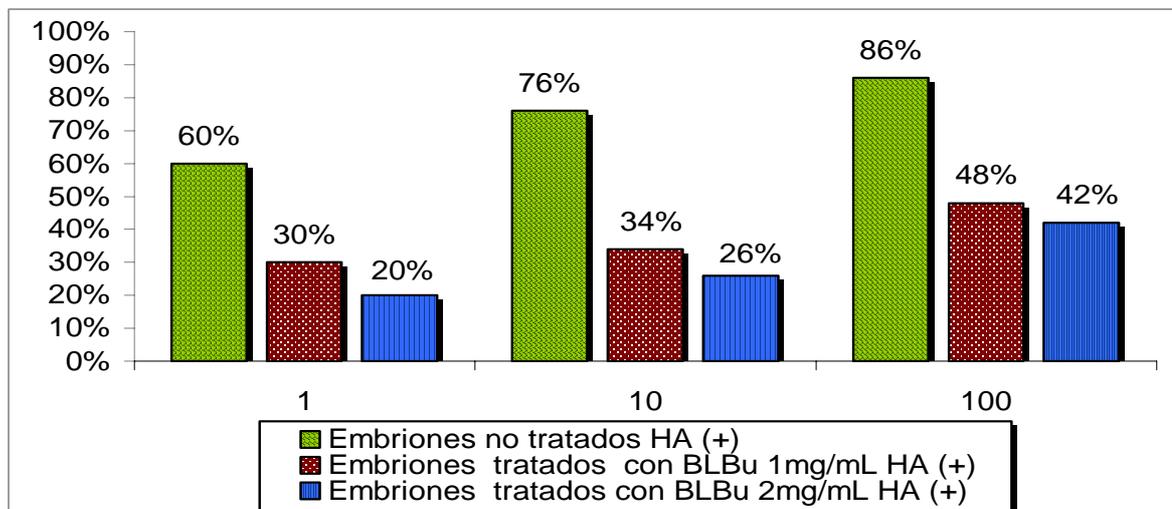
Tabla 11. Análisis estadístico de los resultados del tratamiento a embriones una hora posterior a la infección (p. i.) con influenza A/Mississippi/1/85 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).

Concentración del BLBu (Tratamiento p. i.)	DIE <sub>50</sub>	X <sup>2</sup>	Probabilidades
1 mg/mL	1	8,962**	p < 0,01
	10	9,073**	p < 0,01
	100	3,556 <sup>n.s</sup>	p > 0,05
2 mg/mL	1	21,525***	p < 0,01
	10	30,912***	p < 0,01
	100	3,942 <sup>ns</sup>	p < 0,01

Análisis estadístico: Chi Cuadrado de Proporciones. Diferencias estadísticas indicadas por asteriscos: \* p < 0,05.

DIE<sub>50</sub>: dosis infectivas media por embrión.

Los resultados del tratamiento con el BLBu a los embriones de pollo, antes de infectarlos con dosis crecientes del virus influenza, así como el correspondiente análisis estadístico, se muestran en la Figura 2 y laTabla 12, respectivamente.



**Figura 2. Porcentaje de embriones HA (+) tratados con 1 y 2 mg/mL del extracto BLBu una hora antes de la infección con la Influenza A/Mississippi/1/85 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) y sus respectivos controles.**

Los resultados antes expuestos, indicaron una acción antiviral del BLBu independiente del momento del tratamiento, antes o después de la infección con el virus, pero se observó una respuesta mejor, cuando la concentración del extracto aumentó a 2 mg/mL y éste se administró antes del reto con el virus influenza. En esta última modalidad de tratamiento, los resultados altamente significativos en el análisis estadístico, confirmaron esta apreciación (Tabla 12).

**Tabla 12. Análisis estadístico de los resultados de los tratamientos con 1 y 2 mg/mL del BLBu, una hora(a i), frente al reto con Influenza A/Mississippi/1/85 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).**

Concentración del BLBu (1 hora a. i.)	DIE <sub>50</sub>	X <sup>2</sup>	Probabilidad
1 mg/mL	1	8,032**	p < 0, 01
	10	15,913***	p < 0, 001
	100	5,027*	p < 0, 001
2 mg/mL	1	15,521***	p < 0, 001
	10	24,030***	p < 0, 001
	100	6,081*	p < 0, 001

Análisis estadístico: Chi Cuadrado de Proporciones. Diferencias estadísticas indicadas por asteriscos: \* p < 0,05. DIE<sub>50</sub>: dosis infectivas media por embrión.

Cuando este extracto se suministró una hora posterior a la infección en el embrión de pollo, que es un tiempo suficiente para que se inicie la infección del virus, también se produjeron reducciones estadísticamente significativas de los títulos infectivos.

Cuando este extracto vegetal se suministró una hora antes de la infección, a pesar que estuvo durante todo ese tiempo expuesto a la acción biológica del líquido

alantoideo, o sea, a las condiciones propias de los tejidos embrionarios, se apreció una reducción más marcada de la infectividad,. Todos estos hallazgos, permitieron concluir que el BLBu, tiene acción antiviral *in ovo* frente a la cepa Influenza A/ Mississippi/ 1/85 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).

#### **IV.2.1.3 - Espectro antiviral del BLBu frente a diferentes tipos de influenza *in ovo*.**

En este estudio se incluyeron cepas de influenza B y de influenza A, de diferentes hemaglutininas y neuraminidasas, tanto de referencia como aislamientos cubanos de esta última, lo que permitió apreciar mejor el espectro de acción antiviral del BLBu.

En las Tablas 13 y 14, se informan los resultados de la acción del liofilizado BLBu en el embrión de pollo, al reducir el porciento de aquellos que fueron positivos en la prueba de hemaglutinación, dado por el papel crucial que juega esta proteína durante la infección.

La neutralización de la infectividad de las cepas de influenza, corroboró la acción antiviral del extracto liofilizado en el embrión de pollo, los que resultan muy sensibles a la infección con el virus influenza y brindan la posibilidad de evaluar la acción antiviral de extractos naturales y en particular los de origen vegetal frente a este virus.

Los resultados hallados para el BLBu, confirmaron la acción de este extracto frente al virus (tabla 13) confirmado por el correspondiente análisis estadístico.

**Tabla 13. Porcentaje de embriones con hemaglutinina (+) y (-) tratados con 2 mg/mL del BLBu, 1 hora p. i., frente a diferentes DIE<sub>50</sub> de virus Influenza.**

DIE <sub>50</sub>	Embriones no tratados		Embriones tratados (BLBu)		Estadígrafo G
	HA(+) %	HA(-) %	HA(+) %	HA(-) %	
A/Mississippi/1/85 (H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )					
1	70	30	12.5	87.5	26,772***
10	95	5	25	75	42,926***
100	97.5	2.5	37.5	62.5	4,690 <sup>ns</sup>
A/URSS/3 /85/ (H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )					
1	35	65	10	90	6,020*
10	95	5	25	75	42,926***
100	100	0	35	65	3,859 <sup>ns</sup>
A/Habana/299/88/(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )					
1	32.5	67.5	2.5	97.5	11,760***
10	87.5	12.5	0	100	72,273***
100	97.5	2.5	0	100	2,085 <sup>ns</sup>
A/Holguín/2/ 92/(H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )					
1	67.5	32.5	5	95	34,923***
10	90	10	2.5	97.5	69,523***
100	95	5	32.5	67.5	4,923 <sup>ns</sup>
A/Singapur/6/86/ (H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )					
1	65	35	10	90	25,326***
10	85	15	25	75	28,546***
100	90	10	35	65	5,326*
B/Ann Arbor/1/86					
1	67.5	32.5	5	95	34,923***
10	90	10	15	85	28,648***
100	90	10	32.5	67.5	2,690 <sup>ns</sup>
A/Chile /2/83(H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )					
1	66.5	32.5	5	95.5	34,922***
10	90.11	9.9	2.5	97.	69,532***
100	95	5	32.5	67.5	4,923 <sup>ns</sup>

Leyenda: prueba G de clasificación simple. Probabilidad: \* p < 0.05. \*\*\* p < 0.001.

**Tabla 14. Títulos infectivos de virus Influenza A y B, controles y tratados con BLBu (2 mg/mL), una hora (p. i.) y los índices de reducción de la infectividad respectivos.**

Cepas de influenza	DIE <sub>50</sub>	DIE <sub>50</sub> tratado	Índice Reducción de la infectividad viral (antilogaritmo)
A/Mississippi/1/85 (H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	10 <sup>-6,63</sup>	10 <sup>-3,31</sup>	2,089.0
A/URSS/3 /85/ (H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	10 <sup>-6,31</sup>	10 <sup>-3,12</sup>	1,585.0
A/Habana/299/88/(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	10 <sup>-5,70</sup>	10 <sup>-2,00</sup>	5,012.0
A/Holguín/2/ 92/(H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )	10 <sup>-4,62</sup>	10 <sup>-2,29</sup>	3,3088.0
A/Singapur/6/86/ (H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )	10 <sup>-6,51</sup>	10 <sup>-3,45</sup>	1,413.0
B/Ann Arbor/1/86	10 <sup>-6,35</sup>	10 <sup>-3,91</sup>	275.4
A/Chile /2/83(H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )	10 <sup>-6,73</sup>	10 <sup>-3,85</sup>	758.6

### IV.3- Actividad virucida directa del BLBu frente al virus Influenza A.

El estudio de la acción virucida directa del BLBu permitió conocer las potencialidades antivirales del mismo, a la vez que ayudó a dilucidar posibles mecanismos de acción involucrados en la acción antiinfluenza.

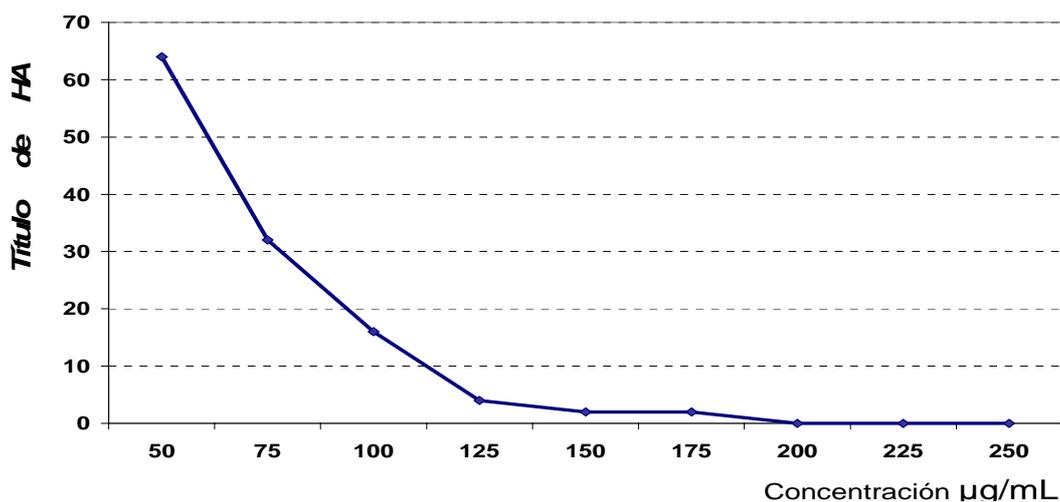


Fig 3. Título hemaglutinante del virus influenza A en dependencia de la concentración del extracto (25°C, 60 minutos).

En la Figura 3 se exponen los resultados de la acción virucida directa del BLBu. La región de la curva con valores de concentración entre 50  $\mu\text{g/mL}$  y 125  $\mu\text{g/mL}$ , muestran una relación lineal de esta acción con respecto a la concentración del extracto, con un coeficiente de correlación de -0.9471. Se deduce, por tanto, que la reducción de los títulos hemaglutinantes del virus influenza, están en dependencia directa de la concentración del BLBu. Este dato será de utilidad para realizar estudios preclínicos futuros.

Con la finalidad de estudiar la interacción de las variables se realizaron los ensayos en los que se combinaron concentración, temperatura y tiempo y de esta manera conocer el resultado de la interacción de estas en la acción antiviral descrita con anterioridad. Este estudio permitió encontrar las variantes óptimas de tratamiento virucida cuyos resultados se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15. Combinaciones de tratamiento virucida directa con el BLBu capaces de inhibir la detección de hemaglutinina a la cepa Influenza A/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).**

Número	Tratamiento	Media	Duncan
19		2.000 000	a
20		2.000 000	a
15		1.227 778	b
12		1.666 670	b
13		1.055 556	b, c
10		1.000 000	b, c
18		1.000 000	b, c
21		0.888 889	c
14		0.777 778	c
22		0.777 778	c
23		0.777 778	c
26		0.777 778	c
25		0.722 222	c
17		0.722 222	c
27		0.666 667	d
16		0.666 667	d
24		0.666 667	d
11		0.555 556	d
1	125 µg/mL, 60 minutos, (t a)	0.180 556	e
7	125 µg/mL, 15 minutos,(t a)	0.972 222	e
8	125 µg/mL, 15 minutos, 37°C	0.902 778	e
4	125 µg/mL, 30 minutos, (t a)	0.868 056	e
2	125 µg/mL, 60 minutos, 37°C	0.763 889	e
5	125 µg/mL, 30 minutos, 37°C	0.763 889	e
3	125 µg/mL, 60 minutos, 4°C	0.659 722	e
9	125 µg/mL, 15 minutos, 4°C	0.590 278	e
6	125 µg/mL, 30 minutos, 4°C	0.555 556	e

Leyenda: temperatura ambiente (t a) 25±1 °C  
 $S_{xabc} = 0.595 546$

A partir de los datos recogidos en la Tabla 15, se concluyó que la variante de ensayo que utilizó 125 µg/mL, con independencia del tiempo y la temperatura de tratamiento, resultó suficientemente efectiva para reducir la presencia de hemaglutinina del virus influenza.

El tiempo mínimo para ejercer la acción virucida directa el BLBu, resultó ser de 15 minutos. También se concluyó que la acción virucida directa del extracto estuvo siempre presente en las diferentes temperaturas probadas.

Otras cepas de influenza A que se sometieron a similar estudio, mostraron igual comportamiento a la cepa A/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) aquí mostrada.

De igual modo, los índices de reducción de la infectividad en las cepas de virus influenza por la acción directa del BLBu, fue mayor de cien, ya que los títulos infectivos disminuyeron dos y tres Log<sub>10</sub> DIE<sub>50</sub>, en todos los tratamientos.

Estos resultados apoyaron la acción antiviral referida para la cepa Influenza A/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) al inicio de este estudio. Los resultados de reducción de la infectividad, se refieren en la Tabla 16.

**Tabla 16. Títulos infectivos de virus Influenza A (DIE<sub>50</sub>) y los índices de reducción de la infectividad luego del tratamiento directo con BLBu.**

Cepas de influenza	DIE <sub>50</sub>	DIE <sub>50</sub> tratado	Índice Reducción de la infectividad viral (antilogaritmo)
A/Mississippi/1/85 (H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	10 <sup>-6,63</sup>	10 <sup>-2,11</sup>	33,120
A/URSS/3 /85/ (H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	10 <sup>-5,81</sup>	10 <sup>-2,02</sup>	6,166
A/Singapur/6/86/ (H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )	10 <sup>-6,51</sup>	10 <sup>-3,45</sup>	1,148
A/Chile /2/83(H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )	10 <sup>-6,73</sup>	10 <sup>-2,55</sup>	15,140

A continuación se exponen los datos de estudio de la acción del extracto sobre las proteínas de este virus.

#### **IV. 3.1- Acción directa del BLBu sobre las proteínas del virus influenza A.**

La acción del BLBu sobre las proteínas del virus, requirió la determinación previa de los parámetros de calidad al material viral de partida, empleados en este estudio. Los datos obtenidos aparecen en la Tabla 17.

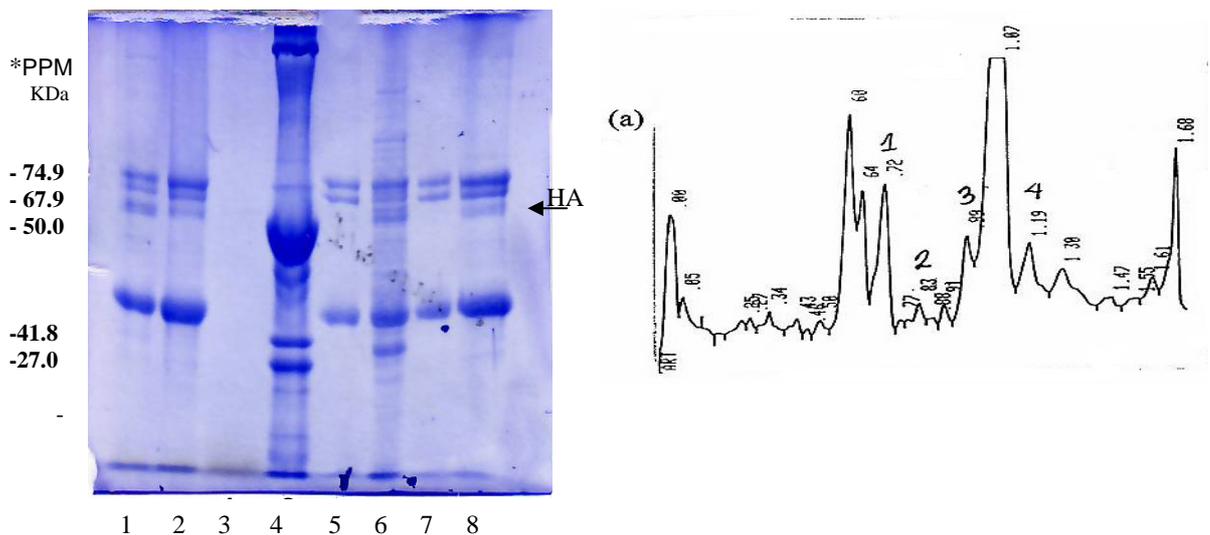
**Tabla 17. Valores de los títulos de HA y concentración de proteínas de las cepas de influenza A y del BLBu.**

Cepas	Título hemaglutinante	Concentración de proteínas ( µg / mL)
A/Victoria/ 3/75(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1:256	3.23
A/Mississippi/1/85/(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1:64	3.61
A/Habana/299/88/(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1:64	3.44
A/Singapur/6/86/(H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )	1:512	4.80
A/Holguín/24/7/93(H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )	1:128	12.90
BLBu (2 mg/mL)	(-)	2.4

Los hematíes de pollo se usan con frecuencia en las técnicas para la detección del virus influenza, por lo que resultó de gran valor determinar que al extracto de granada no es capaz de aglutinar ni de provocar la lisis de los glóbulos rojos de pollo, aún a concentraciones mayores a las utilizadas en los diferentes experimentos expuestos en este trabajo.

Los resultados de la acción del extracto de granada sobre las proteínas constitutivas del virus influenza, a la concentración de 2 mg/mL, a diferentes temperaturas de incubación, durante una hora, se exponen a continuación. En la Figura 4, de izquierda

a derecha, aparece la corrida electroforética de la cepa influenza A/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub> N<sub>2</sub>), tratada con el extracto de granada y las de las diferentes muestras de los controles del ensayo así como el densitograma correspondiente (Figura 4a).



**Figura 4. Perfil de corrida electroforética (SDS- PAGE) de la cepa Influenza A/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub> N<sub>2</sub>) tratada BLBu y sin tratar (37 y 25 °C), los controles de virus. En (a) se muestra el densitograma correspondiente a la corrida.**

La flecha a la derecha de la corrida indica la banda correspondiente a la hemaglutinina (HA).

- Carril 1: Influenza A/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub> N<sub>2</sub>), tratada 37°C.
- Carril 2: Influenza A/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub> N<sub>2</sub>), tratada 25°C.
- Carril 3: extracto de granada, incubado a 25°C
- Carril 4: patrón de pesos moleculares (PPM), incubado a 25°C.
- Carril 5: líquido alantoideo sin infectar, incubado a 25°C
- Carril 6: Influenza A/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub> N<sub>2</sub>) sin tratar, incubado a 37°C.
- Carril 7: líquido alantoideo sin infectar, incubado a 37°C.
- Carril 8: Influenza A/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub> N<sub>2</sub>) sin tratar, (25°C).

\*PPM: a la izquierda de la figura 4 aparecen los valores de los pesos moleculares del patrón.

Las proteínas de superficie del virus influenza HA, M1 y la NA fueron detectadas en las muestras de líquido alantoideo infectados. La corrida del líquido alantoideo sin tratar, que sirvió de control negativo de virus, aportó bandas de proteínas propias de esa muestra, las que no que interfirieron en la interpretación de los resultados del perfil electroforético típico del virus influenza.

En la Tabla 18, se exponen los valores correspondientes a los pesos moleculares de las bandas de interés, mostradas en la Figura 4.

**Tabla 18. Peso molecular estimado (PME\*), % de área y  $\mu\text{g}$  de proteína de las bandas de interés obtenidas en la electroforesis en SDS-PAGE de la cepa de influenza A tratada con BLBu y su respectivo control.**

A/Mississippi/1/85(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ) (control)				A/Mississippi/1/85(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ) (tratada)					
25 <sup>0</sup> C				37 <sup>0</sup> C			25 <sup>0</sup> C		
Proteína*	PME*	%	$\mu\text{g}$	PME	%	$\mu\text{g}$	PME	%	$\mu\text{g}$
NP	68.5	5.40	1.56	67.6	3.6	1.00	68.3	5.30	1.50
NA	58.6	0.30	0.10	60.3	0.1	0.10	59.0	0.30	0.10
HA1	53.0	1.50	0.48	50.8	1.4	0.30	50.8	2.60	0.70
M1/ HA2	33.1	0.40	0.12	31.3	0.5	0.10	32.0	9.30	2.60

\*PME expresado en kDa. NP: nucleoproteína. NA: neuraminidasa. HA: hemaglutinina 1.

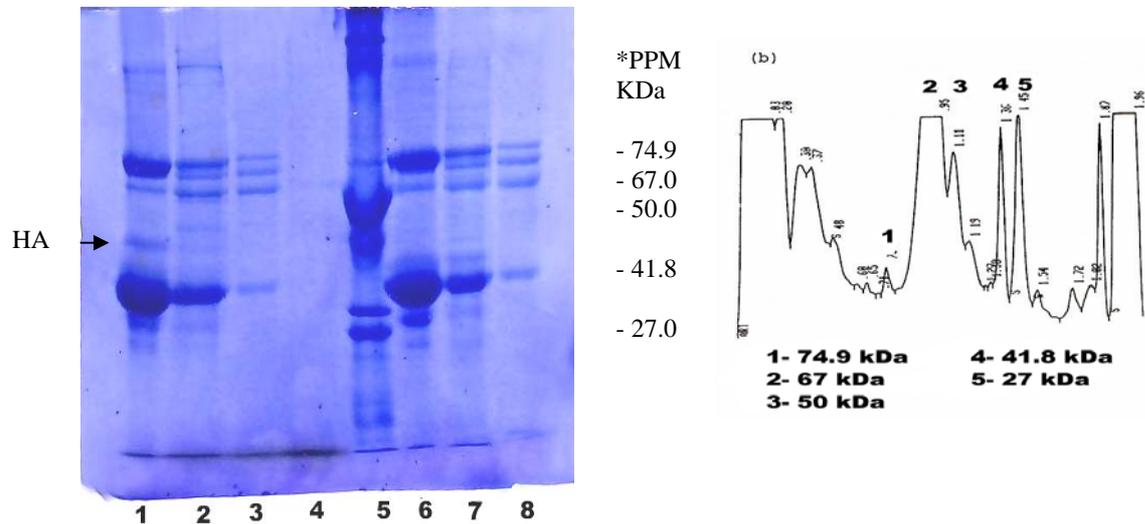
M1/ HA2: matriz / hemaglutinina 2.

Los pesos moleculares de las proteínas constitutivas del virus influenza, fueron estimadas a través de los densitogramas correspondientes, Figura 4 (a) y fueron referidos a la corrida del juego de patrones de pesos moleculares (carril 4, Figura 4). A la izquierda de las electroforesis que se muestran en dicha figura, fueron relacionados los valores de los pesos moleculares correspondientes a las proteínas integrantes del juego patrón.

La hemaglutinina, proteína marcadora de la presencia del virus en las muestras del líquido alantoideo, se detectó en las corridas de las muestras tratadas con el BLBu, así como en las de los controles de virus. Se observó que las cepas de influenza tratadas con el BLBu, a 37 y 25<sup>0</sup>C respectivamente, no mostraron variación del perfil electroforético con respecto al del virus sin tratar con el extracto (control +), cuyas corridas se muestran en la Figura 4.

En la corrida del BLBu (carril 2, Figura 4), no aparecieron bandas de proteínas, al menos en nuestras condiciones de trabajo, lo cual coincide con el hallazgo del estudio fitoquímico preliminar del BLBu antes expuesto. Este resultado para la corrida del BLBu, permitió deducir que las bandas de proteínas observadas en las electroforesis por SDS-PAGE, de las cepas de influenza tratadas con el extracto, eran las correspondientes al virus influenza y a las del líquido alantoideo respectivamente, ratificado por los perfiles de las cepas de virus sin tratar y los pesos moleculares calculados.

En las Figuras 5 y 6, se muestran las electroforesis correspondientes de otras cepas de influenza estudiadas, y los densitogramas respectivos (5b y 6c).



**Figura 5. Perfil de corrida electroforética (SDS- PAGE) del virus Influenza A/Victoria/3/75(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), tratada con el BLBu y sin tratar a 37°C y 25°C. En (b) aparece el densitograma correspondiente al patrón de pesos moleculares.**

- 1: InfluenzaA/Victoria /3/75(H<sub>3</sub> N<sub>2</sub>) tratada con BLBu (37<sup>0</sup>C).
- 2: InfluenzaA/Victoria /3/75(H<sub>3</sub> N<sub>2</sub>) tratada con BLBu (25<sup>0</sup>C).
- 3: líquido alantoideo tratado con el BLBu (2mg/mL), 37<sup>0</sup>C.
- 4: extracto BLBu (2mg/mL) incubado a 37<sup>0</sup>C, durante una hora.
- 5: patrones de pesos moleculares, (PPM) incubados a 37<sup>0</sup>C, durante una hora.
- 6: InfluenzaA/Victoria /3/75(H<sub>3</sub> N<sub>2</sub>) sin tratar con BLBu (37<sup>0</sup>C) durante una hora.
- 7: InfluenzaA/Victoria /3/75(H<sub>3</sub> N<sub>2</sub>) sin tratar con BLBu (25<sup>0</sup>C) durante una hora.
- 8: líquido alantoideo sin tratar con el extracto, incubado 25<sup>0</sup>C durante una hora.

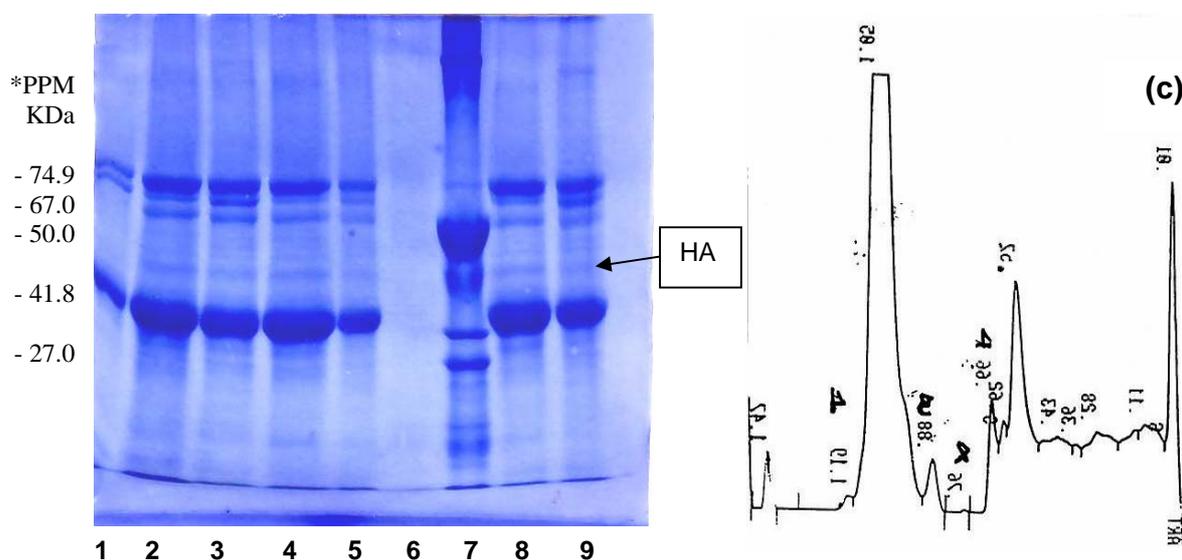
\*PPM: a la derecha de la figura 5 aparecen los valores de los pesos moleculares del patrón.

Los cálculos de los pesos moleculares de las proteínas de interés que correspondieron a las mencionadas electroforesis, aparecen en las Tablas 19 y 20 respectivamente. En dichas tablas se muestran las variaciones que se produjeron en las principales proteínas del virus de manera cualitativa y cuantitativa.

**Tabla 19. Peso molecular estimado (PME\*), % de área y µg de proteína de las bandas de interés, obtenidas en la electroforesis en SDS-PAGE de las cepas de Influenza A tratadas con el BLBu a 37 °C y 25 °C durante una hora.**

A/Victoria/3/75( H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ) control				A/Victoria/3/75( H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ) Tratada					
25°C				37°C			25°C		
Proteína	PME	%	µg	PME	%	µg	PME	%	µg
NP	67.60	4.50	1.22	67.60	3.60	0.96	67.50	5.80	1.54
NA	57.70	0.30	0.80	55.30	0.30	0.05	55.40	2.10	0.53
HA1	52.30	2.50	0.67	50.00	1.80	0.47	50.30	4.90	1.30
M1/HA2	31.30	1.10	0.28	30.00	0.40	0.11	30.70	2.60	0.69

\*PME expresado en kDa. NP: nucleoproteína. NA: neuraminidasa. HA 1: hemaglutinina. M1/HA2: matriz/hemaglutinina 2.



**Figura 6. Electroforesis (SDS-PAGE) de las cepas de influenza tratadas con el BLBu, los controles correspondientes. En (c) se muestra el densitograma de la corrida.**

1: perfil de la corrida del líquido alantoideo sin infectar.

2 y 3: perfiles correspondientes a la cepa A/Habana/299(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) tratada con BLBu a 37 y 25°C respectivamente.

4 y 5: perfiles correspondientes a la cepa A/Singapur/6/86(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) tratada con BLBu a 37 y 25°C.

6: Perfil de corrida del extracto liofilizado de granada (BLBu) incubado a 37°C.

7: Corrida del patrón de peso molecular (PPM).

8 y 9: perfiles correspondientes a la cepa A/Habana/299(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) y A/Singapur/6/86(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>), sin tratar, incubadas a 37°C y 25°C, respectivamente.

\*PPM: a la izquierda de la figura 6 aparecen los valores de los pesos moleculares del patrón.

Los datos encontrados para las cepas correspondientes a aislamientos cubanos no mostraron grandes diferencias en cuanto a sus perfiles y a los pesos moleculares de las proteínas estudiadas, incluso si se les compara con las cepas de referencia

Influenza A/Victoria/3/75(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) y la Influenza A/Singapur/6/86(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>). Un comportamiento similar mostró la Influenza A/Holguín/7/93(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>), aislamiento cubano, cuyos perfiles electroforéticos no fueron mostrados.

**Tabla 20. Peso molecular estimado (PME\*), % de área y µg de proteína de las bandas de interés obtenidas en la electroforesis en SDS-PAGE de las cepas de influenza A tratadas con el extracto durante una hora a 37°C y a temperatura ambiente (25°C).**

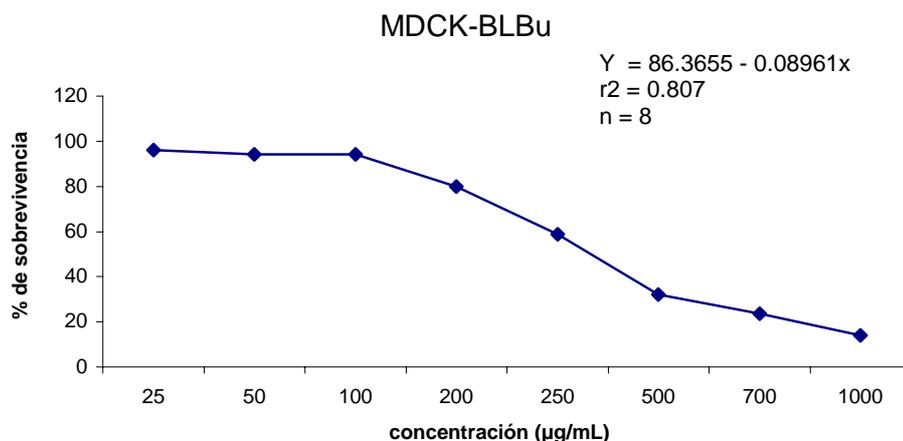
<b>A/Habana/299(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) control</b>				<b>A/Habana/299(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) tratada</b>		
<b>Proteína</b>	<b>PME</b>	<b>%</b>	<b>mg</b>	<b>PME</b>	<b>%</b>	<b>µg</b>
<b>NP</b>	67.00	20.10	5.54	68.00	16.9	4.68
<b>NA</b>	57.20	0.60	0.16	56.30	0.60	0.17
<b>HA1</b>	53.20	0.60	0.16	51.60	0.20	0.06
<b>M1/HA2</b>	33.00	2.40	0.67	32.50	0.50	0.14
<b>A/Singapur/6/86(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) control</b>				<b>A/Singapur/6/86(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) tratada</b>		
<b>Proteína</b>	<b>PME</b>	<b>%</b>	<b>µg</b>	<b>PME</b>	<b>%</b>	<b>µg</b>
<b>NP</b>	67.00	9.60	3.70	67.00	10.6	4.09
<b>NA</b>	57.20	1.00	0.38	60.50	4.80	1.86
<b>HA1</b>	45.30	5.00	1.91	50.20	0.80	0.31
<b>M1/HA2</b>	33.90	2.60	1.00	32.10	0.30	0.12
<b>A/Holguín/7/93(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) control</b>				<b>A/Holguín/7/93(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) tratada</b>		
<b>Proteína</b>	<b>PME</b>	<b>%</b>	<b>µg</b>	<b>PME</b>	<b>%</b>	<b>µg</b>
<b>NP</b>	67.0	4.40	1.69	70.0	3.20	1.22
<b>NA</b>	61.5	3.40	1.33	62.3	0.30	0.13
<b>HA1</b>	53.2	1.10	0.34	51.6	4.70	1.80
<b>M1/HA2</b>	33.0	2.30	2.29	30.2	1.00	0.39

PME expresado en kDa. NP: nucleoproteína. NA: neuraminidasa. HA: hemaglutinina. M1: matriz.

Como resultado fundamental de este estudio, se concluyó que el BLBu modifica el comportamiento biológico de las cepas de influenza A de diferentes subtipos sometidas al tratamiento virucida directo, al inhibir la hemaglutinación que ellas producen, pero este extracto no produce alteraciones apreciables en el patrón electroforético por SDS-PAGE de las proteínas constitutivas de dichas cepas de virus influenza tratadas con el BLBu(2 mg/mL), al menos en nuestras condiciones de trabajo (Figuras 4, 5 y 6). Todo esto corroborado por los datos de los pesos moleculares estimados para las proteínas a partir de los densitogramas de las corridas de las cepas de influenza estudiadas (Tablas 18, 19 y 20).

#### IV.4- Acción del BLBu sobre la apoptosis inducida por el virus influenza A en la línea celular MDCK.

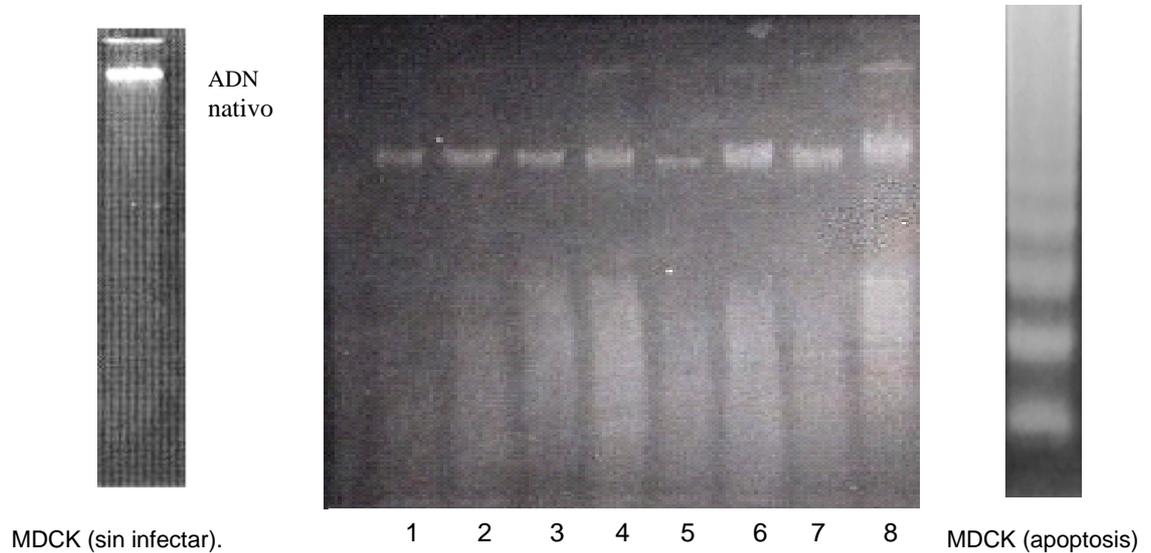
El estudio de la citotoxicidad del extracto liofilizado BLBu, mediante el método colorimétrico del MTT (Mossmann, 1983) puso a relieve que la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) de éste extracto fue de 400±59 µg/mL para las células MDCK. Vale señalar que la concentración de 100 µg/mL de BLBu no resultó tóxica para esta línea celular prácticamente. La toxicidad de este extracto estuvo en función de la concentración, tal como fue observado en estudios de toxicidad del BLBu, mostrados anteriormente. Otro dato de interés que se obtuvo en este experimento, fue el de la máxima concentración citotóxica del BLBU equivalente a 1000 µg/mL, en la que la viabilidad de las células MDCK fue de un 12%, al menos en nuestras condiciones de trabajo (Figura 7).



**Figura 7. Supervivencia de células MDCK tratadas con diferentes concentraciones del BLBu durante 5 días.**

Los resultados del ensayo para conocer si el BLBu a la concentración de 100 µg /mL, inducía algún daño a la integridad del ADN, se pueden observar en la Figura 8. En el extremo derecho de esta figura, se muestra la imagen de la electroforesis del ADN, luego que las células MDCK fueron tratadas con 100mg /mL de amantadina, la cual es capaz de inducir la fragmentación del material nuclear de dichas células. Esto último sirvió de control positivo del fenómeno a observar. Como resultado fundamental

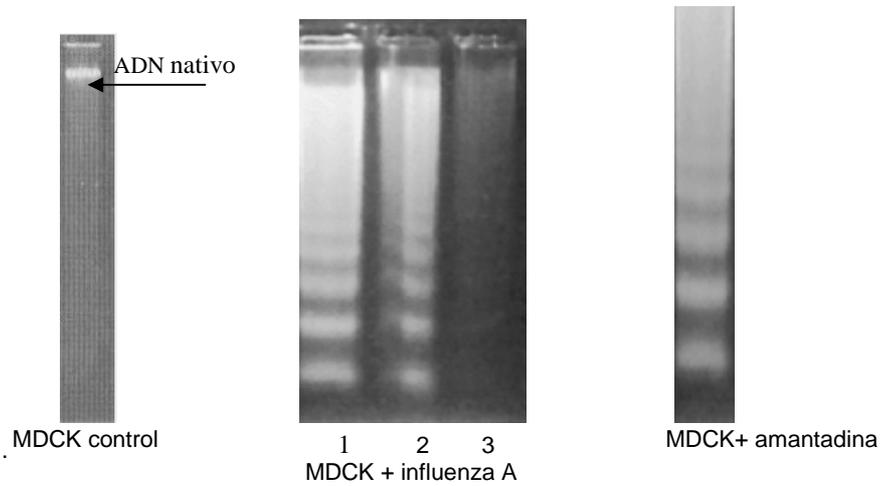
de éste ensayo, fue poner a relieve que el extracto BLBu, a la concentración de 100 µg/mL, no induce la fragmentación del ADN en las células MDCK (Figura 8).



**Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN de las células MDCK tratadas con BLBU a diferentes tiempos y sus respectivos controles. De izquierda a derecha: MDCK, sin infectar a las 72h (control de células). Corridas por duplicado de las MDCK tratadas con BLBU (100 µg/mL) a diferentes tiempos: Carriles 1 y 2 (6h); 3 y 4 (24h); 5 y 6 (48h); 7 y 8 (72 h). MDCK + amantadina (100 mg /mL) a las 24h (control positivo de apoptosis).**

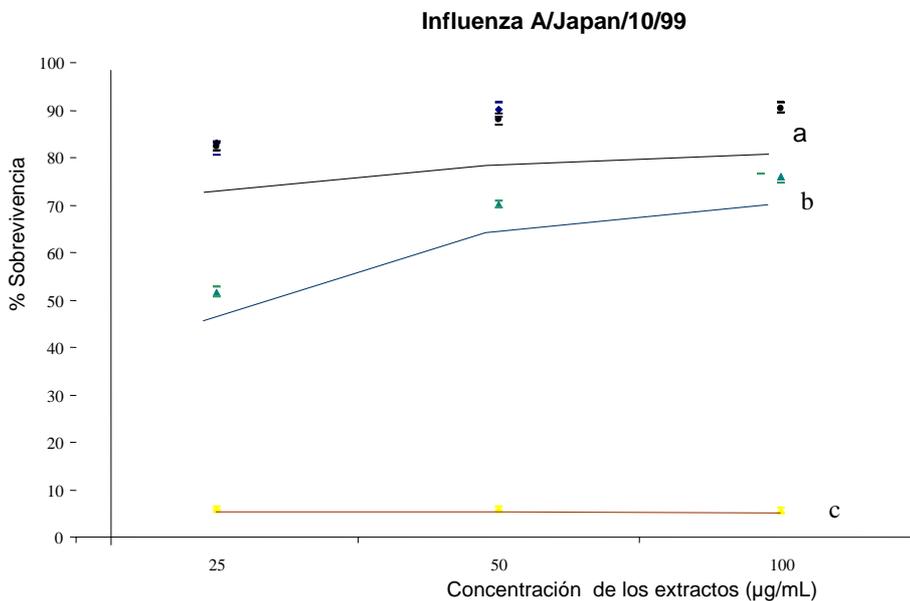
A partir del ensayo en que se evaluó la acción del BLBU durante 72 horas de tratamiento en las células MDCK, se pudo advertir el ADN celular intacto con respecto al ADN de las células tratadas con amantadina.

La Figura 9, muestra la fragmentación del ADN celular que provoca el virus influenza en las células MDCK, comparable al que induce la amantadina, utilizada como control positivo de este daño citopático, durante el tiempo que duró el tratamiento. Estos resultados fueron de gran importancia, puesto que este extracto BLBU se evaluará posteriormente para estudiar su capacidad protectora ante este daño inducido por la Influenza A/Japan/10/99 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).



**Figura 9.** Análisis de la fragmentación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en la línea MDCK infectadas con el virus influenza A/Japan /10/99 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>). (Se aplicaron 8 µL de extracto de ADN). De izquierda a derecha: MDCK control: células no infectadas a las 72 h. La flecha indica el ADN celular intacto. MDCK + virus influenza A: Carril 1: 24 horas; carril 2: 48 horas y carril 3: 72 horas, respectivamente. MDCK + amantadina 100 mg/mL: Células MDCK tratadas a las 24h.

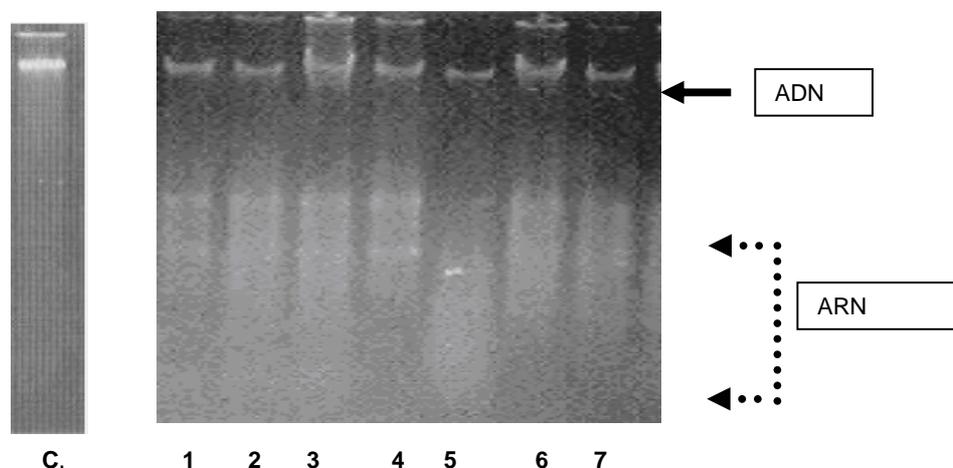
En la Figura 10 se muestra la acción protectora del extracto BLBu en la línea MDCK infectada con la Influenza A.



**Figura 10.** Viabilidad celular de la línea MDCK infectada con influenza A/Japan/10/99 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) y tratada con BLBu, durante 72 horas. (a): MDCK sin infectar y tratadas con el extracto BLBu a diferentes concentraciones (µg/mL). (b): MDCK infectadas con virus influenza y tratadas con diferentes concentraciones de BLBU. (c): Células infectadas con virus influenza.

Cuando las células MDCK infectadas con influenza, fueron tratadas una hora posterior al reto, con 100 µg/mL del extracto BLBU a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas), mostraron el ADN intacto, como señal de inhibición del daño que el virus influenza les provoca (Figuras 10 y 11).

Este efecto protector del BLBU se puso en evidencia en la electroforesis de ADN realizado a las células infectadas con el virus y tratadas con este extracto (Figura 11).



**Figura 11. Análisis de la integridad del ADN en la línea MDCK infectada con el virus influenza A/Japan/10/99 y tratada con el BLBU.**

**Carril C: Control de células MDCK sin tratar. Carriles 1 y 2: BLBU, 25 y 100 µg/mL, a las 24 horas; carriles 3 y 4: BLBU, 25 y 100 µg/mL, a las 48 horas; carriles 5 y 6: BLBU, 25 y 100 µg/mL, a las 72 horas; carril 7, control de tratamiento: BLBU, 100 µg/mL, a las 72 horas. En la parte superior de los carriles la banda correspondiente al ADN intacto. Las flechas de puntos señalan la región del gel donde se observa el ARN.**

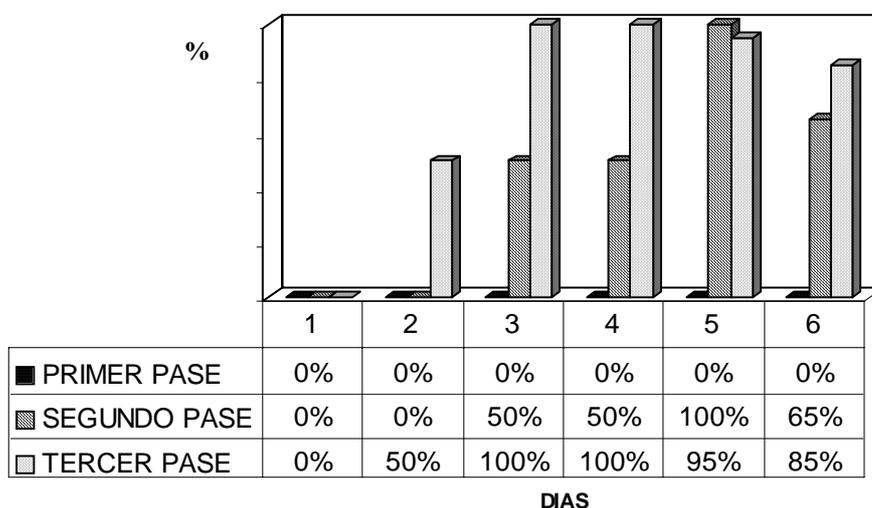
Los resultados del estudio *in vitro* acerca de la protección de la apoptosis provocada por el virus influenza en la línea MDCK (permissiva para este virus) indicaron que el extracto BLBU, a las concentraciones subtóxicas ensayadas, protege de la fragmentación del ADN celular. La apoptosis de las células infectadas por el virus influenza, ha sido referida como un mecanismo inducido por este virus, con la finalidad de lograr su salida de la célula y/o su diseminación en las células o en los tejidos infectados. Por esa razón, la ruptura del ADN es la manifestación citopática más grave que este virus provoca en las células. La protección del ADN en las células MDCK, luego del tratamiento con el BLBU, permitió adjudicarle a este extracto

vegetal, la capacidad de proteger *in vitro* de los daños citopáticos que provoca el virus influenza. Todos estos resultados, sirvieron de puntos de partida para estudiar la capacidad antiviral *in vivo* del BLBu, en el biomodelo experimental de gripe del ratón, provocado por el virus influenza.

#### IV.5- Actividad antiviral del BLBu en el biomodelo experimental de gripe en ratones de la línea Balb/C.

##### IV.5.1-Montaje y evaluación del biomodelo experimental de gripe del ratón.

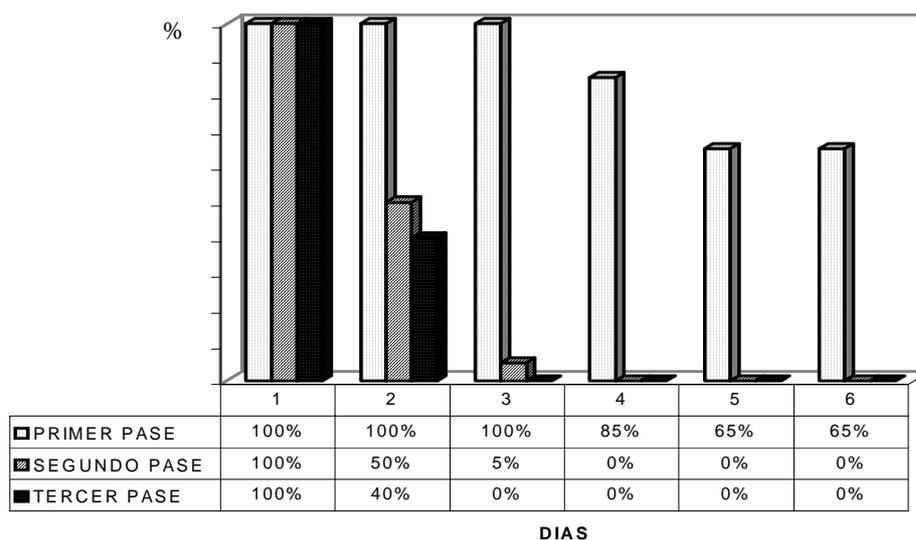
Los signos y síntomas clínicos en los ratones inoculados con la cepa del virus Influenza A/Sydney/5/97(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) con respecto a los que no recibieron virus (controles negativos), fueron utilizados en el estudio de patogénesis.



**Figura 12. Porcentaje de ratones con erizamiento, respiración forzada, y letargo por días en cada uno de los pases del virus Influenza A/Sydney/5/97(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) por la vía intranasal.**

Para el grupo de ratones inoculados con el virus influenza, al tercer día en el tercer pase viral, el 100% de estos presentaron como signos y síntomas predominantes respiración forzada y letargo, aspecto que contrastaba con los controles negativos, los se mostraban alertas y activos durante la manipulación y observación de los mismos. En el primer pase del virus, el erizamiento en la zona del cuello en los ratones, se observó al cuarto día de evolución. Este síntoma luego se presentó más frecuentemente en el segundo y tercer pase, hasta que apareció en casi la totalidad de los animales, en el tercero. Los ratones del grupo control negativo, no presentaron los síntomas que les provoca el virus influenza, se comportaban muy activos ante los

estímulos y mostraron una ganancia de peso acorde a lo referido para la especie (Johansson *et al.*, 2002).



**Figura 13. Porcentaje de ratones sanos durante los días de observación luego de inoculados con la cepa de Influenza A/Sydney/5/97(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) en el estudio de patogénesis.**

En el examen minucioso de la evolución clínica de los ratones, se constató en el grupo inoculado con el virus, que el número de animales sanos descendió paulatinamente en el tiempo (Figura13). Esto se hizo más evidente en la medida que se realizaron los pases sucesivos del virus en los ratones, hasta que al tercer pase (tercer día), el 100% enfermaron.

En este biomodelo de gripe, el estudio de la variación del peso diario ofreció datos que permitieron objetivamente apreciar la trascendencia de la afectación de éste parámetro, el cual es marcador del desarrollo biológico normal de los animales. Los cambios en éste sentido se hicieron más evidentes, al ser ratones recién destetados, en los que la ganancia de peso corporal de estos animales cuando están sanos, se produce más marcadamente que en el estado adulto. En el primer pase, el peso promedio de cada animal fue mayor con respecto al segundo y tercer pase de virus, con diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), mientras que para los animales controles, sin inocular, en los distintos pases virales se produjo en ellos una ganancia de peso

normal y uniforme. La Tabla 21, muestra la variación del peso corporal (gramos) de los ratones en este estudio de patogénesis.

**Tabla 21. Variación del peso corporal (g) y de la unidades de hemaglutinina en los pulmones de los ratones inoculados y controles en cada pase del virus influenza A/ Sydney/ 5/ 97(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).**

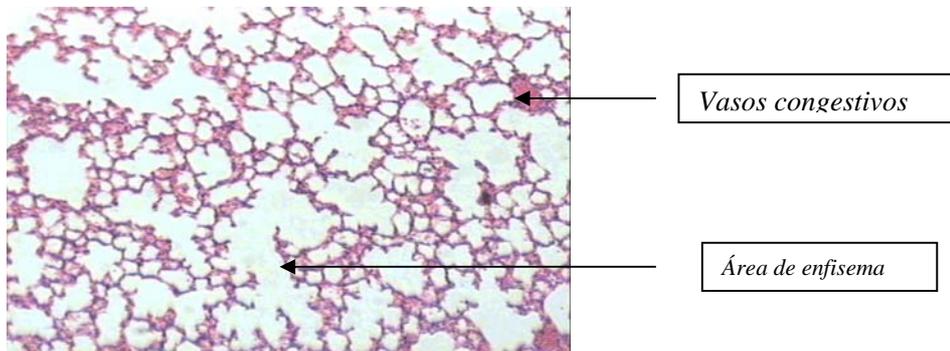
Medias ajustadas del peso corporal (g) *			Inverso del título hemaglutinante.
Pase	Controles	Inoculados	Rango de valores (u)**
1	18.47± 0.028 n. s.	17.39 ± 0.084(a)	2 / 4
2	18.44±0.064 n.s.	16.81 ± 0.056(b)	4 / 8
3	18.28 ± 0.021n. s.	16.42± 0.042(b)	32 / 64

\*Test de Duncan: letras desiguales difieren significativamente para p<0. 001entre cada pase. (n. s.: no significativo)

\*\*Inverso de los valores en que fluctuaron los títulos HA, equivalentes a unidades hemaglutinantes.

La detección de hemaglutinina en las muestras de los pulmones de los ratones inoculados con el virus (Tabla 21), sirvió también de guía para las afectaciones que causó el virus influenza en el curso de la infección experimental, lo cual coincidió con lo descrito por otros autores (Neiryneck *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 2002).

La histopatología de los pulmones de los animales sanos y de los inoculados con el virus, en diferentes pases virales, confirmaron los hallazgos virológicos anteriores, cuyas imágenes aparecen a continuación.



**Figura 14. Corte de tejido pulmonar de ratón sano del grupo control negativo en el tercer pase. El parénquima alveolar dentro de los límites normales (100x, H/E).**

La foto que aparece en la Figura 14, corresponde a la muestra de tejido de un pulmón de los animales que perteneció al grupo control, aquellos que no fueron inoculados con virus influenza. Se aprecia la estructura normal del tejido pulmonar, que permite

establecer la comparación, con las imágenes del tejido pulmonar de los ratones infectados con el virus (Figuras 15, 16, 17 y 18 respectivamente).

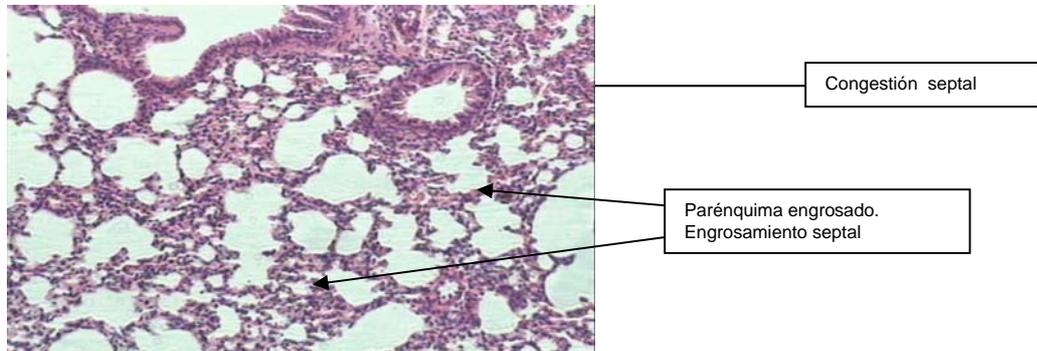


Figura 15. Corte de tejido pulmonar de ratón inoculado con virus en el tercer día del primer pase. Se evidencia un aumento de la celularidad en el tabique interalveolar (100x, H/E).

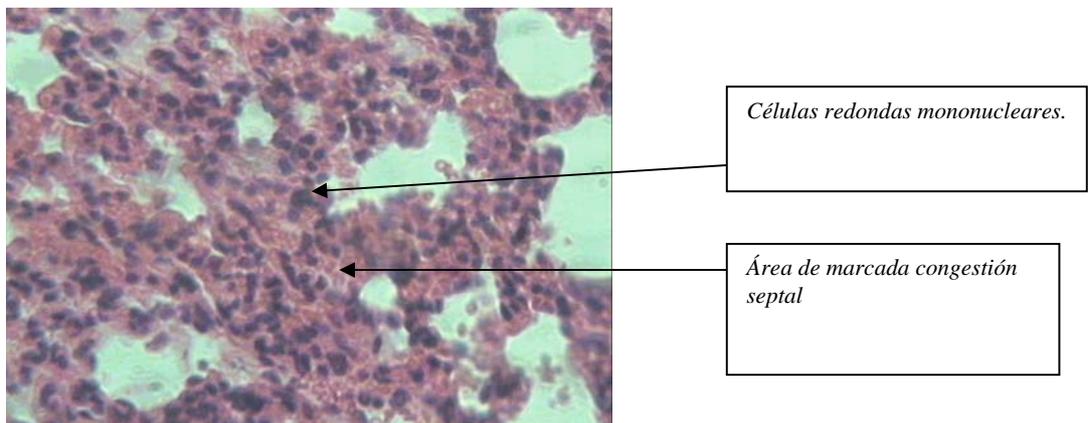


Figura 16. Tejido pulmonar de ratón inoculado con virus, al quinto día del segundo pase. La imagen muestra neumonía intersticial, presencia de elementos inflamatorios que obliteran el espacio aéreo y ejercen tracción sobre la pared rompiendo los espacios aéreos (400x, H/E).

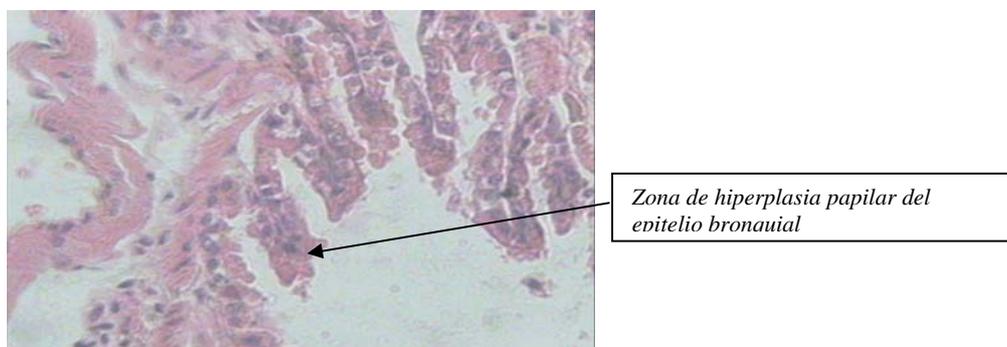
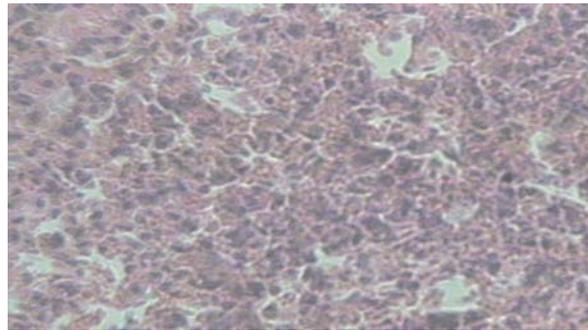


Figura 17. Tejido pulmonar de ratón inoculado con virus influenza correspondiente al tercer día del tercer pase. Se advierte la pérdida de la estructura normal del tejido (400x, H/E).

Se observó también una marcada congestión septal en los tejidos de los pulmones de los animales inoculados (Figura17), caracterizada por un incremento de la celularidad, por encima de los límites histológicos normales (2 o 3 capas). En la Figura 18 se aprecia el avance de los daños en el tejido del pulmón, que provoca la infección del virus influenza.



**Figura 18.** Corte de tejido pulmonar de ratón inoculado con virus influenza al quinto día del tercer pase. La imagen muestra neumonía intersticial severa. Se observa consolidación inflamatoria intersticial, con espacios aéreos totalmente obliterados. Se aprecian células redondas mononucleares. Existe una distorsión intensa de la arquitectura normal del tejido pulmonar del ratón (400x H/E).

Otras alteraciones observadas en los diferentes cortes de pulmones de los animales inoculados con el virus influenza, consistieron en hemorragia intrabronquial, vasculitis, inflamación pleural, descamación de células bronquiales, propio de una neumonía ligera. En algunos pulmones de los ratones del grupo control, se detectó enfisema pulmonar y hemorragias intersticiales (Figura 15). Estos hallazgos, se atribuyeron fundamentalmente a los traumas que se pueden originar durante el sacrificio de los animales. El conjunto de signos y síntomas que caracterizaron la patogénesis viral en los ratones, avalaron la pertinencia del biomodelo experimental de gripe en la Línea Balb/C de ratón, cuando se inocularon por la vía intranasal, con la cepa Influenza A/ Sydney/ 5/ 97(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>). Estos resultados del material de partida, sirvieron de base para iniciar los ensayos en que se evaluó la acción del extracto para proteger a estos animales de los efectos de la gripe.

#### **IV.5.1-Evaluación del BLBu en el biomodelo experimental de gripe.**

Los ratones infectados con el virus influenza, experimentaron una pérdida de peso corporal durante el período que transcurre la evolución clínica de la gripe o influenza

que les causó el virus, en comparación con los animales enfermos y tratados con el BLBu (Tabla 22). Esta tabla refiere los datos fundamentales de la evaluación del BLBu en el biomodelo de gripe. En la misma se muestran los resultados de la variante experimental A: reciben extracto 175 mg/Kg de peso, por la vía intranasal u oral luego del reto con 10DIE<sub>50</sub> de influenza y de la variante B: reciben extracto 50 mg/Kg de peso, por la vía intranasal u oral luego del reto con 10 DIE<sub>50</sub> de influenza. En ambas variantes (A y B) de tratamiento con el BLBu, los ratones del grupo control positivo de virus (I), experimentaron una pérdida de peso corporal con significación estadística.

**Tabla 22. Peso inicial, final e incremento peso promedio (g) en los animales infectados y tratados con BLBu (I y III), los controles de virus (I) y del extracto BLBu (IV), por ambas vías de administración del extracto.**

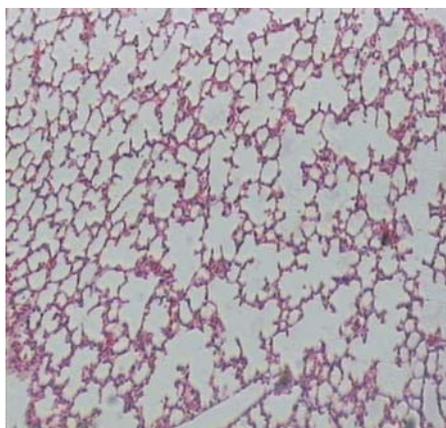
Grupo	10DIE <sub>50</sub>	BLBu	Vía intranasal			Vía oral		
			Pi ±DS	Pf ±DS	Ip±DS	Pi± DS	Pf± DS	Ip± DS
I	10DIE <sub>50</sub> (25 µL)	-----	16.4 ± 0.5	15.2 ± 0.9	-1.2± 1.1 b	16.3 ±0.4	15.4 ±0.7	-0.95± 0.8 b
II	10DIE <sub>50</sub> (25 µL)	175 mg /kg	16.2 ± 0.6	18.0 ± 0.6	1.8± 0.4 a	16.3 ±0.4	17.6 ±0.4	1.3 ± 0.6 a
III	10DIE <sub>50</sub> (25 µL)	50 mg/kg	15.9 ± 0.5	17.8 ± 0.7	1.9±0.7 a	16.3 ±0.5	17.5 ±0.6	1.2 ± 0.9 a
IV	-----	175 mg/kg	16.1± 0.3	18.0 ± 0.5	1.9±0.6 a	16.4 ±0.5	17.3 ±0.5	1.0 ± 0.8 a

Leyenda: letras diferentes en el peso promedio indican significación estadística en el Test de Duncan con  $p < 0.05$ .  
Pi: Peso inicial promedio; Pf: Peso final promedio; Ip: Incremento de peso promedio. DS: desviación estándar.

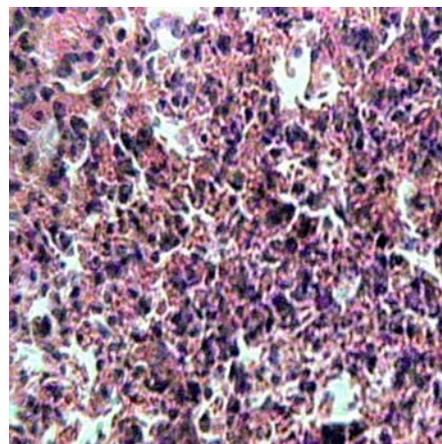
En contraste, los grupos que recibieron el extracto y estaban infectados con el virus influenza y los pertenecientes al grupo control de BLBu, que solamente recibieron el extracto (IV), mostraron una ganancia de peso corporal normal. Todo lo anterior, fue corroborado por el análisis estadístico, que no arrojó diferencias significativas entre últimos grupos.

Las variaciones del peso corporal, en los animales infectados con el virus y tratados con el extracto de granada y los ratones del grupo control negativo, que recibieron exclusivamente la máxima concentración del BLBu (175 mg/Kg peso/día) en comparación con los controles positivos de virus influenza, constituyeron un resultado muy importante, al poner a relieve el efecto protector al daño que ocasiona el virus

influenza en los animales, particularmente en el desarrollo biológico normal de los animales infectados con este virus. Los resultados del estudio anatomopatológico confirmaron lo comentado anteriormente (Figura 19). Como se puede apreciar en la figura 19 (a), en la imagen del tejido pulmonar de los ratones que enfermaron y fueron tratados con el BLBu, se puede observar el parénquima alveolar, el que permanece dentro de los límites normales, muy similar a las imágenes de los tejidos del pulmón normal, mostrada en la Figura 15. Todo esto, habla a favor de la recuperación del tejido pulmonar en los animales enfermos, luego del tratamiento con el BLBu.



a



b

**Figura 19.** La imagen (a) corresponde a un corte de tejido pulmonar de los ratones infectados con el virus influenza A, al quinto día de tratamiento, por la vía oral, con el BLBu (175 mg/Kg/día). Nótese la recuperación del tejido en contraste con la imagen (b) que muestra a un corte de tejido pulmonar correspondiente a los ratones infectados sin tratamiento. Se aprecia la marcada congestión septal y la pérdida de la estructura normal (100x, H / E).

En la Figura 19 (b), contrasta con la imagen mostrada en (a), la marcada congestión del tejido pulmonar, propio del daño que ocasiona el virus influenza en los pulmones de los animales infectados experimentalmente. Apoyaron las evidencias anteriores, la sintomatología clínica de los animales del grupo infectados con el virus influenza que enfermaron y no se trataron con el BLBu (Tabla 23). En esta tabla aparece la variación del número de animales con signos y síntomas clínicos, en particular: erizamiento, respiración agitada y letargo (puntaje 3, Tabla 4). Estos signos y síntomas clínicos en los ratones, disminuyeron en su presentación, luego que los animales recibieron el tratamiento diario con el BLBu. Nótese en dicha Tabla 23, las

diferencias de porcentos en los grupos tratados por ambas vías de administración del BLBU (II y III), comparado con el control de virus (I), en cuyo grupo se observó un elevado porcentaje de animales con los síntomas antes descritos.

**Tabla 23. Porcentaje de ratones que presentaron los síntomas clínicos\* en los grupos infectados con virus influenza (I), los infectados con influenza y tratados con 175 y 50 mg/Kg/ día (II y III), y los tratados con BLBU 175 mg/Kg/ día (IV) por ambas vías de administración del extracto, durante cinco días.**

Grupo	% (ratones con síntomas)*		% (ratones con síntomas)*	
	Vía intranasal		Vía oral (%)	
	Tercer día	Quinto día	Tercer día	Quinto día
Control virus (I)	95	95	70	60
175mg/Kg/peso (II)	60	0	0	15
50mg/Kg/peso (III)	55	90	50	80
Control BLBU (IV)	0	0	0	0

\*Puntaje 3: erizamiento, respiración forzada y letargo.

La presencia de hemaglutinina, proteína marcadora del virus influenza en las muestras de pulmones de los animales infectados y tratados con el BLBU, de las variante A y B, con respecto a los ratones enfermos del grupo control de virus, al quinto día de evolución clínica, se comportó como aparece en la Tabla 24.

**Tabla 24. Títulos hemaglutinantes de las muestras de pulmones de ratones infectados con virus influenza (I), los tratados con el BLBU (II y III) y los tratados con BLBU (IV), por ambas vías de administración, al quinto día de tratamiento.**

Grupos	Variantes de tratamiento			
	Intranasal (A)		Oral (B)	
	Título HA (u HA)	Suma de rangos	Título HA (u HA)	Suma de rangos
I (control virus)	32	1.44a	32	1.17a
II (175mg/Kg/ día)	< 2	0.11c	4	0.53c
III (50mg/Kg/ día)	8	0.82b	8	0.82b
IV (175mg/Kg/día)	< 2	0.11c	< 2	0.11d

Sx =0.007\*\*\*

Sx =0.005\*\*\*

Las letras diferentes en la suma de rangos indican significación estadística para p<0.05.

En el caso que se calculó el título hemaglutinante (HA), este fue < 2 unidades y coincidió cuando no se observó el fenómeno de hemaglutinación, durante la lectura

de resultados. Acerca de esto último, consideramos que es negativo el título HA o equivalente a cero. La técnica de hemaglutinación por tanto, permitió verificar de manera rápida y barata la presencia o no de virus influenza en las muestras de pulmones estudiadas. Vale comentar que la sensibilidad de esta técnica es relativamente baja. No obstante, cuando se les calculó los títulos infectivos virales, a las muestras referidas anteriormente, estas mostraron índices de reducción de la infecciosidad, incluso mayores de cien, los que confirmaron la actividad antiinfluenza del BLBu (tabla 25). Se conoce que el título infectivo es una técnica altamente sensible, ya que teóricamente, una partícula infecciosa, es capaz de iniciar la infección (Burleson, 1992; Lennette, 1992). La disminución de la infectividad resultó definitiva en la evaluación de la acción antiviral del BLBu, al arrojar índices de reducción de la infectividad muy cercanos o mayores de cien.

**Tabla 25. Índice de reducción de la infectividad en las muestras de pulmones de los ratones infectados con Influenza A/sydney/5/97(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>). Control de virus (I), tratados con 175 y 50 mg/Kgpeso/día (II y III) y control de BLBu (IV).**

Vía de tratamiento	10 DIE <sub>50</sub> /índice de reducción de la DIE <sub>50</sub>			
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Intranasal	10 <sup>-5.04</sup>	10 <sup>-2.74</sup> /199.5	10 <sup>-3.49</sup> /35.41	-----
Oral	10 <sup>-5.04</sup>	10 <sup>-4.21</sup> /251.2	10 <sup>-4.21</sup> /67.6	-----

En las muestras procedentes de tejido pulmonar de los ratones que fueron infectados con virus y posteriormente tratados con el BLBu, por ambas vías de administración de este extracto, se produjo una reducción importante de la infectividad para los embriones de pollo. A su vez, en los ratones tratados con el BLBu, se acortó el período de tiempo en que fueron evidentes los signos y síntomas clínicos, verificados en el biomodelo de la infección experimental con el virus influenza que sirvió de base para la evaluación farmacológica de este extracto. Las imágenes de los pulmones de los ratones que se infectaron y trataron con el BLBu, mostraron una apariencia similar a las de los tejidos de los pulmones de los ratones del grupo control negativo de virus, que solamente recibió el BLBu.

A pesar que no se logró eliminar totalmente la infección del virus influenza en los ratones tratados con el extracto, cuando el BLBu se administró posterior a la infección, se puso en evidencia una mejoría clínica y evolución favorable en los

animales bajo tratamiento. Lo expresado con anterioridad se sustentó al constatarse una recuperación clínica de los ratones tratados con el BLBu, por ambas vías de administración del extracto, si se tiene en consideración los diferentes parámetros que fueron evaluados para verificar la eficacia del extracto evaluado, en este biomodelo experimental.

Cuando el tratamiento se realizó con la menor concentración del extracto BLBu, por la vía oral, se produjo una reducción de los valores de infecciosidad, aunque los análisis estadísticos de estos no fueron significativos. De acuerdo a los resultados alcanzados, se considera que las variantes que emplearon la dosis para el tratamiento de 175 mg/Kg de peso/ día, resultaron eficaces por ambas vías de administración del BLBu para acortar la clínica, disminuir la carga viral y recuperar los tejidos del daño que les provocó el virus al tejido pulmonar de los ratones. Los tratamientos por ambas vías, mostraron también en éste biomodelo, una dependencia de la concentración del extracto BLBu, para mostrar su acción antiviral. Este criterio fue respaldado por los análisis estadísticos a los diferentes parámetros evaluados.

## **V- Discusión.**

### **V.1 – Parámetros de calidad del extracto liofilizado de granada (BLBu).**

La utilización de los extractos naturales para combatir diferentes afecciones ha sido retomada como una vía para aliviar y curar diversas enfermedades. La búsqueda de nuevos medicamentos, entre los que están los antivirales, requiere una rigurosa identificación y caracterización del material de partida. Cuando este requisito no se cumple, puede que no se observe el efecto deseado, se refieran datos erróneos en cuanto al extracto / planta que se evalúa y se produzcan graves intoxicaciones o muertes (Morón y Levy, 2002).

En los últimos años, la especie vegetal *Punica granatum* L., ha sido ampliamente estudiada y son muy valiosas y variadas las propiedades farmacológicas que se le atribuyen (Dass *et al.*, 1999; Gracious *et al.*, 2001; Chimdambara *et al.*, 2002; Noda *et al.*, 2002; Suddesh y Vijayalakshmi, 2005 y Sánchez-Lamar *et al.*, 2005). En este sentido, las dos últimas referencias, son estudios acerca de la capacidad de extractos preparados con las frutas de la granada, en su acción protectora frente al estrés oxidativo. En concordancia con esto, a los componentes químicos que se le detectan a estas frutas, se le adjudican propiedades antitumorales. En estos trabajos, se refieren a ciertos componentes químicos presentes en dichas frutas, como los responsables de la acción farmacológica.

El extracto liofilizado BLBu, preparado a partir de frutas de *Punica granatum* L. (granada), presenta en su composición química grupos amino, fenoles, mucílagos, glucósidos, taninos, antocianinas y flavonoides del tipo pirocatecólicos. EL estudio fitoquímico que se le realizó a este liofilizado, coincidió con lo informado para otros extractos de origen vegetal, provenientes de diversas familias de plantas y que han mostrado actividad antiviral y antiinfluenza en particular (Ivancheva *et al.*, 1992; Serkedjieva y Manolova, 1992; Petica *et al.*, 1994; Nagai *et al.*, 1995 a y b; Hayashi *et al.*, 1996 y Serkedjieva *et al.*, 2000). Estos investigadores, responsabilizaron a los polifenoles del tipo flavonoides y taninos, como los responsables de la actividad antiinfluenza detectada por ellos.

Numerosas investigaciones acerca de las propiedades farmacológicas de los productos naturales en los Estados Unidos de Norteamérica y en Japón, han sido

protegidas mediante patentes. Al respecto, M. Tempesta investigó la actividad antiviral de una mezcla de polímeros de proantocianidinas, aislados de plantas de la especie *Calophyllum*. Esta mezcla resultó activa *in vivo* e *in vitro* contra influenza A, B y C y el virus sincitial respiratorio. En ella fue identificado como componente mayoritario, una estructura química del tipo flavonoide, Patente No. 5211944, de la Shaman Pharmaceuticals, Inc. (Tempesta, 1993).

En el BLBu, el porcentaje de sólidos totales del liofilizado, equivalentes al 99%, permitieron conocer la baja cantidad de sustancias volátiles presentes en éste, tanto en el extracto hidroalcohólico de partida, como con el que se preparó el liofilizado. Este dato resultó de gran importancia y utilidad para la normalización del proceso de preparación del BLBu. Por otra parte, el tamizaje fitoquímico del BLBu, detectó la casi totalidad de compuestos contenidos en el extracto hidroalcohólico de partida para preparar el liofilizado. Estos resultados pueden servir de base a los farmacólogos para el ajuste de la dosis de un medicamento elaborado a partir de materiales vegetales. Además, las características polares que posee el BLBu, facilitan su solubilidad en agua. Éste es un requisito indispensable que debe cumplir un medicamento antiviral, pues le permitirá acceder más fácilmente a la célula infectada y allí ejercer su acción (Stuart-Harris *et al.*, 1985).

En esta investigación se conoció también que el BLBu, al menos en el rango de concentraciones empleadas en este trabajo, no aglutina los glóbulos rojos de las diferentes especies animales, incluidos los eritrocitos de humanos. No obstante, se encontró que a concentraciones mayores de 500 µg/mL y 37<sup>0</sup>C de incubación, es capaz de aglutinar estas células *in vitro*. Este comportamiento pudiera explicarse por el alto contenido de mucílagos que posee el fruto de la granada, que están presentes en el liofilizado. Al BLBu, tampoco se le detectó capacidad hemolítica para los tipos de glóbulos rojos que emplearon en esta investigación y en el rango de concentraciones utilizados en los diversos ensayos. Estos hallazgos fueron de inestimable valor, pues la literatura especializada refiere que ciertos extractos de origen vegetal, pueden aglutinar o provocar la lisis de los glóbulos rojos de diferentes orígenes *in vivo* y tener otros efectos adversos, en caso que se preparen medicamentos herbarios a partir de ellos. Con respecto a esto, otros investigadores, cuando estudiaron el extracto SP-

303, proveniente de la familia *Euphorbiceae*, encontraron el inconveniente que aglutinaba los hematíes, lo que les impidió continuar dicha investigación (Wyde *et al.*; 1993).

El BLBu presentó valores de pH que estuvieron en el rango ácido, entre cinco y seis. Resulta de gran utilidad conocer el pH del extracto a estudiar como antiviral, por el papel que juega éste, en la multiplicación viral. En el caso del virus influenza, resulta crucial que se mantenga el pH del medio en el rango de acidez adecuado (Kostolansky *et al.*, 1988; Bui *et al.*, 1996). Otros virus requieren también de valores de pH óptimos, para iniciar su replicación. Tal es el caso del virus Semliki Forest, en el que la proteína transmembrana E1, necesita de un pH medianamente ácido para llevar a cabo la fusión viral. Algo muy similar ocurre con el virus Sindbis y el virus de la estomatitis vesicular, en los que ligeras variaciones del pH del medio, pueden impedir la replicación estos (Käserman y Kempf, 1996). El virus Influenza, precisa de un pH entre 5 y 5.5 para llevar a cabo los pasos iniciales del ciclo de multiplicación (Kostolansky *et al.*, 1988). Estos autores plantearon que las proteínas que conforman las partículas de virus influenza, experimentan cambios conformacionales que se traducen en alteraciones de la permeabilidad de la membrana viral, a valores de pH 5, con la consiguiente formación de poros y canales iónicos, durante la fase de desnudamiento del virus en el ciclo replicativo. Estos canales iónicos provocan la fusión de las membranas del virus y del endosoma, lo que facilita el desnudamiento y liberación del material genético en el citoplasma de la célula. Los valores de pH encontrados al BLBu, apuntan a que el este extracto proporciona acidez al medio en que se encuentre y este es un factor que favorece la multiplicación del virus influenza. Estos datos permitieron concluir que la actividad antiviral encontrada para el BLBu, se deben a otros mecanismos de acción antiviral y no a la acción adversa del pH del medio, que hubiese impedido los eventos antes referidos.

Resultó de gran valor no detectarle al BLBu glicósidos cardiotónicos. Esto se verificó en el extracto acuoso producto de la rotoevaporación, a partir del cual se preparó el liofilizado. La importancia de este resultado se justifica por los posibles efectos tóxicos que podrían provocar estos compuestos químicos a los hospedantes utilizados en los ensayos antivirales.

Los estudios de toxicidad realizados al BLBu, en los que se emplearon diversos modelos, *in ovo*, *in vitro* e *in vivo*, mostraron baja toxicidad para éste (Caballero, 2001; Casadelvalle, 2004 y Sánchez - Lamar, 2005). El valor de la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) del BLBu, calculados en este trabajo para la línea celular MDCK, coincidió con el informado anteriormente (Caballero, 2001). Este autor, que evaluó el efecto citotóxico de este extracto en estas células, mediante la técnica del MTT y durante 3 días de tratamiento, obtuvo valores de CC<sub>50</sub>= 460±69 µg/mL, los cuales son cercanos a los 400±59 µg/mL estimados en esta investigación. Los estudios de toxicidad del BLBu *in vivo* (Morton, 1981) han indicado que es necesario emplear altas concentraciones de este extracto para que resulte tóxico, al menos en los modelos de rata Wistar y ratones OF1 empleados en otras investigaciones así como para los ratones Balb/C, empleados en esta investigación. Los resultados referentes a la toxicidad del BLBu son cercanas al rango de concentraciones informados para un extracto vegetal preparado a partir de la planta *P. orbicularis*, que fue evaluada en diferentes líneas celulares (del Barrio y Parra, 2000). Es bueno señalar que las CC<sub>50</sub> obtenidas por estos autores, diferían en cada sistema celular. Así, para la línea MDBK fue de 262±12.7 µg/mL, para Hep-2 de 144±3.6 µg/mL, para HeLa de 212±8.37 µg/mL y para la línea FPH fue de 669±36 µg/mL. Ellos concluyeron que para el extracto de *P. orbicularis*, la toxicidad *in vitro* variaba en las diferentes líneas celulares que emplearon. Estos hallazgos, justifican la necesidad de evaluar la toxicidad de un candidato a medicamento herbario en diferentes hospedantes, *in vitro* e *in vivo*, de ser posible y realizar los estudios antivirales con dosis sub - tóxicas para el hospedante.

## **V. 2- Acción antiviral del BLBu en embriones de pollo.**

Las investigaciones de fármacos antivirales requieren el uso de un patrón de comparación, siempre que sea posible (Serkedjieva y Zgorniak-Nowosielska, 1993; De Clerq, 1995). El clorhidrato de amantadina se empleó en esta investigación, con éste fin. La amantadina, cuyo blanco fundamental es la proteína M2 del virus influenza, constituye uno de los primeros medicamentos licenciados para el tratamiento de la gripe producida por el virus influenza y hoy día aún se prescribe con ese fin (VADEMECUM, 2005). La amantadina se ha visto implicada también en una

acción antiviral en las fases tardías del ciclo replicativo del virus influenza, relacionado con la maduración del virión y la incorporación de la molécula de hemaglutinina a éste (Shihman y Yeung, 1988; Ruiigrok *et al.*, 1991; Käsermann y Kempf, 1996). Otro antecedente que tiene gran valor para fundamentar la selección de tomar la amantadina como antiviral control en la evaluación inicial del BLBu, fueron los resultados del estudio de Serkedjieva y Zgorniak-Nowosielska, ellos probaron la acción aislada y combinada del extracto SHS-174 con la amantadina. El SHS-174, es una infusión liofilizada preparada con varias plantas superiores y la amantadina sirvió como patrón positivo de la actividad a evaluar. Este estudio se realizó *in vitro*, frente a cepas de virus influenza de los subtipos (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) y (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>). Estos autores, observaron una acción antiviral sinérgica al combinar el SHS-174 con la amantadina, lo cual se evidenció por los altos índices de reducción de infectividad viral (Serkedjieva y Zgorniak-Nowosielska, 1993)

Las concentraciones subtóxicas del BLBu y de la amantadina, que fueron empleadas en esta investigación del BLBu, provocaron porcentos de mortalidad en los embriones de pollo tan bajos, que resultaron muy cercanos a los del agua estéril utilizada. No obstante, se demostró que el BLBu, pudo ejercer su actividad antiviral a concentraciones sub – tóxicas, con la ventaja de la baja mortalidad por efectos tóxicos en la población tratada. Todo esto indicó la factibilidad de continuar los estudios de este liofilizado.

#### **V.2.1- Estudios antivirales del extracto BLBu en embriones de pollo.**

Los embriones de pollo han sido universalmente utilizados para la evaluación de fármacos, por lo que el saco alantoideo y la membrana corioalantoidea del embrión de pollo, han sido exitosamente empleadas para investigaciones de fármacos antivirales (Inoi *et al.*, 1985; Serkedjieva y Manolova, 1992; Nagai *et al.*, 1992; Serkedjieva, 1995).

Con el BLBu, se observó un efecto antiviral *in ovo* sobre la multiplicación del virus influenza, para los tipos de influenza A y B. Se constataron reducciones en la infectividad del virus en más de dos logaritmos, que se traducen en índices de reducción de la infectividad mayores de cien, todo esto cuando el virus se replicó en

el saco alantoideo de los embriones de pollo y más marcado aún, cuando este extracto BLBu se administró antes del reto viral. El BLBu provocó reducciones de  $\pm 2 \log_{10}$  de los títulos infectivos ( $DIE_{50}$ ), incluso cuando fue administrado una hora posterior a la infección, lo que representó índices de reducción de la infectividad mayores de cien, resultados que fueron interpretados como neutralizantes del poder infectivo viral, tanto en embriones de pollo, como en animales de laboratorio (Lennette, 1992; Burleson *et al.*, 1992). Lo planteado con anterioridad es comparable a la acción de un producto obtenido de la planta *Croscomaeflora lemoine*, cuyo principio activo inactivó al virus influenza, con una reducción significativa de la infectividad. El efecto antiviral del mencionado producto, fue dependiente de la concentración y del tiempo de aplicación (Inoi, 1985). Otros investigadores que han evaluado la actividad antiviral a través de la reducción de la infectividad en embriones y cultivos celulares, han constatado reducciones significativas de los títulos infectivos. Ejemplo de ello, es el estudio de un complejo polifenólico frente a la cepa A/Rostock ( $H_7N_1$ ) en cultivos de fibroblasto de embrión de pollo. En dichas células, este complejo polifenólico, provocó la inhibición de la expresión de hemaglutinina, la neuraminidasa y la síntesis de proteínas. Todo lo anterior, se interpretó como expresión de la inhibición de la replicación del virus *in vitro*. En este mismo sentido, otros investigadores estudiaron la acción *in vitro* de la infusión liofilizada de flores de la planta *Verbascum thapsiforme Schrad* contra diferentes cepas de influenza A. Los resultados arrojaron una disminución de los títulos infectivos virales entre uno y tres logaritmos (Zgorniak *et al.*, 1991). Por último, un flavonoide aislado de las hojas de la planta *Scutellaria baicalensis*, fue evaluado en embrión de pollo y en células MDCK, frente a dos cepas de influenza A. Este flavonoide, provocó una inhibición de la actividad de neuraminidasa viral (Nagai *et al.*, 1992).

Para el BLBu, se observó que la respuesta al tratamiento con 2 mg/mL del extracto, antes y después de la infección de los embriones de pollo, resultó eficaz frente a diferentes dosis infecciosas del virus influenza. Este efecto resultó dependiente de la concentración del extracto. Cuando el BLBu se suministró antes o después de la infección, se observó actividad antiinfluenza y los resultados de los análisis estadísticos, así lo confirmaron. Vale destacar, que el BLBu, estuvo bajo la influencia

de diversos factores metabólicos propios del medio en que está inmerso el embrión de pollo, que bien hubiesen podido inactivar, degradar o activar, en fin modificar su capacidad antiviral. El hecho que la acción antiviral se produjo una hora antes y una después del reto viral, induce a pensar que la acción antiviral detectada aquí, tenga lugar en los pasos iniciales del ciclo de replicación, relacionado con la adsorción y/o penetración del virus influenza. Los resultados de los ensayos en embriones de pollo, cuando el extracto fue suministrado una hora antes del reto viral y los de la acción virucida directa, pudieran explicar estos planteamientos y constituyeron hallazgos fundamentales en el estudio del BLBu.

Cuando se estudian antivirales contra influenza, un obstáculo de importancia a tomar en consideración son los cambios antigénicos que experimentan la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) del virus (Belshe, 1989; Médico Interamericano, 1995; Hampson, 1997; De Jong, 2005). Se conoce que estas variaciones de las proteínas de superficie del virus, pueden generar variantes virales resistentes al fármaco (Ruiigrok *et al.*, 1991; Bizebard, 1995; Lipatov *et al.*, 2004; Osterholm, 2005). Algunos autores refieren que, en la aparición de cepas resistentes y sensibles a la amantadina, la hemaglutinina del virus, juega un papel fundamental, al influir de manera indirecta en la susceptibilidad a la droga. Tal es el caso de cepas de influenza con hemaglutinina tipo7 (H<sub>7</sub>), frente a la acción de éste antiviral. La actividad de la amantadina trasciende a las fases tardías del ciclo replicativo e implica a la HA (Riiugrok *et al.*; 1991). Para esta proteína del virus influenza, los cambios en uno o varios residuos de aminoácidos en su estructura primaria, originan variantes que pueden ser resistentes a las drogas y a los anticuerpos (Stuart-Harris *et al.*, 1985; Bizebard, 1995; Käsermann Y Kempf, 1996). Lo anterior se explica, porque la unión de la hemaglutinina al receptor de ácido siálico, tiene lugar por un bolsillo poco profundo, cuyos residuos de aminoácidos constituyen sitios que son fundamentales para que se inicie el ciclo replicativo de este virus y este paso es un blanco perfecto de drogas antivirales (Lentz, 1990; Bizebard *et al.*, 1995). Por ésta razón, es necesario incluir en los estudios de antivirales, cepas de virus influenza con diferentes tipos de HA y NA, ya que al estudiar la acción de extractos vegetales, se pueden detectar respuestas diferentes (Nagai *et al.*, 1995 b). Tal es el caso de los estudios

con los extractos de la planta *Sanicula europea* L., frente a las cepas de influenza A y B. Los investigadores detectaron acción antiviral frente a las del tipo A pero no para las del tipo B. Cuando ése mismo extracto, fue probado frente a la cepa A/Victoria/1/75(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), provocó la aparición de placas microscópicas del virus en las células MDCK. Esta respuesta, pudiera estar relacionada con cambios en la virulencia de la cepa, luego del tratamiento con el extracto de la planta *Sanicula europea* L., (Turan *et al.*, 1996). Todo lo antes expresado, hace que la búsqueda de drogas antivirales de amplio espectro, sea una necesidad que crece por día y justifica las investigaciones en este campo (Ostheraus y de Jong, 1999; Lipatov *et al.*, 2004; Osterholm, 2005).

En este estudio del BLBu, se encontró que las cepas de virus influenza A y B estudiadas, mostraron reducciones significativas de sus títulos infectivos (DIE<sub>50</sub>), tanto las de referencia como los aislamientos nacionales de influenza A, aspecto muy importante para estudios futuros de este extracto de granada.

#### **V.2.2- Actividad virucida directa del BLBu frente al virus influenza A.**

En los extractos procedentes de plantas, a los alcaloides, flavonoides y fenoles, se les atribuyen actividad virucida extracelular para los virus envueltos. Para el caso de los virus desnudos, sin embargo, la acción virucida es intracelular (Berghe *et al.*, 1984). Estos autores les adjudicaron a flavonas y glicósidos flavonoides, afinidad por las proteínas virales y a juicio de ellos, estos compuestos ejercen su acción en el paso de adsorción de los viriones a la célula hospedera. Para el BLBu, el estudio fitoquímico arrojó un alto contenido de flavonoides y probablemente opere en su acción antiviral virucida un mecanismo similar al descrito con anterioridad, ya que el virus influenza es envuelto. Dado la variada composición química del BLBu, quizás ésta no sea la única vía por la que ejerce la acción antiinfluenza observada durante esta investigación.

Los ensayos de la acción virucida directa del BLBu, frente a la cepa de virus Influenza A/Mississippi/1/85(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), permitieron concluir que la mejor variante de tratamiento con este extracto liofilizado fue la que utilizó 125µg / mL y un tiempo mínimo de 15 minutos, con independencia de la temperatura que se utilizó en los

mismos; este resultado que fue de gran utilidad para profundizar en el mecanismo de acción antiinfluenza del BLBu.

En otra investigación realizada por O. Caballero, éste evaluó una fracción química denominada REA. Esta fracción, rica en flavonoides y preparada a partir del extracto BLBu, exhibió una acción virucida directa en la línea MDCK, contra la cepa del virus Influenza A/Victoria/3/75(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>). Esta fracción, cuando fue evaluada en dicha línea celular, produjo la reducción de más de 3.2 log<sub>10</sub> del título infectivo viral. Según este autor, la acción antiviral de REA, fue dependiente de la concentración (Caballero, O., 2001). Estos resultados contribuyeron a confirmar los encontrados para el liofilizado BLBu, en esta investigación.

El estudio de las proteínas totales mediante SDS-PAGE, diferentes cepas del virus influenza para estudiar la acción virucida directa del BLBu, demostró luego del tratamiento con el extracto, la presencia de las proteínas PA, NA, HA1, HA2 y M2, las que son constitutivas del virus. Se verificó que no se produjeron diferencias en los patrones electroforético de las cepas del virus influenza tratadas con el BLBu y las no tratadas, que se utilizaron como controles. Este resultado fué sustentado por los densitogramas correspondientes a las diferentes corridas, los que permitieron los cálculos de los pesos moleculares de las bandas de proteínas de las diferentes corridas. El patrón electroforético y los pesos moleculares estimados para las respectivas bandas de proteínas de las diferentes cepas de influenza, utilizadas en esta investigación, coincidieron con los encontrados por otros autores para éste virus (Kristova *et al.*, 1987; Pérez, 1989; Haslam, 1990). Los perfiles electroforéticos obtenidas en este estudio, fueron muy similares a los mostrados en otros trabajos, sólo con ligeras diferencias en los pesos moleculares estimados (Kristova *et al.*, 1987; Kingsbury, 1996). Estas diferencias podrían explicarse por la variabilidad de los antígenos de superficie del virus influenza, entre ellos, la HA y quizás a condiciones experimentales distintas con respecto a los de los autores antes citados.

El perfil de corrida obtenido para las cepas Habana y Holguín, aislamientos cubanos, resultó en nuestro caso muy similar al mostrado en otro estudio electroforético de cepas de influenza (Pérez, 1989). En otros estudios con antivirales, se ha referido también actividad virucida contra el virus influenza, pero en tales casos se ha

producido la destrucción de las proteínas superficiales del virión, cuestión que ha explicado la acción antiviral referida (Luo, 1997). Este resultado permitió conocer que luego del tratamiento directo con el extracto BLBu, no ocurre la destrucción de las proteínas constituyentes del virus influenza.

La corrida electroforética del extracto BLBu, éste no mostró bandas de proteínas, aspecto que favoreció el análisis de la acción antiviral de este extracto frente al virus. Los grupos amino encontrados al BLBu en el tamizaje fitoquímico, posiblemente pertenezcan a péptidos o polipéptidos de bajo peso molecular que contiene este extracto, los que no fueron detectables en este estudio. En las electroforesis de las muestras virales controles y las tratadas con el BLBu, se encontraron proteínas en el rango de 16-68 kDa para el % de acrilamida empleado. En este resultado, se incluyeron las proteínas del huevo, ya que estas son parte integrante del embrión de pollo y que fue el hospedante donde se replicó el virus. Estas proteínas no fueron eliminadas totalmente en el proceso de preparación de las muestras, con relación a esto último, se ha verificado que para los virus envueltos, inclusive en muestras virales purificadas rigurosamente, es inevitable un determinado grado de contaminación con las proteínas hospederas (Barret e Inglis, 1985).

Para el caso de la proteína  $H_a$  del virus influenza, el patrón de corrida coincide con una proteína propia del líquido alantoideo, razón que a nuestro parecer, no nos permitió distinguirla. Las HA1 y HA2, se separaron en las corridas y se pusieron a relieve en los densitogramas correspondientes. Esto fue corroborado por los pesos moleculares estimados para las bandas de proteínas en los densitogramas. Ya que HA1 y HA2, aparecieron en las electroforesis de las muestras, pero la prueba de hemaglutinación fue negativa, podría inferirse que debió haber ocurrido un bloqueo o impedimento estérico por parte del BLBu, que impidió la hemaglutinación y esto explicaría la acción virucida directa exhibida por este extracto.

El mecanismo acerca de la acción de los antivirales, propuesto por Lentz en 1990, podría servir de sustentación para explicar la acción virucida directo del BLBu. La explicación se basaría en la estructura espacial de la molécula de hemaglutinina, en la que el sitio activo de la molécula reside en un bolsillo poco profundo, donde podría depositarse el antiviral para producir el bloqueo de su acción biológica. Algo similar a

lo que ocurre con los anticuerpos neutralizantes para el virus, los que producen reducciones cuantificables en la infectividad viral y la inhibición de la hemaglutinación de los virus influenza (Berghe *et al.*, 1985, Lentz, 1990; Burleson, *et al.*, 1992; Mahy y Kangro, 1996; Choi *et al.*, 1996). Aquí tiene su expresión más fiel, el vínculo estrecho de la estructura con la función, tal como lo han sugerido numerosos autores.

En este estudio, se observó también que cuando el BLBu se enfrentó a la cepa A/Habana/299/ (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), ocurrió la mayor reducción de título infectivo, más de tres log<sub>10</sub>, en comparación a su control, para todas las dosis de virus ensayadas. Lo antes expuesto, concuerda con los resultados informados para los extractos crudos de hojas y frutos de una planta conocida como guareaguidona (Simoni *et al.*, 1996). Estos extractos mostraron actividad antiviral contra el virus de la pseudorrabia y provocaron reducciones del título infectivo de 3 log<sub>10</sub> en tratamientos virucidas contra éste. Otros estudios de acción virucida, fueron los realizados por Wyde y cols., ellos encontraron que el extracto SP-303, redujo 2 log<sub>10</sub> y más la infectividad del virus influenza y del sincitial respiratorio que emplearon (Wyde *et al.*, 1993).

Con respecto a las glicoproteínas de superficie del virus influenza, la hemaglutinina, la M2 y la neuraminidasa, es a esta última, a la única que no se le conoce implicaciones en la formación de canales iónicos (Käserman y Kempf, 1996). Este evento es fundamental para que se lleve a cabo la liberación del virión del endosoma durante la replicación. Se conoce que la hemaglutinina participa en este paso, el cual es crucial para la multiplicación del virus. A nuestro parecer, la acción del BLBu pudiera consecuentemente impedir este paso de la replicación viral.

Si tomamos en cuenta que la hemaglutinina es la proteína mayoritaria del virus influenza, se plantea que por cada 200 espículas de HA hay solamente una de NA y, que la proteína M2 está pobremente representada en la membrana de los viriones (Frankel *et al.*, 1988; Käserman y Kempf, 1996), entonces pudiera ser que las alteraciones que produce el extracto BLBu en la hemaglutinina de influenza, inciden de manera tal en la funcionalidad de esta molécula, que no le permiten al virión infectar y lograr la replicación. Esto último, está en consonancia con lo planteado por Stuart-Harris, quién definió la hemaglutinina como el blanco por excelencia para el desarrollo y búsqueda de antivirales contra el virus influenza (Stuart-Harris, 1985). Los

resultados aquí presentados, permiten concluir que el BLBu tiene una acción virucida directa relacionada con la molécula de hemaglutinina, que afecta la infecciosidad del virión de manera irreversible. Esta acción virucida del BLBu, no afecta el patrón electroforético del virus, es dependiente del tiempo y de la concentración de este extracto e independiente de la temperatura de tratamiento.

### **V.2.3-Acción del BLBu sobre la apoptosis inducida por influenza A en las células MDCK.**

Estudios actuales de evaluación farmacológica de algunas sustancias naturales procedentes de plantas medicinales o que normalmente incorporamos en la dieta cotidiana, han sugerido que muchas de ellas intervienen, estimulando o inhibiendo, el proceso de apoptosis. El frijol de soya, el ajo, el jengibre, el té verde, así como el ácido brionolítico procedente de *Trichosanthes kirilowii* var Japonica y la alicina, proveniente de *Allium sativum*, son potentes inductores de apoptosis, contrariamente a los efectos inhibitorios que muestra el extracto proveniente de *Panax ginseng*, sobre la muerte celular programada que inducen las radiaciones en los folículos del cabello (Thatte *et al.*, 2000). Se conoce también que la cafeína, presente en el té negro y el café, es un inductor de apoptosis en cultivos celulares y en modelos animales *in vivo* (Dubrez *et al.*, 2001; Jang *et al.*, 2002; Bhattacharyya *et al.*, 2003). Otras sustancias de origen sintético y de amplio uso en la cura de muchas enfermedades, como la aspirina (vasodilatador por excelencia), esteroides (actividad antiinflamatoria), la amantadina, la rimantadina y el zanamivir (antigripales), también han mostrado un efecto de inducción de apoptosis, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Qiao *et al.*, 1998; Freund, 1999; Hayden, 1999; Sugaya y Miura, 1999; Marchetti *et al.*, 2003). Los virus son patógenos intracelulares y debido a su capacidad de disparar los mecanismos efectores de la inmunidad celular, han sido ampliamente utilizados en investigaciones de inducción e inhibición de la apoptosis, tanto en animales de experimentación, como en cultivos celulares (Mori *et al.*, 1995; Aries *et al.*, 2001; Casadelvalle, 2004).

La fragmentación del ADN es uno de los eventos característicos de la muerte apoptótica (Collins *et al.*, 1997; Mc Carthy y Evan, 1998; Walker *et al.*; 1998; Alfaro *et*

*al.*; 2000; Li y Darzynkiewicz, 2000; Nagata, 2000), de manera que los virus pueden ser empleados, además, como sistemas modelo para la evaluación del efecto anti-apoptosis de sustancias naturales o sintéticas (Hayden, 1999; Vaqueroa, 2000; Alfaro *et al.*; 2000; Aries *et al.*, 2001; Dubréz *et al.*, 2001).

Las diferencias en los eventos de inducción de apoptosis por las cepas de influenza A y B, se atribuyen a las diferencias serológicas en las hemaglutininas de este virus (Ohyama *et al.*, 2003). Se conoce que la neuraminidasa de influenza, también juega un papel relevante en la inducción de este fenómeno. Existen evidencias de que la neuraminidasa y la hemaglutinina, constituyen un conjunto clave para disparar la apoptosis (Hayden, 1999; Lou *et al.*, 1999). La NS1, que es una proteína no estructural del virus, también tiene un papel fundamental en la apoptosis que desarrollan los virus influenza. A través de NS1, se ejecuta el proceso de muerte programada cuando se inicia la infección en células MDCK y HeLa, mecanismo que se establece mediante la inhibición de la activación del interferón celular. Es interesante destacar el papel de las proteínas no estructurales relacionadas con el interferón celular. Ya que NS1 no fue detectada en este estudio, pudiera constituir otro blanco de la acción antiviral del BLBu

En este estudio, la influenza A/Japan/10/99(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) fue inoculada a baja multiplicidad de infección en las células MDCK, con el objetivo de poder visualizar la fragmentación del ADN. Esta ruptura del ADN, tiene lugar, como parte del daño citopático que provoca el virus influenza, en una línea celular permisiva para este virus (Price *et al.*, 1997; García-Sastre *et al.*, 1998; Fujimoto *et al.*, 2000; Ohyama *et al.*, 2003). Para estudiar si el BLBu por sí sólo era capaz de inducir la fragmentación del ADN, se partió de las concentraciones del extracto que permitieron más del 50 % de células viables en un estudio anterior. Con relación al tiempo de tratamiento con el BLBu, se consideró que la apoptosis puede manifestarse de manera temprana, tardía o como aponecrosis (Formigli *et al.*, 2000; Hay y Kannourakis, 2002).

Como resultado del análisis de la integridad del ADN de las células MDCK infectadas con el virus influenza, se evidenció que a las 24 horas de infección, ya había tenido lugar la fragmentación del ADN y comenzaba por tanto el proceso de apoptosis en estas células. La fragmentación del ADN se observó aún a las 48 horas y a las 72

horas, posteriores a la infección con el virus, en el que se produjo la total degradación del material nuclear, por lo que el estudio de protección del BLBu, fue posible realizarlo durante este tiempo, o sea que el estudio de la posible acción antiapoptótica del BLBu se pudo iniciar de manera temprana. Resultados similares a los mostrados en este estudio del BLBu, han sido observados por otros investigadores. Ellos refieren que para inducción de apoptosis con el virus influenza, a partir de las 72 horas posteriores a la infección, ya es demasiado tarde para estudiar este fenómeno en las células MDCK y las HeLa, infectadas con el virus influenza (Schultz-Cherry *et al.*, 2001; Takizawa, 2002; Zhirnov *et al.*, 2003).

Para estudiar al BLBu, fue muy útil seleccionar a la amantadina como patrón para inducir la apoptosis, tomando en consideración los estudios que encontraron que éste fenómeno se produce cuando se administra esta sustancia a altas concentraciones a las células en cultivo (Asai *et al.*, 2001). Esta fragmentación del ADN celular que provoca la amantadina, fue también verificada y mostrada en los resultados de este trabajo. Se demostró que éste proceso es llevado a cabo en función de la dosis y el tiempo de duración de exposición al inductor, similar a lo encontrado por otros investigadores (Lorenzo *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001; Zhang y Xu, 2002).

Luego del tratamiento con el BLBu, no se detectó la fragmentación del ADN de las células MDCK. Todo esto, a nuestro juicio, tiene correspondencia con los hallazgos de Sánchez - Lamar y cols., cuando estudiaron la acción de este extracto en otra línea celular y demostraron la acción protectora del mismo, frente al estrés oxidativo (Sánchez- Lamar *et al.*, 2005). En este trabajo, quedó demostrada la capacidad del extracto BLBu para inhibir el fenómeno de apoptosis inducido por el virus influenza en las células MDCK.

Con respecto a esto último, se ha planteado el importante papel que juega la hemaglutinina del virus influenza, en el desencadenamiento del fenómeno de apoptosis (Price *et al.*, 1997; Fujimoto *et al.*, 2000; Ohyama *et al.*, 2003) y como fue evidenciado en esta investigación, esta proteína quedó bloqueada por parte del BLBu para su accionar biológico, lo que formaría parte del mecanismo de acción antiapoptótico del BLBu.

Está demostrado que los virus influenza inducen degeneración celular en los cultivos de células y el efecto citopático principalmente es registrado a través de la muerte celular programada (Mahalingman *et al.*; 2002). En los últimos años se ha discutido que los virus influenza utilizan la apoptosis para garantizar la diseminación viral y lograr una espectacular producción de viriones en un período de tiempo breve, burlando de esta forma el sistema inmune del organismo invadido (O'Brien, 1998; Yuan *et al.*, 2001; Everett y Mc Fadden, 2001; Mahalingam *et al.*, 2002).

De modo general, las partículas virales que conducen la célula hacia la apoptosis, viajan dentro de los apoptosomas y cuando estos son fagocitados por los macrófagos, transitan a través del órgano u organismo en el interior de los cuerpos apoptóticos, sin ser reconocidas por mediadores del sistema inmune, ni atacadas por las enzimas de degradación. De esta forma, colonizan otros tejidos y órganos para establecer la enfermedad infecciosa y garantizar una progenie viral en muy corto tiempo (Geiss *et al.*, 2002; Uchida y Ohyama, 2003).

En este estudio se encontró que el BLBu de alguna manera interrumpe el proceso de replicación viral, relacionado con la adsorción y penetración del virus, al impedir quizás la unión de la hemaglutinina, en primera instancia. A la luz de estos resultados, se puede concluir que los componentes de este extracto, también ejercen otras acciones farmacológicas que pudieran impedir la replicación viral, en especial para aquellas partículas virales que pudieron escapar a la acción inicial del extracto y que al replicarse pudieran involucrar eventos o daños citopáticos más tardíamente y que conducen a la muerte celular programada.

Teniendo en cuenta los elementos anteriores, será necesario continuar profundizando en el papel que juegan los componentes aislados del BLBu, cual o cuales de estos, están implicados en la inhibición de la fragmentación del ADN genómico verificada para este extracto, así como investigar qué mecanismos moleculares se disparan para que sus componentes logren inhibir el proceso apoptótico inducido por el virus influenza *in vitro*, como parte de su mecanismo de acción antiviral.

### **V.3- Acción antiviral del BLBu en el modelo experimental de gripe en el ratón.**

Las evaluaciones de los antivirales en diferentes biomodelos, ha sido ampliamente recomendado para los estudios preclínicos de los mismos (Drobyshevskaya *et al.*, 1962; Hsiung y Chan, 1989; Hirsch y Kaplan 1990; Sidwell *et al.*, 1994; Sidwell *et al.*, 1998; Greek y Swingle, 2000; Olfert y Godson, 2000).

En los ratones tratados con el extracto de granada, BLBu, fue evidente la protección que brindó este extracto a los animales, en particular ante los efectos tan adversos que en ellos causa la infección experimental con el virus de la gripe. Los ratones que fueron tratados con 175mg/Kg del extracto solamente, por la vía intranasal u oral, exhibieron una ganancia de peso similar a los animales controles. Para esta variante de tratamiento, los animales manifestaron una reducción apreciable en la triada de síntomas clínicos: erizamiento, respiración forzada, temblores y letargo con respecto a los que no fueron sometidos al tratamiento con este extracto.

El conjunto de síntomas mencionado con anterioridad, fueron los marcadores de la enfermedad que produjo la cepa de influenza que fué utilizada en este estudio. Las imágenes del tejido pulmonar de los ratones infectados y tratados con el BLBu, por ambas vías de administración del antiviral y con la mayor concentración de éste, mostraron una recuperación de los daños que les causó el virus al recuperarse el aspecto característico del tejido sano. Se produjo en consecuencia, un acortamiento en la duración de la sintomatología clínica que el virus produce en estos animales. Por tanto, las imágenes de los pulmones de los ratones tratados, comparados con las del grupo al que sólo se le administró el BLBu (control negativo), fueron definitivas para apreciar la protección del extracto *in vivo*.

Los resultados de la acción antiviral *in vivo* del extracto BLBu, fueron similares a los encontrados para el extracto vegetal liofilizado SP- 303. En los estudios llevados a cabo en los ratones tratados con este extracto, se produjo una ganancia de peso, dentro del rango de valores normales que se refieren para esta especie, la que fue interpretada como señal de recuperación de la neumonía experimental. En este estudio, los investigadores también observaron la reducción del tiempo de la consolidación de los pulmones en los animales tratados con el SP- 303, aspectos que les indicó la eficacia de este extracto (Sidwell *et al.*, 1994).

Otros resultados similares a los descritos para el BLBu, fueron los encontrados para un jarabe preparado con un extracto vegetal procedente de la familia *Euphorbiaceae*, evaluado frente a un conjunto de virus respiratorios de la familia *Paramyxoviridae*, con el objetivo de estudiar su espectro antiviral. Los signos y alteraciones propios de una neumonía en los ratones, fueron disminuidos y/o eliminados por la acción antiviral del extracto vegetal en estudio (Wyde, 1993).

En las investigaciones de posibles medicamentos con acción antigripal, resultan de gran utilidad los datos que se puedan obtener acerca de la histopatología del tracto respiratorio de los ratones sometidos a este tipo de estudio preclínico. Esto se justifica también en gran medida, por la capacidad carcinogénica y alta toxicidad que suelen tener los medicamentos antivirales (Faccini *et al.*, 1990; Sidwell *et al.*, 1994). En los pulmones de los animales a los que sólo se les administró el BLBu y que pertenecieron al grupo control del extracto, no se observaron lesiones macroscópicas, ni en la histología normal de dichos órganos. Los resultados de la histopatología de los ratones Balb/C presentados en este trabajo, complementaron otros estudios que evaluaron la toxicidad aguda del BLBu en ratones OF1 y ratas Wistar, en las que no observaron daños estructurales en los tejidos de los pulmones (Morton, 1981).

En el estudio de la acción antiviral del BLBu *in vivo*, con el tratamiento por vía oral, el extracto mostró efecto protector, a la mayor concentración ensayada. Para analizar estos resultados, se debe tener en cuenta las características del tracto digestivo y la existencia de otras barreras, a las que se sometió el extracto para su acción farmacológica. Por esta vía de administración, el BLBu pudiera sufrir degradaciones químicas y diversos cambios con respecto al extracto original, que pudieran modificar a favor o en contra, su acción antiinfluenza. Con respecto a los resultados de estos estudios, pudiera haber sucedido que la dosis que se suministró para observar el efecto deseado, debió ser superior a la mínima que se empleó en esta investigación. Otros investigadores, refirieron la inhibición de la infección del virus influenza en ratones por parte de un extracto vegetal denominado GS – 4104, a dosis inferiores a las empleadas para el BLBu. En esas condiciones el GS – 4104, mostró su eficacia cuando fue suministrado por vía oral a los ratones (Sidwell *et al.*, 1998).

Cuando se realizó el tratamiento de los ratones con ambas concentraciones del BLBu, pero por la vía intranasal, se puso de manifiesto una ganancia de peso acorde a lo referido para esta especie, se redujo el tiempo y la gravedad de los síntomas en los animales infectados con el virus. En esta modalidad de ensayo, la infecciosidad y por ende la presencia de hemaglutinina viral, en las muestras de pulmón provenientes de los animales tratados con este extracto, mostraron reducciones apreciables en sus títulos hemaglutinantes e infectivos.

Sin embargo, este efecto protector que se manifestó en dependencia de la concentración para el BLBu, no se produce siempre para los extractos de origen vegetal. El SP-303, no mostró una acción dependiente de la concentración y la acción antiviral dependió de la vía que se utilizó para el tratamiento de los animales enfermos. En este estudio, la administración del SP-303 mediante aerosol, funcionó mejor que la vía intraperitoneal ensayada (Sidwell *et al.*, 1994).

En 1992, Hennes y cols., describieron las alteraciones en los pulmones y el hígado de los ratones infectados influenza A. Ellos vincularon los daños del virus a las alteraciones de las defensas en los animales inoculados con virus influenza y notaron que los daños que se producían en estos, estaban relacionados con la ausencia de sustancias antioxidantes en los tejidos infectados con el virus influenza, el que causaba estrés oxidativo en el curso de la enfermedad (Hennes *et al.*, 1992). En la literatura aparecen referencias a los estudios acerca de las modificaciones que tienen lugar en el funcionamiento hepático y en los tejidos del pulmón de los ratones que se infectan experimentalmente con cepas de influenza A. En particular se mencionan las alteraciones en los mecanismos de defensa antioxidantes que tienen lugar en el biomodelo de gripe (Hennes *et al.*, 1992).

Para el caso del BLBu, existen estudios que refirieron la capacidad de éste extracto en cultivo de células para protegerlas del daño causado por el estrés oxidativo (Casadelvalle, 2004; Sánchez- Lamar *et al.*, 2005). Estos hallazgos han resultado referencias de gran valor para explicar la posible base de la actividad antiviral detectada a este extracto, si se tiene en cuenta, que el virus influenza origina muchas de las alteraciones antes referidas en los tejidos que infecta. En particular, este

efecto antioxidante se sumaría a otros, en aras de explicar los posibles mecanismos implicados en la acción antigripal del BLbu, en el modelo diseñado para evaluarlo.

Los resultados de la acción antiinfluenza del BLBu presentados en esta tesis, podrían compararse a los de Serkedjieva y Manolova. Ellos estudiaron el complejo polifenólico aislado de *Geranium sanguineum* L., el que resultó capaz de inhibir la replicación de los virus influenza A y B *in vitro*, *in ovo* e *in vivo*. Estos investigadores refirieron la protección de los ratones de la infección letal con este virus (Serkedjieva y Manolova, 1992).

El estudio de la acción del extracto de granada, en el modelo experimental de gripe en ratones Balb/C, complementó un importante paso en la evaluación preclínica de éste extracto liofilizado, preparado con el fruto de la especie vegetal *Punica granatum* L. frente al virus influenza.

#### **V.4- Valoración de la utilidad del biomodelo experimental de gripe.**

El desarrollo de modelos adecuados para la investigación de antivirales resulta de gran importancia y vigencia, si se toma en consideración la recurrencia y surgimiento de enfermedades originadas por el virus influenza (Snacken *et al.*, 1999; Osterholm, 2005). En tal sentido, otros trabajos con biomodelos de ratón, forman parte de los pioneros en este tipo de investigación. Estos estudios, sentaron las bases para el empleo exitoso del modelo experimental de gripe causado por el virus influenza en los ratones. Ellos refirieron la gran similitud de este biomodelo, con las alteraciones que este virus provoca en los pulmones de los humanos (Schulman y Kilbourne, 1963 y Hsiung y Chang, 1989; Calvi, 1997). Investigaciones más actuales en este campo, han confirmado el criterio antes planteado (Petica *et al.*, 1994; Nishimura *et al.*, 2000; Laver *et al.*, 2000; Ottolini *et al.*, 2005). Al respecto, Nishimura y cols., cuando estudiaron la influenza (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>) en ratones de la línea ddY, libres de gérmenes patógenos específicos, refirieron por primera vez, la necrosis del tejido adiposo, como parte de la patogénesis del virus influenza *in vivo*. Estos hallazgos avalan la importancia el uso de biomodelos, puesto que en los ratones se pueden verificar daños no referidos con anterioridad (Nishimura *et al.*, 2000). Los autores antes mencionados, también observaron en la infección con la cepa de influenza (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>) la congestión pulmonar, desde el primer pase del virus en las Líneas de ratones que

emplearon. Cuando compararon los resultados anteriores con los obtenidos por ellos para los ratones de la línea Balb/C, advirtieron que el grado de letalidad de la influenza (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>) estaba afectado por un factor o la combinación de varios, que identificaron con: la cepa viral, el número de pases del virus, la edad de los animales y el volumen de inóculo.

Respecto a los daños que puede originar *in vivo* el virus influenza, Nishimura y cols., refirieron para la cepa de influenza (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>) un conjunto de alteraciones no descritas con anterioridad en el modelo de ratón. Los daños en órganos y sistemas, radicaron en cambios degenerativos severos en el tejido adiposo, daños del sistema nervioso central y afectaciones graves de los pulmones de los ratones. En el estudio inmunohistoquímico, detectaron antígenos del virus influenza en el corazón, el hígado, el bazo, los riñones y la sangre de los ratones infectados (Nishimura *et al.*, 2000). Los datos que se brindaron en éste modelo, resultan de gran utilidad práctica, para la búsqueda de antivirales; en particular aquellos que sean eficaces ante las variantes emergentes de influenza, capaces de afectar a los seres humanos (Lipatov *et al.*, 2004; De Jong *et al.*, 2005).

Respecto a los factores involucrados en la patogénesis viral, *in vivo*, Hsiung y Chan también destacaron la influencia e importancia de las variables mencionadas por Nishimura y cols., y las responsabilizaron con los daños que produce el virus en los animales (Hsiung y Chan, 1989; Nishimura *et al.*, 2000). Otros autores que han utilizado cepas de influenza diferentes a la (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>) en sus investigaciones, han constatado también la relación entre estos factores con la enfermedad que causa en los ratones (Mori *et al.*, 1995; Sidwell *et al.*, 1994; Neiryck *et al.*, 1999).

En el biomodelo de gripe causado por el virus influenza, que se empleó en esta investigación, las alteraciones constatadas en tejido pulmonar, resultaron congruentes con las alteraciones propias de una bronconeumonía en su estadio más avanzado, similar a lo descrito por otros autores (Schulman y Kilbourne, 1963). Los resultados mostraron que a medida que se realizaban los pases del virus en los ratones, aumentaba la carga viral en los pulmones de los ratones, lo que iba dando una medida de la adaptación paulatina del virus al nuevo tejido. Los pulmones de los ratones pertenecientes al primer pase viral, manifestaron focos de neumonía ligera.

Los del segundo pase, tuvieron manifestaciones de un proceso neumónico moderado, mientras que en el tercero, aparecieron pulmones infectados con una consolidación parenquimatosa, que panorámicamente fue evidente y que se correspondió con una neumonía intersticial severa. En contraste con esto último, las imágenes del tejido pulmonar de los animales controles, mostraron la apariencia normal de éste tejido. El biomodelo empleado en este trabajo, tomó las experiencias de varios investigadores (Cook *et al.*, 1998 y Nishimura *et al.*, 2000). Ellos encontraron que durante el tercer y quinto día, un incremento de células alveolares, predominantemente en regiones peribronquiales y perivasculares en las muestras de tejido pulmonar y las correlacionaron con los signos marcadores de la enfermedad en los animales. Algo similar también lo observamos en este estudio. Los resultados de los exámenes anatomopatológicos presentados en esta investigación, coincidieron con las alteraciones propias de una neumonía intersticial, al tercer pase de virus. La presencia de infiltrados inflamatorios, en el tabique interalveolar, permitió inferir la presencia de virus en el tejido pulmonar, similar a lo que se observa en los pulmones humanos infectados con influenza. La atelectasia, que ha sido referida por otros investigadores como un daño propio de la infección con influenza, también la detectamos, tanto en los de los pulmones de los ratones inoculados como en algunos del grupo control. No obstante, a pesar de constituir un daño en la arquitectura pulmonar, ésta podría estar originada por causas ajenas al virus en estudio o debida a otras causas. En otros trabajos de patogénesis de influenza en ratones, se han referidos la cianosis, en la cola y las orejas en estos animales inoculados con el virus y se han descrito estas alteraciones como marcadoras de la enfermedad que causa en dichos animales (Nishimura *et al.*, 2000). A nuestro parecer, esto quizás se deba a que utilizaron la Influenza A/PR/8/34(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>), la cual es altamente patógena y mortal para los ratones.

Para el montaje del biomodelo, se adaptó la Influenza A/ Sydney/ 5/ 97(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), al tejido pulmonar de los ratones Balb/C. Este proceder, ha sido recomendado por numerosos estudios precedentes (Kilbourne, 1975; Hsiung y Chan, 1989; Ottolini *et al.*, 2005). Los pases seriados, contribuyen de alguna manera a adaptar al virus a un tejido que es bien diferente al original en el se replicó originalmente, pues éste procedía del saco

alantoideo de embriones de pollo, una especie diferente a la murina. Se ha señalado la importancia de los pasos virales, sobre todo para el reconocimiento de los receptores celulares que debe ocurrir durante la replicación del virus en el tejido pulmonar, donde encuentra nuevas condiciones para multiplicarse (Lennette, 1992; Cook *et al.*, 1998). No obstante esto último, durante el estudio del Camostat, un medicamento antiinfluenza, cuando se evaluó en el modelo de gripe en ratones, no fue necesario adaptar previamente la cepa de virus influenza que emplearon los investigadores (Lee *et al.*, 1996). Esto de no tener que realizar la adaptación del virus al nuevo hospedante, representa una gran ventaja, en cuanto al tiempo y el costo de los experimentos. Pero en esto último, influye la cepa viral que se emplee, la línea de ratón que se seleccione y la vía que se utilice para inocular el virus, entre otros factores más.

Recientemente, Ottolini y cols., diseñaron un biomodelo experimental de gripe, en el que se emplearon la rata algodonera (*Sigmodon Hispidus*) y la cepa de Influenza A / Wuhan /359/ 95. Lo interesante de este trabajo es que el montaje de este biomodelo, no fue necesaria la adaptación previa del virus influenza al tejido pulmonar de los animales. En este estudio, se emplearon ratas consanguíneas (imbred) y sin embargo, estos animales respondieron de manera diferente a lo que encontraron otros investigadores con ratas no consanguíneas (outbred) de esta misma Línea. Estos investigadores consideraron las diferencias genéticas, como un factor determinante en sus resultados (Ottolini *et al.*, 2005).

La variación del peso corporal de los animales infectados con el virus influenza en esta investigación estuvieron asociadas con una conducta animal menos activa, caracterizada por el letargo, la adopción de la posición en ovillo de los ratones enfermos, estrechamente relacionada con la presentación de las manifestaciones clínicas que causa el virus influenza en estos animales. La enfermedad de los ratones provocó la disminución del consumo de alimentos y agua lo que originó las diferencias de peso corporal con respecto a los animales sanos. En el modelo diseñado para evaluar el BLBu, la disminución promedio de peso que se verificó, fue estadísticamente significativa, aunque en otras investigaciones se han verificado variaciones de peso aún mayores (Cook *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 2002). Esto

quizás se pueda explicar porque la cepa de virus influenza seleccionada para evaluar el BLBu tenga una patogenicidad menor para los ratones Balb/C. Este juicio está basado en las referencias que aparecen en la literatura con respecto a la patogenicidad de la Influenza A/PR/8/34(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) para el ratón. Son numerosos los trabajos que refieren la importancia de esto en la infección de los ratones inoculados con el virus influenza, incluidos los modelos en los que los animales no llegan a enfermar (Hennet *et al.*, 1992; Cook *et al.*, 1998; Neiryck *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 2002). En biomodelos con el virus influenza A, los daños del virus están relacionados con la genética del hospedante. Se sabe que la presencia del alelo dominante Mx1+, determina la resistencia en el ratón a la infección. Los animales transgénicos carentes de este gen Mx1+, fueron sensibles a la infección por éste virus. (Arnheiter *et al.*, 1990).

Los hallazgos clínicos, histopatológicos y virológicos en los ratones de la Línea Balb/C infectados con la Influenza A/ Sydney/5/ 97(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), permitieron contar con una simulación bastante cercana a la neumonía que provoca el virus influenza en el humano y con ello evaluar la acción antiinfluenza del extracto liofilizado de *Punica granatum* L. (BLBu).

## VII.- Conclusiones.

- El extracto liofilizado BLBu, posee compuestos bioactivos con actividad antiinfluenza al reducir la infectividad *in ovo*, *in vitro* e *in vivo*.
- El BLBu, posee acción virucida directa al bloquear la actividad biológica de la hemaglutina del virus influenza, en tanto el perfil electroforético del virus permanece intacto.
- El BLBu bloquea la apoptosis provocada por el virus influenza, en la Línea Celular MDCK.
- El modelo de gripe en ratones Balb/C que se diseñó, permitió evaluar la acción antiinfluenza del BLBu.
- El BLBu posee acción antiviral *in vivo* al contribuir a la recuperación clínica de los ratones Balb/C que se enfermaron con el virus influenza.

### **VIII.- Recomendaciones.**

- Continuar los estudios de los mecanismos de acción antiapoptóticos del extracto liofilizado BLBu.
- Realizar la formulación y los ensayos clínicos del BLBu en humanos, para confeccionar el expediente correspondiente como medicamento natural para tratar la influenza y neumonía, dadas las evidencias populares y los resultados teóricos y prácticos de ésta tesis.

### VIII.- Bibliografía.

- Adams L; Seeram N; Aggarwal B; Takada Y; *et al.*, (2006). Pomegranate juice total Pomegranate Ellagitannins and Punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer. *J Agric Food Chem* Feb 8;54 (3):980-85.
- Ahmad, A.; J. Davies; S. Randall; G.R. Skinner (1996). Antiviral properties of an extract of *Opuntia streptacantha*. *Antiviral Research* 30(2-3); 75-85.
- Alfaro, E; García, C y Dueñas, A. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Rev Inst Nal Cancerología (Mex)* 6 (4):275-80
- Amorin, A. (1995). Test of mutagenesis in mice treated with aqueous extracts from *Púnica granatum* L. *Revista Brasileña de Farmacia* 74 (4):110-111.
- Anesini, C. y Pérez C. (1993). Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 39(2):119 -128.
- Anuario Estadístico (2005). Dirección Nacional de Estadística. MINSAP. Cuba. ISSN 1561- 4425. Pag 25-7.
- Aries, S.; Weirich, B.; Hansaen, R.; Dennin, R.(2001). Early T cells Apoptosis and Fas expresión during antiretroviral therapy in individuals infected with HIV. *J Inmunol* 48:86-91.
- Armas, L.; González, E.; Goyenechea, A. (1993). Influenza y otras infecciones respiratorias agudas. República de Cuba, 1989. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 45(1):72-78.
- Arnheiter, J. M.; Skuntz, S.; Noteborn, M.; Chang, S. y Meier, E. (1990). Transgenic mice with intracellular immunity to Influenza virus. *Cell*, 62: 51-61.
- Asai, Y.; Hashimoto, K.; Kujime, Y.; Gon, K.; Mizumura, K;Shinusi, F and Oire, T. (2001). Amantadine inhibe RANTES production by Influenza virus infected human bronquial epithelial cell. *Br. Farmacol.* 132:119-28.
- Barbieri, F.; Pessini,G.;Sanchez,N.; *et al.*, (2002). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* .ISSN 0074-0276. Vol97 (7):1027-31.

- Barret, T. And S. Inglis (1985). Growth, purification and titration of influenza viruses. *The Influenza Viruses and Influenza*. Academy Press, New York, London: 243-264. p 119-146.
- Barreto, J.; Gundian, J.; Rodríguez, M. y Pino, P. (1998). Medicamentos antivirales. *Acta Médica* 8 (1), 86 – 100.
- Belshe, R. ; Buró, B. ; Nweman, F. ; Cerruti, L. ; Sim J. (1989). Resistence of Influenza A virus to amantadine and rimantadine: results of one decade of surveillance . *J Infect Dis*, 159: 430-475.
- Berghe, D.A. Vanden, A. J. Vlietinck and L. Van Hoof (1984). Present status and prospects of plant products as antiviral agents. Vlietinck, Dimmise. En: *Advances in medical plant research. Plenary lectures of the 32nd International Congress on Med Plant Research*. July 23-28: 47-48, 51-54, 75-78.
- Bhattacharyya, A; Choudhuri, T. ; Pal, S. ; Chattopadhayya, G ; and Daas,T. (2003). Apoptogenic effects of black tea on Ehrlichs ascitic carcinoma cell Carcinogenesis. *Antiviral Research* 24 (1) 75-80.
- Bizebard, T.; Gigant, B.; Rigolet; P. Rasmussen B.; Diat, O. *et al.*, (1995). Structure of influenza virus hemagglutinin complexed with a neutralizing antibody. *Nature* 376 (6535):92-94.
- Bombardelli, E.; Morazzoni, P.; Mustch, G. (1995). Extracts of *piliostigma thonningii*, the use thereof and formulations containing them. PN: EP 0685235.
- Borrajo, I. (1983). Introducción al laboratorio de Anatomía Patológica. En: *Citohistopatología I.*; MINSAP, 153-271.
- Braga, L.; Shupp, I.; Cumming, C.; Jett, M. *et al.*, (2005). Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol* Jan 4; 96 (1-2):355-9.
- Brown, H. (2005). Nation set out a global plan for influenza action. *Lancet* 366:1684-5.
- Budihardjo, I.; Olive, H. ; Lutter, M. ; Lou, X. ; Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspases activation during of apoptosis. *Ann Rev Cell Biol* 15:269-90.

- Bui, M.; Whittaker, G.; Helenius, A. (1996). Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *Journal of Virology* 70(12): 8391-8401.
- Burleson, F.; Chambers, T.; Wiedbrauk, D. *Virology: A Laboratory Manual*. Academic Press, Inc. California USA (1992).
- Caballero, O. (2001). Actividad antiviral de un extracto acuoso de *Púnica granatum* L. frente al virus Influenza A. Tesis de Maestría. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Calvi, F. (1997). Producción de un antisuero específico a la cepa A/Johannesburg /33/94(H<sub>3</sub> N<sub>2</sub>) en ratas Wistar para la caracterización del virus Influenza. Tesis de Maestría, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Cuba.
- Cápiro, N. (2004). *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Caña Santa como antígenotóxica frente a la acción de diferentes mutágenos en *Drosophila melanogaster*. Tesis Doctoral. Facultad de Biología, UH.
- Carr, C. y P. S. Kim (1994). Flu virus invasion: halfway there. *Science* 266(5183): 234-236.
- Casadelvalle, I. (2004). Efecto de dos extractos naturales de plantas sobre la apoptosis inducida por virus Influenza y Adenovirus. Tesis de Maestría. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Chang, L.; Chen, C.; Urlacher, V. y Lee, T. (2000). Differential apoptosis effects primate lentiviral Vpr and Vpx in mammalian cell. *J Biom Sci* 7. 322-33.
- Chávez, M.; Díaz, J.; Pérez, U. y Delfín, J. (1990). *Temas de Enzimología*. EMPES Tomo II, Facultad de Biología, UH.
- Chimdambara, M.; Jayapoakasha, G.; Singh, R. y Kim, G. (2002). Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Púnica granatum*) peel extract using in vivo models. *J Agric Food Chem*, 50 (17):4791-95.
- Choi, S.; Mamme, M.; Whitesides, G. (1996). Monomeric inhibitors of influenza neuraminidase enhance the hemagglutination inhibition activities of polyacrilamides presenting multiple C-sialidase group. *Che. Bio.* 3(2):97-104.

- Cohen, M. G. (1997). Caspases: The executioner of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16.
- Collins, J.; Schandall, C.; Young, K.; Vesely, C. y Willingham, M. (1997). Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* 45:923-34.
- Cook, M. (1965) .The anatomy of the laboratory mouse. Academy Press de San Francisco, London, pp75.
- Cook, P.; Eglin, R. y Easton, A. (1998). Patogenesis of Pneumovirus infections in mice and human respiratory syncytial virus in lungs of infected mice by in situ hybridization. *J Gen Virol* 79; 2411-17.
- Dass, G. ; Avram, M. ; Dornfeld, L. ; Kaplan, M. ; Coleman, R. ;Gaitini, D. *et al.*, (1999). Pomegranate juice flavonoids inhibit low-densitylipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and humans. *Drugs Exp Clin Res* 28:49-62.
- De clerq, E. (1995). Chemotherapy of human inmunodeficiency (HIV) infection based on chemotherapeutic intervention with early steps of the virus replicative cycle. *Postepy Biochemii* 41 (5):338- 42.
- De Jong, M. ;Thauh T. ; Klank T. *et al.*, (2005).Oseltamivir resistance during treatment of during of Influenza A(H<sub>5</sub> N<sub>1</sub>) infection. *N Engl Med* 353:2667-72.
- del Barrio y Parra (2000). Evaluation of the antiviral activity of aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 72: 317-322.
- Drobyshevskaya, A.; Pigarevsky, V. y Smorodintsev, A. (1962). Activity of phagocytic factors in experimental infection of white mouse pneumonia and meningopneumonia viruses. *Acta Virologica* 6 (5), 458 – 63.
- Dubréz, L.; Coll, J.; Hurbin, A.; Solary, E. and Favrot, M. (2001). Caffeine sensitive Human H358 cell line to p53 mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of Bax protein. *J Biol Chem* 276 (46), 38980-87.
- Enda-Caribe (1995). Púnica Granatum L. U. A. G. / U. Antioquia, 526-528.
- Everett, H y Mc Fadden, G. (2001). Viruses and apoptosis: Medlling With mitochondria. *Virology* 288, 1-7.

- Faccini, J.; Abbott, D. y Paulus, G. (1990). Respiratory Tract. En: Mouse Histopatology. A Glossary for Use in Toxicity and Carcinogenicity Studies. Elsevier, Amsterdam- New York- Oxford, pp 48- 71.
- Fauquet, C. (2005). Virus Taxonomy: Clasification and Nomenclature of viruses: eighth report of International Committe on Taxonomy Viruses. Academic Press Inc. Edited by: C.M Fauquet ; M.A. Mayo; J. H. Maniloff; W. Desselberger ; L. A. Ball.
- Field, F. (2001). Virology. En: Field, F. Editado por: David M. Knife, Petrre M. Howley, 4ta edición, Philadelphia.
- Fitoterapia. (2003). VADEMECUM de Prescripción, 4<sup>ta</sup> Edición. Editado por: Massón S.A. ISBN 84-458-1220-3.
- Flint, S. J (2000). Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control: 716-727.
- Formigli, L. ; Papucci, L. ; Tani, A. ; Shiavone, N. ;Tempestine, A. ; Orlandine, G. ; Cappacioli, S. ; Orlandine, S. (2000). Aponecrosis: Morfological and Biochemical exploration of a sincretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. J Cell Physiol 182, 41-49.
- Freund, B. (1999). Zanamivir. A review of clinical safety. Drug 4:56-9.
- Fujimoto, I.; Pan, T.; Takizawa, y.; Ohba, Y. y Nakanishi, Y. (2000). Clearance through apoptosis dependent phagocytosis of Influenza A virus infected cell. Cell Death Differ 5:426-31.
- García-Sastre, A.; Durbin, R.; Zheng, H.; Palese, P.; Levy, E. y Durbin, J. (1998). The role of interferon in influenza virus tissue tropism. J Virol 72:8550-58.
- Geiss, G.; Salvatore, M.; Tumpey, T.; Carter, V.; Wuang, X.; Basler, C. (2002). Cellular Transcripcional profiling in influenza A virus –infected lung epithelial cell: the role of the nonstructural NS1 protein in evasion of the innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99(16): 10736-41. .
- Glezen, W.P. (1996) Emerging infections: pandemic influenza. Epidemiology Review 18(1):64-76.

- González E.; Aguirre, J.; Sastre, L.; Suárez B. (1989). Un modelo para el pronóstico de las epidemias de gripe. Rev.Cub.Hig.Epid. 27:159-165.
- Govorkova, P.; Murti, G.; Meinier, B.; Taisne, C. y Webster, R. (1996). African Greene Monkey Kidney and Vero cells provide system Influenza A y B viruses. Journal of Virology 70, pp 5519- 5524.
- Gracious, R.; Selvasabramanian, S.; Jayasumdar, S. (2001). Inmunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits. A preliminary study. J Ethnopharmacol Nov; 78 (1): 85-7.
- Greek, R. y Swingle, J. (2000). Effective or Not?: Animals Models of AIDS. En: Satya, 3. [en línea.]<[http:// www. Satya. mag. com/ march 00/ greek. htm](http://www.Satya.mag.com/march00/greek.htm) >. [Consulta: Marzo/ 2002].
- Guía Metodológica Para La Investigación Fitoquímica en Plantas Medicinales. (1992). MINSAP, Cuba.
- Hampson, A. (1997). Adult immunization for influenza and pneumococcal infection. Int J of Infection Diseases 1/3; 165-71.
- Haslam, E.; Hampson A.; White D. (1970). The polipeptide of Influenza virus. Virology 42:566-575.
- Hagiwara, K y Kikuchi M, (1995). Anti- virus agent. PN: JP5320849.
- Hay, S. y Kannourakis, G. (2002). A time to Kill Viral manipulation of the cell death program. J Gen Virol Rev. 1- 41.
- Hayashi, T.; Kamiya, M.; Hayashi, T. (1995). Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its componentes on HSV-1, influenza A virus and HIV. Planta Médica 61(3): 237-241.
- Hayashi, T.; Hayashi, K.; M. Maeda; I. Kojima (1996). Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication from a blue-green alga *Spirulina platensis*. J Nat Product 59(1):83-87.
- Hayden, F. (1996). Safety and efficacy of the neuraminidase inhibition GG167 in experimental human influenza. JAMA 275 (Jan 24-31):295-299.
- Hayden, F. (1999). Use of the oral neuraminidase inhibitor of Oseltamivir in experimental human influenza. Jama, 282:1240-46.

- Hennes, T.; Peterhans, S. y Stocker, R. (1992). Alterations in antioxidant defences in lungs and liver of mice infected with Influenza A virus. *Journal of Virology*, 73(1), pp 39-46.
- Hirsch, M. y J. Kaplan (1990). *Antiviral agents*. B.N. Fields, D.M. Knipe: *Virology* vol 1, 2nd. Edition, Raven Press, New York: 441-447
- Horisberger, M. (1980). The large protein of influenza A virus are composed of one acidic and two basic polypeptides. *Virology* 107:302-05.
- Hozumi, T.; Matsumoto, T.; Ooyama, H.; Namba, T.; Shirahi, K.; Hottori, M.; Kurokawa, M.; Kadota, S. (1995). Antiviral agent containing crude drug. PN: JP 5411733.
- Hsiung, G. y Chan, V. (1989). Evaluation of new antiviral agents: II. The use of animals models. *Antiviral Research*, 12, Elsevier, 239- 258.
- Hu, J. (1989). Evaluation of new antiviral agents: "in vitro" perspectives. *Antiviral Research* 11:217-232.
- Huklery, V.; Kalyani, G.; Hatapakei, B. *et al.*, (1993). *In Vitro* Antihelmintic Activity of a Aqueous Extracts of Fruits Rind of *Punica Granatum* L. *J Biol Chem*. 193 :260- 64.
- Iglesias J. (1990). Fraccionamiento quimico de BLBu. Tesis de Diploma. Facultad de Biologia. UH.
- Iizuka, Ch. y Hiroaki, M. (1982). Antiviral Agent. PN: JP 57106624.
- Iizuka, Ch. (1980). Antiviral drug and its preparation. PN: JP 55157517.
- Inoi, T.; Ishibashi H. y Yoshikawa, S. (1985). Antiviral Agent. PN: JP 60072823.
- Ivanchenva, S.; Manolova, N.; Serkedjieva, J.; Dimov, V.; Ivanovska, N. (1992). Polyphenols from bulgarian medicinal plants with anti-infectious activity. *Basic-Life- Sci*. 59: 717-778.
- Jafri, M.; Islam, M.; Javed, K.; Singh, S. (2000). Effect of *Punica granatum* Linn (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 70(3)309 -14.

- Jang, M.; Shin, M.; Kang, I.; Baik, H.; Cho, Y. (2002). Caffeine induces apoptosis in human neuroblastoma cell line SK-N-MC. *J Korean Med Sci* 17:674-78.
- Ji-Yong Zhou; Hui-Gang Shen; Hong-Xun Chen; Guang-Zhi Tong; *et al.*, (2006). Characterization of a highly pathogenic H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> influenza virus derived from bar-headed geese in China. *J Gen Virol* 87, 1823-33.
- Johansson, B.; Pokorny, B. y Tiso, V. (2002). Supplementation of conventional trivalent Influenza vaccine with purified viral N1 and N2 neuraminidase induces balanced immune response without antigenic competition. *Vaccine*, 20: 568-70.
- Käsermann, F. Y C. Kempf (1996). Low pH-induced pore formation by spike proteins of enveloped viruses. *J Gen Virol* 77(12): 394.
- Kido, H.; Niwa, Y.; Beppu, Y.; Towatarey, T. (1996). Cellular proteases involved in the pathogenicity of enveloped animal viruses: HIV, Influenza A virus and Sendai virus. *Adv Enzyme Regul* 36:325-347.
- Kilbourne, E. (1975). Laboratory Propagation of Human Influenza Viruses. Experimental Host Range and Isolation from Clinical Materials / W. R. Dowdle, G. C. Schild. En: *The Influenza Viruses and Influenza – Estados Unidos de América: Academy Press*, 243-264.
- Kim, N.; Metha, R.; Yu, W.; Neeman, I.; Livney, T.; *et al.*, (2002). Chemopreventive and adjuvant potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Brest Cancer Res Treat* 71 (3):203 -17.
- King, S. y M. Tempesta (1994). From shaman to human clinical trials: The role of industry in ethnobotany, conservation and community reciprocity. *Ciba Found Symp* 197-206.
- Kingsbury, D. (1996). Orthomyxoviridae and their replication. B.N: Fields, D.M: Knipe, P.M. Howley *et al.*, *Virology* 3rd edition, Raven Publishers, Philadelphia: 1353-1385.
- Kocher, T.; Thomas, W.; Meyer, A.; Edwards, S.; Paavo, S.; Villablanca, F. y Wilson, A. (1989). Dynamic mitochondrial DNA evolution in animal: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sc U S A* 86:6196-612000.

- Kohl, M.; Jhonson, L.; Scorrano, S.; Korsmeyer, A and Ley, T. (2003). Cell death induced by grancyme. *C Blood*, 101(8): 3093-3101
- Kostolansky, F.; Russ, G.; Mucha, V.; Styck, B. (1988). Changes in the influenza virus haemagglutinin at acid pH detected by monoclonal antibodies to glycopolypeptides HA1 and HA2. *Archives of Virology* 101(1-2)13-24.
- Kristova M. ; Egorenkova E.; Zagiullin N. *et al.*, (1987). The influence of the isolation technique of the influenza virus nucleoprotein on its antigenic properties. *Acta Virologica* 31 (4):289-297.
- Kruse, R.; Pukkett, W. y Richardson, J. (1991). Biological Safety Cabinetys. *Clinical Microbiology* vol 4(2); pp207-241.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophageT4. *Nature* 227:680-88.
- Laver, W.; Bischofberger, N. y Webster, R. (2000): The Origin y Control of Pandemic Influenza. *Perspect Biol Med* 43(2), pp 173 - 192.
- Lee, M.; Kim, K.; Park; K. Kim J. (1996). Evaluation of anti-influenza effects of camostat in mice infected with non-adapted human influenza virus. *Archives of Virology* 141(10): 1979-89.
- Lennette, E. (1992). *Manual of Clinic Microbiology*. 5th edition, Washington. Am. Soc. Microbiol.
- Lentz, T.L. (1990). Review article: The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents. *J Gen Virol* 71:751-766.
- Li, X y Darzynkiewicz, A. (2000). Labing DNA strand breaks with Brd-UTP. Detection apoptosis and proliferation. *Cell prolif* 28:572-79.
- Lin, T.; Heider; H. y Schroeder, C. (1997). Different modes of inhibition by adamantane amine derivatives and natural polyamines of the functionally reconstituted influenza virus M2 proton channel protein. *J Gen Virol* 78 (4):767-774.
- Lipatov, A.; Govorkova, E.; Welby, R. *et al.*, (2004). Influenza: Emergence and control. *J Virol* 78:8951 -9.

- Livne, A.; Shtrichman, R.; Kleingberger, T. (2001). Caspase activation by adenovirus E4orf4 protein in cell line specific and is mediated by death receptor pathway. *J Virol* 75:789-98.
- Lobodzinska, M. y Krisanova, O. (1966). Purification of properties of an influenza virus inhibitor isolated from mouse lungs. *Acta Virologica* 10 (1), 28-33.
- Lorenzo, H.; Susin, S.; Penninger, J. y Kroemer, G. (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetic old caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 6, 516-24.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R. (1951). Protein determination with the Folin reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Luo, G.; Colonno, R.; Krystal, M. (1996). Characterization of a hemagglutinin-specific inhibitor of Influenza A virus. *Virology* 226(1):66-76.
- Luo, G.; Torri, A.; Harte, W.E.; Danetz, S.; Cianci, C. et al. (1997). Molecular mechanism underlying the action of a novel fusion inhibitor of Influenza A virus. *Journal of Virology* 71(5): 4062-4070.
- Lou, C.; Nobasawa, E. and Nakajima, K. (1999). The analysis of the role of the neuraminidase in the receptor – binding activity of influenza B viruses: the inhibitory effect of Zanamivir on haemoabsorption. *J Gen Virol* 80(11): 2969-76.
- Maeno, K. (1994). Replication of Influenza B virus: biological functions of viral neuraminidase. *Nagoya Journal of Medical Science* 57(124):1-17.
- Mahalingam, S.; Meanger, J.; Foster, P. y Lidbury, A. (2002). The viral manipulation of the immune environments to enhance propagation and survival: a focus on RNA virus. *J Biol* 72(3): 429-39.
- Mahy, B. y Kangro, H. (1996). *Virology Methods Manual*, Academic Press Limited, N Y :294, 303 -07
- Marchetti, C.; di Marco, B; Cifone, G.;Migliorati, G.;Riccardi, C. (2003). *Blood* 101(2):585-93.
- Mc Carthy, N. y Evan, G. (1998). Methods of detecting and quantifying apoptosis. *Curr Top Dev Biol.* 36:259-78.

- Medico Interamericano: Editorial. (1995). La influenza trastorna las vidas ajetreadas. Revista Medico Interamericano Vol 12 / 549.
- Miranda, M. (1995). Programa Nacional de Plantas Medicinales. Sección Plantas medicinales y Síntesis. Rev Cub Farmacia. Suplemento Especial, Vol 30:205.
- Miyamoto, D.; Kusagaya, Y.; Endo, N.; Sometan, A.; Tadeo, S.; Susuki, Y. (1998). Thujaplicin-copper chelates inhibit replication of human Influenza viruses. Antiviral Research, 39 (2):89-100.
- Mori, L.; Komatsu, T.; Takeuchi, K.; Nakakuri, K.; Sudo, M. y Kimura, Y. (1995). In vivo induction of apoptosis by Influenza virus. J of Virol 76, 2869-73.
- Morón, F. y Levy M. (2002). Farmacología General. Editorial Ciencias Médicas; 195-204.
- Morris, S.; Price, G.; Barnett, J.; Hiscox, S.; Smith, H. y Sweet, C. (1999). Role of the neuraminidase in influenza virus induce apoptosis. J Gen Virol 80(1):137-46.
- Morton, T. (1981). Atlas of Medicinal Plants of Middle América. Vol I. EUA.
- Mossman, T; (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays . J Inmunol Meth 65:55-63.
- Murphy, B. y Webster, R. (1996). Orthomyxoviruses. B.N. Fields, D.M: Knipe, P.M: Howley et al. Virology 3rd edition, Raven Publishers, Philadelphia: 1424-1429.
- Nagai, T; T. Miyaichi; T. Tomimori; Y. Suzuki; H. Yamada (1992). *In vivo* anti-influenza virus activity of plant flavonoids possessing inhibitory activity for influenza virus sialidasa. Antiviral Res 19(3): 207- 217.
- Nagai, T.; R. Moriguchi; T. Tomimori; Y. Suzuki; H. Yamada (1995- a). Mode of action of the anti-influenza virus activity of plant flavonoid, 5, 7, 4' – tryhydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria Baicalensis*. Antiviral – Res. 26 (1): 11-25.
- Nagai, T.; Y. Suzuki; T. Tomimori; H. Yamada (1995- b). Antiviral activity of plant flavonoid, 5, 7, 4' – tryhydroxy-8-methoxyflavone from the roots of

Scutellaria Baicalensis against Influenza A (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) and B viruses. Biol and Pharm Bull 18(2): 295- 299

- Nagai, T.; Urata, M.; Yamada, H. (1996). "In vivo" anti-influenza activity of Kampo (Japanese herbal) medicine "sho-seryu-to"-effects on aged mice against subtypes of A and B viruses, and therapeutic effect. Immunopharmacol-Immunotoxicol 18(2):193-208.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation . EXP Cell Res. 256, 12-8.
- Nakajima K.; S. Nakajima y A.Sugiura (1982).The Possible Origin of H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> Influenza Virus. Virology 120, 504 - 509.
- Neiryck, S.; Deroo, T.; Saelens, X.; Vanlansdhoot, W.; MinJou, W. y Fiers, W. (1999). A universal Influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. Nature Medicine, 5 (10); 1157- 63.
- Nicholson, K. (1996). Use of antivirals in influenza virus in the elderly: prophylaxis and therapy. Gerontology 42(5):280-289.
- Nishimura, H.; Shigeyuki, I.; Takuya, I.; Takeshi, K. y Masato, T.(2000). Characterization of human influenza (H<sub>5</sub> N<sub>1</sub>), virus infections in mice: neuro - pneumo – and adpotropic infection. J Gen Virol 81, 2503-2508.
- Noda, Y.; Kaneiyuki, T.; Mori A; Packer, L. (2002). Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin and pelargonidin. J Agric Food Chem 50 (1):166-71.
- Norma Ramal Cubana NRSP-309. MINSAP. (1992). Medicamentos de Origen Vegetal. Droga Cruda.
- Norma Ramal Cubana NRSP-312. MINSAP. (1992). Medicamentos de Origen Vegetal. Extractos fluídos y tinturas.
- O'Brien, J. (1998). Virus and Apoptosis. J Gen Virol79: 1833-45.
- Ogbeide, O. Y Parvez, M. (1991). A simple colorimetric quantification of flavonoids in the flowers of Lonchocarpus cyanescens genus: Lonchocarpus. Plant-Foods-Hum- Nutr. Julio: 41(3): 233-239.
- Ohuchi, R.; Ochuchi, M.; Garten, W.; Klenk, H. (1997). Oligosacharides in the stem region maintain the influenza virus hemagglutinin in the metastable form required for fusion activity. Journal of Virology 71(5):3719-25.

- Ohyama, K.; Nishima, M.; Yoan, B.; Bessho, T. y Yamakawa, T. (2003). Apoptosis induced by Influenza virus hemagglutinin stimulation may be related to fluctuation of cellular oxidative condition . Biol. Farm. Bull. 26(2) 141-47.
- Olfert, E. y Godson, D. (2000): Humane Endpoints for Infectious Disease Animals Models. En: ILAR Journal, 41(2), pp 99- 104.
- Oropesa, S.; Abreu, I.; Morier, L.; Hernández, B.; González, B. y Goyenechea A. (2000) Neumonía Hemorrágica por Influenza virus. Diagnóstico virológico. Rev. Cubana MEDTROP, 52 (1), 73 – 5.
- Osterholm, M. (2005). Preparing for the next pandemic. Engl. J. Med 352:1839-42.
- Ostheraus, A. y de Jong, J. (1999) . The battle against Influenza: Antivirals vs Vaccine. Vaccine 12 (6), 568-70.
- Ottolini, M.; Blanco J.; Eichelberger, M. ; Porter, D. ; Pletneva, L. ; Richarson, J. y Prince, A. (2005). The cotton rat provides a useful small- animal model for the study of influenza virus pathogenesis. J Gen Virol 86 (10):2823-30. ISSN0022 -1317.
- Patel, C; Muktar, M y Pomeratz, R. (2000). HIV type I induces apoptosis in human neuronal cell. J Virol 74:9717-26.
- Pérez, M. (1989). Estudio de las proteínas estructurales de Influenza virus A (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) por PAGE. Trabajo de Diploma. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Pérez, C. y Anesini C. (1994). “In vitro” antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against Salmonella typhi. J Ethnopharmacol 44(1):41-46.
- Petica, M; Crisan, I.; Esany; V.; Petrescu, A. (1994). Morphologic changes following experimental influenza virus infection and the therapeutic administration of flavonoids in aqueous extract. Rev- Roum- Virol- 45(1-2):39-45.
- Ponce, M.; Navarro, I.; Martínez, M.; Alvarez, R. (1994). “In vitro” effect against Giardia of 14 plant extracts. Rev Invest Clin 46(5):343-347.
- Prakash, A. (1986). Potentialities of some indigenous plants for antifertility activity. Int J Crude Drug Res 24(1):19-24.

- Prashant, D; Asha, M Y Amit, A. (2001). Antibacterial activity of *Punica granatum* L. . Fitoterapia 72:171-3.
- Price, G.; Smith, H. y Sweet, C. (1997). Differential induction of cytotoxicity and apoptosis by influenza virus strain of differing virulence. J Gen Virol 78 : 2821-29.
- Qiao, L.; Hanif, R. ; Shiff, S. y Rigas, B. (1998). Effects of aspirin on induction of cytotoxicity and apoptosis by influenza virus strain of different virulence. J Gen Virol 78: 2821-29.
- Reed, L. y Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. Am J Hyg 27: 493-497.
- Rodríguez, V.; Ortega, V. y Jordana, C. (1997). Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad in vitro de líneas de melanoma. Patología 30(1):18-27.
- Roig, J. y Mesa, T. (1974). Plantas Medicinales, aromáticas o venenosas de cuba. Editorial Ciencia y Técnica, Academia de Ciencias de Cuba.
- Rosete, O.; Archundia, S.; Cabello, G.; Manjarrez, Z. (2002). Patogenia de las infecciones respiratorias por virus. Rev Int Nat Enf Resp Mex Vol 15(4) Oct –Dic, 239- 254.
- Ruiigrok, R.; Hirst, E. y Hay, A. (1991). The specific inhibition of influenza A virus maturation by Amantadine: an electron microscopic studies. Clinical Microbiology vol 4(2); pp202-211.
- Sakar, D.; Morris, S.; Edelman, O.; Zunmerberg, J. y Blumenthal, R. (1989). Initial stages of influenza hemagglutinin-induced cell fusion monitored simultaneously by two fluorescent events. Journal of Cell Biology 109:113-122.
- Sánchez-Lamar, A.; Cozzi, R.; Cundari, E.; *et al.*, (2005). Extracto de frutos enteros de *Púnica granatum* L. como agente protector del daño inducido por el peróxido de hidrógeno. Revista Cubana de Plantas Medicinales 10 (2).
- Scholtissek, C. (1994). Source for influenza pandemics. Eur J Epidemiol 10(4):455-458.
- Schulman, J. y Kilbourne, E. (1963): Experimental transmission of Influenza virus infection in mice. Journal of Experimental Medical 118, pp 257- 266.

- Schultz-Cherry, S.; Diddahl- Sissokpo, N.; Kawaoka, Y. y Hinshaw, S. (2001). Influenza virus NS1 proteins induce apoptosis in culture cell. *J Virol* 75(17): 7875-81.
- Serkedjieva, J.; Manolova, N.; Zgorniak, N.; Zawilinska, B.; Grzybeck, J. (1990). Antiviral activitie of the infusion SHS – 174 against influenza and herpes simplex viruses. *Phytoter Res* 4: 97-100.
- Serkedjieva, J.; Manolova, N. (1992). Plant polyphenolic complex inhibits the reproduction of influenza and herpes simplex viruses. *Basic-Live-Sci* 59: 705-715.
- Serkedjieva, J. y Zgorniak-Nowosielska, I. (1993). Combined antiinfluenza activity of a plant preparation SHS-174 and amantadine derivatives. *Acta Viroológica* 37(4)258-264.
- Serkedjieva, J. (1995). Inhibition of influenza virus protein synthesis by a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. *Acta Viroológica* 39(1): 5-10.
- Serkedjieva, J. y Hay, A. (1998). In vitro anti-Influenza virus activity of a plant perparation from *Geranium sanguineum* L. *Antiviral Research* 37:121 -30.
- Serkedjieva, J.; Konalklieva, M.; Dimitrova, K.; Ivanova, V.; Stefenov, K.; Popov, S. (2000). Anti-Influenza virus effects of extracts from marine algae and invertebrates. *Naturforshah (c) Jan –feb*, 55 (1-2):87-93.
- Shi, L.; Galarza, J.; Summers, D. (1996). Recombinant-baculovirus-expressed PB2 subunit of the Influenza A virus RNA polimerase binds cap groups as an isolated subunit. *Virus Research* 42(1-2):1-9.
- Shigeta, S. (1998). Approaches progress to antiviral chemotherapy for acute respiratory infections . *Antiviral Chemistry & chemotherapy* 9: 93- 107.
- Shigeta, S. (1999). Recent anti-influenzachemotherapy. *Drugs Sep*; 2(3):153-64.
- Shih, S. y Krug, R. (1996). Surprising function of the three influenza viral polimerase proteins: selective protection of viral mRNA against the cap-snatching reaction catalyzed by the same polymerase proteins. *Virology* 226(2):430-435.

- Shilman Chang, R. Y Yeung, H. (1988). Inhibition of growth of human immunodeficiency virus "in vitro" by crude extracts of chinese medicinal herbs. *Antiviral Research* 9:163-176.
- Shimamura, T. y Hara, M. (1991). Preventive of Influenza virus infection. PN: JP 03101623.
- Sidwell, R.; Huffman, J. ; Moscon, B. y Warren, R. (1994). Influenza virus-inhibitory effects of intraperitoneally and aerosol administered SP-303, a plant flavonoid. *Experimental Chemotherapy* Vol 40:42-50.
- Sidwell, R.; Huffman, J.; Barnard, D.; Bailey, K. *et al.*, (1998). Inhibition of influenza virus infection in mice by G S 4104, an orally effective influenza virus neuraminidase inhibitor. *Antiviral Research*, 37 (2):107-20.
- Simoni, I.; Munford, V.; Felicio, J.; Lins, A. (1996). Virucidal activity in Brazilian PLants. *Braz J Med Bio Res* 29/5:647-50.
- Sigarroa, A. (1987). Programa TONYSTAT. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Snacken, K.; Kendal, A.P.; Haatein, L.R. y Wood J.M. (1999): The Next pandemic. Lesson from Hong Kong 1997. *Emerging Infectious diseases*, 5, pp 1-9.
- Sokal, R. y Rohlf, F. (1995). *Biometry*. W. H. Freeman & Co. New York.
- Solórzano, A.; Hongyong, Z.; Fodor, E.; Brwnlee, G.; Palese y García-Sastre. (2000). Reduces levels of neuraminidase of influenza virus correlates with attenuated phenotypes in mice. *J Gen Virol* 81:737-42.
- Stuart-Harris, C.; Schild, G.; Oxford, J. (1985). *Influenza: The viruses and the diseases* (Second Edition ). Arnold Press, Victoria.
- Suddesh, S. y Vijayalakshmi, N. (2005). Flavonoids from *Punica granatum* L. potential antiperoxidative agents. *Fitoterapia*, March, 76(2):181-6.
- Suffness, M. y Duros, J. (1979). An antiviral research guide. *Methods in Cancer Research* 16:73.
- Sugaya, N. y Miura, M. (1999). Amantadine therapy for influenza type A-associated encephalopathy. *Pediatric disease Journal* 18(8):734-36.

- Takizawa, T.; Matsukawa, S.; Higuchi, S.; Nakamura, Y.; Nakanishi, Y.; Fukuda, R. (2002). Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J Gen Virol* 74(2):1006-17.
- Tempesta, M. (1993). Proanthocyanidin polymers having antiviral activity and methods of obtaining same. Patente No. 5211944. Shaman Pharmaceuticals, Inc.
- Thatte, U.; Bagadey, S. y Dahanukar, S. (2000). Modulation of programmed cell death by medicinal plants. *Cell Mol Biol* 46(1) 199-214.
- Tobita, K.; Sugiura, A.; Enomoto, C. y Furuyana, M. (1975). Plaque Assay and Primary Isolation of Influenza A viruses in an Establish Line of Canine Kidney Cells (MDCK) in Presence of Tripsin. *Med Microbiol Inmunol* 162;9-14.
- Toyoda, T.; Kobayashi, M.; Nakada, S.; Ishihama, A. (1996). Molecular dissection of influenza virus RNA polymerase: PB1 subunit alone is able to catalyze RNA synthesis. *Virus-genes* 12(2):155-163.
- Gramil 1990-1992. Seminario Tramil 5 y 6. Guatemala, Noviembre, 1990. Guadalupe, Noviembre 1992.
- Tsai, Y.; Cole, L.; Davis, L. ; Lockwood, S.; Simmons, V.; Wild, G. (1985). Antiviral properties of garlic: "in vitro" effects on Influenza B, Herpes simplex and Coxsackie virus. *Planta Médica J Med Plant Res s/v* (5):460-461.
- Turán, K.; Nagata, A.; Kuni, A. (1996). Antiviral effect of *Sanicula europea* leaves extract on influenza virus infected cells. *Biochem –Biophys – Res-Commun* 225 (1): 22-26.
- Uchide, N.; Ohyama, K.; Besso, T ;Yuan , B. ; Yamakawa,T. (2002). Apoptosis in cultured Human fetal membrane cell infected with influenza virus. *Biol and Pharma* 25(1):109-10.
- Uchide, N. y Ohyama, K. (2003). Antiviral function of pyrrolidone dithiocarbamate against influenza virus: the inhibition of viral gene replication and transcription. *J of Antimicrob Chem* 52:1-10.
- VADEMECUM International (2005). 46 Edition.

- van Regenmortel *et al.*, (2000). Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on the taxonomy of viruses. Edited by M.H.V. van Regenmortel *et al.*, C.R. Pringle and R.B. Wicken. San Diego: Academic Press.
- Vaqueroa, M. (2000). Apoptosis: To be or no to be, that is a question. *Med Clin* 114: 144-56.
- Walker, T.; Sangeeta, K. Y Tilden S. (1994). Viral Respiratory Infections. *Pediatric Critical Care. Pediatric Clinics of North America Vol 41 No 6 December.*
- Walker, R.; Kokileva, L.; le Blanck J y Sikopraska, M. (1998). Detection of the initial stages of fragmentation in apoptosis. *Biotechniques* 15:1032-36.
- Watanabe, W.; Konno, K.; Ijichi, K.; Inoue, H.; Yolota, T.; Shigeta, S. (1994) MTT Colorimetric Assay System for the Screening of Anti-orthomyxo –and Anti–para myxoviral Agents. *J Virol Meth* 48:256-65.
- Webster, R.; Laever, W.; Air, G.; Schild, G. (1982). Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature*, 296 (5853): 115-121.
- Webster, R.; Bean, W.; Gorman, O.; Chambers, T.; Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of Influenza A viruses. *Microbiological Rev*, 58, 152-79.
- WHO, (2006). World Health Organization Writing group Non pharmaceutical interventions for pandemic influenza, international measures. *Emerg Infect Dis* 12:81- 7.
- Williams, R. y Robertson, J. (1993). Analysis of the restriction to growth of non egg adapted human influenza viruses in eggs. *Virology*, 196,660-65.
- Worobey, M. and Holmes, E. (1999). Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol* 80: 2535-2543.
- Wurzer, W.; Planz, O.; Ehrhardt, C.; Giner,M.; Silberzahn,T.; Plescha, S. y Ludwig, S. (2003). Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J* 22(11): 2717-2728.

- Wyde, P.; Meyerson, L.; Gilbert, B. (1993). In vitro evaluation of the antiviral activity of SP-303, an Euphorbiaceae Shrub extract, against a panel of respiratory viruses. *Drug Development Research* 28(4): 467-472.
- Yamazaky, Z. y Tagaya, J. (1980). Inhibition for medical plant. *J Gen Virol* 50:429.
- Yen, H. ; Horelocher, L.; Hoffmann, E. *et al .*, (2005 ). Neuraminidasa inhibitor –resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4075-84
- Yuan, W. y Krug, M. (2001). Influenza B virus NS1 proteins inhibits conjugation of the interferon (IFN) induced ubiquity-like ISG15 protein. *EMBO*, (3): 362-71.
- Zgorniak, N.; Grzybek, J.; Manolova, N.; Serkedjeiva, J. (1991). Antiviral activity of Flos verbasi infusion against influenza and herpes simplex viruses. *Arch Immunol Ther Exp (Warz)* 39(1-2):103- 08.
- Zhang, J.; Zhan, B.; Yao, X.; Gao, Y.; Shong, J. (1995). Antiviral activity of tanin from the pericarp of *Punicam granatum* L. against Herpes genital virus “in vitro”. *Chung-Kuo-Chung-Yao-Tsa-Chih* 20(9):556-558.
- Zhang, J. y Xu, M. (2002). Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis: how Pandoras Box opens. *Nat Rev* 2:67-71.
- Zhirnov, O.; Wolf, T.; Konakova, T. y Klenk, H. (2003). Host - dependent variation of apoptosis in cell infected with influeza A virus lacking NS1 gene. *Virol.* 82:10158-63.
- Zhu, Y.; Gelbart, H.; Roshal, M.; Prusell, S. y Planelle, M. (2001). Comparison of cell cycle arrest, transactivation and apoptosis induced by SIV. *J Gen Virol* 75: 3791-3801.
- Zgorniak, N.; Grzybeck, J.; Manolova, N.: Serkedjeiva, J.(1991). Antiviral activity of Flos verbasci infusion against Herpes genital virus in vitro. *Chung-Kuo-Chung-Yao-Tsao-Chin* 20 (9):556-58.

## IX.- Eventos.

- 20 Aniversario de la E. P. B. Carlos J. Finlay. Cuba. 1990. Actividad Antiviral del extracto BLBu. Autor: Blanca del R. Peña, G del barrio y O Caballero.
- Congreso 50 Aniversario del IPK Cuba 1988. Acción Antiviral de un extracto de plantas frente al virus influenza. Coautor: del Barrio G B del R. Peña O. Caballero.
- La mujer Trabajadora. Cuba.1995. Coautor. Las plantas medicinales como fuente de antivirales para la terapéutica humana y animal.
- III Simposium Internacional de Plantas Medicinales. La Habana 1999. Actividad Antiviral in vivo de Extractos de *Punica granatum* L. Autor Blanca Peña; Caballero. O; del Barrio G. e Iglesia J.
- IV Congreso Internacional de Química. La Habana. Abril/ 2001. Acción virucida de un extracto de *Punica granatum* L. sobre cepas de influenza A. Autor Blanca del R .Peña, Martínez M, y Caballero O.
- IV Congreso Internacional de Química. La Habana. Abril/ 2001. Actividad inhibitoria de extractos del fruto de *Punica granatum* L. sobre cepas del virus de la gripe. Coautor. O. Caballero. , Peña B del R.; del Barrio G. e Iglesia J.
- XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. II Congreso Cubano de Medicina Tropical. Noviembre 2002. Cuba Desarrollo y evaluación del biomodelo experimental del virus de la Influenza Humana en la línea de ratones Balb/c. Internacional de Química. La Habana. Abril/ 2001. Autor B. del R. Peña, A. Bellma, E. Arteaga, G. Ramos, S. Oropesa,
- XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. II Congreso Cubano de Medicina Tropical. Noviembre 2002. Cuba Actividad in vitro de cuatro extractos de plantas que crecen en Cuba. Coautor Rojas N., Peña B., Caballero O. y Lugo
- IV Taller Internacional de productos Naturales. CQF. Cuba/ 2002. Efecto inhibitorio de un extracto natural obtenido de *Punica granatum* L. frente al virus

de la gripe. Coautor O. Caballero; B. Peña; G del Barrio; S. Valdés; A. Roque y J. Ortín

- III Congreso Mundial de Plantas Medicinales. Tailandia. Enero 2003  
Inhibitory activity of fruit extracts from *Punica granatum* L on FLU virus strains.  
Autor. B. del R. Peña; O. Caballero; G del Barrio y J. Ortín.
- V Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química. Ciudad Habana, octubre 2004. Capacidad antiviral de un extracto natural obtenido de *Punica granatum* L frente al virus de la gripe. (Cartel) Autor. B del R. Peña O. Caballero, G. del Barrio, y J. Ortín.

#### **XI.- Publicaciones.**

- Peña, B. del R.; Martínez, M. y Fernández de Castro, A. Actividad virucida del extracto de planta BLBU en cepas de Influenza A. (1999). Memorias: IV Congreso de plantas Medicinales.
- Vidal, A.; Fallarero, A.; Peña, B. del R.; Medina, M.; Gra, B.; Rivera, F...; Gutiérrez, Y. y Vuorela, P. (2003) .Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruits extracts. J of Ethnopharmacol 89(2-3):295-300.
- Rojas, N.; Peña, B. del R.; Caballero, O.; Lugo, D. (2002). Actividad antibacteriana in vitro de cuatro extractos de plantas que crecen en Cuba. Revista Latinoamericana de Microbiología; Vol 44, No. 4: 104 SSN 0034-8771.
- Pendás, J.; Moreira, T.; Guerra, O.; Peña, B. del R. and Fernández, J. (2001). Water relationship in *Phyllanthus orbicularis* and *Punica granatum* L. antiviral extracts and their influence on stability after freezing and freeze-dying. Cryoletters jan-feb 22(1): 5-12.
- Peña, B. del R.; Caballero, O.; Ortín, J.; Zucher, J.; Martínez, M. (2001). Actividad inhibitoria de extractos del fruto de *Punica granatum* L frente a cepas del virus de la gripe. Rev. Cubana de Química, Vol XIII, No. 2, 106. ISSN 058-5995.
- Peña, B. del R. O.; Ortín J; Zucher, J; O. Caballero. Inhibición de la actividad hemaglutinante del virus Influenza A por un extracto de *Punica granatum* L. en

la línea MDCK. (2001). Rev. Cubana de Química, Vol XIII, No. 2, 108. ISSN 058-5995.

- Morffi, J. y Peña, B. del R. Actividad antiviral del extracto de *Punica granatum* L (BLBu) en el modelo experimental de gripe en ratones de la línea Balb/C. Revista CNIC. (En prensa).
- Menéndez, A.; Peña, B. del R. y Arteaga, H. (2005). Aspectos Clínicos y Viroológicos útiles en la implementación de un modelo de Influenza A en Líneas de Ratones Balb/C. Acta Farmacéutica Bonaerense 24 (3):395-401.

#### **XI.- Premios.**

Premio y / o Mención de Facultad al mejor resultado Científico Recibidos:

- Premio en la Dirección de Salud Humana a nivel de facultad: Acción anti/influenza del extracto de *Punica granatum* L (BLBu) en modelos experimentales in vitro e in vivo. Autor: Blanca del Rosario Peña. Coautores: O. Caballero Pérez, G. del Barrio A. Roque Quintero, S. Valdés y M. Medrano, 2002-03.
- Trabajo Destacado del Forum de Ciencia y Técnica a nivel provincial, 1997.
- Cuatro Logros Científicos de la facultad de Biología.

#### **XII.- Logros científicos:**

- Acción antiinfluenza del extracto de *Punica granatum* L. en modelos experimentales in vivo e in vitro. B. del R. Peña O. Caballero, M. Medrano S. Valdés, G. 2002 /03.
- Evaluación de dos extractos naturales frente a influenzavirus y adenovirus, inductores de apoptosis. Logro Científico. 2003 /04. B del R. Peña. I. Casadelvalle, O. Caballero.
- Desarrollo y evaluación del biomodelo experimental del virus influenza Humana en la línea de ratones Balb/c. Logro Científico. Peña B. Del R. del Barrio, G y colb. 2002/03.
- Evaluación de la actividad antiviral de un extracto acuoso de *Punica granatum* L. frente al virus Influenza A .en células MDCK. O Caballero, Peña B.del R., G. del Barrio, Valdés S., Roque A., Zulueta S., Ortín J y Medrano. 2000/01.