

71343

U N R C  
Biblioteca Central



71343

SABINI, MARIA CAROLA  
Evaluacion de activi



2013

71342

71342

MFN:
Clasif:
T-797

71342



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS,  
FISICO-QUIMICAS Y NATURALES



**“Evaluación de actividades biomoleculares de  
extractos y subproductos obtenidos de  
*Achyrocline satureioides*”**

Mic. María Carola SABINI

Tesis para optar al Título de  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Realizada en el Departamento de Microbiología e Inmunología  
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Río Cuarto, 2013

Este trabajo de tesis es presentado a la Escuela de Posgrado de la  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Para obtener el título de:

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



.....  
Por: María Carola Sabini

TEMA:

**“Evaluación de actividades biomoleculares de  
extractos y subproductos obtenidos de  
*Achyrocline satureioides*”**



.....  
Directora: Dra. Silvia Matilde Zanon



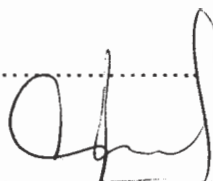
.....  
Co-Directora: Dra. Marta Silvia Contigiani

Área de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de  
Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río  
Cuarto.

CALIFICACIÓN: .....



.....  
Dra. Analía LACIAR



.....  
Dra. Cecilia FARNOCHI



.....  
Dr. Blas MICALIZZI

Río Cuarto, 21 de febrero de 2013



A mí hijas y mí esposo,  
a toda mi familia,  
a todos mis seres queridos

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer:

A mis soles, Alfonsina y Martina, por ser todo en mi vida, por haber soportado tantas horas de trabajo, las AMO MUCHO.

A Carlos, mi esposo, a quien AMO con todo mi corazón, gracias por estar siempre conmigo.

A Silvia, mi directora, por ser buena persona, darme buenos consejos, darme mucho apoyo y permitirme crecer.

A mi co-directora, Marta, por el apoyo en la realización de la tesis.

A mi tía Lily, por aceptarme en su laboratorio y por el apoyo brindado.

A la familia de mi esposo, que también es mi familia, por tanto apoyo, y permitirme realizarme profesionalmente, por amar tanto a mis hijas, gracias.

A mis hermanos, Belén y Hugo, a mi cuñada Vale, a mi ahijadito adorado Tiago, a mi sobrina querida Paz.

Gracias a mis tesoristas, Romi y Aldy, a quienes quiero un montón y no las voy a olvidar nunca.

A mis compañeros de trabajo: Liliana, Silvia, Sonia, Jenny, Noelia y Franco, por su apoyo, buenas ideas y mates compartidos.

Gracias especialmente a Sonia, Evangelina y Noelia, porque en ellas además de compañeras siento que he encontrado buenas amigas.

A mis amigas de toda la vida, Lore y Lau.

A los miembros de la comisión asesora por su buena predisposición y profesionalismo a la hora de corregir la tesis.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto.

A todos los que me quieren, y me han brindado su apoyo incondicional.



## ÍNDICE

ÍNDICE .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE DIAGRAMAS .....	xix
ABREVIATURAS .....	xx
RESUMEN.....	xxii
SUMMARY .....	xxiii
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Impacto de las infecciones virales sobre salud humana y animal .....	1
1.2. Familia Togaviridae: Arbovirus .....	1
1.2.1. Género <i>Alphavirus</i> .....	2
1.2.2. Virus <i>Encefalitis Equina del Oeste</i> .....	2
1.2.3. Patología del virus WEE.....	4
1.2.4. Epidemiología del virus .....	4
1.2.5. Cepas argentinas del virus WEE .....	5
1.2.6. Ciclo de replicación de los miembros de la familia Togaviridae .....	6
1.3. Familia Herpesviridae .....	8
1.3.1. Principales miembros de la familia .....	8
1.3.2. Características generales .....	8
1.3.3. Replicación viral de los miembros de la familia Herpesviridae .....	9
1.3.4. Nomenclatura y clasificación.....	10
1.3.5. Patogenia de algunos virus Herpes .....	11
1.3.6. Virus herpes de impacto sanitario a nivel veterinario .....	11
1.4. Las plantas como fuente de sustancias antivirales .....	12
1.5. Especie <i>Achyrocline satureioides</i> .....	12
1.5.1. Características generales .....	12
1.5.2. Usos populares .....	13
1.5.3. Propiedades fitomedicinales .....	14
1.5.4. Constituyentes químicos de <i>Achyrocline satureioides</i> .....	14
1.6. Antivirales .....	15
1.6.1. Problemática de las terapias antivirales .....	15
1.6.2. Sitio de acción de los antivirales .....	16



1.7. Evaluación de la seguridad de los medicamentos a base de hierbas .....	18
1.7.1. Estudios citotóxicos .....	20
1.7.2. Estudios toxicológicos .....	21
1.7.3. Estudios de citogenotoxicidad .....	22
1.7.3.a. Tipos de daño genético .....	22
1.7.4. Procedimientos para la evaluación de genotoxicidad .....	22
1.7.4.a. Test de <i>Allium cepa</i> L .....	23
1.7.4.b. Test de micronúcleos en médula ósea de ratón .....	24
1.8. Planteamiento del problema .....	26
1.9. Hipótesis .....	26
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
2.1. Objetivo general .....	27
2.2. Objetivos específicos .....	27
<b>3. MATERIALES .....</b>	<b>28</b>
3.1. Materiales biológicos .....	28
3.1.a. Animales .....	28
3.1.b. Cepas virales .....	28
3.1.b.1. Virus <i>Encefalitis Equina del Oeste</i> (WEE) cepa AG 80-646 .....	28
3.1.b.2. Virus <i>Herpes suis tipo 1</i> cepa RC/79 .....	28
3.1.c. Cultivos celulares .....	28
3.1.d. Material vegetal .....	29
3.1.d.1. <i>Achyrocline satureioides</i> .....	29
3.1.b. Bulbos de cebollas .....	29
3.2. Drogas .....	29
3.3. Medios .....	29
3.3.1. Medio de crecimiento para células (MC) .....	29
3.3.2. Medio de mantenimiento para células (MM) .....	30
3.3.3. Medio para placas (MP) .....	30
3.3.4. Medio tioglicolato .....	30
3.4. Soluciones .....	30
3.4.1. Solución de ácido clorhídrico 1 N .....	30
3.4.2. Solución de agarosa al 1,0 % .....	30
3.4.3. Solución de agua mineral .....	30
3.4.4. Solución de azul tripán al 0,5% .....	31



	Índices
3.4.5. Solución balanceada de fosfatos (PBS) .....	31
3.4.6. Solución de bicarbonato de sodio al 5% .....	31
3.4.7. Solución de Ciclofosfamida .....	32
3.4.8. Solución colorante Giemsa .....	32
3.4.9. Solución colorante May-Grünwald .....	32
3.4.10. Solución de cristal violeta .....	32
3.4.11. Solución etanol absoluto: ácido acético glacial.....	32
3.4.12. Solución etanol 70° .....	32
3.4.13. Solución fisiológica .....	33
3.4.14. Solución de gentamicina .....	33
3.4.15. Solución de glutamina .....	33
3.4.16. Solución de metilcelulosa al 1,5% .....	33
3.4.17. Solución de de orceína aceto-acética.....	33
3.4.18. Solución de rojo fenol al 0,5% .....	34
3.4.19. Solución de tripsina + EDTA 2X (solución stock) .....	34
3.5. Reactivos .....	34
3.6. Materiales para análisis químico .....	34
3.6.1. Caracterización química preliminar .....	34
3.6.2. Cromatografía en columna .....	35
3.6.3. Cromatografía en capa fina .....	35
3.6.4. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC/DAD) .....	35
<b>4. MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1. Propagación de la Línea Celular Vero .....	37
4.2. Amplificación y cuantificación de los lotes virales .....	37
4.2.1. Virus <i>Encefalitis Equina del Oeste</i> (WEE) cepa AG 80-646 .....	37
4.2.1.a. Obtención del stock viral .....	37
4.2.1.b. Cuantificación de la infectividad del virus .....	37
4.2.1.c. Caracterización del efecto citopático del virus WEE, cepa AG 80-646, en células Vero .....	38
4.2.1.d. Curva de multiplicación del virus WEE cepa AG 80-646 en células Vero.....	38
4.2.2. Virus <i>Herpes suis tipo 1</i> , cepa RC/79 o <i>Pseudorrabia</i> (VPr) .....	39
4.2.2.a. Obtención del stock de viral .....	39
4.2.2.b. Cuantificación de la infectividad del virus .....	39
4.3. Obtención de los extractos de <i>Achyrocline satureioides</i> .....	40



4.4. Determinación de acciones biológicas de los extractos .....	43
4.4.1. Ensayos de citotoxicidad .....	43
4.4.1.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC) .....	43
4.4.1.2. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC <sub>50</sub> ).....	43
4.4.1.2.a. Por captación del Rojo Neutro (RN).....	43
4.4.1.2.b. Por reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) .....	45
4.4.1.2.c. Por tinción por exclusión al azul tripán (AT).....	45
4.4.1.2.d. Análisis estadístico de la CC <sub>50</sub> .....	46
4.4.2. Evaluación de la actividad antiviral frente al virus WEE .....	46
4.4.2.1. <i>Screening</i> antiviral durante todo el ciclo replicativo viral .....	46
4.4.2.2. Efecto antiviral de los extractos EAF y EAC de A. <i>satureioides</i> en distintos pasos de la replicación del virus WEE.....	48
4.4.2.2.a. Ensayo sobre adsorción y penetración viral .....	48
4.4.2.2.b. Ensayo post adsorción y penetración viral: replicación intracelular .....	49
4.4.2.2.c. Pre-tratamiento celular .....	51
4.4.2.3. Pre-tratamiento del virus libre: acción virucida .....	52
4.4.2.4. Determinación de la Concentración Inhibitoria 50% (CI <sub>50</sub> ) .....	52
4.4.2.5. Cálculo del Índice de Selectividad (IS).....	53
4.4.2.6. Evaluación de la actividad antiviral de los extractos acuosos a diferentes tiempos post adsorción y penetración del virus WEE .....	53
4.4.3. Evaluación de la actividad antiviral frente al virus <i>Herpes suis tipo 1</i> .....	55
4.4.3.1. <i>Screening</i> antiviral durante todo el ciclo replicativo viral .....	56
4.4.3.2. Efecto antiviral ejercido por EAF y EAC de A. <i>satureioides</i> en distintos pasos de la replicación del virus <i>H. suis</i> .....	56
4.4.3.2. a. Ensayos sobre la adsorción y penetración viral.....	56
4.4.3.2. b. Ensayo post adsorción y penetración viral: replicación intracelular .....	56
4.4.3.2.c. Pre-tratamiento celular .....	56
4.4.3.3. Pre-tratamiento del virus libre: acción virucida .....	56
4.4.4. Análisis estadístico.....	56
4.5. Estudios de genotoxicidad de EAF y EAC .....	56
4.5.1. Estudios <i>in vivo</i> de citogenotoxicidad mediante el test de <i>Allium cepa</i> L.....	56
4.5.1.a. Desarrollo de la prueba de mutagenicidad .....	57
4.5.1.b. Desarrollo de la prueba de reversión de mutagenicidad .....	58



	Índices
4.5.1.c. Estudios de alteraciones macroscópicas .....	60
4.5.1.d. Estudios citogenéticos.....	60
4.5.1.e. Registro de imágenes .....	61
4.5.2. Evaluación del potencial citogenotóxico de EAF y EAC por el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón .....	61
4.5.2.a. Desarrollo de la prueba .....	61
4.5.2.b. Análisis estadístico .....	63
4.5.2.c. Registro de imágenes.....	63
4.6. Caracterización química preliminar de los extractos acuosos de <i>A. satureioides</i> .....	64
4.7. Caracterización química del extracto acuoso frío .....	65
4.7.1. Determinación de grupos químicos por TLC.....	65
4.7.1.a. Determinación de azúcares.....	66
4.7.1.b. Determinación de saponinas.....	66
4.7.1.c. Determinación de cafeilquínicos y flavonoides glicosilados.....	67
4.7.1.d. Determinación de flavonoides aglicones.....	67
4.7.2. Análisis químico por HPLC/DAD .....	67
4.8. Fraccionamiento de EAF por cromatografía en columna .....	67
4.9. Determinación de las bioactividades de las fracciones de EAF .....	68
4.9.1. Evaluación de acción citotóxica por captación del RN .....	68
4.9.2. Actividad antiviral frente al virus WEE durante la replicación intracelular .....	68
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>69</b>
5.1. Propagación de la Línea Celular Vero .....	69
5.2. Amplificación y cuantificación de los lotes virales.....	69
5.2.1. Virus <i>Encefalitis Equina del Oeste (WEE) cepa AG 80-646</i> .....	69
5.2.1.a. Obtención del stock viral .....	69
5.2.1.b. Cuantificación de la infectividad del virus .....	70
5.2.1.c. Caracterización del efecto citopático del virus WEE, cepa AG 80-646, en células Vero.....	70
5.2.1.d. Curva de multiplicación del virus WEE cepa AG 80-646 en células Vero .....	71
5.2.2. Virus <i>Herpes suis tipo 1</i> , cepa RC/79 .....	73
5.2.2.a. Obtención del stock viral .....	73
5.2.2.b. Cuantificación de la infectividad del virus .....	75
5.3. Obtención de los extractos de <i>Achyrocline satureioides</i> .....	75
5.4. Determinación de acciones biológicas de los extractos .....	77





5.4.1. Ensayos de citotoxicidad.....	77
5.4.1.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC) .....	77
5.4.1.2. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC <sub>50</sub> ).....	79
5.4.1.2.a. Por captación del Rojo Neutro (RN).....	80
5.4.1.2.b. Por reducción de MTT.....	83
5.4.1.2.c. Por tinción por exclusión al azul tripán (AT).....	89
5.4.2. Evaluación de la actividad antiviral de los extractos acuosos frente al virus WEE.....	90
5.4.2.1. <i>Screening</i> antiviral durante todo el ciclo replicativo viral .....	90
5.4.2.2. Efecto antiviral de los extractos en distintos pasos de la replicación viral.....	91
5.4.2.2.a. Ensayo sobre adsorción y penetración viral .....	91
5.4.2.2.b. Ensayo post adsorción y penetración viral: replicación intracelular .....	92
5.4.2.2.c. Pre-tratamiento celular .....	92
5.4.2.3 Pre-tratamiento del virus libre: acción virucida .....	93
5.4.2.4. Determinación de la Concentración Inhibitoria 50% (CI <sub>50</sub> ) .....	94
5.4.2.5. Cálculo del Índice de Selectividad (IS).....	96
5.4.2.6. Actividad antiviral a diferentes tiempos post adsorción y penetración .....	97
5.4.3. Evaluación de la actividad antiviral frente al virus <i>Herpes suis tipo 1</i> .....	99
5.4.3.1. <i>Screening</i> antiviral durante todo el ciclo replicativo viral .....	99
5.4.3.2. Efecto antiviral de los extractos en distintos pasos de la replicación viral.....	100
5.4.3.2.a. Ensayo sobre adsorción y penetración viral .....	100
5.4.3.2.b. Ensayo post adsorción y penetración viral: replicación intracelular .....	102
5.4.3.2.c. Pre-tratamiento celular .....	103
5.4.3.3. Pre-tratamiento del virus libre: acción virucida .....	104
5.5. Estudios de genotoxicidad de EAF y EAC .....	105
5.5.1. Test de <i>Allium cepa</i> L.....	106
5.5.1.a. Pruebas de mutagenicidad.....	106
5.5.1.b. Prueba de reversión de mutagenicidad .....	106
5.5.1.c.1. Evaluación del daño macroscópico inducido por EAF .....	106
5.5.1.c.2. Evaluación del daño macroscópico inducido por EAC.....	117
5.5.1.d. Estudios citogenéticos.....	125
5.5.1.d.1. Evaluación de los daños microscópicos inducidos por EAF.....	126
5.5.1.d.2. Evaluación de los daños microscópicos inducidos por EAC .....	144
5.5.2. Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón .....	158
5.5.2.a. Citogenotoxicidad de EAF.....	158





	Índices
5.5.2.b. Citogenotoxicidad de EAC .....	164
5.6. Caracterización química preliminar de los extractos acuosos de <i>A. satureioides</i> .....	166
5.7. Caracterización química de EAF .....	167
5.7.1. Determinación de grupos químicos por TLC.....	167
5.7.1.a. Determinación de azúcares.....	167
5.7.1.b. Determinación de saponinas.....	168
5.7.1.c. Determinación de cafeilquínicos y flavonoides glicosilados.....	168
5.7.1.c. Determinación de flavonoides aglicones.....	169
5.7.2. Análisis químico por HPLC/DAD .....	170
5.8. Fraccionamiento de EAF por cromatografía en columna .....	171
5.9. Determinación de las bioactividades de las fracciones de EAF .....	172
5.9.1. Evaluación de acción citotóxica por captación del RN .....	172
5.9.2. Actividad antiviral frente al virus WEE durante la replicación intracelular .....	173
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>174</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>176</b>
<b>8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>187</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos macroscópicos de plantas de <i>Achyrocline satureioides</i> colectadas a campo .....	13
Figura 2. Etapas del ciclo de replicación de un virus, como posibles blancos de ataque con drogas antivirales .....	17
Figura 3. Etapas de estudio para el desarrollo de un nuevo fármaco. ....	19
Figura 4. Modelo de inducción de micronúcleos mediante agentes clastogénicos y aneugénicos .....	25
Figura 5. Determinación de acción antiviral de los extractos de <i>A. satureioides</i> durante todo el ciclo de la replicación del virus WEE .....	48
Figura 6. Determinación de acción antiviral de los extractos de <i>A. satureioides</i> durante la adsorción y penetración viral .....	49
Figura 7. Determinación de acción antiviral de los extractos de <i>A. satureioides</i> durante la etapa posterior a la adsorción y penetración viral. ....	50
Figura 8. Pre-tratamiento de las células con extracto vegetal, previo a la Infección viral.....	51
Figura 9. Tratamientos de monocapas de células Vero con EAF o EAC de <i>A. satureioides</i> incorporados a distintos tiempos de la replicación viral luego de las etapas de adsorción y penetración del virus a las células .....	54
Figura 9 (continuación). Tratamientos de monocapas de células Vero con EAF o EAC de <i>A. satureioides</i> incorporados a distintos tiempos de la replicación viral luego de las etapas de adsorción y penetración del virus a las células.....	55
Figura 10. Disco radicular de un bulbo de cebolla .....	57



Figura 11. Bulbos de cebolla sometidos a tratamiento con diferentes concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> .....	58
Figura 12. Punta de raíz sin cofia, observada bajo lupa .....	60
Figura 13. Monocopa de células Vero sin infectar, normales. 10X.....	69
Figura 14. Monocapas de células Vero sin infectar (A), e infectada con el virus WEE que exhibe placas de lisis de bordes difusos (B) .....	70
Figura 15. Efecto Citopático inducido por el virus WEE cepa AG 80-646 sobre monocopa de células Vero, 10X .....	71
Figura 16. Curva de replicación del virus WEE cepa AG 80-646 en células Vero .....	72
Figura 17. Monocopa de células Vero infectada con <i>Herpes suis tipo 1</i> , mostrando sincitios. 10X .....	74
Figura 18. Monocapa celular Vero infectada con <i>Herpes suis tipo 1</i> , mostrando una formación asteroide. 20X .....	74
Figura 19. Monocapas de células Vero, infectada con el virus <i>Herpes suis tipo 1</i> , mostrando placas de lisis típicas (A) y sin infectar (B).....	75
Figura 20. Aspectos morfológicos de células Vero en monocapas tratadas con concentraciones tóxicas de extractos acuosos y orgánicos obtenidos de <i>A. satureioides</i> .....	78
Figura 21A-B. Curvas de supervivencia de células Vero en fase estacionaria, determinadas por captación de RN, luego del tratamiento con extractos de <i>A. satureioides</i> : (A) EAF; (B) EAC .....	81
Figura 22A-B. Curvas de supervivencia de células Vero en fase estacionaria, determinadas por captación de RN, luego del tratamiento con extractos de <i>A. satureioides</i> : (A) EM; (B) EC.....	82



Figura 23A-B. Curvas de sobrevivencia de células Vero en fase estacionaria, determinadas por reducción de MTT, luego del tratamiento con extractos de <i>A. satureioides</i> : (A) EAF; (B) EAC.....	84
Figura 24A-B. Curvas de sobrevivencia de células Vero en fase estacionaria, determinadas por reducción de MTT, luego del tratamiento con extractos de <i>A. satureioides</i> : (A) EM; (B) EC.....	85
Figura 25. Curva de sobrevivencia de células Vero en fase estacionaria, determinada por exclusión al azul tripán, luego del tratamiento con EAF de <i>Achyrocline satureioides</i> .....	89
Figura 26. Curva dosis-respuesta de la inhibición del virus WEE por EAF y EAC de <i>Achyrocline satureioides</i> en cultivos de células Vero .....	96
Figura 27. Radiculación normal de un bulbo de <i>Allium cepa</i> L tratado con agua mineral durante 48 h a temperatura ambiente .....	106
Figura 28. Inhibición porcentual del crecimiento radicular de bulbos de <i>Allium cepa</i> L tratados con diferentes concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> durante 5 días .....	108
Figura 29. Bulbos de <i>Allium cepa</i> L tratados durante 5 días con concentraciones crecientes de EAF de <i>A. satureioides</i> vs. bulbos sin tratar.....	109
Figura 30. Alteraciones macroscópicas observadas en raíces de cebollas tratadas y sin tratar con EAF de <i>A. satureioides</i> .....	110
Figura 31. Inhibición porcentual del crecimiento radicular de bulbos de <i>Allium cepa</i> L tratados con concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> por 2 días y sometidas a depuración con agua mineral .....	113
Figura 32. Comparación entre longitud de raíces de bulbos de <i>Allium cepa</i> L tratadas con concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> durante 5 días vs. raíces tratadas 2 días y luego sometidas a depuración con agua mineral.....	114



Figura 33. Comparación entre porcentajes de anormalidades totales de raíces de bulbos de <i>Allium cepa</i> L tratadas con EAF de <i>A. satureioides</i> durante 5 días vs. 2 días y luego sometidas a depuración con agua mineral.....	116
Figura 34. Inhibición porcentual del crecimiento radicular de bulbos de <i>Allium cepa</i> L tratados con diferentes concentraciones de EAC de <i>A. satureioides</i> durante 5 días.....	118
Figura 35. Inhibición porcentual del crecimiento radicular de bulbos de <i>Allium cepa</i> L tratados con EAC de <i>A. satureioides</i> por 2 días y sometidas a depuración con agua mineral.....	121
Figura 36. Comparación entre longitud de las raíces de los bulbos de <i>Allium cepa</i> L tratadas con concentraciones de EAC de <i>A. satureioides</i> durante 5 días vs. aquellas tratadas durante 2 días y sometidas a depuración con agua mineral.....	122
Figura 37. Longitud de raíces de bulbos tratadas con concentraciones de EAC por 2 y 5 días.....	122
Figura 38. Comparación entre porcentajes de anormalidades totales de raíces de bulbos de <i>Allium cepa</i> L tratadas con concentraciones de EAC de <i>A. satureioides</i> durante 5 días vs. aquellas tratadas durante 2 días y luego sometidas a depuración con agua mineral.....	125
Figura 39. Células meristemáticas de raíces de <i>Allium cepa</i> en interfase y en los diferentes estadios de la división celular.....	130
Figura 40. Comparación entre los índices mitóticos 1, 2 y 3 de raíces correspondientes a bulbos de <i>Allium cepa</i> tratados con las distintas concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> .....	132
Figura 41. Índices de fases de raíces tratadas con distintas concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> vs. sistemas controles: (A) durante 2 días, (B) durante 5 días, (C) durante 2 días y luego sometidas a recuperación con agua mineral.....	134
Figura 42. Aberraciones en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> compatibles con cuerpos apoptóticos, inducidas por el tratamiento con EAF de <i>A. satureioides</i> .....	139



Figura 43. Aberraciones en células meristemáticas en división de <i>Allium cepa</i> inducidas por EAF de <i>A. satureioides</i> aplicado durante 2 días .....	140
Figura 44. Aberraciones en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> inducidas por el tratamiento con EAF de <i>A. satureioides</i> aplicado durante 5 días .....	142
Figura 45. Índices de anomalías cromosómicas en raíces tratadas con concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> durante 2 días, 5 días y, 2 días más 3 días con agua mineral .....	144
Figura 46. Comparación entre los Índices mitóticos 1, 2 y 3 de las raíces de los bulbos de <i>Allium cepa</i> tratadas con concentraciones de EAC de <i>A. satureioides</i> .....	149
Figura 47. Índices de fases de raíces tratadas con distintas concentraciones de EAC de <i>A. satureioides</i> vs. sistemas controles: (A) durante 2 días, (B) durante 5 días, (C) durante 2 días y luego tratadas con agua mineral .....	151
Figura 48. Aberraciones en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> compatibles con cuerpos apoptóticos, inducidas por el tratamiento con EAC de <i>A. satureioides</i> .....	154
Figura 49. Micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón Balb/C luego del tratamiento con 100 mg/kg de EAF de <i>A. satureioides</i> .....	161
Figura 50. Índice de toxicidad (EPC/ENC cada 1000 EPC) en células de médula ósea de ratón Balb/C tratados con diferentes concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> .....	162
Figura 51. Recuento de Eritrocitos Normocromáticos (ENC) en médula ósea de ratones tratados con concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> , de acuerdo al sexo.....	163
Figura 52. Índices de toxicidad (EPC/ENC) de distintas concentraciones de EAC de <i>A. satureioides</i> .....	165
Figura 53. Determinación de azúcares del EAF por TLC, revelado a 254 nm .....	168
Figura 54. Determinación de cafeilquínicos y flavonoides glicosilados en EAF por TLC, revelado a 366 nm.....	169



Figura 55. Cromatograma (HPLC-UV/DAD) del Extracto Acuoso Frío de <i>A. satureioides</i> .....	170
Figura 56. Fraccionamiento por cromatografía en columna de EAF de <i>A. satureioides</i> .....	172
Figura 57. Curva de sobrevivencia de células Vero en fase estacionaria, determinada por RN, luego del tratamiento con F2 de <i>Achyrocline satureioides</i> .....	173





**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Títulos virales intra y extracelulares alcanzados por el virus de la WEE, cepa AG 80-646 a diferentes tiempos p.i., en monocapas de células Vero .....	72
Tabla 2. Rendimiento de los extractos acuosos y orgánicos de <i>Achyrocline satureioides</i> .....	76
Tabla 3. Determinación de valores de Máxima Concentración No Citotóxica de extractos obtenidos de <i>Achyrocline satureioides</i> empleando células Vero. ....	77
Tabla 4. Valores de Máxima Concentración No Citotóxica y CC <sub>50</sub> , cuantificada por captación de RN, de extractos acuosos y orgánicos de <i>A. satureioides</i> en células Vero.....	83
Tabla 5. Valores de Máxima Concentración No Citotóxica y CC <sub>50</sub> cuantificada por reducción de MTT, de extractos acuosos y orgánicos de <i>A. satureioides</i> en células Vero.....	86
Tabla 6. Correlación entre valores de viabilidad celular porcentual obtenidos por tres métodos diferentes en células Vero.....	87
Tabla 7. Datos comparativos de valores de CC <sub>50</sub> alcanzados por métodos colorimétricos diferentes empleando células Vero en monocapas.....	87
Tabla 8. Actividad inhibitoria de extractos acuosos de <i>Achyrocline satureioides</i> contra el virus de la <i>Encefalitis Equina del Oeste</i> .....	90
Tabla 9. Acción antiviral ejercida por EAF y EAC de <i>A. satureioides</i> sobre la adsorción y penetración del virus WEE en células Vero. ....	91
Tabla 10. Porcentajes de inhibición de la multiplicación del virus WEE por EAF y EAC de <i>A. satureioides</i> incorporados posteriores a la adsorción y penetración viral.....	92
Tabla 11. Acción antiviral de los EAC y EAF de <i>A. satureioides</i> sobre la replicación del virus WEE en células Vero pre-tratadas. ....	93
Tabla 12. Inactivación del virus WEE por EAC y EAF de <i>A. satureioides</i> . ....	94





Tabla 13. Porcentajes de inhibición de WEE luego del tratamiento con EAF y EAC de <i>A. satureioides</i> , incorporados posteriores a la adsorción y penetración viral .....	95
Tabla 14. Índice de selectividad de los extractos EAF y EAC frente al virus WEE .....	96
Tabla 15. Actividad antiviral de los extractos acuosos frío y caliente de <i>A. satureioides</i> frente al virus WEE a diferentes tiempos post adsorción y penetración viral .....	98
Tabla 16. Actividad inhibitoria de extractos acuosos de <i>A. satureioides</i> contra el virus <i>H. suis</i> .....	100
Tabla 17. Acción antiviral de EAF y EAC de <i>A. satureioides</i> sobre la adsorción y penetración del virus <i>H. suis</i> en células Vero .....	101
Tabla 18. Porcentajes de inhibición del virus <i>H. suis</i> por EAF y EAC de <i>A. satureioides</i> incorporados posteriores a la adsorción y penetración viral .....	102
Tabla 19. Acción antiviral de EAF y EAC de <i>A. satureioides</i> sobre la replicación del virus <i>H. suis</i> en células Vero pre-tratadas durante 1 hora .....	103
Tabla 20. Inactivación del virus <i>H. suis</i> por EAF y EAC de <i>A. satureioides</i> .....	105
Tabla 21. Valores promedio del número y longitud de raíces de <i>Allium cepa</i> L, y anomalías luego del tratamiento por 5 días con concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> .....	107
Tabla 22. Valores de anomalías macroscópicas presentes en las raíces tratadas durante 5 días con distintas concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> .....	111
Tabla 23. Valores promedio del número y longitud de raíces de <i>Allium cepa</i> L, y anomalías luego del tratamiento por 2 días con concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> y luego sometidas a depuración con agua mineral .....	112



Tabla 24. Valores de anomalías macroscópicas en raíces tratadas durante 2 días con concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> y luego sometidas a depuración con agua mineral.....	115
Tabla 25. Valores promedio del número y longitud de raíces de <i>Allium cepa</i> L, y anomalías luego del tratamiento por 5 días con concentraciones de EAC de <i>A. satureioides</i> .....	117
Tabla 26. Valores de anomalías macroscópicas presentes en las raíces tratadas durante 5 días con concentraciones de EAC de <i>A. satureioides</i> .....	119
Tabla 27. Valores promedio del número y longitud de raíces de <i>Allium cepa</i> L, y anomalías luego del tratamiento durante 2 días con EAC de <i>A. satureioides</i> y sometidas a depuración con agua mineral .....	120
Tabla 28. Valores de anomalías macroscópicas en las raíces tratadas durante 2 días con EAC de <i>A. satureioides</i> y luego sometidas a depuración con agua mineral.....	124
Tabla 29. Valores de los parámetros microscópicos en raíces de <i>Allium cepa</i> L tratadas por 2 días con concentraciones de EAF de <i>Achyrocline satureioides</i> .....	127
Tabla 30. Valores de los parámetros microscópicos en raíces de <i>Allium cepa</i> L tratadas por 5 días con concentraciones de EAF de <i>Achyrocline satureioides</i> .....	128
Tabla 31. Valores de los parámetros microscópicos en raíces de <i>Allium cepa</i> L tratadas durante 2 días con concentraciones de EAF de <i>Achyrocline satureioides</i> y luego con 3 días de agua mineral (reversión).....	129
Tabla 32. Índices de aberraciones y diferenciación de anomalías microscópicas en raíces tratadas con concentraciones de EAF de <i>Achyrocline satureioides</i> durante 2 días.....	138
Tabla 33. Índice de aberraciones y diferenciación de anomalías microscópicas de raíces tratadas con concentraciones de EAF de <i>Achyrocline satureioides</i> durante 5 días.....	141



Tabla 34. Índice de aberraciones y diferenciación de anomalías microscópicas de raíces tratadas con concentraciones de EAF de <i>A. satureioides</i> por 2 días y luego con agua mineral .....	143
Tabla 35. Valores de los parámetros microscópicos en raíces de <i>Allium cepa</i> L luego del tratamiento durante 2 días con concentraciones de EAC de <i>Achyrocline satureioides</i> .....	145
Tabla 36. Valores de los parámetros microscópicos en raíces de <i>Allium cepa</i> L luego del tratamiento durante 5 días con concentraciones de EAC de <i>Achyrocline satureioides</i> .....	146
Tabla 37. Valores de los parámetros microscópicos en raíces de <i>Allium cepa</i> L luego del tratamiento durante 2 días con concentraciones de EAC de <i>Achyrocline satureioides</i> y luego con 3 días de agua mineral (reversión).....	147
Tabla 38. Índice de aberraciones y diferenciación de anomalías microscópicas de raíces tratadas con concentraciones de EAC de <i>Achyrocline satureioides</i> durante 2 días.....	153
Tabla 39. Índice de aberraciones y diferenciación de anomalías microscópicas de raíces tratadas con concentraciones de EAC de <i>Achyrocline satureioides</i> durante 5 días.....	155
Tabla 40. Índice de aberraciones y diferenciación de anomalías microscópicas de raíces tratadas con concentraciones de EAC de <i>Achyrocline satureioides</i> durante 2 días y luego sometidas a recuperación con agua mineral.....	156
Tabla 41. Mortalidad y signos de toxicidad en ratones inoculados intraperitonealmente con EAF de <i>A. satureioides</i> observados a las 24 h (n=6).....	159
Tabla 42. Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones tratados con EAF de <i>A. satureioides</i> .....	160
Tabla 43. Mortalidad y signos de toxicidad en ratones inoculados intraperitonealmente con EAC de <i>A. satureioides</i> observados a las 24 h (n=6). .....	164



Tabla 44. Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones tratados con EAC de <i>A. satureioides</i> .....	165
Tabla 45. Grupos de compuestos químicos presentes en EAF y EAC .....	167
Tabla 46. Tiempos de retención y espectros UV de los picos principales observados en el cromatograma de EAF de <i>A. satureioides</i> .....	171
Tabla 47. Citotoxicidad por RN y actividad antiviral de las fracciones obtenidas de EAF de <i>A. satureioides</i> frente al virus <i>Encefalitis Equina del Oeste</i> .....	173



**ÍNDICE DE DIAGRAMAS**

Diagrama 1. Obtención de los extractos de <i>A. satureioides</i> empleando solventes orgánicos.....	41
Diagrama 2. Obtención de extractos polares de <i>Achyrocline satureioides</i> .....	42
Diagrama 3. Test de <i>Allium cepa</i> L. ....	59
Diagrama 4. Test de Micronúcleos.....	62



## ABREVIATURAS

‰: Porcentaje

µg: Microgramo

ARN: Acido ribonucleico

ADN: Acido desoxirribonucleico

atm: Atmósferas

c.s.p.: Cantidad suficiente para

DMSO: Dimetilsulfóxido

EM: extracto metanólico

EAF: Extracto acuoso obtenido en frío

EAC: Extracto acuoso obtenido en caliente

EH: Extracto n-hexánico

EC: Extracto clorofórmico

ENC: Eritrocitos normocromáticos

EPC: Eritrocitos policromáticos

EPCMN: Eritrocitos policromáticos micronucleados

g: Gramo

h: Hora

IT: Índice de toxicidad

LDH: Lactatodehidrogenasa

Lt: Litro

mARN: Acido ribonucleico mensajero

MC: Medio de crecimiento

MCNC: Máxima concentración no citotóxica

min: Minutos

ml: Mililitro

MM: Medio de mantenimiento

mm: Milímetro

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

Nº: Número

°C: Grado centígrado

OMS: Organización Mundial de la Salud

PRV: Virus de la Pseudorrabia



**“Evaluación de actividades biomoleculares de extractos y subproductos obtenidos de  
*Achyrocline satureioides*”**

---

Abreviaturas

RN: Rojo Neutro

v/p: Volumen en peso



## RESUMEN

Las infecciones virales son un problema importante a nivel mundial, a menudo afectan diferentes zonas geográficas con graves consecuencias en la salud pública humana y animal y con derivaciones económicas importantes para el país involucrado. Argentina, al igual que el resto del mundo, continúa enfrentando los problemas que plantean las infecciones virales endemo-epidémicas, emergentes y re-emergentes. Así, la aparición de brotes de encefalitis virales constituye un problema sanitario cada vez más importante. Dentro de esas virosis cobran relevancia aquellas cuyos agentes etiológicos están incluidos en el género *Alphavirus* (Filia Togaviridae), tales como el virus *Encefalitis Equina del Oeste* (WEEV), *Encefalitis Equina del Este* y *Encefalitis Equina Venezolana*, patógenos transmitidos por mosquitos. Otra patología relevante en veterinaria son las infecciones porcinas donde cobra importancia el virus *Herpes suis tipo 1* (Pseudorrabia) que se asocia con abortos prematuros, alta tasa de mortalidad de lechones y disminución de la camada en cerdas madres infectadas. No hay hasta el momento vacunas argentinas apropiadas para el control de esta enfermedad y sólo se apela a prácticas de manejo. El propósito de esta investigación fue estudiar las actividades biológicas de los extractos obtenidos a partir de *Achyrocline satureioides* y su(s) componente(s) parcialmente purificados utilizando ensayos bioquímicos seleccionados para la detección de sus propiedades antivirales frente a los virus WEE (genoma ARN) y *H. suis tipo 1* (genoma ADN), su posible blanco de ataque en el ciclo de la replicación del virus y su toxicidad general. De cinco extractos obtenidos de la especie, se determinó en primera instancia la actividad citotóxica *in vitro* por tres técnicas, captación de rojo neutro, ensayo de MTT y Máxima Concentración No Citotóxica, pudiéndose establecer un orden de toxicidad, seleccionando para los estudios antivirales los extractos acuosos frío (EAF) y caliente (EAC) por resultar los menos tóxicos. El estudio del mecanismo de acción antiviral del EAF y EAC a diferentes concentraciones no citotóxicas reveló que los extractos ejercieron acción inhibitoria en etapas posteriores a la adsorción y penetración. Un estudio más profundo permitió conocer el mecanismo de acción pudiendo determinarse que ambos extractos afectan etapas tardías de la replicación del virus WEE. Por otra parte, EAF y EAC ejercieron una importante acción virucida frente a WEE cuando se trató previamente el virus por 1h a 37°C. Se determinó que los valores de índice de selectividad fueron altos para ambos extractos, siendo mayor para EAF (73 por MTT y 27 por RN). Por otra parte, los estudios con *H. suis*, revelaron que ambos extractos inhibieron al virus en porcentajes elevados 80% (EAF) y 96% (EAC). Los estudios de citogenotoxicidad por las técnicas de micronúcleos en médula ósea de ratón y *Allium cepa L* indicaron que los extractos no fueron genotóxicos ni citotóxicos a las concentraciones activas frente a los virus. Por fraccionamiento en columna de Sephadex se obtuvieron cinco fracciones de EAF, de las cuales F3 fue la más activa frente al virus WEE.





## SUMMARY

Viral infections are a major problem worldwide, often affecting different geographic areas with serious consequences for human and animal health. Argentina, such as the rest of the world continues to face the challenges posed by endemic-epidemic, emerging and re-emerging, viral infections. Thus, outbreaks of viral encephalitis are a health issue increasingly important. Within these viruses become relevant those whose etiologic agents are included in the genus Alphavirus (Togaviridae Flia), such as *Western Equine Encephalitis* (WEEV), *Eastern Equine Encephalitis* and *Venezuelan equine encephalitis* viruses, this are borne pathogens by mosquitoes. Outbreaks of viral encephalitis are a health issue of increasing importance. Moreover, this illness has economic importance because it causes significant morbidity and mortality. In infants and children this disease is more serious and is often associated with seizures. Other relevant pathology in veterinary is pseudorabia illness caused by *Herpes suis virus type 1* (pseudorabies) which is associated with premature abortions, high mortality rate of piglets and decreased litter sows infected. In Argentina, there are no appropriate vaccinations for control of the disease, and only are used management practices. The purpose of this research was to study the biological activities of extracts obtained from *Achyrocline satureioides* and their components partially purified using selected bioquímicos tests for detection of antiviral properties against viruses *WEE* (genome RNA) and *H. suis type 1* (genome DNA), its possible target in the replication cycle of the virus and its toxicity. Five extracts obtained of the species, were submitted to cytotoxic activity *in vitro* by three techniques, neutral red uptake (NRU), MTT assay and Maximum Non Cytotoxic Concentration (MNCC). An order of toxicity was established with extracts and, cold (CAE) and hot (HAE) aqueous extracts were selected for antiviral studies, due to them were the least toxic. The study of the mechanism of antiviral action of HAE and CAE at non-cytotoxic concentrations revealed that the extracts exert inhibitory action in post adsorption and penetration. Then, further study allowed us to determined that both extracts affect late stages of replication of WEEV. Furthermore, HAE and CAE exerted a significant virucida action against WEEV when virus was pretreated for 1 h at 37°C. The selectivity index showed high values for CAE and HAE, indicating the selective action of both extracts, being higher for CAE (73 for MTT y 27 for NRU). Moreover, studies with *H suis* revealed that both extracts inhibited the virus in high percentages 80% (CAE) and 96% (HAE). Cytogenotoxicity studies indicated that the extracts were not genotoxic neither cytotoxic at concentrations that are active against viruses by both techniques, micronuclei bone marrow mice and *Allium cepa* L test. The fractionation in Sephadex column allowed obtained five fractions of CAE, which F3 was the most active against WEE virus.

# *INTRODUCCIÓN*



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Impacto de las infecciones virales sobre salud humana y animal

Las infecciones virales son un problema importante a nivel mundial, a menudo afectan diferentes zonas geográficas con graves consecuencias en la salud pública humana y animal, y con derivaciones económicas importantes para el país involucrado. Argentina, al igual que el resto del mundo, continúa enfrentando los problemas que plantean las infecciones virales endemo-epidémicas, emergentes y re-emergentes. Contribuyen al surgimiento de estas enfermedades, factores sociales y económicos tales como el aumento de las diferencias en el grado de desarrollo, el desmoronamiento de la infraestructura sanitaria pública, la pobreza, la urbanización, el cambio ambiental, la globalización de los viajes y del comercio, influyendo además la adaptación y el cambio de los microorganismos que se relacionan con la prevalencia de diferentes entidades infecciosas. Algunos ejemplos de la vulnerabilidad de la sociedad actual a la emergencia de arbovirus lo constituye la introducción reciente del virus de West Nile en América, del Chikungunya en Italia o del Usutu en Austria, (Pfeffer y Dobler, 2010).

Así, la aparición de brotes de encefalitis virales constituye un problema sanitario cada vez más importante. Dentro de estas virosis cobran relevancia aquéllas cuyos agentes etiológicos están incluidos en el género *Alphavirus* (Familia *Togaviridae*), tales como los virus *Encefalitis Equina del Oeste* (WEE), *Encefalitis Equina del Este* (EEE) y *Encefalitis Equina Venezolana* (VEE).

### 1.2. Familia *Togaviridae*: Arbovirus

La denominación *Togaviridae* proviene del latín en el que *toga* significa capa o cubierta y hace referencia a la envoltura que presentan los virus pertenecientes a esta familia.

Como se mencionó anteriormente, los brotes de encefalitis virales son un problema sanitario de importancia creciente y algunos agentes productores de estas virosis que son miembros del género *Alphavirus* están clasificados según un criterio biológico como Arbovirus.

Se denominan arbovirus (anagrama del idioma inglés *arthropod borne viruses*: virus transmitidos por artrópodos) a todos aquellos virus que persisten en la naturaleza a través de una transmisión de tipo biológica entre huéspedes vertebrados susceptibles y artrópodos hematófagos. Este concepto epidemiológico implica que los arbovirus deben



replicar obligatoriamente en un artrópodo hematófago que actúa como vector y transmitirlo así a un hospedador vertebrado susceptible. Éste lo multiplica y produce una viremia de suficiente magnitud como para infectar nuevos vectores susceptibles. El virus ingerido por el artrópodo hematófago se multiplica en el intestino y escapa del tracto alimenticio para alcanzar una concentración elevada en sus glándulas salivales (período de incubación extrínseca). Luego el virus es transmitido por picadura a un nuevo huésped susceptible. Así, los arbovirus llegan a multiplicarse tanto en el vertebrado como en el artrópodo, el cual actúa así fundamentalmente como vector en el ciclo de transmisión, (Contigiani, 1996).

### 1.2.1. Género *Alphavirus*

El Comité Internacional de Taxonomía Viral ha incluido en la familia *Togaviridae* tres géneros: *Alphavirus*, *Rubivirus* y *Arterivirus* y por lo menos dos miembros adicionales, el virus de la deshidrogenasa láctica y el virus del moteado de la zanahoria, (Contigiani, 1996).

Los togavirus están constituidos por ARN genómico de cadena simple lineal, polaridad positiva y PM de  $3 \times 10^6$  a  $4 \times 10^6$  daltons, que junto con la proteína C “core” constituyen la nucleocápside, de simetría icosaédrica. Las partículas tienen un tamaño de 50-70 nm de diámetro y están rodeadas por una envoltura lipoproteica con proyecciones conformadas por dos glicoproteínas, E1 y E2. Esta cubierta la adquieren cuando maduran por brotación citoplasmática o intracitoplasmática.

En el taxón *Alphavirus* se incluyen los arbovirus anteriormente reconocidos como del grupo antigénico A en la clasificación clásica de Cassals, (Calisher et al., 1980).

### 1.2.2. Virus *Encefalitis Equina del Oeste*

El virus *Encefalitis Equina del Oeste* (WEE) es el prototipo del complejo que incluye además a los virus *Sindbis* (África, Asia, Europa y Australia), *Y62-33* (Rusia), *Highlands J* y *Fort Morgan* (USA) y *Aura* (Sudamérica), (Calisher y Karabatsos, 1988).

Este virus tiene una amplia distribución en América encontrándose desde Canadá hasta Argentina.

El virus WEE fue aislado por primera vez en 1930. Reisen y Monath (1988), resumieron su distribución histórica “a través de las Américas desde el Círculo Ártico hasta Argentina y desde el Pacífico hasta las costas Atlánticas”. Las epidemias y



epizootias han sido más frecuentes en Norte América, al oeste del río Mississippi. En Estados Unidos, el vector principal es el mosquito *Culex tarsalis* que se reproduce en áreas agrícolas bajo irrigación, y los principales hospedadores amplificadores son las aves. Un ciclo de transmisión secundario se establece entre mamíferos, particularmente conejos, y mosquitos del género *Aedes* en los que se ha demostrado transmisión transovárica del virus, (Reisen y Monath, 1988).

En las regiones neotropicales, específicamente en zonas tropicales y subtropicales hay baja actividad del virus, en tanto que en zonas templadas, principalmente en Argentina y Uruguay se han descrito períodos epizooticos, (Sabattini et al., 1998). Así, dos brotes epidémicos muy importantes causados por WEE fueron los acontecidos en los veranos 1972/73 y 1982/83. Estos empezaron en el norte de la provincia de Santa Fe en primavera y para diciembre se habían extendido por toda la zona templada, hasta Mendoza y San Juan por el oeste y hasta Río Negro por el sur. La particularidad de estas dos extensas epizootias equinas, fue la implementación de vigilancia de casos humanos en toda la región pero sólo se confirmaron en Río Negro, el límite sur de la dispersión viral, (Sabattini, 2010).

En la actualidad Delfraro et al., 2011, publicaron un caso fatal de encefalitis en humanos ocurrido en Uruguay en abril de 2009, confirmando por RT-PCR que el agente causal fue el virus *Encefalitis Equina del Oeste*, lo que indica la circulación y patogenicidad de este virus en las zonas templadas de América del Sur. El registro de un único caso de enfermedad y muerte causado por WEE no posibilita dimensionar el impacto de dicho patógeno, considerando además el reporte de más casos de encefalitis no confirmados etiológicamente.

En Argentina aún no se conoce completamente el ciclo natural. Debido a que no se han encontrado anticuerpos en aves que indiquen su participación en la cadena epidemiológica, no se descarta que el caballo, a pesar de presentar viremias muy bajas, u otro mamífero, sea el huésped vertebrado que actúe como fuente de virus para mosquitos, (Contigiani, 1996).

Se han informado infecciones naturales en serpientes, ranas y tortugas, como también se han documentado que culebras infectadas de forma experimental pueden transmitir el virus WEE a los mosquitos, ([www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/encefalomielitis\\_equina.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/encefalomielitis_equina.pdf)).





### 1.2.3. Patología del virus WEE

Además de la forma habitual de transmisión del WEEV, se ha reportado en humanos la capacidad del virus de atravesar la placenta y producir infección congénita, ([www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/encefalomiелitis\\_equina.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/encefalomiелitis_equina.pdf)).

En el hombre la infección se puede manifestar de modo asintomático o generar cuadros letales, pasando por estadios intermedios caracterizados por fiebre y dolor de cabeza o meningitis aséptica.

En la etapa inicial de la infección, período de incubación asintomático, comienza la multiplicación viral. Luego, acontece la diseminación viral y es allí cuando aparecen las manifestaciones clínicas, el paciente presenta un compromiso de su estado general con fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, náuseas y vómitos, y en ocasiones presenta síntomas respiratorios. A continuación comienzan los síntomas neurológicos centrales, que duran uno o varios días, e incluyen letargo, rigidez de nuca, somnolencia, fotofobia, vértigo, cambios en el estado mental. Principalmente en niños menores de 2 años se observa irritabilidad, temblores, convulsiones y alteraciones motoras. Si bien hay casos fatales, el curso habitual de esta enfermedad es la recuperación. Entre el 15 y el 30% sufren secuelas neurológicas, especialmente niños menores de 1 año.

En equinos, la patología se caracteriza por fiebre, leucopenia y encefalomiелitis que se manifiesta con depresión, anorexia y parálisis de labios y patas. Esta enfermedad, conocida como la “locura de los caballos”, tiene un período de incubación de 3 a 12 días. Los signos de compromiso del sistema nervioso central se caracterizan por caída de la cabeza o de las orejas, movimientos de masticación, salivación excesiva, incoordinación, locomoción en círculos, incapacidad para pararse, flaccidez de los labios, ceguera aparente, ataxia, movimientos involuntarios, irritabilidad, hiperexcitabilidad y convulsiones. En el estado terminal los animales postrados muestran movimientos de pedaleo, nistagmo, parálisis, dificultades en la respiración y coma, (*Bianchi, 1991*).

### 1.2.4. Epidemiología del virus

De acuerdo a información del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), entre 1964 y 2005 hubo 639 casos humanos confirmados de encefalitis causadas por el virus WEE en Estados Unidos, (*Zacks y Paessler, 2010*). El porcentaje de casos fatales en humanos se encuentra en un rango de 3 a 7%. Se ha informado que la relación



de infecciones asintomáticas/sintomáticas es 1:1 en niños menores de 1 año; de 58:1 en niños de 1 a 4 años; y >1000:1 en niños mayores de 14 años, (Reeves *et al.*, 1958).

Los datos recogidos del brote ocurrido en Argentina en 1983 indican que de los 7 casos denunciados, sólo falleció una persona. La información referida al total de casos fatales no es completa teniendo en cuenta la falta de registro, (Sabattini, 1984).

Los últimos casos de WEE en equinos en Argentina se diagnosticaron en 1989, (Sabattini, 2010).

En USA, los registros de distintas epizootias indican porcentajes de mortalidad equina del 10 al 50%, valores estimativos dada la dificultad para obtener datos seguros durante los brotes.

### 1.2.5. Cepas argentinas del virus WEE

El primer aislamiento del virus WEE (cepa MV) se realizó en Buenos Aires en 1933. Posteriormente, durante la epizootia equina del verano de 1957-1958, se aislaron las cepas Cba 87 y Cba 97 en Oncativo, Córdoba; y la cepa M 1021 en Pergamino, Buenos Aires. Éstas fueron identificadas como virus WEE por Aguirre *et al.* (1964). Durante la epizootia se pudo realizar el diagnóstico serológico de un número pequeño de equinos; por primera vez en Argentina se usó la seroconversión para establecer etiología en caballos no vacunados. En 1972/73 ocurrió una epizootia en la que no fue posible aislar el virus de caballos enfermos, de aves salvajes o domésticas, ni de mosquitos, sólo se realizó diagnóstico serológico y se diagnosticaron, por primera vez, casos humanos en la provincia de Río Negro, (Pauli y Sabattini, 1976).

En 1982/83, se produjo otra epizootia durante la cual el virus se aisló de cerebros de caballos de las provincias de Córdoba, Chaco, Santa Fe y Río Negro constituyendo las cepas CIV 180, CIV 26 A y B, CIV 76 y CIV 288. En este brote también se registraron casos de encefalitis en humanos en Río Negro, (Sabattini, 1984). Además, a partir de mosquitos capturados en Santa Fe se pudieron aislar las siguientes cepas: AG 83-356, AG 83-367, AG 83-2006 y AG 83-2043, (Mitchell *et al.*, 1987). Posterior a 1983 hubo casos de infección de caballos con WEE pero el virus no fue aislado.

La cepa MV ha sido considerada como el prototipo de Argentina, (Theiler y Downs, 1973), y ha sido utilizada para pruebas serológicas, (Mettler, 1966a, 1966b). En otros estudios las cepas Cba 87 y CIV 180 han sido empleadas como representativas de



Argentina, (Calisher et al., 1985; Avilés et al., 1990, 1992, 1993; Bianchi et al., 1990, 1993; Sabbatini et al., 1991).

En la zona subtropical, durante un período interepizoótico se aislaron a partir de mosquitos tres cepas enzoóticas relacionadas serológicamente las que se denominaron AG 80- 463, 621 y 646. Esta última ha sido seleccionada como representativa para diferentes estudios, (Calisher et al., 1985; Mitchell et al., 1985).

### 1.2.6. Ciclo de replicación de los miembros de la familia *Togaviridae*

El ciclo de multiplicación viral comprende varias etapas:

► **Adsorción y penetración:** no hay información convincente referida a los receptores celulares específicos para estos virus. Los antígenos de histocompatibilidad H2 y HLA podrían actuar como receptores para *Semliki Forest* (SFV). El virión requiere para su adhesión de espículas glicoproteicas presentes en la envoltura del virus, y se ha demostrado que la glicoproteína E2 es la que cumple la función de anti-receptor viral. Una vez que el virus está unido a la superficie de la célula susceptible, ingresa al citoplasma por endocitosis mediada por receptor. Estas vesículas son engolfadas por los endosomas que debido a las condiciones de pH ácido favorece la fusión de la membrana viral con la membrana del endosoma. Se ha demostrado también que los alfavirus pueden entrar por fusión con la membrana plasmática directamente.

► **Transcripción y replicación del genoma:** el virión endocitado transfiere su genoma al citoplasma de la célula huésped para que ocurra la replicación del virus, la cual comprende traducción, transcripción y replicación del ARN genómico. Estas actividades bioquímicas no están aún bien definidas. El mecanismo por el cual el ARN del virión pierde la nucleocápside es desconocido. El ARN libre, funciona como ARN mensajero a partir del cual se traducen poliproteínas no estructurales que luego de clivadas por proteasas a polipéptidos menores no estructurales, catalizan las actividades de transcripción y replicación. Estos eventos ocurren de la siguiente manera: la síntesis de ARN es iniciada en la región 3' poliadenilada del ARN 49S; la polimerización por la ARN polimerasa - ARN dependiente produce un ARN cadena (-) que sirve como templado para la transcripción de dos ARN; La iniciación en el extremo 3' terminal del templado ARN (-) seguido por la elongación da origen a una cadena de ARN 49S sentido (+), en tanto que la iniciación en otra región lleva a la formación de un ARNm 26S. Los extremos 5' de ambas cadenas son capeados y metilados. Ha sido descrita una





actividad enzimática asociada con proteínas no estructurales para el virus WEE que es una nucleótido-hidrolasa. Se cree que las proteínas de la célula huésped podrían jugar un rol en el proceso de transcripción y replicación. La nueva cadena de ARN 49S puede unirse a ribosomas y traducir proteínas no estructurales adicionales, o se puede unir a un complejo de replicación para producir más templados ARN sentido (-). La síntesis de ambas cadenas de ARN sentido (-) y (+) incrementa durante las 3-3,5 h después de la infección. Luego, se detiene la formación de ARN sentido (-) mientras continúa la síntesis de ARN subgenómico 26S y 49S sentido (+).

➤ **Síntesis de proteínas estructurales: Traducción del ARN subgenómico.**

Tempranamente, alrededor de las 3 h post-infección, comienzan a detectarse proteínas estructurales del virus recién sintetizadas. Estos polipéptidos emergen como resultado de varios clivajes poliproteicos. Una vez liberados interactúan rápidamente con la cadena de ARN 49S sentido (+) para formar las nucleocápsides. Luego, continúa la traducción de la proteína p62 que es transportada hacia la membrana del retículo endoplásmico (RE) y translocada hacia el lumen del mismo. Posteriormente, ocurre la traducción del ARN subgenómico unido a la membrana del RE, y se sintetiza un polipéptido fuertemente hidrofóbico (proteína 6 K), el cual contiene en su extremo carboxilo terminal una secuencia que podría servir de señal para la inserción de E1 en la membrana del RE. La proteína 6K es removida de E1 y como consecuencia E1 pasa al lumen del RE. Allí, al igual que ocurre con p62, E1 es glicosilada. Ambas, son transportadas vía aparato de Golgi hacia la membrana plasmática.

➤ **Maduración y transporte de las glicoproteínas del virus:** un número de modificaciones son realizadas en las glicoproteínas de los alfavirus entre el momento de su biosíntesis hasta el tiempo del ensamblado de los viriones.

En primer lugar, ocurren alteraciones en los oligosacáridos tales como liberación de residuos de glucosa y manosa y, adición de galactosa, N-acetil-glucosamina y ácido siálico. Estas modificaciones pueden afectar la conformación de las glicoproteínas y también podrían facilitar el transporte a través de organelas de la célula. En segundo lugar, hay un clivaje de la poliproteína p62 para formar E2 y E3 (en algunos miembros) y, en tercer lugar, estas proteínas sufren acetilaciones. Todas estas modificaciones ocurren en el RE y en el aparato de Golgi. Las enzimas involucradas en estos cambios pertenecen a la célula huésped. En la mayoría de los cultivos celulares hay 25 minutos de fase de latencia comprendidos entre la síntesis de las glicoproteínas y la aparición en la



superficie de la membrana. Una vez transportadas hacia la superficie allí interactúan con la nucleocápsides.

► **Ensamblado y gemación del virus:** es la etapa final de la replicación y consiste en la unión de los elementos estructurales para formar el virus: la nucleocápside y la envoltura con las espículas glicoproteicas. En células de vertebrados, este proceso de ensamblaje acontece primariamente en la membrana de las células infectadas. Se cree que en la nucleocápside hay un sitio receptor para unirse a secuencias citoplasmáticas de la glicoproteína de transmembrana E2.

La interacción entre la nucleocápside y el dominio citoplasmático de E2 podría iniciar el proceso final de gemación que lleva a la liberación de los viriones hijos, (*Schlesinger and Schlesinger, 2001*).

### 1.3. Familia Herpesviridae

#### 1.3.1. Principales miembros de la familia

La familia Herpesviridae está constituida por un numeroso grupo de virus muy difundidos en el reino animal, de los cuales al menos 8 han sido aislados de humanos: *Herpes simplex tipo 1* (VHS-1), *Herpes simplex tipo 2* (VHS-2), *Citomegalovirus* (CMV), *Varicela-Zoster* (VZV), *Epstein-Barr*, y los *Herpesvirus tipo 6, 7 y 8*. También, al menos 5 especies de herpesvirus fueron aislados de equinos, por lo menos 4 de bovinos, 3 de aves y 2 de cerdos: virus *Herpes suis* (o virus de la *Pseudorabia* o *Aujeszky*) y *Citomegalovirus porcino*.

#### 1.3.2. Características generales

Todos los miembros que integran esta familia son capaces de inducir un estado biológico en el huésped por el cual, posterior a la infección, se establece una latencia del virus en el organismo del huésped infectado por el resto de su vida. En muchas ocasiones, el virus puede reactivarse generando infecciones recurrentes en el sitio de la primo infección o en su entorno cercano y por períodos variables.

Las propiedades de la partícula viral son comunes a todos los miembros de la familia. Presenta un diámetro total de 180 a 200 nanómetros (nm). Está formada por cuatro componentes estructurales que son, de adentro hacia fuera:



- Un “core” que se presenta como un carrete fibrilar alrededor del cual está enrollado el ADN de doble cadena, capaz de codificar alrededor de 100 proteínas, (Kluge *et al.*, 1992).
- Una cápside icosaédrica de naturaleza proteica, con un diámetro aproximado de 100 a 110 nm.
- Una estructura amorfa designada tegumento y constituida por material globular proteico.
- Una envoltura compuesta por una bicapa lipídica que presenta a modo de espículas las glicoproteínas virales. Algunas de estas proteínas glicosiladas son esenciales para que el virus pueda infectar la célula huésped y llevar a cabo su replicación, (De Cristófano *et al.*, 1996). La naturaleza lipídica de esta cubierta lo hace sensible a disolventes orgánicos tales como éter, cloroformo y detergentes.

Los viriones son relativamente estables a 4°C en un pH 5 a 9. A temperaturas de -70°C se conservan durante meses, pero a -20°C se inactivan rápidamente, (Farnham y Newton, 1959).

### 1.3.3. Replicación viral de los miembros de la familia Herpesviridae

El ciclo de multiplicación viral puede ser dividido en varias etapas:

- **Adsorción:** para iniciar la infección el virus debe reconocer y unirse a los receptores presentes en la superficie celular. Se ha demostrado que el heparán sulfato es el principal receptor celular para diferentes herpesvirus de humanos y animales, en los que se incluye los virus *Herpes suis*, VHS-1 y VHS-2, (Wudunn y Spear, 1989; Mettenleiter *et al.*, 1990). La tasa de adsorción no está condicionada a la temperatura pero sí a la concentración relativa de virus y células, (Farnham, 1958).
- **Penetración y desnudamiento:** luego de la adsorción a los receptores del huésped a través de las glicoproteínas de envoltura, la nucleocápside penetra al citoplasma celular por endocitosis o bien por un proceso de fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática. La penetración, a diferencia de la adsorción, es un proceso dependiente de la temperatura, lo que manifiesta que el mecanismo es enzimático, (Farnham y Newton, 1959). Como consecuencia de la penetración, la nucleocápside es transportada posteriormente hasta el núcleo donde es liberado el ADN, que inmediatamente se circulariza gracias a la presencia de los extremos repetidos invertidos



que posee. El citoesqueleto probablemente participe del transporte de la nucleocápside hasta el núcleo, (Kristensson *et al.*, 1986).

➤ **Biosíntesis de macromoléculas:** a partir del ADN viral se transcriben, por la ARN polimerasa II celular, al menos 3 ARN mensajeros (ARNm):  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de manera coordinada y ordenada secuencialmente en cascada. Las proteínas traducidas a partir de los ARNm $\alpha$  (tempranos inmediatos) y de los ARNm $\beta$  (tempranos retardados) cumplen roles regulatorios y otras actúan como enzimas involucradas en la replicación del genoma viral. En cambio, las proteínas traducidas a partir de los ARNm $\gamma$  (tardíos) son proteínas estructurales sintetizadas luego de la replicación del genoma viral. La replicación del ADN viral se realiza siguiendo el modelo del círculo rodante, participando en el proceso, además de las proteínas virales anteriormente mencionadas, proteínas de la célula huésped. En células infectadas con *Herpes simplex*, se detecta síntesis de ADN a las 3 h post-infección y continúa por otras 12 h más, (Roizman *et al.*, 1963).

➤ **Armado y maduración:** el ADN se incorpora a la cápside preformada y la nucleocápside resultante se asocia con áreas alteradas de la membrana interna nuclear, modificadas por la inserción de glicoproteínas virales.

➤ **Liberación:** los viriones ya envueltos, acumulados en el espacio perinuclear atraviesan el citoplasma y migran al espacio extracelular, por exocitosis o por disrupción de la membrana plasmática, (Berría, 1998).

Todo el ciclo de multiplicación demanda aproximadamente entre 18 y 24 y hasta 72 horas dependiendo del virus.

#### 1.3.4. Nomenclatura y clasificación

Los miembros de la familia *Herpesviridae* han sido clasificados por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus, sobre la base de sus propiedades biológicas, en tres subfamilias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gamaherpesvirinae*.

Sólo se mencionarán aquí las características biológicas más importantes y comunes a los miembros de la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, en virtud que el herpesvirus utilizado para este trabajo de tesis fue el *Herpes suis tipo 1*, cepa RC/79. Esta cepa viral ha sido adecuadamente caracterizada en sus aspectos biológicos, físico-químicos y moleculares en nuestro laboratorio, (Sabini *et al.*, 1996; 2000).

Los miembros pertenecientes a esta subfamilia realizan ciclos replicativos cortos, de menos de 24 horas. Su crecimiento y diseminación en cultivos celulares son rápidos.





Producen destrucción eficiente en las células infectadas. Y realizan latencia en las neuronas del ganglio que inerva el área donde se produjo la lesión primaria, (Roizman y Sears, 1991).

Además del virus *Herpes suis*, pertenecen a esta subfamilia VHS-1, VHS-2, el virus *Varicela-Zoster*, entre otros.

### 1.3.5. Patogenia de algunos virus *Herpes*

Los virus *Herpes simplex tipo 1 y 2* están asociados frecuentemente a infecciones mucocutáneas faciales, oftálmicas o genitales y con menor frecuencia producen daño encefálico, hepático, entre otros e incluso infecciones generalizadas. El virus puede reactivarse periódicamente y causar lesiones autolimitantes en la región inervada, pero en los pacientes inmunocomprometidos la recurrencia origina problemas graves, (De Cristóforo et al., 1996; Berría, 1998).

Si bien el hombre es el único huésped natural de *Herpes simplex*, también son sensibles al virus ratones, cobayos, hámster, conejos, los que son utilizados para estudios *in vivo*.

### 1.3.6. Virus herpes de impacto sanitario a nivel veterinario

El virus *Herpes suis tipo 1* o virus *Aujeszky* es el agente causal de la enfermedad de Aujeszky (EA), también conocida como *pseudorrabia* por su similitud con la rabia canina. El virus *Herpes suis* afecta a la mayoría de los mamíferos y varias especies de aves en las que produce alteraciones en el sistema nervioso central, siendo el prurito uno de los síntomas más comunes en la zona de infección primaria. Este importante patógeno de cerdos tiene fuerte predilección por las células del sistema nervioso y, dependiendo de la cepa, por el tejido del sistema respiratorio, por lo que los principales signos clínicos están asociados con la disfunción de esos dos sistemas de órganos. La infección en los porcinos genera un cuadro clínico que varía dependiendo de la edad del animal, la virulencia del virus y la ruta de infección.

Los cerdos infectados recién nacidos sufren postración y mueren rápidamente, a menudo sin síntomas nerviosos. En lechones de más edad, acontecen severos desórdenes del sistema nervioso central caracterizado por incoordinación, espasmos, pataleos, temblores, ataxia, convulsiones y/o parálisis, mientras que el prurito raramente está presente. La mortalidad en los lechones de 2-3 semanas de vida alcanza hasta un



100%, resultando en severas pérdidas económicas. Los cerdos de 3-6 semanas de edad pueden exhibir signos neurológicos y alta morbilidad, pero la mortalidad usualmente está reducida.

La adquisición del virus por parte de cerdas preñadas puede causar abortos, momificaciones y nacimientos de fetos muertos, debido a una endometriosis y necrosis placentaria con infección de los trofoblastos, (*Baskerville et al., 1973; Kluge y Maré, 1974; Bolin et al., 1985; Ceriatti et al., 1992*). La patología por el virus *H. suis* causa importantes pérdidas económicas en el ganado porcino por lo que resulta de interés en virología veterinaria, (*De Cristóforo et al., 1996; Sabini, 1996*).

#### **1.4. Las plantas como fuente de sustancias antivirales**

Los ecosistemas áridos y semiáridos han concitado siempre particular atención desde el punto de vista antropológico, sobre todo en relación con las especies vegetales que se utilizan en el campo de la medicina popular. Esto ha llevado a crear, en torno a la flora de estas regiones, una rica tradición basada en el empirismo. La región fitogeográfica del Monte, incluida dentro de los ecosistemas semiáridos, se caracteriza por poseer numerosas especies de plantas y hierbas con tradición folclórica medicinal, y dentro de estas especies se destaca *Achyrocline satureioides*, planta seleccionada para realizar este trabajo de investigación.

Numerosas investigaciones han demostrado que una variedad de hierbas étnicas exhiben efectos antivirales en diferentes pasos de la replicación, así como acción virucida. Estos datos sugieren que los derivados herbáceos podrían desnaturalizar o inactivar directamente proteínas virales e incluso interferir en la adherencia del virus a la célula. Otros datos indican también que podrían interferir en el ciclo replicativo del patógeno reduciendo la síntesis del ácido nucleico viral, (*Vanden Berghe et al., 1986; Montanha et al., 1995; Cowan, 1999; Kurokawa et al., 1999*).

#### **1.5. Especie *Achyrocline satureioides***

##### **1.5.1. Características generales**

Esta planta vulgarmente conocida como “marcela del campo” es un subarbusto muy aromático que pertenece a la familia Asteraceae (o Compositae) (**Figura 1**). Se caracteriza por presentar una altura cercana a los 80 cm, tallo erecto cubierto por una pilosidad corta y lanosa de color blanquecino; hojas oblongas o lanceoladas, alternas,



sésiles y densamente tomentosas en el envés; numerosos capítulos florales cilíndricos, dispuestos en glomérulos terminales de coloración grisácea, con tres o cuatro flores pistiladas marginales y una o dos centrales. El fruto es un aquenio provisto de un papus blanco o vilano. La floración ocurre al final del verano, (Alonso, 2004).

Esta especie es originaria de América y se distribuye en todo el continente. También crece en Europa y África. En nuestro país se la encuentra con mayor frecuencia en suelos arenosos y húmedos de las sierras de Córdoba, San Luis y Tandil, (INIA, 2004).



**Figura 1:** Aspectos macroscópicos de plantas de *Achyrocline satureioides* colectadas a campo

### 1.5.2. Usos populares

La “marcela del campo” fue una planta muy empleada por los indígenas sudamericanos (en especial los *Kaingang* de Río Grande do Sul), quienes la utilizaron como tisana digestiva, antiinflamatoria, emenagoga y antiséptica. La planta entera macerada en agua fría era utilizada por los indígenas Tobas como adelgazante. La denominación *Achyrocline* deriva del griego *Achyros*=broza, relleno y *Kline*=cama, en alusión al receptáculo más o menos fimbriado. El término *satureioides* significa similar a la *Satureja* (género de la familia Labiatae), (Martínez Crovetto, 1981; Alonso, 2004).



Es tradición uruguaya y brasilera que esta planta deba ser cosechada en viernes santo para lograr sus máximos beneficios medicinales. D'Avila en 1910 fue quien dio las primeras referencias terapéuticas probadas con pacientes, atribuyéndole a la “marcela” propiedades antigástricas. El farmacéutico Rodolpho Albino Dias da Silva, en 1926, describe en la 1ª Ed. de la Farmacopea Brasileira su empleo medicinal como especie amarga, (Alonso, 2004).

### 1.5.3. Propiedades fitomedicinales

Para la especie se han documentado propiedades bioactivas por numerosas investigaciones tales como: antiinflamatoria (De Souza et al., 2007), sedativa (Hnatyszyn et al., 2004), hepatoprotectora (Kadarian et al., 2002), antioxidante (Arredondo et al., 2004; Polydoro et al., 2004), inmunomoduladora y antimicrobiana (Calvo et al., 2006), antitumoral (Ruffa et al., 2002), antiviral (Zanon et al., 1999; Bettega et al., 2004) y fotoprotectivo (Morquio et al., 2005). Es tradicionalmente utilizada como antiespasmódica en caso de infecciones intestinales (por sus propiedades antibióticas) y en diversos trastornos digestivos. También se aconseja para diabéticos, actuando en el control de glicogénesis. Externamente se utiliza como antiinflamatoria y antiséptica, y su uso está también registrado en cuadros de asma bronquítica y en lavajes ginecológicos, (Cañigüeral et al., 1998; INIA, 2004).

Últimamente se ha popularizado su uso para el control de enfermedades cardiovasculares ya que se cita como reductora del colesterol. En Argentina, además de su uso terapéutico, esta especie es utilizada como ingrediente de aperitivos, (Filot da Silva y Langeloh, 1994; INIA, 2004; [www.rain-tree.com](http://www.rain-tree.com); Taylor, 2005).

### 1.5.4. Constituyentes químicos de *Achyrocline satureioides*

En la inflorescencia se ha demostrado la presencia de polifenoles como ácido cafeico (Ferraro et al., 1981; Petrovick y Knorst, 1991), flavonoides como luteolina, quercetina, escoparol (Petrovick y Knorst, 1991), 5,8-dihidroxi-3,7 dimetoxiflavona, y de cumarina escoparona, (Senna et al., 1997). Por otra parte, la esencia (0,24-0,84%) estaría compuesta principalmente por  $\alpha$ -pineno, y en menor proporción por  $\beta$ -pineno, limoneno, cis- $\beta$ -ocimeno, trans- $\beta$ -ocimeno, oxicariofileno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, (E)-cariofileno y  $\alpha$ -copaeno, (Lamaty et al., 1991; Labuckas et al., 1999; Lorenzo et al., 2000).





## Introducción

Las hojas contienen polisacáridos, entre ellos ramnogalacturanos (*Puhlmann et al., 1992*); lactosas 6-O-dimetil-23-metil auricepirona, italdipirona, 6-O-dimetil-23-metil auricepirona y 6-(4'-hidroxi) trans-S- $\alpha$ -pirona (*Schmeda Hirschmann y Silva, 1982; Kaloga et al., 1983*). La esencia estaría compuesta por  $\delta$ -cadineno,  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno, germacreno D (*Lamaty et al., 1991*). Para *A. satureioides* var. *albicans* se menciona también la presencia de alnustina, 3,5,7,8-tetrametoxiflavona y 5,7,8-trimetoxiflavona, (*Mesquita et al., 1986*).

Otros estudios realizados con partes aéreas han determinado la existencia de polifenoles: cafeoil callerianina, protocaquil callerianina, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico (*Ferraro et al., 1981; Broussalis et al., 1989*), de flavonoides 3,7 dimetoxiquercetina, quercetagetina (*Broussalis et al., 1989*), caryatina (*Broussalis et al., 1988*), galangina, galangín-3-metil éter, isognafalina (5,8-dihidroxi-3,7-dimetilflavona), gnafalina, 4-metoxi-quercetagetina, quercetina-3 metil éter, quercetina-3 metil éter 7 diglucósido, tamarixetina, tamarixetina-7-glucósido (*Ferraro et al., 1981; Broussalis et al., 1988; Senna et al., 1997*), 3-O-metil quercetina (*De Souza et al., 2002*); lactonas 6-O-dimetil-23-metil auriceoirona, italdipirona, 6-O- dimetil-23 auricepirona, 6-(4'-hidroxi )-trans-S-pirona (*Kaloga et al., 1983*).

## 1.6. Antivirales

### 1.6.1. Problemática de las terapias antivirales

Las enfermedades virales pueden ser enfrentadas mediante diversas estrategias terapéuticas tales como quimioterapia antiviral, interferones (proteínas de la familia de las citoquinas producidas por el huésped que inhiben la replicación viral), vacunas virales (a virus inactivado, virus atenuado, subunidades, recombinantes).

A diferencia de la evolución en otras áreas, la quimioterapia antiviral ha evolucionado muy lentamente. Sin embargo, existe actualmente una intensa búsqueda de agentes antivirales acorde con la creciente demanda de un tratamiento efectivo de las infecciones causadas por virus.

Los primeros antivirales experimentales se desarrollaron en la década de los 60 y recién a mediados de la década de los 80, entró en auge el desarrollo de estas sustancias.

El desarrollo de sustancias antivirales no resulta una tarea fácil de realizar debido a la característica de parásito obligado intracelular que presentan los virus y a que su



ciclo de replicación está íntimamente relacionado con las funciones de la célula hospedadora, por lo que ofrecen entonces menos blancos vulnerables que le sean propios y que permitan un ataque selectivo, (*De Clercq, 1979; Damonte, 1996*). No obstante, estudios de virología molecular han logrado identificar funciones específicas de los virus que pueden servir como sitio blanco de acción y por lo tanto para la confección de fármacos antivirales, siendo algunos de estos sitios la entrada del virus a la célula huésped, (*Saettone, 2003*).

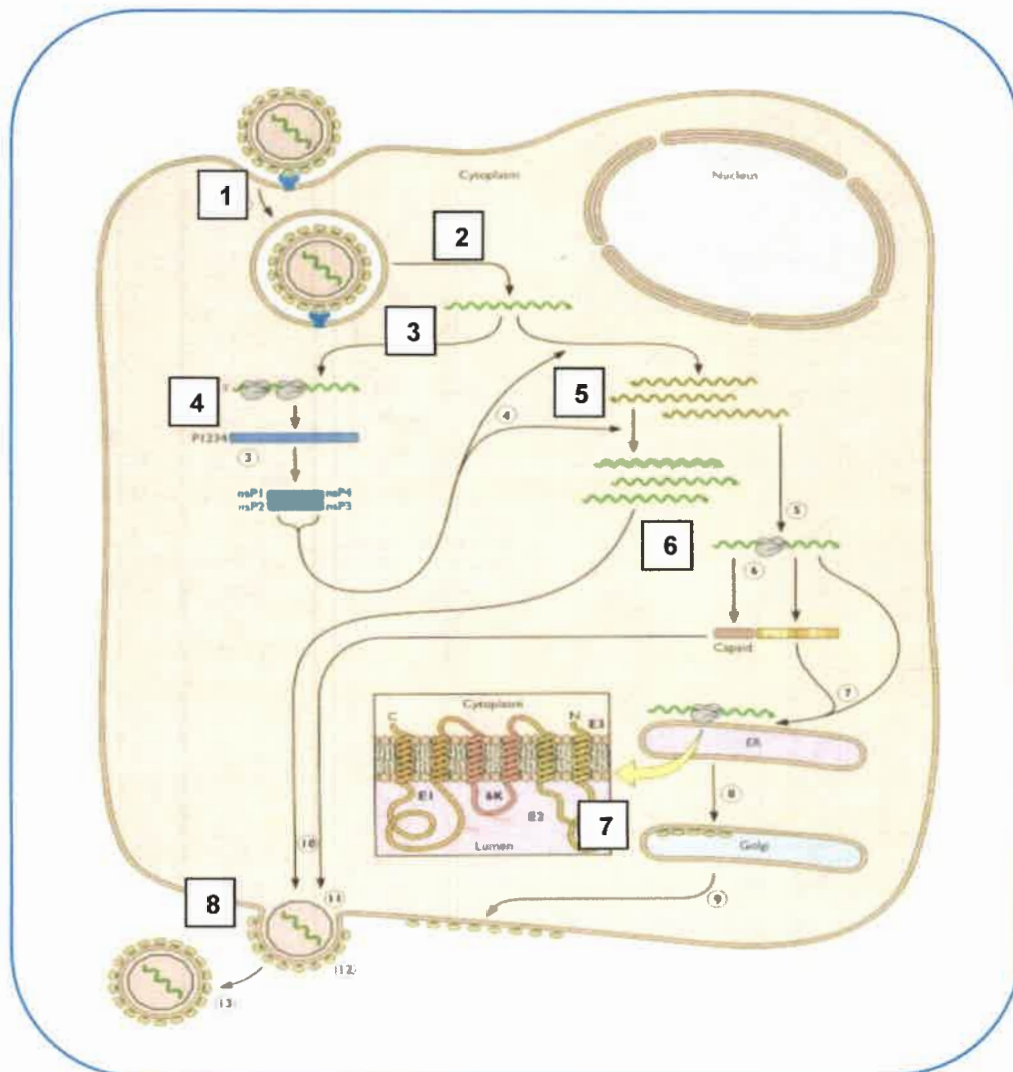
Los tratamientos antivirales deben bloquear la adherencia y penetración de los virus dentro de la célula huésped, impedir su liberación o actuar dentro de la célula infectada, (*Safrin, 2001*).

Sin embargo, existen también algunas limitaciones generales inherentes a la quimioterapia antiviral. En primer lugar, cuanto más selectiva es una droga más reducido es su espectro de acción. Dado que las drogas antivirales afectan etapas de la replicación viral, la fase latente característica de algunos virus está fuera del alcance de la quimioterapia, por lo que la erradicación de las infecciones latentes no es factible. La quimioterapia debe iniciarse tempranamente antes de que ocurran daños irreversibles, ello no es posible sin un diagnóstico rápido y preciso, lo cual es difícil para muchas infecciones virales. Además, el riesgo de aparición de mutantes resistentes es inevitable. Por otra parte, el costo de estos medicamentos limitan su adquisición por gran parte de la población, (*Andrei y De Clercq, 1996*).

Por todo lo expuesto, se considera de suma importancia investigar en el área dedicada al desarrollo de nuevas terapias antivirales a partir de productos naturales.

### **1.6.2. Sitio de acción de los antivirales**

Las etapas más susceptibles de la replicación de los virus son: 1) adhesión del virus a la célula huésped; 2) pérdida de la cubierta del genoma viral; 3) transcripción temprana de determinados genes virales; regulación de la transcripción viral; 4) traducción de proteínas virales tempranas; 5) replicación del ácido nucleico viral; 6) transcripción de genes tardíos y traducción de proteínas virales tardías; 7) maduración de proteínas estructurales y armado viral; 8) liberación de las partículas virales de la progenie (**Figura 2**).



**Figura 2.** Etapas del ciclo de replicación de un virus, como posibles blancos de ataque con drogas antivirales

En términos generales, y de acuerdo con este criterio, los antivirales pueden ser clasificados en aquellos que:

- **Impiden la adsorción** (Interferón y Polisacáridos sulfatados)
- **Inhiben la penetración** (Interferón, Amantadina, Rimantadina)
- **Inhiben el desnudamiento** (Amantadina, Arildone)
- **Inhiben la transcripción del genoma viral:** Este grupo a su vez se subdivide en:



1. **Inhiben la ADN polimerasa viral:** Aciclovir, Fanciclovir, Ganciclovir, Foscarnet
  2. **Inhiben la ARN polimerasa viral:** Ribavirina
  3. **Inhiben transcriptasa reversa:** Didanosina, Zidovudina, Estavudina
- **Inhiben la traducción del ARNm viral** (Interferón)
  - **Inhiben el ensamblaje y liberación viral** (Interferón)
  - **Inhiben la maduración y la liberación de la progenie:** Saquinavir, Ritonavir, Indinavir.

Además, los compuestos antivirales pueden ser divididos en dos grandes categorías: aquellos que pueden actuar directamente con sus blancos de acción y aquellos que deben ser primero activados intracelularmente por medio de la fosforilación a las formas activas, (*Andrei y De Clercq, 1996*).

### 1.7. Evaluación de la seguridad de los medicamentos a base de hierbas

Existe un aumento importante del interés público por las plantas medicinales y los medicamentos derivados de ellas, sin embargo hasta la actualidad pocos medicamentos a base de hierbas han sido evaluados científicamente para probar su seguridad, eficacia y posibles beneficios, (*Calixto et al., 2000*). Sólo un conjunto de plantas medicinales más utilizadas están avaladas por estudios rigurosos. La mayoría de la información que llega a los consumidores provenientes de vendedores o de folletos y libros presenta escaso contenido científico, (*www.economiadelasalud.com*). Es falso considerar que los medicamentos herbarios son seguros y libres de efectos secundarios por el solo hecho de ser naturales. Las plantas tienen cientos de componentes y algunos de ellos son muy tóxicos.

La evaluación de la inocuidad debe abarcar todos los aspectos pertinentes de un producto medicinal. Aunque el uso tradicional prolongado puede indicar que un medicamento es inocuo, no siempre resulta claro cuán confiable es como para garantizar su seguridad.

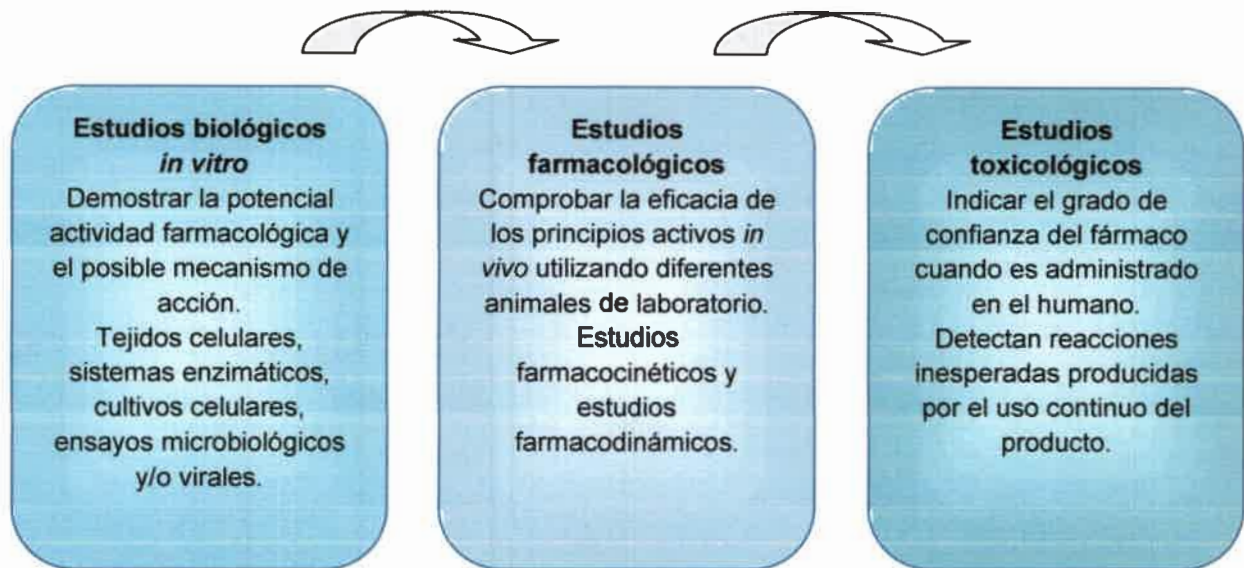
En el desarrollo de un nuevo fármaco se deben considerar dos etapas de estudio:

- 1) Ensayos biológicos pre-clínicos y 2) Desarrollo clínico (**Figura 3**).

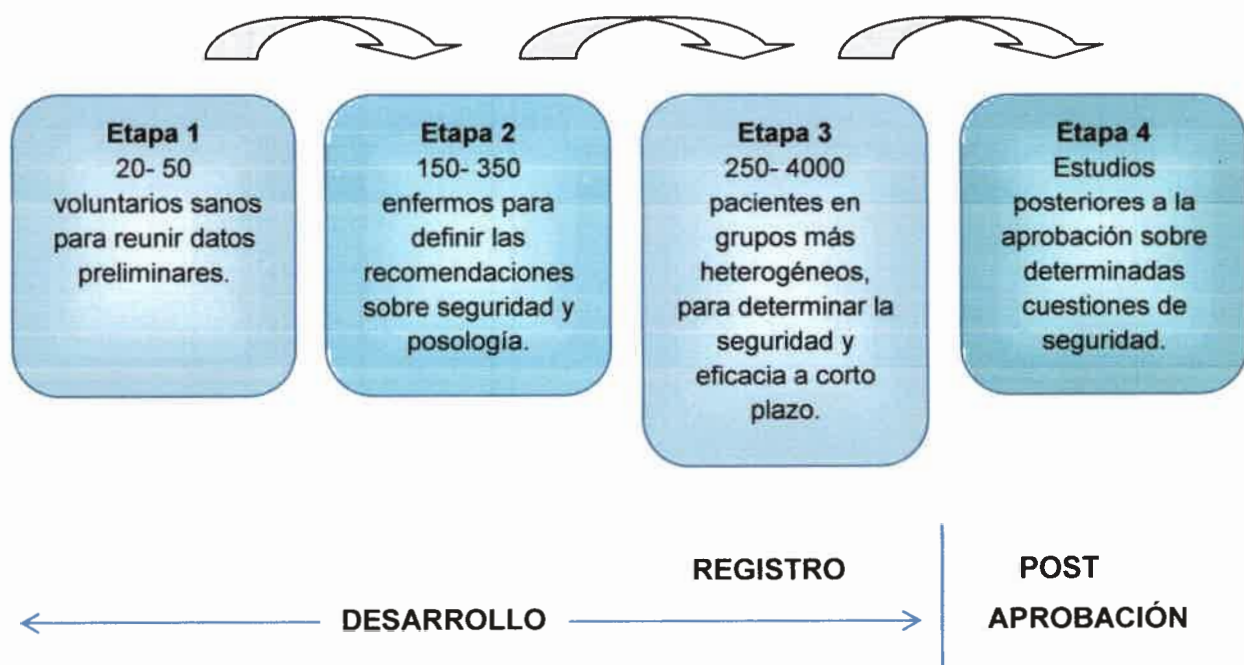




### 1- Ensayos biológicos pre-clínicos



### 2- Desarrollo clínico



**Figura 3.** Etapas de estudio para el desarrollo de un nuevo fármaco. Basado en La farmacovigilancia: garantía de seguridad en el uso de los medicamentos. Perspectivas políticas de la OMS sobre medicamentos. Octubre de 2004. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.



### 1.7.1. Estudios citotóxicos

Todo estudio que pretenda analizar la capacidad antiviral de un determinado producto requiere previamente del análisis de su capacidad tóxica sobre sistemas vivos debido a la característica de parásito obligado intracelular que presentan los virus. Más importante aún, la determinación de la capacidad tóxica de un producto está relacionada íntimamente con la posibilidad de su aplicación para frenar la multiplicación del virus sin dañar al huésped.

Los modelos animales han jugado siempre un rol importante en la evaluación de la capacidad tóxica de un producto. Sin embargo, el empleo de los sistemas celulares en monocapas es una herramienta muy útil para evaluar el potencial daño tóxico ejercido, entre otras sustancias, por productos naturales, particularmente apoyado por aspectos financieros en virtud de que las pruebas "*in vitro*" ofrecen ventajas económicas respecto de las pruebas *in vivo*. Existe también una fuerte limitación del uso de modelos animales en relación al metabolismo humano, en consideración al avance de la biología molecular que ha permitido identificar un número cada vez mayor de diferencias metabólicas entre las especies. Finalmente hay una fuerte presión moral para reducir la experimentación con animales.

Todo lo expuesto justifica la utilización de los cultivos celulares para la evaluación inicial de la capacidad tóxica de un producto. El empleo de la línea celular Vero se fundamenta en el hecho de que la misma deriva de células de mono y dicha especie está filogenéticamente relacionada con el humano por lo que los resultados obtenidos son válidos y útiles en la futura aplicación de las sustancias analizadas como potenciales antivirales naturales.

Existen muchos blancos celulares para el daño, pero generalmente, estos mecanismos convergen y producen una respuesta celular común, la muerte celular. Ésta seguirá mecanismos similares independientemente de que la causa del daño sea de naturaleza química, física o biológica. La línea celular Vero en particular, se adapta fácilmente a las condiciones de cultivo, lo que es útil a la hora de llevar a cabo una investigación de citotoxicidad y también con virus.

Hay una gran variedad de ensayos dirigidos a determinar la toxicidad de un compuesto en particular. Entre ellos se destacan técnicas inmunológicas tales como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) que permiten determinar la integridad del citoesqueleto. De igual forma, el ensayo de determinación de pérdida de la enzima



citoplasmática lactato dehidrogenasa (LDH), la visualización del daño morfológico celular, la cuantificación de proteínas, la técnica de captación del rojo neutro y la de reducción de MTT son algunos de los métodos apropiados para cumplir este propósito, (Fotakis y Timbrell, 2006).

### 1.7.2. Estudios toxicológicos

Los estudios de toxicidad constituyen una parte muy importante dentro del desarrollo de un nuevo fármaco. Podría definirse la toxicidad como “*el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos deletéreos ocasionados por agentes físicos o químicos sobre la estructura y función de los sistemas vivos, y la aplicación de estos estudios para la evaluación de la seguridad y la prevención de daños al hombre y a las formas de vida útiles*”.

Una de las vías para evaluar la posible toxicidad o efectos adversos de un fármaco es la experimentación con animales. Para lograr este objetivo se suelen llevar a cabo los ensayos de: toxicidad aguda, toxicidad subaguda, toxicidad subcrónica, toxicocinética, toxicidad crónica, carcinogénesis, teratogenia y fertilidad, toxicidad peri y post natal, y mutagénesis, ([www.iqb.es/cbasicas/farma/farma05/tox/tox01.htm](http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma05/tox/tox01.htm)).

En la actualidad, se están aplicando técnicas “alternativas a la experimentación animal”. Se consideran bajo este concepto todos aquellos métodos que cumplen con alguno de los postulados del principio de las tres R, que se refieren a Reemplazar los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, Reducir su número cuando sea necesario utilizarlos y Refinar las técnicas para aminorar su sufrimiento. Dentro de la batería de ensayos *in vitro* como métodos de toxicología alternativa útiles se encuentran los ensayos de citotoxicidad capaces de detectar, mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos, se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo (síntesis y degradación), liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular. La citotoxicidad celular se define como “*una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a la producción de un daño que pueda ser detectado*”, (Arencibia Arrebola et al., 2009).



### 1.7.3. Estudios de citogenotoxicidad

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético de una célula, afectando su integridad y originando efectos biológicos adversos. El concepto de genotoxicidad es un término amplio que hace referencia a cualquier tipo de daño causado sobre el material genético. El daño inducido incluye al ADN y a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula, tales como las proteínas que intervienen en la reparación, condensación y descondensación del ADN en los cromosomas, u otras estructuras como el huso mitótico, responsable de la distribución de los cromosomas durante la división celular, (Guzmán Cano, 2008).

Los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética, llamados genotóxicos, pueden clasificarse de acuerdo a sus efectos en: mutágenos (causantes de mutación), carcinógenos (causantes de cáncer) o teratógenos (agentes que causan defectos de nacimiento).

#### 1.7.3.a. Tipos de daño genético

Los daños genéticos se pueden clasificar en:

- Mutaciones génicas: cambio de uno o pocos pares de bases.
- Aberraciones cromosómicas estructurales: cambios groseros en la estructura.
- Aberraciones cromosómicas numéricas: aneuploidías y poliploidías por alteraciones en los componentes del aparato mitótico.
- Alteraciones del ADN: formación de puentes, alquilación de bases, intercalamiento de bases, (Rani et al., 2005).

### 1.7.4. Procedimientos para la evaluación de genotoxicidad

Las autoridades regulatorias de todo el mundo requieren información sobre el potencial genotóxico de nuevas drogas, como parte del proceso de evaluación de seguridad. El posible rol de las sustancias químicas en la inducción de cambios genéticos asociados a defectos hereditarios y procesos cancerígenos en humanos ha llevado al desarrollo de un amplio número de ensayos para valorar el potencial genotóxico. En este sentido, los ensayos de genotoxicidad son ensayos *in vitro* e *in vivo* diseñados para detectar agentes que inducen daño genético de forma directa o indirecta, mediante





diversos mecanismos. Los resultados obtenidos deben permitir valorar el potencial genotóxico del fármaco y el posible riesgo de daño genotóxico ante una eventual exposición en humanos, (Guzmán Cano, 2008).

Algunas de las pruebas utilizadas para detectar el daño genético son el cariotipo, el estudio del índice mitótico, el intercambio de cromátides hermanas, el ensayo de la cometa, el estudio de la inducción de apoptosis, la prueba de Ames, el test de *Allium cepa* L y el ensayo de micronúcleos.

En la búsqueda de sistemas adecuados para estudios a corto plazo, las plantas han mostrado ser valiosas en la investigación básica. Las razones para usar sistemas vegetales son muchas: son fáciles de cultivar y manipular, tienen frecuentemente buenas condiciones cromosómicas, bajo costo y, lo más importante, buena correlación con otros sistemas de test. En las plantas superiores los meristemas proliferan siguiendo una cinética en equilibrio dinámico, lo que puede evaluarse a través de una serie de indicadores tales como: la velocidad de crecimiento, la población de células en división celular, la duración del ciclo celular, el índice mitótico y la frecuencia de células en los diferentes estados morfológicos.

#### **1.7.4.a. Test de *Allium cepa* L**

Los meristemas de Liliáceas, como la cebolla, son frecuentemente utilizados para estudios de la dinámica celular porque constituyen un sistema *in vivo* ideal, (Giménez-Martin *et al.*, 1977); así como para estudiar los mecanismos regulatorios que afecten el ciclo celular, (Rosth, 1977). La cebolla (*Allium cepa*) contiene células meristemáticas bastante homogéneas que poseen sólo 16 cromosomas, los cuales son muy largos, bien visibles y fáciles de teñir. Además posee un ciclo de división de 48 h, lo que permite visualizar a corto plazo alteraciones en el proceso de mitosis.

Actualmente, se conoce al ensayo como "*Allium test*" y se utiliza para determinar los efectos de diferentes xenobióticos o principios activos obtenidos de plantas y animales. Es un método rápido y económico, que permite la investigación de los mecanismos universales para las células meristemáticas de plantas y la extrapolación sobre células animales, (Kuras *et al.*, 2006), ya que brinda resultados similares a otros de citotoxicidad *in vitro* en células animales, (Chauhan *et al.*, 1999; Vicentini *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2003).



El ensayo de aberraciones cromosómicas en raíces de *Allium* es un bioensayo en plantas validado por el Programa Internacional sobre Seguridad Química y por el Programa de Medioambiente de las Naciones Unidas como un test estándar y eficiente para el *screening* y el monitoreo *in situ* de sustancias para evaluar genotoxicidad medioambiental, (Cabrera y Rodríguez, 1999).

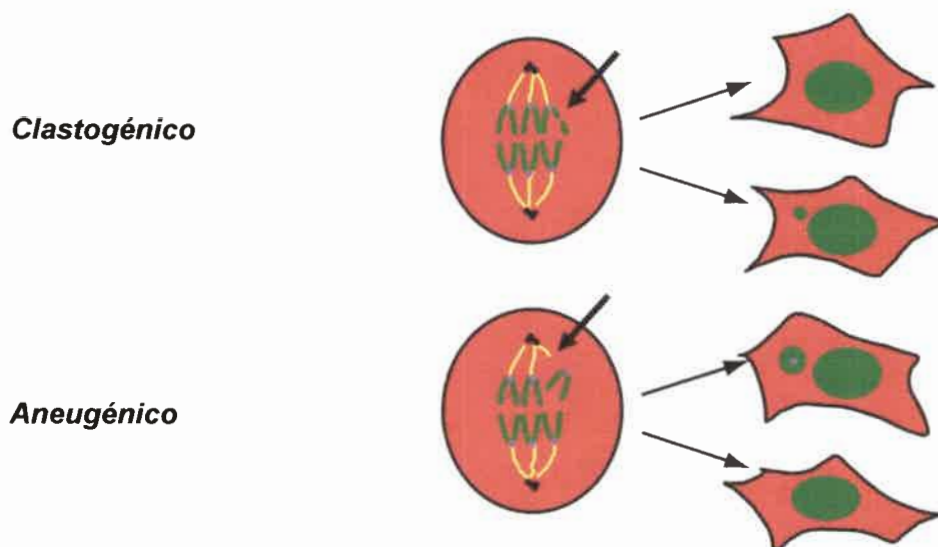
#### **Principio del test**

Este ensayo permite determinar aberraciones cromosómicas a través de sus parámetros citogenéticos, y toxicidad general a través de los parámetros macroscópicos. Cuando un bulbo se hidrata, se produce una estimulación del crecimiento de las células permitiendo la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz y, por lo tanto, su elongación, (Fiskesjö, 1985, 1993, 1997).

#### **1.7.4.b. Test de Micronúcleos en médula ósea de ratón**

La prueba *in vivo* de micronúcleos en roedores es ampliamente utilizada para evaluar el potencial clastogénico (roturas cromosómicas) y, posiblemente, el potencial aneugénico (pérdida de cromosomas por interacción con el uso mitótico) de productos químicos. Se emplea para detectar las sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas que dan lugar a la formación de micronúcleos (MN) mediante el análisis de eritrocitos tomados de la médula ósea (Figura 4).

La prueba de micronúcleos fue desarrollada por Schmid, (1975), quien originalmente la propuso para practicarse en la médula ósea del ratón; posteriormente, la técnica se ha instrumentado en una gran variedad de tejidos y especies, y en la actualidad se la utiliza ampliamente.



**Figura 4.** Modelo de inducción de micronúcleos mediante agentes clastogénicos y aneugénicos. Los micronúcleos inducidos por sustancias aneugénicas poseen centrómeros y son más grandes que los inducidos por agentes clastogénicos, (Hayashi M., 2007)

### **Principio del test**

Los micronúcleos son conocidos en el campo de la hematología como cuerpos de Howell-Jolly y presentan generalmente forma redondeada o almendrada, con un diámetro que varía entre 0,4 y 1,6 micras. En la anafase, cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase, tanto los cromosomas normales como los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas. Sin embargo, los elementos rezagados, que pueden ser fragmentos o cromosomas completos, quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas, y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios. Tales núcleos son mucho más pequeños que el núcleo principal, de ahí su nombre de “micronúcleos”. Si el compuesto estudiado es un clastógeno, se formarán micronúcleos pequeños; por el contrario si es un aneuploidógeno, se originarán micronúcleos grandes.

La técnica de evaluación de MN presenta ventajas tales como facilidad y rapidez, posibilidad de probar un compuesto químico en particular, abundancia de células analizables en diferentes periodos del ciclo celular y persistencia de los micronúcleos



formados durante la división celular, al menos durante la siguiente interfase, (Zúñiga González y Gómez Meda, 2006).

### 1.8. Planteamiento del problema

Numerosas infecciones de etiología viral tales como las producidas por los virus WEE y *Herpes suis tipo 1*, han sido caracterizadas como enfermedades emergentes lo cual ha conducido la investigación hacia la búsqueda de nuevos productos capaces de inhibir la sobrevivencia de estos microorganismos. Dentro de este campo, ha cobrado mayor relevancia el estudio de fracciones derivadas de plantas aromáticas con el propósito de reemplazar o complementar el uso de los escasos antivirales disponibles.

Si bien es reconocida la aplicación industrial de la especie aromática *Achyrocline satureioides* en el campo de la industria licorera y su empleo a nivel popular para controlar ciertas afecciones, científicamente a nivel antimicrobiano sólo se ha demostrado su capacidad para inhibir *in vitro* ciertas bacterias Gram positivas de impacto sanitario. Resta evaluar su potencial antiviral y su capacidad citogenotóxica frente a células eucariota que permitan inferir su aplicabilidad como fitofármaco y validar su potencial etnobotánico.

El retorno progresivo al uso de productos de origen natural ha sido estimulado por factores que juegan un papel relevante tales como, el descubrimiento de efectos adversos en fármacos de uso convencional y rutinario, el mejor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales y sus derivados, el desarrollo de nuevos métodos analíticos puestos a disposición del control de calidad y el desarrollo de nuevas formas de preparación y administración.

### 1.9. Hipótesis

Extractos y/o fracciones de la especie *Achyrocline satureioides* presentan bioactividad aplicable para combatir afecciones de etiología viral de interés médico-veterinario a concentraciones no citogenotóxicas.

*OBJETIVOS*



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

Determinar en extractos vegetales de diferente polaridad y de sus fracciones obtenidos a partir de la especie *Achyrocline satureioides*, actividad antiviral *in vitro* frente a virus ADN (*Herpes suis tipo 1*) y ARN (*Encefalitis Equina del Oeste*) a concentraciones no citogenotóxicas, e investigar su posible blanco de acción en los ciclos de replicación viral.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Obtener extractos con solventes de diferente polaridad a partir de individuos de la especie *Achyrocline satureioides*.
2. Estudiar la citotoxicidad *in vitro* de los extractos.
  - 2.1. Por determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC).
  - 2.2. Por análisis de actividad lisosomal: Captación del Rojo Neutro.
  - 2.3. Por detección de actividad mitocondrial: técnica de MTT.
  - 2.4. Por exclusión a la tinción con Azul Tripán.
3. Evaluar el potencial citogenotóxico *in vivo*.
  - 3.1. Por el test de *Allium cepa* L.
  - 3.2. Por ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón.
4. Determinar la acción antiviral *in vitro* frente a virus ADN y ARN.
  - 4.1. Antiviral.
  - 4.2. Virucida.
5. Realizar análisis químicos cuali-cuantitativos de los extractos bioactivos.
6. Evaluar la citotoxicidad y la actividad antiviral *in vitro* de las fracciones bioactivas de *A. satureioides* frente a virus ARN.



*MATERIALES*





### 3. MATERIALES

#### 3.1. Materiales biológicos

##### 3.1.a. Animales

Se emplearon ratones Balb C, de dos meses de vida y con un peso promedio de 20 g que fueron obtenidos del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Los animales fueron aclimatados a las condiciones del laboratorio durante tres días previos al comienzo del ensayo, recibiendo una dieta balanceada comercial en forma de pellet y agua *ad libitum*.

##### 3.1.b. Cepas virales

###### 3.1.b.1. Virus *Encefalitis Equina del Oeste* (WEE) cepa AG 80-646

Se utilizó la cepa del virus *Encefalitis Equina del Oeste* (WEE) cepa AG 80-646 enzoótica aislada, durante un período interepizoótico (1977-1980), de mosquitos *Culex (Melanoconion) ocosa* en la provincia de Chaco, Argentina, (Mitchell et al., 1985). Este virus enzoótico fue mantenido por inoculación intracerebral en ratón lactante cepa *Rockefeller*. Parte de dicha suspensión viral se conservó a -70°C.

###### 3.1.b.2. Virus *Herpes suis tipo 1* cepa RC/79

Se utilizó la cepa del virus *Herpes suis tipo 1* o virus de la *Pseudorrabia* (VPR), cepa RC/79 aislada en el año 1979 en la ciudad de Río Cuarto, (Ambrogi et al., 1981). El virus fue sometido a 10 pasajes sucesivos en cultivos de células Vero hasta lograrse un título de  $1 \times 10^8$  DICC<sub>50</sub>/ml. Una parte de esta semilla viral se conservó a -20°C y fue mantenida en el laboratorio por pasajes sucesivos en células Vero, mientras que otra se conservó como stock a -45°C por períodos prolongados.

##### 3.1.c. Cultivos celulares

En el desarrollo de las experiencias se empleó la línea celular Vero (riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*) ATCC CCL-81, adquirida comercialmente en la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC) de la ciudad de Pergamino. Las células se mantuvieron en Medio de Crecimiento formando monocapas.



### 3.1.d. Material vegetal

#### 3.1.d.1. *Achyrocline satureioides*

Se utilizó la especie *Achyrocline satureioides* colectada en mayo de 2007 y 2009 de la zona Villa Jorcoricó, situada a 12 km de Alpa Corral. Este lugar pertenece a las serranías del sur de Córdoba, se ubica geográficamente a 32° 41' 26" de latitud sur y a 64° 43' 16" de longitud oeste y se encuentra a 800 msnm. La identificación taxonómica fue realizada por el Profesor Luis A. del Vitto de la Universidad Nacional de San Luis. Un ejemplar fue depositado en el Herbario de dicha universidad bajo el número de exsicata 6362.

#### 3.1.d.2. Bulbos de cebollas

Se utilizaron bulbos de cebollas *Allium cepa* L (variedad valenciana) adquiridas comercialmente, de no más de 5 centímetros de diámetro en su corte transversal y con un promedio de 20 g de peso. Los especímenes fueron seleccionados en función de su buen aspecto, con las catáfilas externas de color tostado, libres de infecciones microbianas aparentes y sin indicios de golpes y/o estados de putrefacción.

A fin de evitar el uso de cebollas que pudieran tener un tratamiento inhibitorio de la germinación, se utilizó un número elevado en las primeras etapas, descartándose aquellas que no desarrollaron raíces a las 48 h.

### 3.2. Drogas

Todas las drogas empleadas en este trabajo fueron Sigma, Merck o Mallinckrodt, salvo que se indique lo contrario.

Orceína standard (Fluka 75415).

### 3.3. Medios

#### 3.3.1. Medio de crecimiento para células (MC)

Medio esencial mínimo de Eagle (MEM) en solución salina balanceada de Earle (medio sintético GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor), (inactivado a 56°C, 30 min), 30 µg/ml de glutamina y 50 µg/ml de gentamicina; pH 7,2-7,4.



### 3.3.2. Medio de mantenimiento para células (MM)

Medio esencial mínimo de Eagle (MEM) en solución salina balanceada de Earle, suplementado con 2% de SFB (inactivado a 56°C, 30 min), 30 µg/ml de glutamina y 50 µg/ml de gentamicina; pH 7,2-7,4.

### 3.3.3. Medio para placas (MP)

a) MEM 2X, suplementado con 4% de SFB, 2% de solución de gentamicina (50 µg/ml) y bicarbonato de sodio al 5% hasta pH 7,2-7,4.

b) Solución de metilcelulosa al 1,5% o

b) Solución de agarosa al 1,0%

Las soluciones a y b, se conservaron a 4°C y volúmenes iguales de ambas se mezclaron, previo temperado de las mismas a 37°C, en el momento de su uso.

### 3.3.4. Medio thioglicolato

Thioglicolato Difco ----- 29 g

Agua destilada c.s.p. ----- 1000 ml

Se esterilizó a  $\frac{3}{4}$  atmósfera durante 20 min y se conservó a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su uso. Este medio se utilizó para el control de esterilidad de los distintos medios y soluciones empleados en los cultivos celulares.

## 3.4. Soluciones

### 3.4.1. Solución de ácido clorhídrico 1 N

HCl ----- 36 g

Agua destilada c.s.p. ----- 1000 ml

### 3.4.2. Solución de agarosa al 1,0 %

Agarosa ultrapura (invitrogen) ----- 1,0 g

Agua bidestilada c.s.p. ----- 100 ml

Se disolvió en un frasco Erlenmeyer en microondas, máxima potencia durante 2 min. Se conservó a 4°C hasta su uso.

### 3.4.3. Solución de agua mineral

Se utilizó agua de manantial, conteniendo los siguientes minerales:



NaCO <sub>3</sub> H-----	325 mg/l
Ca(CO <sub>3</sub> H) <sub>2</sub> -----	130 mg/l
Mg(CO <sub>3</sub> H) <sub>2</sub> -----	130 mg/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -----	78 mg/ml
CaSO <sub>4</sub> -----	78 mg/ml
MgSO <sub>4</sub> -----	78 mg/ml
NaCl-----	16 mg/ml
CaCl <sub>2</sub> -----	16 mg/ml
MgCl <sub>2</sub> -----	16 mg/ml
CaF-----	1,4 mg/ml
Oligoelementos-----	1,5 mg/ml

#### 3.4.4. Solución de azul tripán al 0,5%

Azul tripán -----	0,5 g
Agua bidestilada -----	100 ml

Se disolvió por agitación y se conservó a 4°C.

#### 3.4.5. Solución balanceada de fosfatos (PBS)

NaCl -----	8 g
KCl -----	0,20 g
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H + 2 H <sub>2</sub> O -----	1,44 g
KPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> -----	0,20 g
Agua bidestilada c.s.p. -----	1000 ml

La solución se fraccionó en frascos de 200 ml aproximadamente, se esterilizó a ¾ atmósfera durante 30 min y se conservó a 4°C hasta su uso.

#### 3.4.6. Solución de bicarbonato de sodio al 5%

NaCO <sub>3</sub> H -----	5 g
Agua bidestilada c.s.p. -----	100 ml

Se disolvió por agitación y se fraccionó en tubos de ensayo. Se esterilizó a ¾ atmósfera durante 20 min y se conservó a 4°C hasta su uso.



### 3.4.7. Solución de Ciclofosfamida

Ciclofosfamida-----	0,2 g
NaCl-----	0,85 g
Agua bidestilada -----	100 ml

Se agitó hasta disolución. Se esterilizó por filtración y fraccionada, se conservó a -20°C hasta su uso.

### 3.4.8. Solución colorante Giemsa

Solución según Giemsa: Azur-eosina azul de metileno en solución.

### 3.4.9. Solución colorante May-Grünwald

Solución según May-Grünwald modificada: Eosina-azul de metileno en solución.

### 3.4.10. Solución de cristal violeta

Cristal violeta -----	10 g
Fenol -----	20 g
Etanol -----	100 ml
Agua destilada c.s.p. -----	1000 ml

El colorante se maceró en un mortero con fenol, se incorporó poco a poco el etanol, luego se agregó agua destilada hasta completar el volumen final. Se dejó estacionar a 37°C por 48 h en oscuridad. Se filtró con papel Whattman N°2 y se conservó a temperatura ambiente en frascos color caramelo hasta su uso.

### 3.4.11. Solución etanol absoluto: ácido acético glacial

Se empleó etanol absoluto en proporción  $\frac{3}{4}$  de la solución y ácido acético glacial en proporción  $\frac{1}{4}$  para formar una solución etanol: ácido acético 3:1

### 3.4.12. Solución etanol 70°

Alcohol 96° -----	84 ml
Agua destilada c.s.p. -----	100 ml



### 3.4.13. Solución fisiológica

NaCl----- 8,5 g  
Agua destilada----- 1000 ml

Esta solución fue fraccionada en frascos de 250 ml y esterilizada a  $\frac{3}{4}$  atmósfera durante 30 min. Se conservó a 4°C.

### 3.4.14. Solución de gentamicina

Sulfato de gentamicina ----- 0,5 g  
Agua bidestilada ----- 100 ml

Se esterilizó por filtración fraccionándose en pequeños volúmenes. Se conservó a 4°C hasta su uso.

### 3.4.15. Solución de glutamina

Glutamina ----- 3 g  
NaCl----- 0,85 g  
Agua bidestilada ----- 100 ml

Se agitó hasta disolución en baño a 37°C. Se esterilizó por filtración, se fraccionó y se conservó a -20°C hasta su uso.

### 3.4.16. Solución de metilcelulosa al 1,5 %

Metilcelulosa ----- 1,5 g  
Agua bidestilada c.s.p. ----- 100 ml

Se disolvió en un frasco Erlenmeyer y se esterilizó en autoclave a  $\frac{3}{4}$  atmósfera durante 25 min. Se conservó a 4°C hasta su uso.

### 3.4.17. Solución de orceína aceto-acética

Orceína----- 1 g  
Ácido acético----- 45 ml  
Agua destilada ----- 100 ml

Se disolvió la orceína en el ácido acético a baño María (60°C). Una vez frío el sistema, se agregó agua destilada. Una vez filtrada la solución, fue conservada a 4°C en frascos color caramelo hasta su uso.



### 3.4.18. Solución de rojo fenol al 0,5%

Rojo fenol -----	1 g
Solución de NaOH N/20 -----	50 ml
Agua bidestilada c.s.p. -----	200 ml

Se maceró el rojo fenol en un mortero con un pequeño volumen de solución de NaOH N/20 el que se continuó agregando de a gotas hasta obtener una solución completa que mantuvo su color rojo intenso. Una vez disuelto el colorante, se ajustó a volumen final con agua bidestilada. Se fraccionó en frascos color caramelo y se esterilizó a  $\frac{3}{4}$  atmósfera durante 30 min. Se conservó a 4°C hasta su uso.

### 3.4.19. Solución de tripsina + EDTA 2X

NaCl-----	16 g
KCl -----	0,8 g
Dextrosa -----	2 g
NaCO <sub>3</sub> H-----	1,16 g
Tripsina-----	1,5 g
Versene -----	0,4 g
Agua bidestilada c.s.p. -----	1000 ml

Se disolvieron los componentes por agitación magnética agregando luego 4 ml de rojo fenol al 0,5%. Se esterilizó por filtración y fraccionó en volúmenes de 50 ml. Luego de realizar controles de esterilidad en medio thioglicolato, se conservó a -20°C hasta su uso.

## 3.5. Reactivos

Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Vybrant® MTT).

## 3.6. Materiales para análisis químico

### 3.6.1. Caracterización química preliminar

- BaCl<sub>2</sub>
- FeCl<sub>3</sub>
- Limaduras de magnesio
- NH<sub>4</sub>(OH)
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Molich





### 3.6.2. Cromatografía en columna

Fase Estacionaria: Sephadex LH20

Fase Móvil: CH<sub>3</sub>OH 100% a CH<sub>3</sub>OH: H<sub>2</sub>O (9:1)

### 3.6.3. Cromatografía en capa fina

1. Cromatofolios de Sílica gel 60 HF 254

2. Reveladores:

- anisaldehído sulfúrico*: p-anisaldehído: ácido acético (AcOH): ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): metanol (MeOH) (0,5:10:5:85)
- reactivo de productos naturales (RPN)*: 1 g de difenil-boril-oxietilamina en 100 ml de metanol.
- reactivo de ácido sulfúrico*: ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): metanol (MeOH) (5:95)

3. Solventes:

- n-hexano: C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>
- Acetato de etilo: AcOet
- Isopropanol: H<sub>3</sub>C-HCOH-CH<sub>3</sub>
- Cloroformo: CHCl<sub>3</sub>
- Metanol: CH<sub>3</sub>OH
- p-anisaldehído: C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OCH<sub>3</sub>)CHO
- Ácido acético glacial: CH<sub>3</sub>-COOH
- Ácido sulfúrico: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Ácido fórmico: CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Cloruro de metileno: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- n-butanol: C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH

4. Testigos:

- Azúcares: glucosa, fructosa y sacarosa
- Saponinas: α-hederina.
- Polifenoles (ácidos cafeilquínicos, flavonoides): ácido clorogénico, ácido cafeico, rutina, quercetina y kaempferol.

### 3.6.4. Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC/DAD)

1. Cromatógrafo: sistema Shimadzu Prominence, equipado con una bomba LC20A y detector con arreglo de diodos SPD-M20 A.



## 2. Condiciones cromatográficas:

Columna: Gemini C18 (150 x 4,60 mm) 5 micrones (Phenomenex).

Fase móvil: Solvente A: Ácido o-fosfórico 0,1%.

Solvente B: Acetonitrilo: ácido o-fosfórico (99,9:0,1).

### Programa de elución:

Tiempo (min.)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0,01	90	10
15,00	70	30
25,00	15	85
28,00	15	85
28,01	90	10
30,00	90	10

Detección: 210/280/325/190-800 (máx. plot).

Flujo: 1,0 ml/min.

Temperatura: 24°C.

Volumen de inyección: 20 µl.

## 3. Testigos:

- a. Ácido clorogénico.
- b. Ácido cafeico.
- c. Rutina.
- d. Quercetina.
- e. Kaempferol.

*MÉTODOS*



## 4. MÉTODOS

### 4.1. Propagación de la Línea Celular Vero

Las células Vero fueron crecidas en botellas tipo Falcon de 25 o 75 cm<sup>2</sup> de superficie. Cuando las células alcanzaron un desarrollo confluyente generando una monocapa, la misma fue lavada dos veces con PBS y dispersada con solución de tripsina + EDTA 2X. Posteriormente un volumen adecuado de MC fue agregado para obtener una concentración aproximada de  $2 \times 10^5$  células/ml, determinado por tinción por exclusión con azul tripán en la cámara de Neubauer, (Mongini y Waldner, 1996). La suspensión celular homogeneizada fue sembrada en botellas de cultivo estériles e incubadas a 37°C hasta la formación de una nueva monocapa, (Vanella, 1964; Lennette y Schmidt, 1979).

Cuando el período de incubación fue prolongado, el MC que bañaba las monocapas celulares fue reemplazado por MM y conservadas en estufa a 28°C para posteriores repiques.

Para todas las experiencias los reactivos fueron precalentados a 37°C.

### 4.2. Amplificación y cuantificación de los lotes virales

#### 4.2.1. Virus *Encefalitis Equina del Oeste* (WEE) cepa AG 80-646

##### 4.2.1.a. Obtención del stock viral

Ratones recién nacidos (cepa *Rockefeller*) se inocularon por vía intracerebral con 0,1 ml de virus WEE cepa AG 80-646 con un título viral aproximado de  $10^5$  Unidades Formadoras de Placas por ml (UFP/ml). Cuando los ratones presentaron síntomas nerviosos, los mismos fueron cosechados y almacenados a temperatura de congelamiento hasta el momento de preparación de la suspensión viral. A partir del cerebro extraído se hizo una suspensión al 10% (peso/volumen) en MEM conteniendo 10% de SFB inactivado y 50 µg/ml de gentamicina, pH 7,2. Se centrifugó a 4500 x g durante 30 min a 4°C, se separó el sobrenadante que constituyó el stock, se fraccionó y conservó a -70°C hasta el momento de su uso.

##### 4.2.1.b. Cuantificación de la infectividad del virus

El título viral fue calculado por el método de Cuantificación de Unidades Formadoras de Placas para Arbovirus, (Dulbecco, 1962; Early et al., 1967).

Para ello, monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos, se infectaron con un inóculo de 100 µl de diluciones seriadas factor 10 del stock viral, por



duplicado. Luego de 1 h de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y se cubrió cada orificio con 1 ml de MP. Las policubetas se incubaron a 37°C durante 4 días en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, se fijaron las células con formaldehído al 10% durante 1 hora y se revelaron las placas de lisis por tinción con solución de cristal violeta al 1%.

El título viral se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Título (UFP / ml)} = \frac{n}{v \times d}$$

Donde:  $n$  = número promedio de placas contadas  
 $v$  = volumen del inóculo viral  
 $d$  = dilución viral empleada

#### 4.2.1.c. Caracterización del efecto citopático del virus WEE, cepa AG 80-646, en células Vero

Para el desarrollo de esta experiencia se emplearon cultivos celulares confluentes crecidos en botellas de 25 cm<sup>2</sup> de superficie, que fueron infectados con 300 UFP de virus WEE. La suspensión viral se dejó adsorber durante 1 h a 37°C con agitación periódica cada 15 minutos. Cumplido el tiempo de adsorción, el virus remanente fue descartado y la monocapa celular fue bañada con MM precalentado a 37°C. Se incluyó una monocapa sin infectar que constituyó el control celular. Los cultivos inoculados y el control celular se incubaron a 37°C durante 96 h.

Se realizaron observaciones diarias al microscopio óptico durante todo el período de incubación que demandó la experiencia, con el objetivo de determinar todos los cambios morfológicos (alteraciones) que se presentaran en los cultivos infectados.

#### 4.2.1.d. Curva de multiplicación del virus WEE cepa AG 80-646 en células Vero

Se sembraron células Vero a razón de  $1,5 \times 10^5$  células/ml en tubos Leighton, concentración determinada mediante recuento celular por exclusión al azul tripán. Transcurridas 24 h, los cultivos se infectaron con 400 UFP/ml de virus WEE e incubaron 1 h a 37°C. Luego las monocapas se lavaron con PBS, se adicionó MM y se llevaron a



estufa a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Para la construcción de la curva de crecimiento viral se seleccionaron los siguientes tiempos post-infección (p.i.): 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 36 y 96 h y para cada determinación se utilizaron tubos infectados por duplicado. Para cada tiempo p.i. se realizó la cuantificación viral extracelular a partir del líquido sobrenadante, mientras que para la cuantificación de virus asociado a células, una vez extraído el sobrenadante, se sometieron las monocapas a dos ciclos de congelamiento y descongelamiento para romper el tejido. Los títulos virales fueron determinados siguiendo las descripciones metodológicas del punto anterior. Los datos fueron utilizados para la construcción de la curva de crecimiento viral expresando títulos virales *versus* tiempos p.i. En este ensayo se incluyeron monocapas sin infectar que conformaron los controles celulares.

#### **4.2.2. Virus *Herpes suis* tipo 1, cepa RC/79 o *Pseudorhabdia* (VPr)**

##### **4.2.2.a. Obtención del stock viral**

Para la producción de virus *Herpes suis* tipo 1, cepa RC/79 se inocularon monocapas de células Vero a las 48 horas de sembradas, con 500 UFP. La dilución viral se dejó adsorber durante 90 minutos a 37°C realizando una agitación rápida cada 20 minutos. Cumplido el tiempo de adsorción, el virus remanente no adsorbido fue descartado y la monocapa celular se cubrió con MM precalentado a 37°C.

A las 48-72 h post-infección, cuando el Efecto Citopático (ECP) comprometió alrededor del 90% de la monocapa celular, la misma fue sometida a dos ciclos de congelamiento y descongelamiento para facilitar la liberación de los virus retenidos en las células. Los líquidos sobrenadantes fueron clarificados a 3000 x g durante 15 minutos en una centrifuga Rolco modelo AMC-2500. El precipitado celular fue descartado y el sobrenadante obtenido fue fraccionado en alícuotas de 1 ml, y mantenido a -20°C hasta el momento de su uso.

##### **4.2.2.b. Cuantificación de la infectividad del virus**

La cuantificación del título viral fue efectuada por el método descrito en el punto 4.2.1.b., con la excepción del tiempo de infección que fue de 90 minutos para este virus.





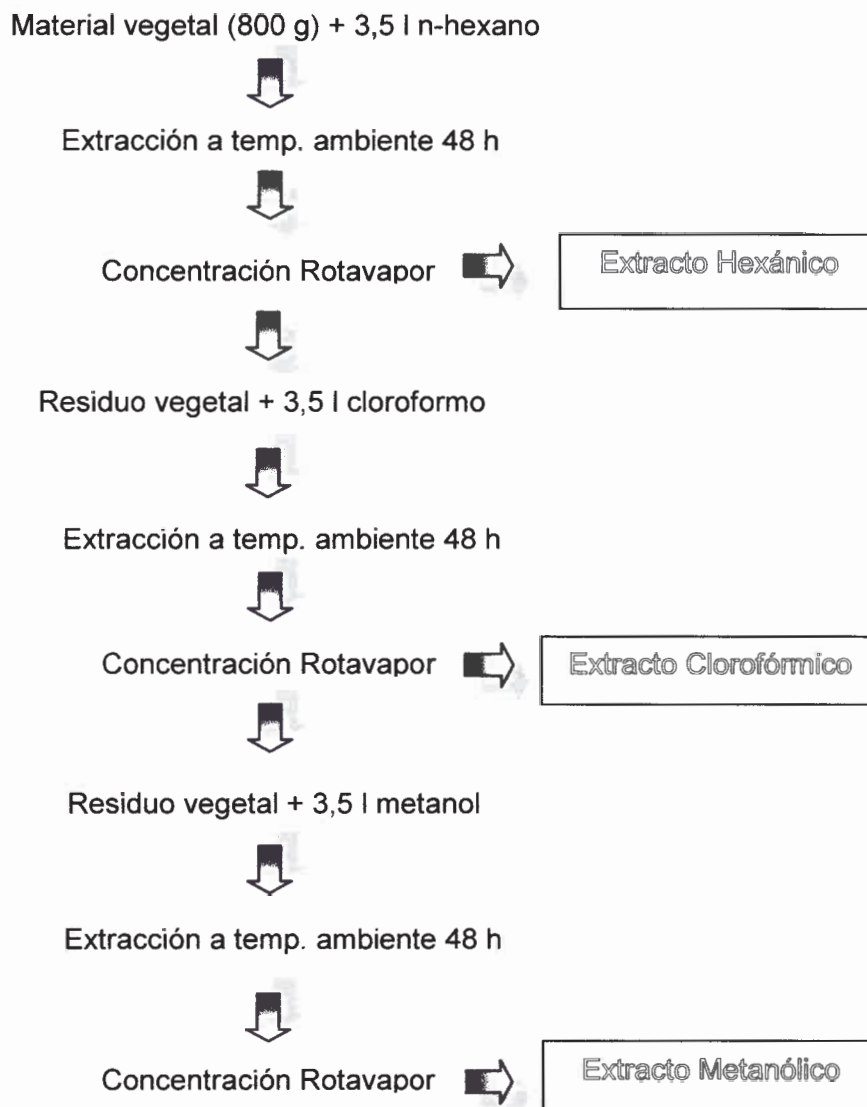
### 4.3. Obtención de los extractos de *Achyrocline satureioides*

Es muy importante realizar de modo correcto el secado y almacenamiento del vegetal ya que las plantas medicinales precisan conservar las sustancias activas en su máximo grado de efectividad. En este trabajo, el secado en capas finas del material vegetal se realizó, a temperatura ambiente, sobre papel grafito limpio durante una semana aproximadamente, ([www.natureduca.com](http://www.natureduca.com)). El vegetal fue almacenado a temperatura ambiente, protegido de luz y humedad.

*Extractos seriados obtenidos con solventes orgánicos:*

El material vegetal seco fue cortado y sometido a molienda en una picadora eléctrica (marca Braun). Se pesaron 800 g y se sometieron a extracción secuencial con 3,5 l de cada uno de los solventes: n-hexano, cloroformo y metanol, por 48 h a temperatura ambiente. Dichos extractos fueron llevados a sequedad empleando un evaporador rotatorio, para dar los extractos hexánico (EH), clorofórmico (EC) y metanólico (EM) (**Diagrama 1**). Todos los extractos se conservaron a -20°C. Para cada uno, se calculó el rendimiento porcentual respecto al material de partida.

Cada extracto vegetal fue disuelto en Dimetilsulfóxido (DMSO) hasta obtener una concentración inicial de trabajo de 50 mg/ml. Las soluciones madres fueron conservadas a -20°C hasta el momento de su uso.



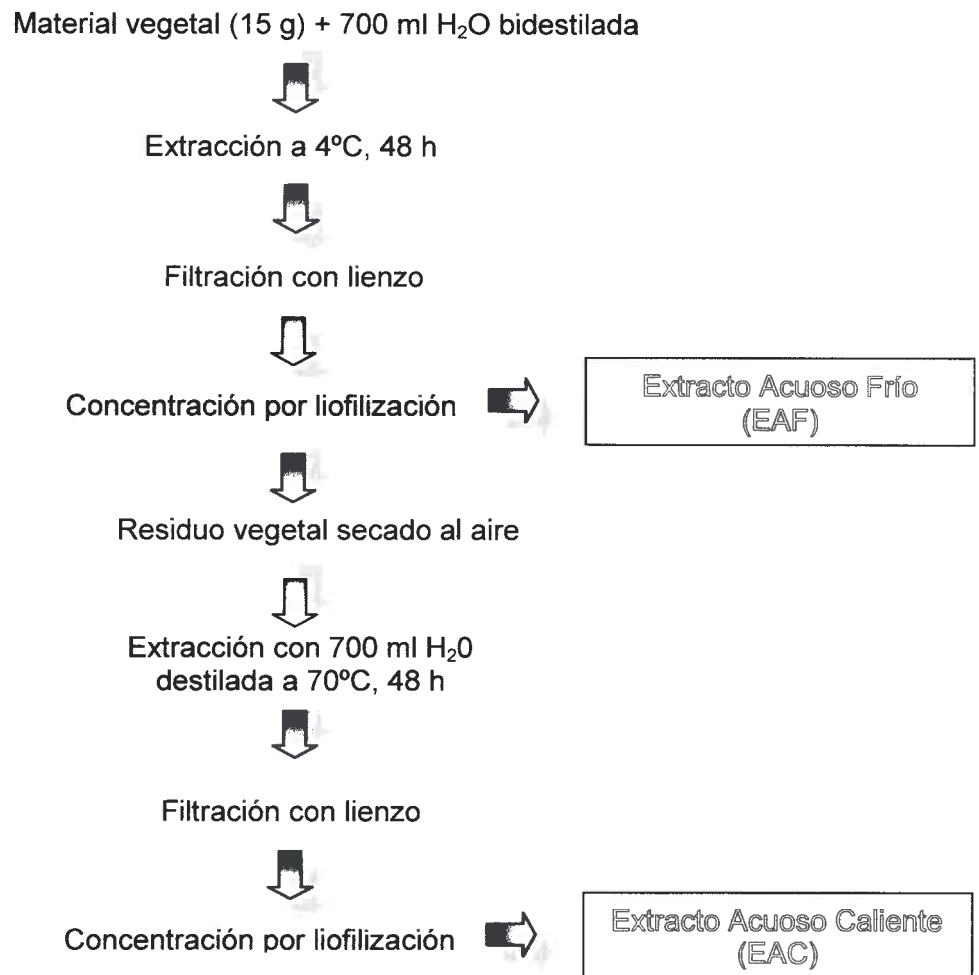
**Diagrama 1.** Obtención de los extractos de *A. satureioides* empleando solventes orgánicos

*Extractos seriados obtenidos con agua:*

A partir del material vegetal seco y molido se pesaron 15 g y se extrajeron con 700 ml de agua destilada fría (4°C) durante dos días. La mezcla fue filtrada con un lienzo y el líquido resultante se rotuló como Extracto Acuoso Frío (EAF). El material vegetal procedente de la extracción anterior, se secó al aire y se realizó una segunda extracción con agua destilada a 70°C durante dos días. Se filtró y el percolado se rotuló como Extracto Acuoso Caliente (EAC). Posteriormente ambos extractos fueron sometidos a



lío-filización. El **Diagrama 2** resume los pasos desarrollados para la preparación de los extractos.



**Diagrama 2.** Obtención de extractos polares de *Achyrocline satureioides*

A partir de los extractos liofilizados se prepararon soluciones madres con una concentración de 50 mg/ml en DMSO: PBS (20:80). Estas soluciones se fraccionaron en tubos eppendorf, se centrifugaron a 4500 x g durante 30 minutos para descontaminación, se conservó el sobrenadante (desechándose el pellet) a -20°C hasta el momento de su uso.



#### 4.4. Determinación de acciones biológicas de los extractos

##### 4.4.1. Ensayos de citotoxicidad

##### 4.4.1.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC)

Cultivos celulares confluentes crecidos en policubetas de 96 pocillos fueron incubados con MM conteniendo concentraciones de cada extracto vegetal en rango de 5-2000  $\mu\text{g/ml}$ . Como controles del sistema se emplearon:

- *Control celular*: monocapas celulares bañadas solamente con MM, sin el extracto vegetal, como indicador de la morfología celular normal.
- *Control de DMSO*: cultivos celulares bañados con MM conteniendo DMSO al 1%, concentración máxima empleada indicada como no tóxica, (Zanon S., 2005), para corroborar la ausencia de citotoxicidad de esta droga.

Todos los cultivos se incubaron a 37°C durante 72 h. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

La morfología de las células se observó diariamente al microscopio óptico invertido con el propósito de detectar alteraciones tales como redondeamiento celular, presencia de granulaciones y/o vacuolización citoplasmática y desprendimiento celular.

Se consideraron citotóxicas aquellas concentraciones de las muestras vegetales que generaron alteraciones morfológicas visibles al microscopio.

La MCNC fue definida como la máxima concentración de cada muestra que no produjo ninguna alteración visible en la monocapa celular luego de 72 h de incubación a 37°C, siendo éste el tiempo límite de observación, (Waschman, 1987; Andrei, 1988; Pujol, 1995; Li et al., 2002; Ooi et al., 2004; Zanon, 2005).

##### 4.4.1.2. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>)

##### 4.4.1.2.a. Por captación del Rojo Neutro (RN)

La viabilidad celular fue evaluada usando el test de captación del Rojo Neutro (RN) según Borenfreund y Puerner, (1985).

Las células Vero fueron sembradas en policubetas de 96 pocillos a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/pozo en MC, e incubadas a 37°C durante 24 h. Las monocapas celulares subconfluentes fueron tratadas por 48 h con diferentes concentraciones de cada extracto, por triplicado. Cultivos celulares mantenidos en MM solo y en MM con DMSO al 1% fueron los controles del sistema. Las soluciones fueron removidas y las células fueron lavadas con 200  $\mu\text{l}$  de PBS/pozo. Luego se agregaron 200  $\mu\text{l}$ /pocillo de la solución de RN



(30 µg/ml en MEM) y la policubeta se incubó a 37°C por 3 h para favorecer la incorporación del colorante por las células. Al cabo de ese tiempo las células fueron lavadas 3 veces con PBS. El colorante dentro de las células fue liberado por extracción con una mezcla de ácido acético, etanol y agua (1:50:49). Después de la agitación de los cultivos por 20 minutos, los valores de densidad óptica (D.O.) se midieron a 540 nm en un lector de microplacas (*Labsystems Multiskan MS* o *Bio-Tek, Elx 800*).

La viabilidad relativa en los tratamientos fue expresada como porcentaje de disminución de RN captado respecto de las células controles; y la fracción de sobrevivencia (FS) fue calculada según la siguiente fórmula:

$$FS \% = \frac{D.O. \text{ de las células tratadas}}{D.O. \text{ de las células control}} \times 100$$

El ensayo de captación del RN es un ensayo quimiosensible que evalúa la sobrevivencia y viabilidad celular, basada en la capacidad de las células viables de incorporar y unir el RN, un colorante supravital, (*Gutleb et al., 2002*).

El RN es un colorante catiónico débil que penetra fácilmente las membranas celulares por difusión no iónica, acumulándose intracelularmente en los lisosomas donde se une con sitios aniónicos en la matriz lisosomal. Alteraciones de la superficie celular o de la membrana sensible del lisosoma conducen a una fragilidad lisosomal y a otros cambios que gradualmente se tornan irreversibles. Tales cambios provocados por la acción de xenobióticos resultan en una disminución de la captación y unión del RN; así, es posible distinguir células muertas, dañadas y vivas.

Este ensayo ha sido validado como una prueba de citotoxicidad *in vitro* por diferentes organizaciones internacionales como la Comisión de Comunidades Europeas, la Asociación de Cosméticos, Artículos de Tocador y Fragancia y la Asociación de Jabones y Detergentes de los Estados Unidos. Un gran número de laboratorios en los Estados Unidos, Europa y Asia están actualmente utilizando este ensayo para investigar la citotoxicidad de plaguicidas, surfactantes, anilinas, fenólicos, aditivos alimentarios, conservantes y agentes antibacterianos, anticancerígenos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y mezclas complejas.



#### 4.4.1.2.b. Por reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

La viabilidad celular fue estudiada usando el test de reducción del MTT según *Mosmann, (1983)*. Se utilizó el equipo Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies, Eugene, Oregon, USA).

Las células Vero fueron sembradas en policubetas de 96 pocillos a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/pozo en MC, e incubadas a 37°C durante 24 h. Las monocapas celulares subconfluentes fueron tratadas durante 48 h con diferentes concentraciones de cada extracto, por triplicado. Las soluciones fueron luego removidas y las células fueron lavadas con 200 µl de PBS/pozo. Luego se agregaron 100 µl de MM sin suero y 25 µl de la solución MTT (1mg/ml de MTT en PBS 0,01 M pH 7,2) a cada pocillo. La placa fue incubada a 37°C durante 4 h. Al cabo de ese tiempo, las monocapas se lavaron con 200 µl de PBS por pocillo y descartado éste se agregaron 100 µl de DMSO por pocillo, para disolver los cristales de formazán que resultaron de la conversión del MTT. Se interpretó el resultado por lectura a 570 nm en un lector de microplacas.

El sistema incluyó cultivos celulares mantenidos en MM solo y en MM con DMSO al 1% como controles. La viabilidad relativa en los tratamientos fue expresada como porcentaje de disminución de reducción de MTT respecto de las células controles y el porcentaje de FS fue calculada según la fórmula presentada en apartado 4.4.1.2.a.

El MTT es una sal de tetrazolio, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, la cual es reducida por la enzima succinato-deshidrogenasa de las mitocondrias de las células vivas, dando origen a un producto (formazán) de color azul, que puede ser detectado en un espectrofotómetro a 570 nm.

Este método desarrollado por *Mosmann, (1983)* y modificado por *Denizot y Lang, (1986)* ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

#### 4.4.1.2.c. Por tinción por exclusión al azul tripán (AT)

La viabilidad celular fue evaluada usando el test de tinción de exclusión al azul tripán sólo para el EAF de *A. satureioides*, según *Mongini y Waldner, (1996)*.

Las células Vero fueron sembradas en policubetas de 96 pocillos a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/pozo en MC, se incubaron a 37°C durante 24 h. Las monocapas





celulares subconfluentes fueron tratadas durante las próximas 48 h con diferentes concentraciones de EAF en el rango de 100-2200 µg/ml, por triplicado. Transcurrido el período de incubación, se descartó el medio, se lavó la monocapa con 200 µl de PBS, se adicionó 50 µl de tripsina-EDTA 2X por pocillo y se incubó a 37°C por 5 min. Una vez desprendidas las células se agregaron 200 µl de MM y se procedió a realizar el recuento de células viables. Para ello se mezclaron partes iguales del colorante AT al 0,4% y de la suspensión celular. Se utilizó cámara de Neubauer para el recuento de las células viables en un microscopio óptico. Se calculó su porcentaje como FS, teniendo en cuenta el número de células en cultivos tratados respecto de la cantidad de células viables del control, empleando la fórmula del inciso 4.4.2.1.a.

El azul tripán es un colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad y permite diferenciar células vivas de células muertas. Las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta no son coloreados debido a que las células son muy selectivas a los compuestos que dejan pasar a través de la membrana. Por lo tanto, en las células viables, el azul tripán no es absorbido y, por el contrario, sí atraviesa la membrana de las células muertas. Como resultado, las células muertas se observan de color azul bajo el microscopio. Debido a que las células vivas son excluidas de la tinción, este método también es llamado método de tinción por exclusión.

#### **4.4.1.2.d. Análisis estadístico de la CC<sub>50</sub>**

Los valores obtenidos en los apartados 4.4.1.2. a., b. y c. fueron sometidos a análisis estadístico de regresión no-lineal, con un coeficiente de determinación >0,90, basado en la curva dosis-respuesta Boltzman sigmoidal y usando el programa *GraphPad Prism 5.0*. Los resultados representan la media ± error estándar.

### **4.4.2. Evaluación de la actividad antiviral frente al virus WEE**

#### **4.4.2.1. Screening antiviral durante todo el ciclo replicativo viral**

La actividad antiviral de los extractos acuosos fue evaluada mediante el ensayo de reducción de placas de lisis, (*Ghosh et al., 2004; Saddi et al., 2007*). En este estudio se emplearon tres concentraciones no citotóxicas de cada extracto que correspondieron a 100, 200 y 400 µg/ml para el EAC y 200, 400 y 800 µg/ml para el EAF.



Células Vero fueron sembradas en policubetas de 24 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pozo. Cuando los cultivos mostraron confluencia, se incorporaron 100  $\mu$ l de extracto con 100  $\mu$ l de virus WEE (100 UFP) por pocillo y se incubaron durante 1 h a 37°C. Las monocapas fueron lavadas con PBS e incubadas con 1 ml de MP conteniendo extracto a la misma concentración ensayada, durante 96 h a 37°C. Las placas de lisis se cuantificaron como se describió en el apartado 4.2.1.b. (**Figura 5**).

Los controles del sistema fueron:

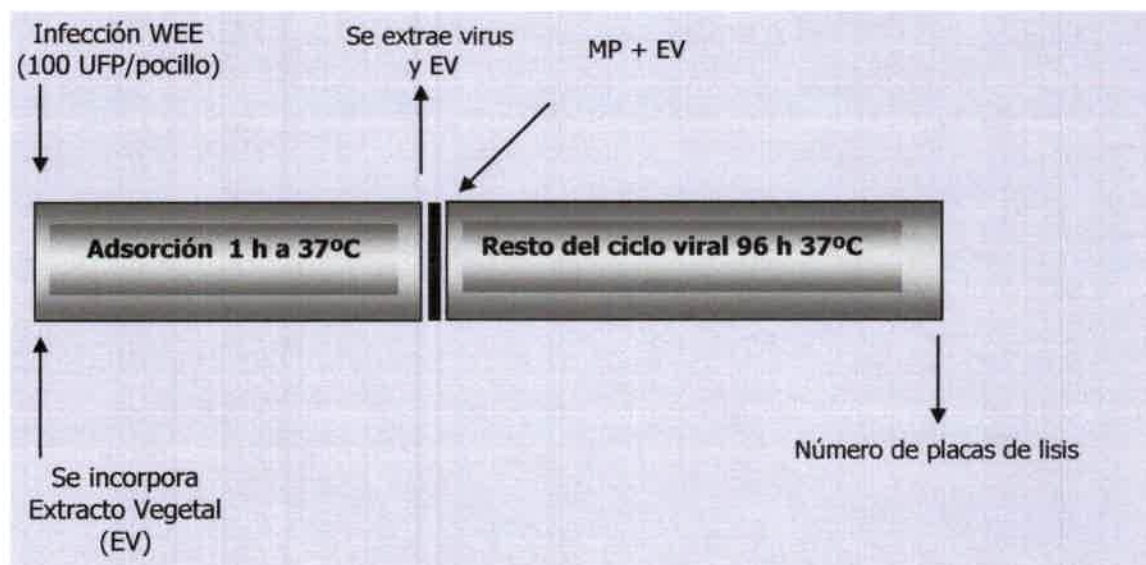
- *Controles virales*: incluyeron células infectadas con 100, 50 y 25 UFP/pocillo de virus en MM sin extracto. Estos controles representaron la infectividad normal del virus.
- *Controles celulares*: incluyeron células con MM, sin virus ni extracto. Fueron el indicador de la morfología normal y característica de la línea celular empleada.
- *Controles de inocuidad de extracto*: incluyeron células con MM conteniendo el extracto a la concentración ensayada.

Todos los controles del ensayo fueron incubados en las mismas condiciones y posteriormente incubados con MP sin el extracto.

La determinación de la acción antiviral se infirió en función de la reducción del número de placas de lisis en el tratamiento *versus* control. El porcentaje de inhibición fue calculado a partir de la siguiente fórmula, (*García et al., 1990*):

$$\% \text{ de Inhibición viral} = 100 - A/B \times 100$$

Donde: A = Número de placas de lisis en cultivos tratados con extracto.  
B = Número de placas de lisis en cultivos controles.



**Figura 5.** Determinación de acción antiviral de los extractos de *A. satureioides* durante todo el ciclo de la replicación del virus WEE

Para dilucidar el modo de acción antiviral y para identificar el posible sitio de ataque de EAF y EAC, que resultaron con capacidad para inhibir el virus en las pruebas de *screening*, se llevaron a cabo los ensayos que a continuación se detallan.

#### 4.4.2.2. Efecto antiviral de los extractos EAF y EAC de *A. satureioides* en distintos pasos de la replicación del virus WEE

##### 4.4.2.2.a. Ensayo sobre adsorción y penetración viral

En esta experiencia se emplearon distintas concentraciones no citotóxicas de cada extracto que correspondieron a 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{g/ml}$  para el EAC y 200, 400, 600 y 800  $\mu\text{g/ml}$  para el EAF.

Se sembraron células Vero en policubetas de 24 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pozo. Cuando los cultivos mostraron confluencia, se incorporaron 100  $\mu\text{l}$  de extracto con 100  $\mu\text{l}$  de virus WEE (100 UFP) por pocillo y se incubaron durante 1 h a 37°C.

Las monocapas fueron lavadas con PBS agregándose luego el MP sin extracto y se llevaron a incubación a 37°C durante 96 h, momento en que se calculó el título viral por reducción de placas de lisis según metodología descrita en el punto 4.2.1.b. (Figura 6).

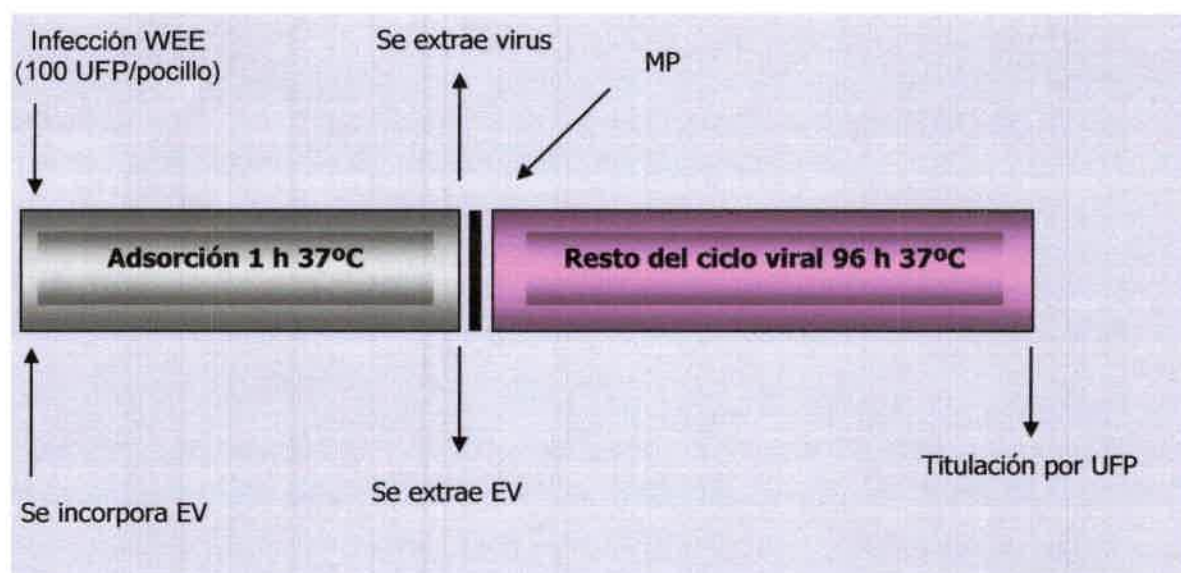


Como controles del sistema se incluyeron:

- *Controles virales*: células infectadas con 100, 50 y 25 UFP/pocillo de virus en MM sin extracto. Estos controles representaron la infectividad normal del virus.
- *Controles celulares*: células con MM, sin virus ni extracto. Fueron el indicador de la morfología normal y característica de la línea celular empleada.
- *Controles de inocuidad de extracto*: células con MM conteniendo el extracto a la concentración ensayada.

Todos los controles fueron mantenidos en iguales condiciones de incubación.

La acción antiviral de los extractos fue calculada en función de la reducción del título viral en el tratamiento *versus* control.



**Figura 6.** Determinación de acción antiviral de los extractos de *A. satureioides* durante la adsorción y penetración viral

#### 4.4.2.2.b. Ensayo post adsorción y penetración viral: replicación intracelular

Células Vero fueron sembradas en policubetas de 24 pocillos a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/pozo e incubadas hasta lograr la confluencia. Los cultivos se infectaron con 100 UFP/pocillo del virus WEE y se incubaron durante 1 h a 37°C. Luego el virus no adsorbido fue descartado y las monocapas fueron incubadas, en ensayos independientes, con MP conteniendo diferentes concentraciones no citotóxicas del EAC

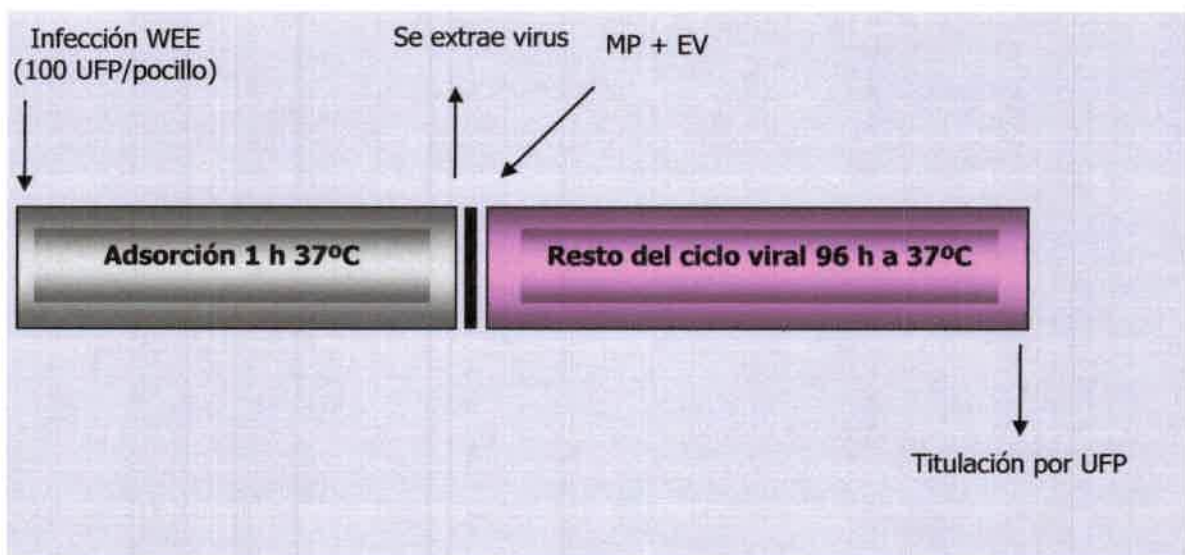


(100, 200, 300 y 400 µg/ml) o del EAF (200, 400, 600 y 800 µg/ml), durante 96 h a 37°C. (Figura 7). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

Simultáneamente se dejaron los siguientes controles:

- ▶ *Controles virales*: células infectadas con 100, 50 y 25 UFP/pocillo de virus en MM sin extracto.
  - ▶ *Controles celulares*: células con MM, sin virus ni extracto.
- Ambos controles fueron incubados en las mismas condiciones y posteriormente incubados con MP sin el extracto.
- ▶ *Controles de inocuidad de extracto*: células con MM solo y luego con MP conteniendo el extracto a la concentración ensayada.

Finalizado el período de incubación y siguiendo la metodología ya descrita, se calcularon los títulos virales y posteriormente se determinaron los porcentajes de acción antiviral de las muestras vegetales.



**Figura 7.** Determinación de acción antiviral de los extractos de *A. satureioides* durante la etapa posterior a la adsorción y penetración viral



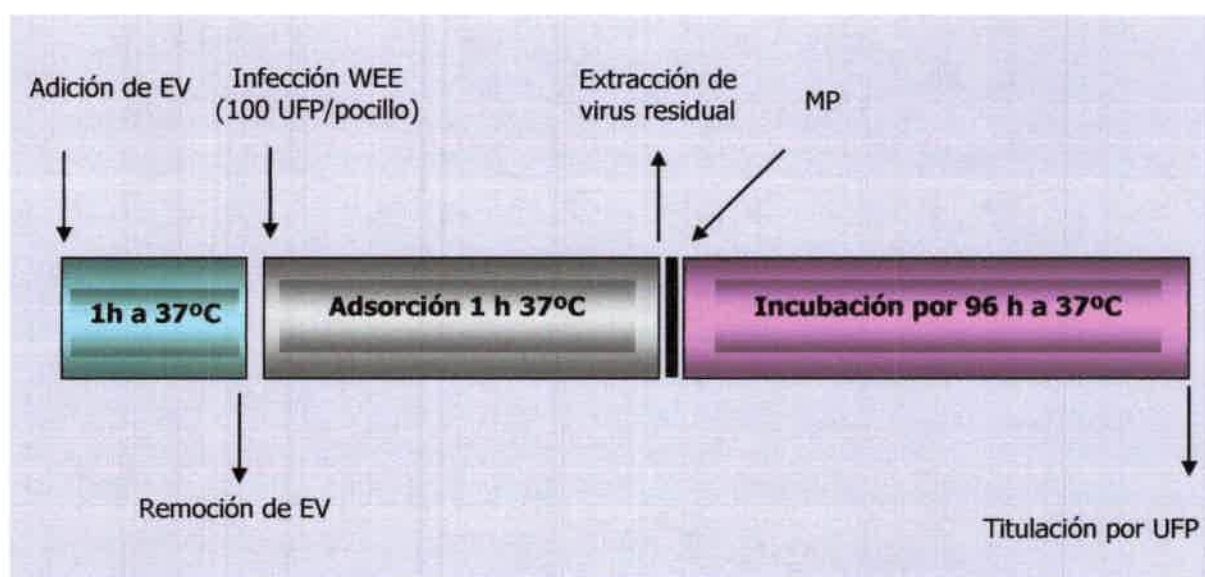
#### 4.4.2.2.c. Pre-tratamiento celular

Células Vero fueron sembradas en policubetas de 24 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pozo e incubadas a 37°C hasta lograr la confluencia. Previa a la infección con el virus, 1 ml de MM conteniendo diferentes concentraciones de EAC (100, 200 y 400 µg/ml) o EAF (200, 400 y 800 µg/ml) fue incorporado a cada pocillo y el sistema fue incubado durante 1 h a 37°C. Al cabo de ese tiempo el medio con extracto fue removido, las monocapas fueron lavadas con PBS e infectadas con 100 UFP/pocillo de virus WEE incubándose nuevamente 1 h a 37°C. El virus remanente fue removido y los cultivos celulares fueron incubados con MP durante 96 h a 37°C (**Figura 8**).

Los controles del ensayo consistieron en:

- *Control viral*: células, sin pre-tratamiento con la muestra vegetal, infectadas con la misma dosis viral (100 UFP/pocillo) que los cultivos tratados.
- *Control celular*: células sin infección y sin pre-tratamiento con extracto.
- *Controles de inocuidad de extracto*: células sin infección y tratadas con el EAF o el EAC a las concentraciones ensayadas.

Transcurrida la incubación, todos los cultivos fueron fijados y teñidos para calcular títulos virales según la metodología ya descrita. A partir de los títulos obtenidos se calculó el porcentaje de acción inhibitoria de cada extracto a las concentraciones ensayadas.



**Figura 8.** Pre-tratamiento de las células con extracto vegetal, previo a la infección viral





#### 4.4.2.3. Pre-tratamiento del virus libre: acción virucida

El efecto directo de EAF o EAC de *A. satureioides* sobre la infectividad del virus WEE fue evaluada de acuerdo a los procedimientos descritos por *Cheng et al.*, (2008), con modificaciones. Volúmenes iguales de suspensión viral (200 UFP/100 $\mu$ l) y de cada extracto empleado a diferentes concentraciones: EAC (200, 400, 800  $\mu$ g/ml) y EAF (400, 800 y 1600  $\mu$ g/ml) fueron mezclados en ensayos independientes e incubados por 1 h a 37°C. Luego, se adicionaron a los cultivos 100  $\mu$ l/pocillo de cada mezcla (por triplicado) y se los incubó 1 h a 37°C. Posteriormente, las monocapas se lavaron con PBS y se les agregó MP. Las células se mantuvieron por 96 h a 37°C. Al cabo de ese tiempo el título viral fue calculado por el método de recuento de placas de lisis descrito en el apartado 4.2.1.b.

El sistema incluyó los siguientes controles:

- *Control de título viral*: virus con MM (sin extracto) por 1 h a 37°C.
- *Control de células*: células con MM, sin virus ni extracto.

La actividad virucida se determinó a través de la reducción del número de placas de lisis en las suspensiones virales tratadas vs. suspensiones virales sin tratar (controles virales), (*Hayashi et al.*, 1995).

#### 4.4.2.4. Determinación de la Concentración Inhibitoria 50% (CI<sub>50</sub>)

La CI<sub>50</sub> de EAC y EAF fue evaluada por reducción del número de placas de lisis. Monocapas celulares preformadas en placas de 24 pocillos fueron infectadas con 100 UFP/pozo de virus WEE e incubadas 1 h a 37°C. Luego, el virus residual fue removido y las monocapas fueron lavadas con PBS. Posteriormente se les adicionó MP con concentraciones crecientes de EAC o EAF (rango 5-200  $\mu$ g/ml).

El sistema incluyó los siguientes controles:

- *Controles virales*: células infectadas con 100, 50 y 25 UFP/pocillo.
- *Controles celulares*: cultivos con MP sin virus ni extracto.
- *Controles de inocuidad de extracto*: células cubiertas con MP conteniendo idénticas concentraciones crecientes de cada extracto.

Todos los tratamientos se realizaron por duplicado. El sistema se incubó durante 96 h a 37°C y posterior a la fijación y tinción de las monocapas, las placas de lisis fueron contadas.



El porcentaje de inhibición correspondiente a cada concentración de EAC o EAF ensayado, fue calculado de acuerdo a la fórmula descrita en el punto 4.2.1.b. Con dichos valores se construyó una curva dosis-respuesta a partir de la cual se determinó la  $CI_{50}$ . Este parámetro se define como la concentración del compuesto en estudio (extractos acuosos) que reduce la multiplicación viral (número de UFP) a un 50% con respecto al control viral.

#### 4.4.2.5. Cálculo del Índice de Selectividad (IS)

Con los valores de  $CC_{50}$ , obtenidos para EAF y EAC, por las técnicas RN y MTT, y el valor de  $CI_{50}$ , logrado para cada extracto, se calculó el índice de selectividad (IS) mediante la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{CC_{50}}{CI_{50}}$$

En el área de investigación dedicada a la búsqueda de antivirales efectivos, este cociente indica la relación entre la actividad tóxica que ejerce un compuesto sobre un sistema celular y la capacidad del mismo de inhibir a un determinado virus.

Si el IS es  $>1$ , indica que el extracto vegetal ejerce acción antiviral selectiva pues estaría inhibiendo el desarrollo viral sin comprometer la viabilidad celular, (Cheng *et al.*, 2008).

#### 4.4.2.6. Evaluación de la actividad antiviral de los extractos acuosos a diferentes tiempos post adsorción y penetración del virus WEE

Basado en los resultados obtenidos de acción antiviral ejercida por los EAF y EAC en etapas posteriores a la adsorción y penetración viral fue necesario dilucidar qué etapa del ciclo de replicación del virus, a nivel intracelular, es afectada por los extractos.

Monocapas celulares desarrolladas en placas de 24 pocillos fueron infectadas con 100 UFP/pozo de virus WEE e incubadas 1 h a 37°C. Luego, el virus residual fue descartado y las monocapas fueron incubadas con MM a 37°C durante 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 h. Transcurrido esos tiempos, se descartó el MM y se adicionó MP conteniendo una



única concentración de extracto acuoso: 300 µg/ml de EAC o 400 µg/ml de EAF y se incubó a 37°C durante 96 h (**Figura 9**).

Todos los tratamientos se realizaron por duplicado incluyéndose:

- *Controles virales*: monocapas infectadas con 100, 50 y 25 UFP/ml y mantenidas con MP sin extracto vegetal.
- *Controles celulares*: monocapas no infectadas, incubadas con MP sin extracto vegetal.
- *Controles de inocuidad de extracto*: células cubiertas con MP conteniendo idénticas concentraciones de cada extracto.

Finalizado el tiempo de incubación, los cultivos celulares se fijaron y tiñeron. Luego, los títulos virales fueron calculados como se describió en el apartado 4.2.1.b.

#### Tratamiento 1



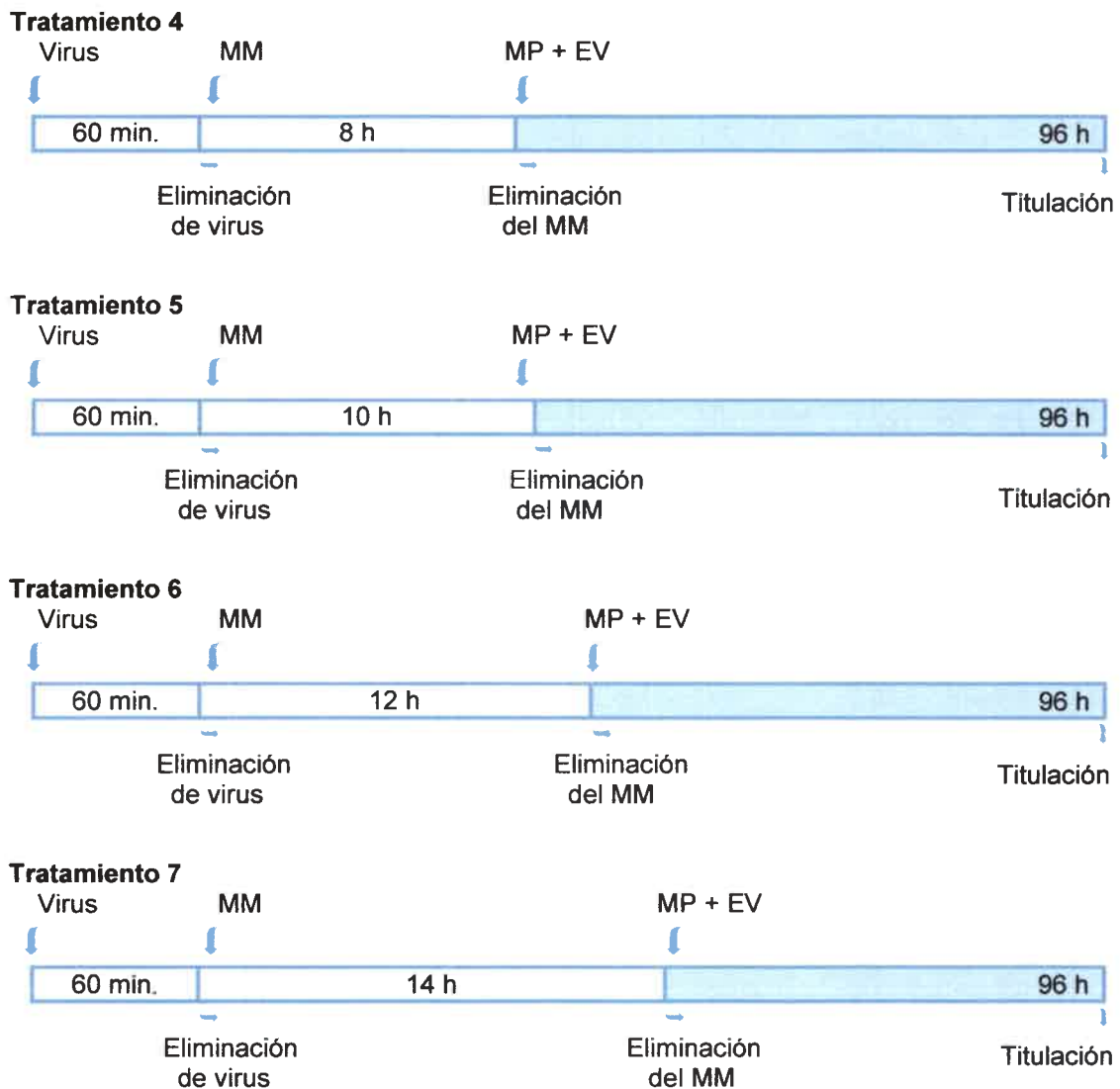
#### Tratamiento 2



#### Tratamiento 3



**Figura 9.** Tratamientos de monocapas de células Vero con EAF o EAC de *A. satureioides* incorporados a distintos tiempos de la replicación viral luego de las etapas de adsorción y penetración del virus a las células



**Figura 9** (continuación). Tratamientos de monocapas de células Vero con EAF o EAC de *A. satureioides* incorporados a distintos tiempos de la replicación viral luego de las etapas de adsorción y penetración del virus a las células

#### 4.4.3. Evaluación de la actividad antiviral frente al virus *Herpes suis* tipo 1

En todas las experiencias de actividad antiviral frente a este virus se emplearon tres concentraciones no citotóxicas de cada extracto que correspondieron a 100, 200 y 400 µg/ml para EAC; y 200, 400 y 800 µg/ml para EAF.



#### **4.4.3.1. Screening antiviral durante todo el ciclo replicativo viral**

La metodología desarrollada fue idéntica a la descrita en el punto 4.4.2.1. (Figura 5). Para este ensayo y para los que se describen a continuación las variables fueron el tiempo de adsorción del virus a la célula establecido en 90 min y el de revelado de los títulos virales que se efectuó a las 72 h p.i.

#### **4.4.3.2. Efecto antiviral ejercido por EAF y EAC de *A. satureioides* en distintos pasos de la replicación del virus *H. suis***

##### **4.4.3.2.a. Ensayo sobre adsorción y penetración viral**

La metodología desarrollada fue idéntica a la detallada en el punto 4.4.2.2.a. (Figura 6).

##### **4.4.3.2.b. Ensayo post adsorción y penetración viral: replicación intracelular**

La metodología desarrollada correspondió a la descrita en el apartado 4.4.2.2.b. (Figura 7).

##### **4.4.3.2.c. Pre-tratamiento celular**

La metodología desarrollada fue la misma a la detallada en el punto 4.4.2.2.c. (Figura 8).

#### **4.4.3.3. Pre-tratamiento del virus libre: acción virucida**

La metodología empleada fue igual a la descrita en el apartado 4.4.2.3.

#### **4.4.4. Análisis estadístico**

Los valores de  $CI_{50}$  obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico de regresión no lineal (Boltzman sigmoidal) empleando el programa *GraphPad Prism 5.0*. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar.

#### **4.5. Estudios de genotoxicidad de EAF y EAC**

##### **4.5.1. Estudios *in vivo* de citogenotoxicidad mediante el test de *Allium cepa* L**

Para este estudio, los extractos acuosos se probaron a: 0,5, 1, 2, 3 y 4 mg/ml empleando agua mineralizada como agente de disolución. Como control positivo se empleó una solución de paracetamol (acetaminophen) de 0,3 mg/ml.



El criterio de selección de estas concentraciones de trabajo estuvo basado en los valores de Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC) mostrados en ítem 5.4.1.1. El rango se definió entre una concentración de extracto ligeramente superior a la MCNC del EAF (500 µg/ml) y hasta valores máximos que según la literatura se indican como posibles de utilizar. En particular, para la especie *A. satureioides* se consideró como límite superior a 4 mg/ml, concentración inferior a la que el uso popular indica como activa cuando se ingiere como una infusión (5 mg/ml), (Fachinetto et al., 2007).

#### 4.5.1.a. Desarrollo de la prueba de mutagenicidad

Se desarrolló el test de *Allium* descrito por Fiskesjö, (1993, 1994, 1997) en el que se emplean bulbos de cebolla de la especie *Allium cepa* L y se describe a continuación (ver **Diagrama 3**):

1. Se utilizaron cebollas (bulbos) redondas con las características descritas en el apartado 3.1.b.
2. Se eliminaron las catáfilas exteriores coloreadas hasta la primera catáfila blanca, tratando de producir el menor daño posible a las restantes. Se eliminó con un corte neto el brote apical y las porciones necrosadas del disco inferior.
3. Con ayuda de una hoja de afeitar se raspó el disco por sus bordes hasta visualizar los primordios radiculares (**Figura 10**).



**Figura 10.** Disco radicular de un bulbo de cebolla.

4. Se lavaron los bulbos con abundante agua corriente y se colocaron en frascos de vidrio individuales conteniendo agua mineral hasta que el líquido cubrió el disco. Generalmente, luego de un par de horas, fue necesario reponer el agua a su nivel adecuado debido al fenómeno bulbos.
5. Se mantuvieron los bulbos en estas condiciones durante 48 h, renovando el agua cada 24 h y lavando suavemente la porción inferior del bulbo con agua corriente en cada recambio.
6. Transcurridas las 48 h, se descartaron los bulbos que no habían desarrollado raíces y se retuvieron los restantes para el tratamiento.





**Figura 11.** Bulbos de cebolla sometidos a tratamiento con diferentes concentraciones de EAF de *A. satureioides*.

7. Los bulbos se dividieron en tantos lotes como fue necesario para el tratamiento, reservando siempre un lote como control negativo (sólo con agua mineral) y otro lote para el control positivo (paracetamol). Se utilizaron 4 bulbos por lote.

8. Los bulbos de cada lote se pusieron en contacto con las concentraciones del extracto a ensayar (**Figura 11**).
9. Las soluciones de prueba y la del control se renovaron cada 24 h, como se indicó anteriormente.
10. Transcurridas 48 h (dos ciclos celulares), se extrajeron 3 raicillas por bulbo y se fijaron en una mezcla de alcohol absoluto: ácido acético glacial (3:1) por 12 - 15 h y hasta un máximo de 24 h a 4°C. Luego las raicillas se transfirieron a una solución de etanol 70° y se conservaron en heladera hasta el momento del estudio citogenético que permitiera definir, entre otros parámetros, el valor del primer Índice Mitótico (IM1).
11. De los 4 bulbos, 2 de ellos se mantuvieron en tratamiento diario con los extractos hasta completar 5 días. Al final de este tiempo, todas las raíces fueron consideradas para el análisis macroscópico y 3 de ellas fueron sometidas a fijación, tal como se describe en el punto anterior, para definir un nuevo valor de Índice Mitótico (IM2).

#### **4.5.1.b. Desarrollo de la prueba de reversión de mutagenicidad**

Este estudio implicó someter los 2 bulbos restantes, tratados durante 2 días con los extractos, a la acción de agua mineral durante 3 días más.

Al final del ensayo (quinto día del inicio de la prueba) se extrajeron 3 raicillas las que fijadas como se indicó, fueron sometidas a estudios citogenéticos para el cálculo del IM3.

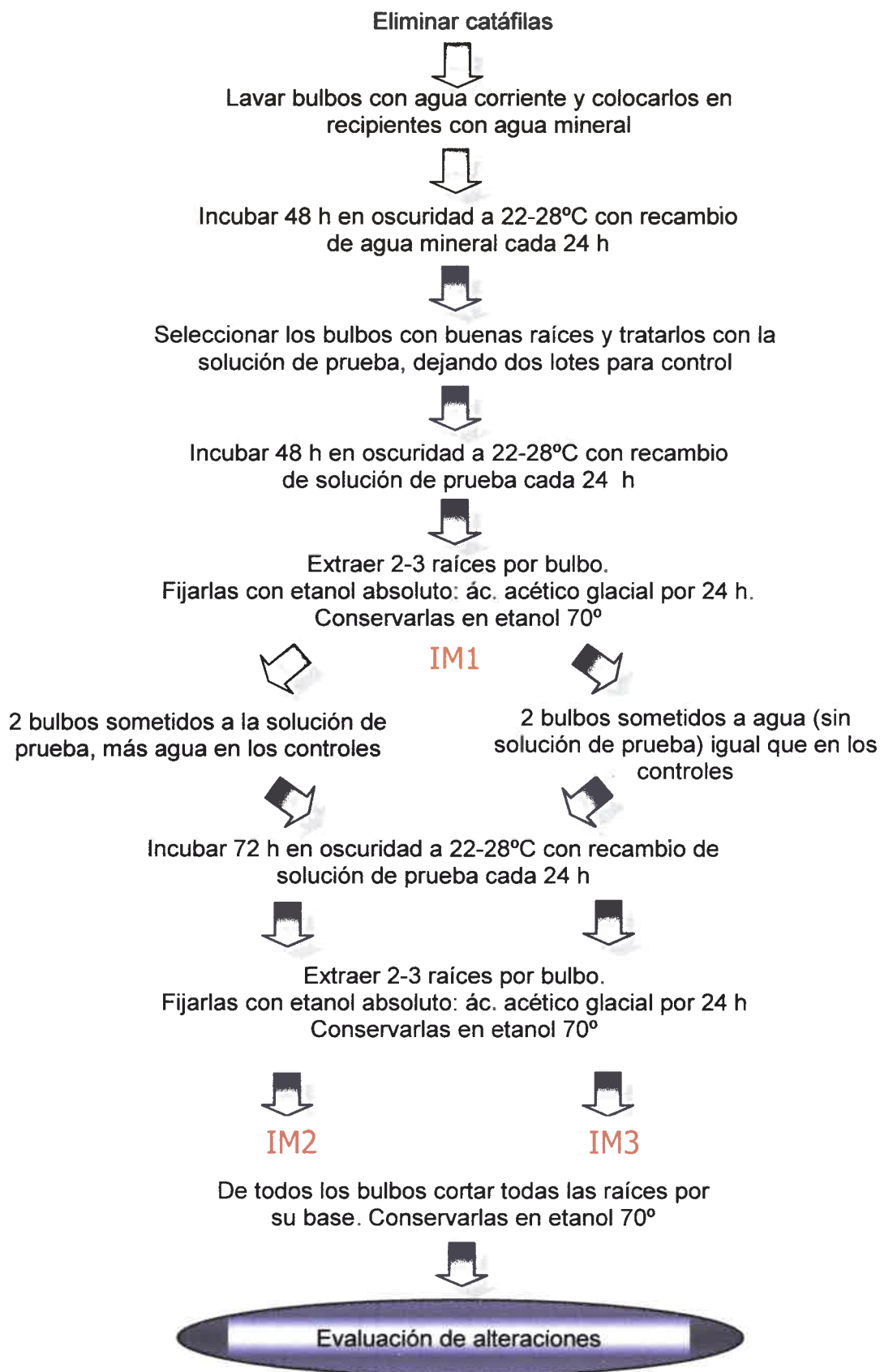


Diagrama 3. Test de *Allium cepa* L



#### 4.5.1.c. Estudios de alteraciones macroscópicas

Al final del ensayo, todas las raíces de cada bulbo se cortaron por su base y se almacenaron en envases independientes en etanol a 70°, para completar el estudio de los parámetros macroscópicos.

Los daños macroscópicos evaluados se refirieron a modificaciones en la estructura de las raíces: cambio de forma, aparición de ganchos radiculares, tumores, gelatinización, pigmentación, necrosis; así como modificaciones en el número y longitud de dichas raíces, (*Bidau et al., 2004*). Se efectuó análisis estadístico desarrollando el test de ANOVA (One way ANOVA. Tukey's Multiple Comparison test) mediante aplicación del software *GraphPad Prism 5.0*.

#### 4.5.1.d. Estudios citogenéticos

Para este propósito se emplearon las raíces conservadas en la solución de fijación etanol 70°, desarrollándose la técnica de tinción con orceína aceto-acética, (*Dyer, 1963*).

1. Las raicillas de cada bulbo se extrajeron del etanol y se les eliminó la cofia bajo lupa usando como soporte un portaobjetos (**Figura 12**).



**Figura 12.** Punta de raíz sin cofia, observada bajo lupa.

2. Las células del tejido apical se hidrolizaron en ácido clorhídrico 1N a temperatura ambiente por tiempos variables, no más de 3 min, y luego se efectuó la tinción con orceína aceto-acética, durante 5-10 min, macerando el tejido con golpes suaves aplicados con varilla de vidrio esmerilada en su extremo.
3. Se agregó una gota más de orceína, se colocó un cubreobjetos y se realizó el squash (aplastamiento). Los preparados se sellaron con cera vegetal y se rotularon. Se mantuvieron en recipientes de plástico para evitar la deshidratación, hasta su análisis al microscopio de luz.
4. Para cada bulbo tratado se contaron no menos de 2000 células. Se evaluó la presencia de alteraciones en las distintas fases del ciclo celular: Interfase (I), Profase (P), Metafase (M), Anafase (A) y Telofase (T). Estos datos fueron utilizados para cuantificar alteración en el índice mitótico (IM) y en el índice de



fases (IF) por comparación con los índices del sistema testigo. Las fórmulas para el cálculo de dichos parámetros fueron las siguientes, (Rank, 2003):

$$IM = \frac{\text{N}^\circ \text{ células en división}}{\text{N}^\circ \text{ total de células}} \times 100 \quad IF = \frac{\text{N}^\circ \text{ células en c/ fase}}{\text{N}^\circ \text{ de células en división}} \times 100$$

Basado en la literatura descrita por Rani *et al.*, (2005), se analizaron:

*Aberraciones fisiológicas*: C-mitosis, cromosomas pegajosos, células binucleadas, cromosomas retardados y/o adelantados en anafase.

*Aberraciones clastogénicas*: puentes entre cromosomas, ruptura de cromosomas y presencia de micronúcleos.

Todos los datos se evaluaron estadísticamente mediante la aplicación del software *GraphPad Prism 5.0*.

#### 4.5.1.e. Registro de imágenes

Las imágenes de las alteraciones microscópicas fueron registradas en un microscopio óptico de campo brillante complementado con cámara fotográfica digital marca Sony Cyber-shot con lente Carl Zeiss Vario Tessar 2,8-5,2/6-18 y 4,1 mega pixels MPEGMovie VX y Picture Package versión 1.6. La misma cámara digital fue empleada para documentar las alteraciones macroscópicas.

#### 4.5.2. Evaluación del potencial citogenotóxico de EAF y EAC por el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón

Se utilizaron ratones Balb/C, con las características descritas en el apartado 3.1.a. Los animales fueron aclimatados a las condiciones del laboratorio durante tres días previos al comienzo del ensayo, recibiendo una dieta balanceada comercial en forma de pellet y agua *ad libitum*. Se conformaron 7 grupos de 6 individuos para el EAF y 5 grupos de 6 individuos para el EAC, cada uno con igual cantidad de machos y hembras.

##### 4.5.2.a. Desarrollo de la prueba

Se siguió el protocolo de trabajo descrito por Schmid, (1975), que se resume en el Diagrama 4.

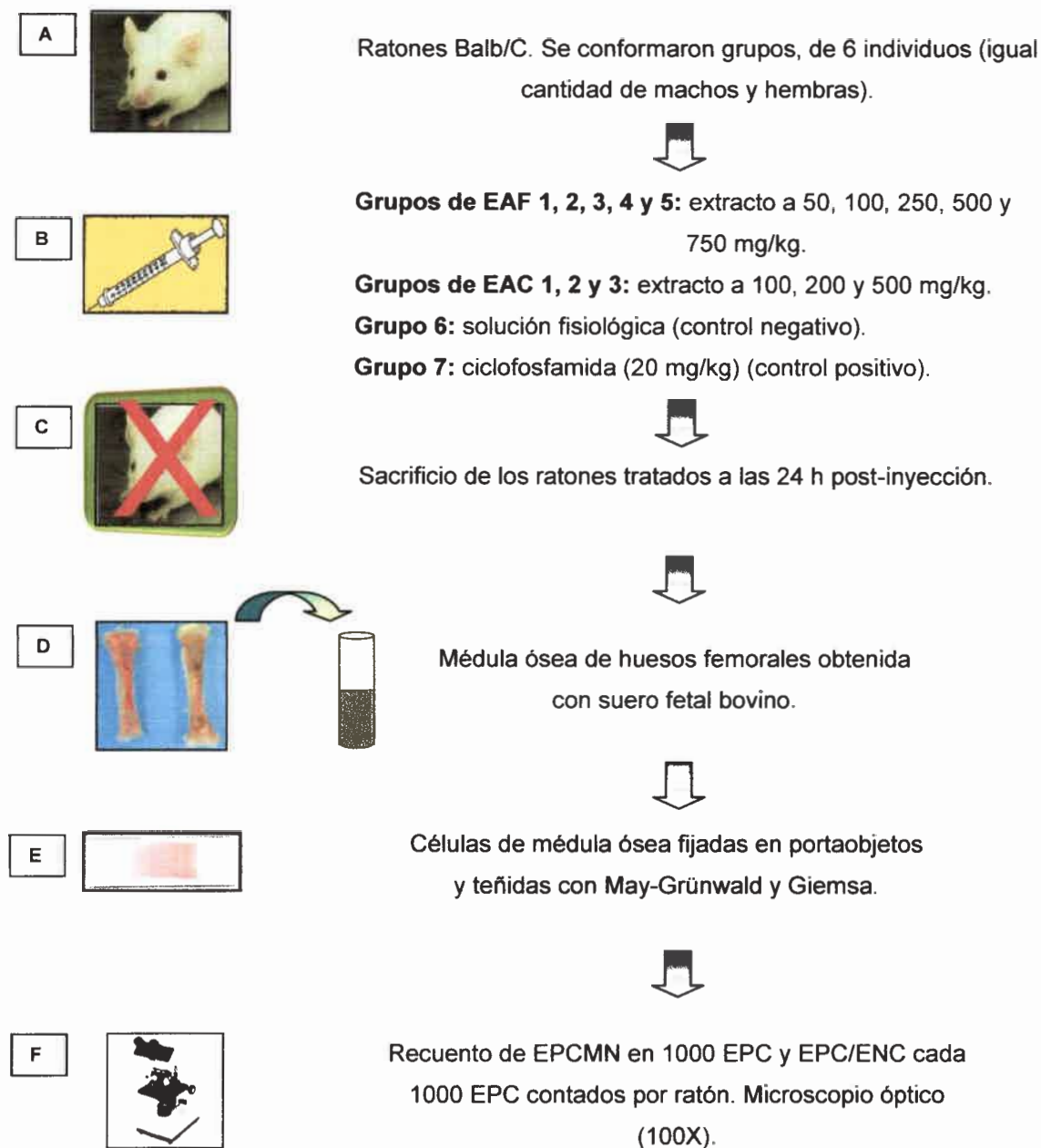


Diagrama 4. Test de Micronúcleos

Los animales recibieron, mediante inyección intraperitoneal, 0,2 ml de extracto de *A. satureioides* a razón de 50, 100, 250, 500 y 750 mg/kg de peso corporal para EAF y de 100, 200 y 500 mg/kg para EAC. El grupo control negativo se inoculó con solución fisiológica por la misma ruta y el grupo control positivo con 20 mg/kg de ciclofosfamida



(Sigma). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical a las 24 h post-inyección. Las muestras de médula de los huesos femorales obtenidas en 1 ml de suero fetal bovino para cada fémur, se homogenizaron, se centrifugaron a 1000 rpm/min, durante 5 minutos y se extendieron sobre portaobjetos que fueron fijados por flameo suave. Los preparados se tiñeron durante 3 minutos con solución May-Grünwald sin diluir. A continuación, se tiñeron por 2 minutos más con May-Grünwald diluida con agua destilada (1:1) y luego por 10 minutos en Giemsa diluida con agua destilada 1:6. Los preparados se lavaron con agua destilada, se dejaron secar al aire y se observaron al microscopio óptico efectuando el registro de 1000 eritrocitos policromáticos por animal, contando las células micronucleadas como una unidad, independientemente del número de micronúcleos presentes en cada una.

Se determinó el **índice de genotoxicidad**: número de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en un total de 1000 eritrocitos policromáticos.

Se estableció el **índice de toxicidad (IT)** considerando los eritrocitos policromáticos (EPC)/eritrocitos normocromáticos (ENC) cada 1000 EPC contados, (Castro *et al.*, 2009).

Se calculó la **Dosis letal 50%**: para cada grupo de individuos tratados con las diferentes concentraciones de extracto evaluando la tasa de mortalidad a las 24 h y expresando la DL<sub>50</sub> calculada según Reed y Muench, (1932).

#### 4.5.2.b. Análisis estadístico

La significación estadística se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA) aplicando el *software GraphPad Prism 5.0*.

#### 4.5.2.c. Registro de imágenes

Las alteraciones citogenotóxicas ejercidas por EAF y EAC sobre las células de la médula ósea de ratón se registraron con el mismo microscopio óptico y cámara digital utilizados para el registro de imágenes en el test de *Allium cepa* L (apartado 4.5.1.e.).





#### 4.6. Caracterización química preliminar de los extractos acuosos de *A. satureioides*

La aplicación de reacciones químicas de coloración permitió identificar familias de compuestos químicos presentes en EAF y EAC de *A. satureioides*.

A partir de los extractos liofilizados se prepararon 2 soluciones madre de 1 g/ml en etanol: agua (1:1), (solución A) y en agua (solución B), con el objetivo de extraer la mayor diversidad de compuestos químicos. Se determinaron, según *Harborne, (1984)*:

**Taninos:** se tomó 0,5 ml de la solución A y se agregaron 5 gotas de  $\text{FeCl}_3$  al 1% en etanol. La reacción se considera positiva si aparece precipitado o coloración azul-negruzca o pardo-verdoso. Con esta reacción es posible diferenciar los taninos hidrolizables (azul-negruzco) de los condensados (pardo-verdoso).

**Proantocianidinas:** a 1 ml de la solución A se le agregó HCl hasta llegar a pH 2 y se calentó a fuego directo. La reacción se considera positiva si toma un color rojizo, y con el agregado de n-butanol o alcohol amílico esta coloración pasa a la fracción alcohólica. Frente a un resultado positivo, las antocianidinas producidas pueden identificarse por TLC y espectroscopía.

**Saponinas:** a 2 ml de la solución B se le añadió 3 ml de agua y se agitó vigorosamente, se esperó 5 min. La reacción se considera positiva si la espuma permanece al cabo de ese tiempo.

**Hidratos de carbono reductores:** a una alícuota (2 ml) de la solución B se le agregó 3 gotas de reactivo de Molich y luego se agregó cuidadosamente por las paredes del tubo ácido sulfúrico concentrado hasta formar dos fases. La reacción se considera positiva si el límite entre las dos fases es de color rojo.

**Antraquinonas glicósidos:** reacción de Bortraëger indirecta. Se tomó 2 ml de la solución B, se le agregó 5 gotas de HCl y se colocó en baño María durante 30 min con el propósito de hidrolizar los glicósidos. Luego, la mezcla se enfrió y se extrajo con benceno. A 1 ml de benceno se le añadió 1 ml de  $\text{NH}_4(\text{OH})$ . La reacción se considera positiva cuando aparece coloración rosa-roja en la fase inferior.

**Antraquinonas aglicones:** reacción de Bortraëger directa. A 1 ml de la solución B se le agregó 1 ml de  $\text{NH}_4(\text{OH})$ . La reacción es positiva si aparece una coloración rosa-roja.

**Flavonoides glicósidos:** ensayo de Shinoda. A 2 ml de la solución B se le añadió 8 gotas de HCl y limaduras de magnesio. Luego se agregó 0,5 ml de butanol. La reacción se considera positiva si aparece una coloración rojiza que pasa a la fracción butanólica



cuando éste es agregado.

**Flavonoides aglicones:** se concentró el extracto etanólico solución A a sequedad, se retomó con 2 ml de agua destilada y se procedió como se describió para flavonoides glicósidos.

**Flavonoides sulfatados:** se tomó una alícuota de la solución B, se le agregó 8 gotas de HCl y se calentó a baño María durante 30 min. Se dejó enfriar y se le adicionó una solución acuosa de BaCl<sub>2</sub> (2 M). La reacción se considera positiva si aparece un precipitado blanco.

**Alcaloides:** a una alícuota de la solución B se le agregó HCl hasta pH 2, se realizó una prueba de toque en una placa de sílica gel y se agregó una gota de reactivo de Dragendorff. La reacción se considera positiva si aparece una coloración rojo ladrillo.

**Asperulósido:** A 2 ml de la solución B se le agregó 5 gotas de HCl y se lo calentó a fuego directo durante 3 min aproximadamente. La reacción se considera positiva si aparece una coloración verde con un precipitado oscuro (negro).

#### 4.7. Caracterización química del extracto acuoso frío

##### 4.7.1. Determinación de grupos químicos por TLC

La cromatografía es un método de análisis rápido que permite separar los constituyentes de una mezcla utilizando las diferencias de las constantes de equilibrio de estas sustancias durante su distribución entre una fase móvil y una fase estacionaria que ejerce sobre ellas un efecto de retención. Durante el proceso, los constituyentes de la mezcla se desplazan a velocidades diferentes y se separan, (Gutiérrez, 2002).

Este método presenta como ventajas principales sencillez experimental, bajo costo del equipo, rapidez del desarrollo cromatográfico, elevada resolución y nitidez en la separación de la mezcla y, alta sensibilidad en la detección de pequeñas cantidades de sustancias. Además, cuenta con la posibilidad de emplear distintos soportes estacionarios según el tipo de sustancias a separar, utilizar diversos reveladores agresivos y poder calentar la placa a temperaturas elevadas para mejor visualización de las manchas, y finalmente facilidad de extracción de las fracciones para su determinación cuantitativa.

La determinación cualitativa de los componentes de la muestra se realiza mediante la medida de las distancias recorridas por cada componente y por el disolvente, calculando el R<sub>f</sub> o el R<sub>x</sub>. El R<sub>f</sub> es el "Factor de Retención" y representa la relación entre la distancia recorrida por la sustancia y la recorrida por el frente del eluyente. Este parámetro nos indica



la afinidad relativa de la sustancia por el adsorbente o por el eluyente. El valor del Rf está condicionado por numerosos factores tales como las variaciones en la composición del líquido de desarrollo, la temperatura, que modifica el coeficiente de reparto y la viscosidad del eluyente, así como la naturaleza del adsorbente en sí y las condiciones de trabajo. Por ello, para dar el valor del Rf como una característica propia de cada sustancia hay que especificar muy claramente las condiciones en que se ha realizado el ensayo. Actualmente se emplea otro parámetro denominado Rx, que representa la relación entre la distancia recorrida por la sustancia problema y la recorrida por otra sustancia patrón de características similares, en el mismo cromatograma y durante el mismo tiempo, (Fernández Calvo, 2009).

#### 4.7.1.a. Determinación de azúcares

Se empleó como Fase Estacionaria (FE) sílica gel 60 HF 254 y como Fase Móvil (FM) acetato de etilo: isopropanol: agua destilada en una proporción 4,5:4:1,5.

Se preparó una solución muestra (SM1) de 10 mg/ml de EAF en agua destilada y se sembró en la placa realizando puntos de siembra formando bandas de 2, 4 y 6 pasadas. Se utilizaron como testigos fructosa, sacarosa y glucosa realizando 4 pasadas de cada uno. Se corrió la placa hasta una altura de 7 cm, se retiró de la cuba y se secó con calor. El cromatograma se evaluó a 254 y 366 nm de longitud de onda. Luego se pulverizó con ácido sulfúrico al 5% en metanol y se calentó en estufa a 100°C durante 5 minutos.

Un segundo cromatograma realizado bajo las mismas condiciones que el anterior y evaluado bajo UV, se pulverizó con RPN (reactivo de productos naturales) calentando con secador. Se evaluó nuevamente bajo UV a 366 nm y a luz visible, (Wagner y Blatt, 1996).

#### 4.7.1.b. Determinación de saponinas

Para este propósito, se realizaron dos corridas cromatográficas en las que se emplearon la misma FE que en el punto anterior (4.7.1.a) y dos FM diferentes. La primera FM estuvo compuesta por cloroformo: metanol: agua destilada en una proporción 70:30:4 y la segunda por n-butanol: agua destilada: acetato de etilo en una relación 10:5:2,5.

SM1 (4.7.1.a.) fue sembrada en las dos placas realizando bandas de 6 pasadas y como testigo se sembró  $\alpha$ -hederina (5 mg/ml). Las placas se corrieron en una cuba cromatográfica hasta una distancia de 7 cm. Una vez secadas al aire, se evaluaron a 254



y 366 nm. Posteriormente, se pulverizaron con el reactivo de anisaldehído sulfúrico, se calentaron en estufa a 100°C por 5 min y se evaluaron a luz visible y a luz UV a las dos longitudes de onda, (*Wagner y Bladt, 1996*).

#### 4.7.1.c. Determinación de cafeilquínicos y flavonoides glicosilados

Se empleó la misma FE que en el punto 4.7.1.a. y como FM se utilizó acetato de etilo: ác. acético: ác. fórmico: agua destilada en una proporción 100:11:11:26.

Dos soluciones muestras SM2 (1 mg/ml en agua/metanol, 1:1) y SM3 (1 mg/ml en metanol) se sembraron en bandas de 6 pasadas. Los testigos fueron ác. clorogénico, rutina, quercetina y, una mezcla de los 3 anteriores más ácido cafeico y kaempferol. Se corrió en una cuba cromatográfica hasta una altura de 7 cm, se secó al aire y se reveló. El cromatograma se evaluó bajo luz UV de 254 y 366 nm y luego, a 366 con vapores de amoníaco. El cromatograma se pulverizó con RPN calentando por 5 min con secador y se evaluó a la luz visible y a UV de 366 nm, (*Wagner y Bladt, 1996*).

#### 4.7.1.d. Determinación de flavonoides aglicones

En este estudio se utilizó la misma FE que en las determinaciones anteriores y como FM se empleó una mezcla de cloruro de metileno: metanol (9:1) a la que se le agregó 0,5 ml de ácido acético. Se sembraron en bandas de 8 pasadas la solución SM2 y de 1 pasada el testigo, quercetina. Posteriormente, se procedió según se describe en el punto anterior, (*Wagner y Bladt, 1996*).

#### 4.7.2. Análisis por HPLC/DAD

Se prepararon dos soluciones de EAF de 4 y 10 mg/ml en agua: metanol (1:1), se sonicaron durante 10 minutos, se filtraron y 20 µl de cada solución se inyectó en el cromatógrafo, en corridas independientes. Por otra parte, se inyectaron las soluciones testigos de ácido clorogénico, ácido cafeico, rutina, quercetina y kaempferol a una concentración de 0,1 mg/ml, disueltas en agua: metanol (1:1). El sistema se sometió al programa de elución descrito en el apartado 3.6.4., empleando los solventes A (ácido o-fosfórico 0,1%) y B (acetonitrilo: ácido o-fosfórico 99,9:0,1).

#### 4.8. Fraccionamiento de EAF por cromatografía en columna

Se sembró 1 g de EAF en una columna de Sephadex LH20 (2,5 x 20 cm) y se



eluyó con un gradiente de metanol (100%) a metanol: agua (9:1). Se recogieron volúmenes de 75 ml obteniéndose fracciones del extracto, las que fueron sometidas a sequedad en evaporador rotatorio.

#### **4.9. Determinación de las bioactividades de las fracciones de EAF**

##### **4.9.1. Evaluación de acción citotóxica por captación del RN**

Para cumplir este objetivo se llevó a cabo la metodología descrita en el apartado 4.4.1.2.a. Para ello, las monocapas celulares subconfluentes fueron tratadas por 48 h con diferentes concentraciones de cada fracción (10-100 µg/ml), por triplicado. El sistema incluyó como control de viabilidad celular, cultivos sin tratar con las fracciones. Una vez calculados los valores de FS, se realizó el análisis estadístico de regresión no lineal, detallado en el punto 4.4.1.2.d.

##### **4.9.2. Actividad antiviral frente al virus WEE durante la replicación intracelular**

Para evaluar la capacidad inhibitoria de las fracciones en estudio frente al virus WEE se procedió según la técnica metodológica desarrollada en el punto 4.4.2.2.b. Posterior al tiempo de adsorción y penetración del virus en los cultivos, los mismos fueron tratados con las fracciones vegetales F1, F3, F4 y F5 a la concentración de 100 µg/ml, y F2 a 20 µg/ml, en ensayos independientes. Simultáneamente se dejaron controles virales, celulares y de inocuidad de la fracción a ensayar. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

Se calcularon los títulos virales y posteriormente se determinaron los porcentajes de acción antiviral de las fracciones vegetales.

# *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

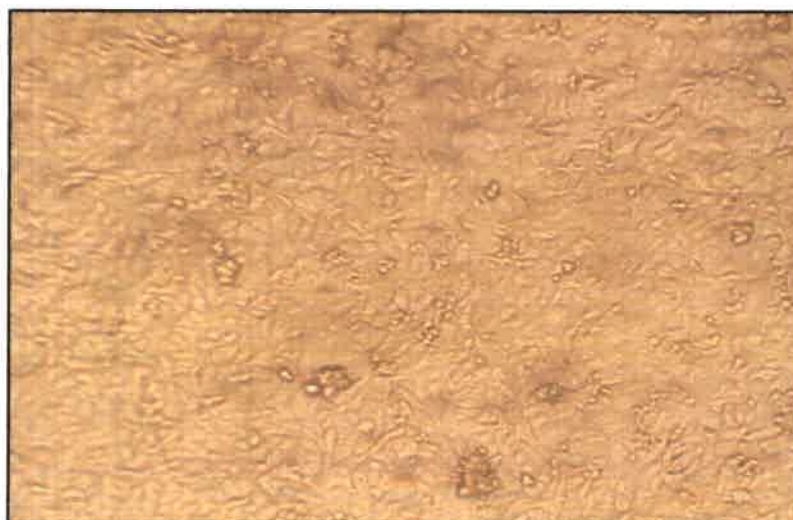


## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Propagación de la Línea Celular Vero

La confluencia de este cultivo se logró al cabo de 24-48 h post siembra, cuando la concentración inicial aproximada fue de  $2 \times 10^5$  cél/ml, (**Figura 13**).

En paralelo se pudo determinar el tiempo de conservación de las monocapas celulares en un estado morfológico compatible a células normales, establecido entre los 20-28 días de lograda la confluencia, cuando se las mantuvo a 28°C. La visualización realizada al microscopio óptico durante ese tiempo indicó ausencia de alteraciones morfológicas celulares.



**Figura 13.** Monocapa de células Vero sin infectar, normales. 10X

### 5.2. Amplificación y cuantificación de los lotes virales

#### 5.2.1. Virus *Encefalitis Equina del Oeste* (WEE) cepa AG 80-646

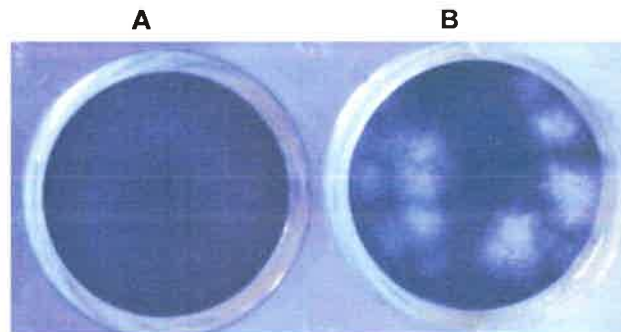
##### 5.2.1.a. Obtención del stock viral

La inoculación viral de los animales permitió observar síntomas nerviosos al cabo de 4 días post-infección, tales como alteraciones en el equilibrio. Estos resultados son los esperados ya que este huésped permite la multiplicación abundante del virus en el cerebro ocasionando dichos síntomas según lo indicado por *Bianchi, (1991)*.



### 5.2.1.b. Cuantificación de la infectividad del virus

Una vez obtenido el stock viral se procedió a cuantificar su infectividad a través del recuento de placas de lisis, las que fueron grandes y de bordes difusos (**Figura 14B**).

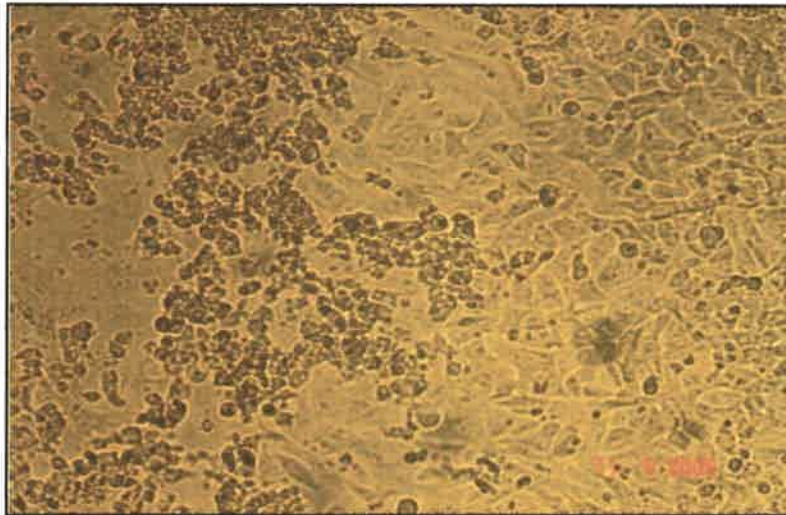


**Figura 14.** Monocapas de células Vero sin infectar (A), e infectada con el virus WEE que exhibe placas de lisis de bordes difusos (B)

La infectividad de la suspensión viral arrojó títulos virales entre  $2 \times 10^6$  y  $1,2 \times 10^7$  UFP/ml.

### 5.2.1.c. Caracterización del efecto citopático del virus WEE, cepa AG 80-646, en células Vero

Con el objeto de caracterizar los cambios morfológicos ocasionados por la infección de las monocapas de células Vero, con el virus WEE cepa AG 80-646, se realizó la técnica detallada en el ítem 4.2.1.c. La visualización al microscopio óptico invertido de los cultivos infectados mostró que a los 3-4 días p.i. pudieron detectarse cambios morfológicos en las células. El Efecto Citopático (ECP) se caracterizó por la aparición de redondeamiento y retracción de las células, con agrupamiento de algunas de ellas en forma de grumos, (**Figura 15**).



**Figura 15.** Efecto Citopático inducido por el virus WEE cepa AG 80-646 sobre monocapa de células Vero, 10X

#### 5.2.1.d. Curva de multiplicación del virus WEE cepa AG 80-646 en células Vero

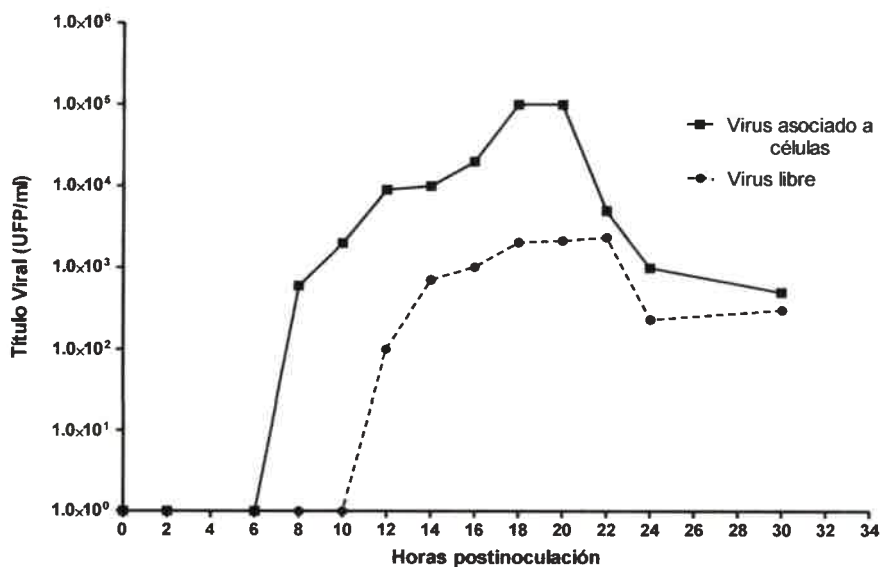
La literatura consultada sobre el ciclo de multiplicación de miembros del género *Alphavirus* indica que el tiempo requerido por el virus para la producción de una progenie viral completa está estipulado entre 10 y 20 horas, (*Schlesinger and Schlesinger, 2001*). Esta variación dependería tanto del virus como del sistema celular donde se lleve a cabo la replicación viral. La cepa AG 80-646 del virus WEE, como se indicó en materiales, fue recuperada de mosquitos infectados durante un período enzoótico y fue sometida a diferentes estudios para lograr su caracterización. *Bianchi, (1991)* evaluó los aspectos clínicos de la infección por este virus empleando modelos animales, entre ellos ratones inoculados por vía intracerebral. Estos estudios definieron un perfil patogénico del virus, sin embargo la caracterización de su ciclo de replicación empleando cultivos celulares no había sido realizada. Por tal motivo y antes de efectuar los estudios de sensibilidad del virus a la acción de los extractos de *A. satureioides*, la caracterización del ciclo de replicación del virus en células Vero fue una condición previa y necesaria.

Los títulos virales alcanzados cuando se cuantificó el virus asociado a las células y el virus libre (contenido en el sobrenadante) se resumen en la **Tabla 1** y fueron utilizados para la construcción de la **Figura 16**.



**Tabla 1.** Títulos virales, del virus asociado a las células y del virus libre, alcanzados por WEE cepa AG 80-646 a diferentes tiempos p.i., en monocapas de células Vero

Tiempo post-infección (h)	Título viral (UFP/ml)	
	Virus asociado a células	Virus libre
0	0	0
2	0	0
6	0	0
8	0	0
10	$2 \times 10^3$	0
12:30	$9 \times 10^3$	$10^2$
14	$10^4$	$7 \times 10^2$
16	$2 \times 10^4$	$10^3$
18	$10^5$	$2 \times 10^3$
20	$10^5$	$2,1 \times 10^3$
22	$5 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$
24	$10^4$	$2,3 \times 10^3$
30	$< 10^3$	$3 \times 10^2$
96	$1,9 \times 10^2$	$4,4 \times 10^5$



**Figura 16.** Curva de replicación del virus WEE cepa AG 80-646 en células Vero



El análisis de la curva reveló que el virus WEE cepa AG 80-646 requirió un período de tiempo superior a 8 h p.i. para que se detecten partículas virales infectivas asociadas a las células (**Tabla 1**) mientras que recién a las 12 horas aparecen partículas virales a nivel extracelular. Esto confirma la capacidad del virus para gemar a partir de membranas intracitoplasmáticas.

Entre los tiempos comprendidos entre 8 y 12 h ocurren los eventos finales de la replicación viral que incluyen la gemación a nivel de membranas de organelas internas como a nivel de membrana citoplasmática. Entre las 0 y 8 h p.i. acontece la producción inicial de virus, que implica procesos metabólicos-fisiológicos del virus asociado a la célula, tal como la transcripción y traducción de diversos ARNm virales que conducen a la formación de la progenie viral.

Por otra parte, los resultados obtenidos muestran que el ciclo de replicación del virus WEE demanda alrededor de 12 horas. Respecto a la máxima producción alcanzada, se puede observar que esta ocurre entre las 18 y 20 h p.i. para el virus asociado a las células, mientras que para el virus libre se alcanza a las 96 h.

## **5.2.2. Virus *Herpes suis* tipo 1, cepa RC/79**

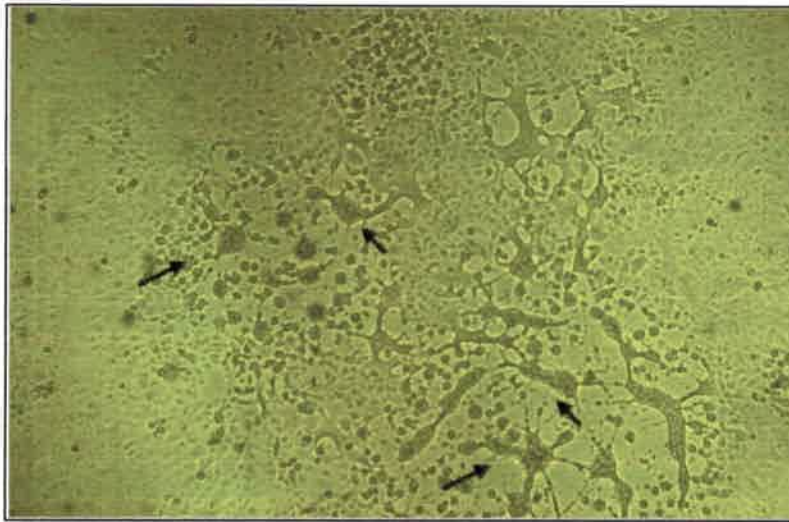
### **5.2.2.a. Obtención del stock viral**

Para producir el stock viral fue necesario amplificar la semilla por infección de monocapas de células Vero y titular inmediatamente el virus en todas las experiencias. Esta metodología se realizó porque se sabe que el virus *H. suis*, aún conservándolo a 4°C, puede disminuir su infectividad, (Sabini, 1996).

La visualización al microscopio óptico de los cambios inducidos por el virus permitió identificar el efecto citopático (ECP) que caracteriza la cepa viral problema, (Sabini, 1996; 2000).

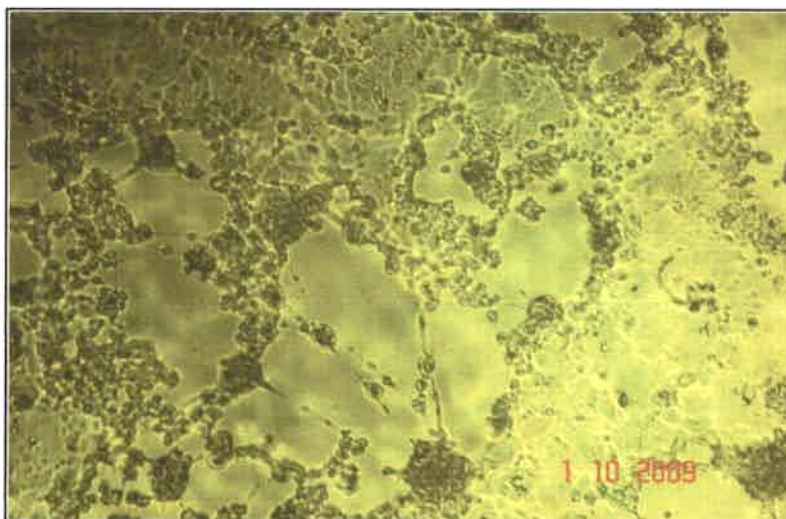
Fue posible observar al comienzo, la formación de grupos de células redondeadas de gran tamaño y refringentes que generaron los típicos sincitios descritos en la literatura (**Figura 17**), los que posteriormente, entre las 36 y 48 h p.i. se constituyeron en focos de lisis con desprendimiento de las células de la pared del vidrio permitiendo observar verdaderos huecos en la monocapa.





**Figura 17.** Monocapa de células Vero infectada con *Herpes suis tipo 1*, mostrando sincitios. 10X

Un cierto número de células que no sufrieron lisis quedaron unidas a otras que las rodeaban por conexiones citoplasmáticas, dando el aspecto de formaciones asteroideas (**Figura 18**).



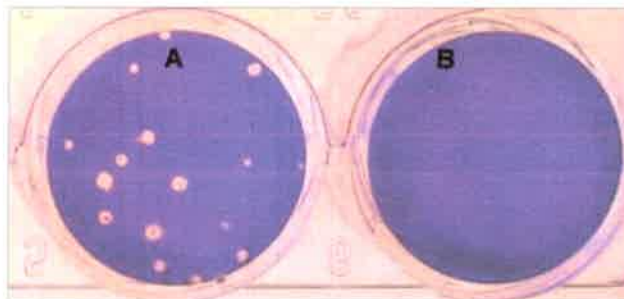
**Figura 18.** Monocapa celular Vero infectada con *Herpes suis tipo 1* mostrando una formación asteroide. 20X



### 5.2.2.b. Cuantificación de la infectividad del virus

Una vez amplificada la semilla viral se procedió a cuantificar su infectividad a través del recuento de placas de lisis (*Dulbecco, 1962*), las que fueron nítidas y de bordes regulares (**Figura 19A**).

El título viral obtenido en los diferentes ensayos fluctuó entre  $10^5$  y  $10^7$  UFP/ml.



**Figura 19.** Monocapas de células Vero, infectada con el virus *Herpes suis tipo 1* mostrando placas de lisis típicas (A) y sin infectar (B)

### 5.3. Obtención de los extractos de *Achyrocline satureioides*

Los extractos de *A. satureioides* se obtuvieron siguiendo la metodología que se describió en el punto 4.3.

De todos los extractos obtenidos pudo lograrse un rendimiento p/p significativamente superior en aquellos cuyos solventes de extracción fueron de mayor polaridad, tales como los dos extractos acuosos y en menor grado el EM (**Tabla 2**).

El que presentó el mayor rendimiento fue EAC, en el que se se obtuvieron 2 g de extracto liofilizado cuando se partió de 35 g de vegetal seco, y significó un 5,76% de rendimiento p/p.

La búsqueda en la base de datos refiere valores de rendimiento para extractos polares inferiores al 20% (*Tan et al., 2005*), coincidiendo con los rendimientos obtenidos aquí.



Tabla 2. Rendimiento de los extractos acuosos y orgánicos de *Achyrocline satureioides*.

Material vegetal	Extracto Vegetal				
	n-Hexánico	Clorofórmico	Metanólico	Acuoso frío	Acuoso caliente
Peso Inicial (g)	800	800	800	42	35
Peso Final (g)	3,05	3,61	13,23	2	2
Volumen de solvente (ml)	3500	3500	3500	1960	1630
Rendimiento % p/p	0,381	0,451	1,65	4,76	5,71
Características Físicas	Marrón claro, extremadamente viscoso	Marrón oscuro, pegajoso	Marrón oscuro, denso	Tostado, fino	Beige, voluminoso

Si se comparan los resultados del presente estudio con los obtenidos con otro extracto de *Achyrocline satureioides* elaborado y estudiado por Zanon, (2005), podemos deducir que dicho extracto (etanólico) presentó un rendimiento del 12%, representando más del doble de los rendimientos de los EAC y EAF de este trabajo y con un dígito de diferencia respecto del EM. Esta diferencia de los porcentajes de sólidos totales puede deberse a varias razones. El método extractivo que no fue secuencial, y el solvente empleado (etanol) por esta autora probablemente permitieron extraer mayor cantidad de compuestos. La época de recolección también fue diferente: primavera-verano para el extracto etanólico, y otoño para los extractos acuosos y metanólico. El lugar geográfico de recolección del material, Piedra Blanca para el extracto etanólico y Alpa Corral para el presente trabajo, constituye otro de los factores que podrían ser responsables de la diferencia entre los rendimientos. Numerosas investigaciones indican que hay una gran variación de componentes químicos bioactivos extraídos de vegetales, dichas variaciones estarían condicionadas al tipo de suelo y a los factores climáticos y ecológicos del lugar donde crece la planta, (Domínguez, 1973; Zygadlo et al., 1996; Álvarez et al., 1998).



## 5.4. Determinación de acciones biológicas de los extractos

### 5.4.1. Ensayos de citotoxicidad

#### 5.4.1.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC)

La interpretación de la MCNC representa, como fue mencionado en el apartado 4.4.1.1., la máxima concentración de la muestra vegetal posible de utilizar sin que ocasione efectos tóxicos sobre su morfología o altere la viabilidad celular pudiendo, en consecuencia, ser empleada en los ensayos de actividad antiviral. De esta manera es posible asegurar que la inhibición de la multiplicación viral es debida sólo a una acción directa sobre la replicación viral y no sobre la célula huésped que la soporta, (Andrei et al., 1985; Hudson, 1990; García, 1999).

Los extractos obtenidos de *A. satureioides* fueron sometidos a los estudios de toxicidad sobre las células Vero y fue posible determinar el valor de MCNC para cada uno de ellos a excepción del EH, que dada sus características físicas no fue posible de disolver en DMSO a la concentración del 1%, máximo valor tolerado por las células en monocapas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Determinación de valores de Máxima Concentración No Citotóxica de extractos obtenidos de *Achyrocline satureioides* empleando células Vero.

	Extractos ensayados				
	EAF	EAC	EH	EC	EM
MCNC ( $\mu\text{g/ml}$ )	480	260	ND	40	50

ND: No determinado

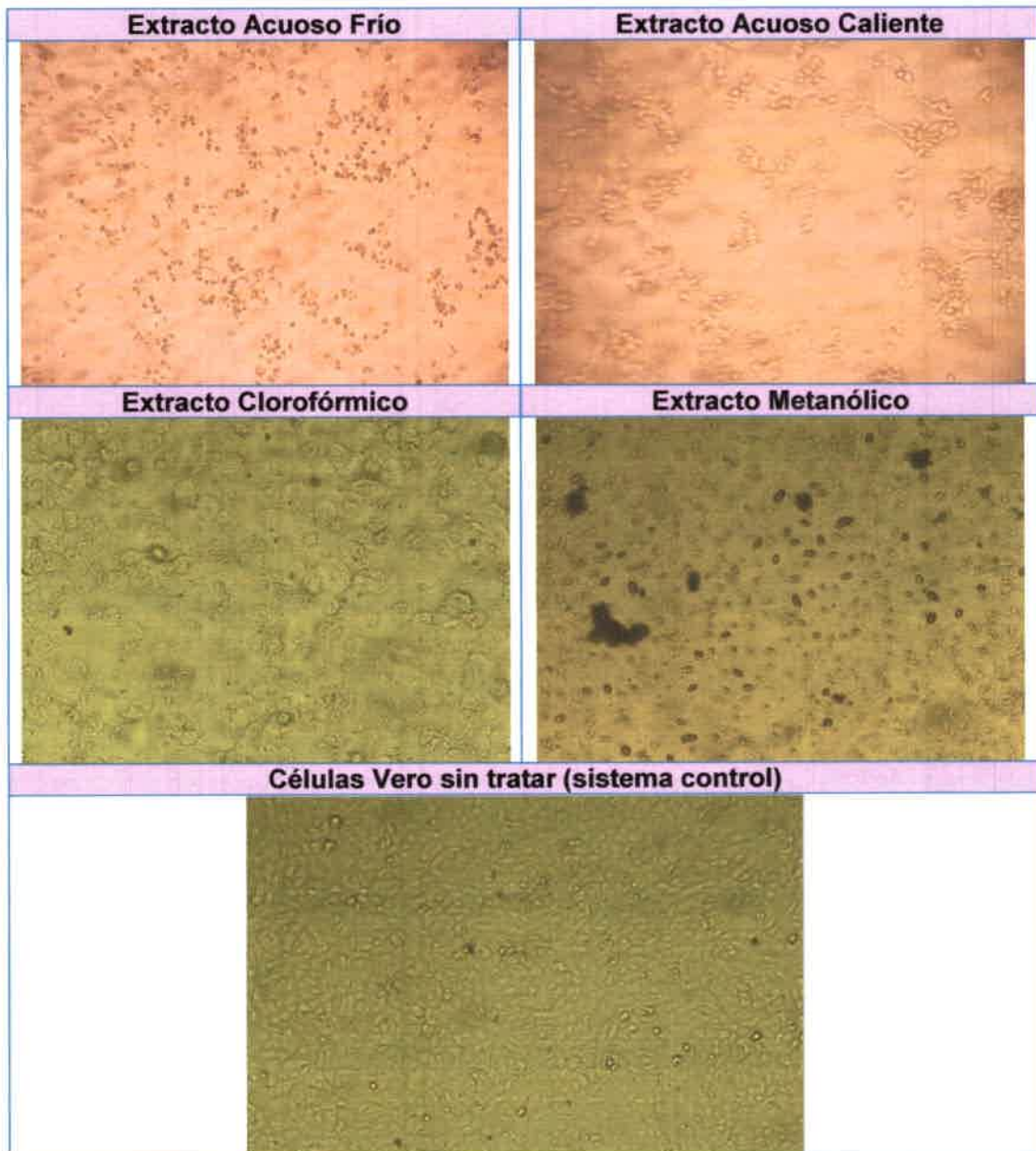
Los valores expresados se infirieron desde los aspectos morfológicos visualizados en las monocapas tratadas con las distintas concentraciones ensayadas de los extractos vegetales. En la **Figura 20** se exhiben las modificaciones generadas en la estructura de la monocapa celular cuando cada muestra vegetal resultó tóxica para las células.

El daño celular ejercido por los extractos vegetales se describió como alteraciones de las células en su morfología y disposición, con desprendimiento de aquellas muertas que condujo a una ruptura de la continuidad de la monocapa. Las células que permanecieron adheridas a la superficie del vidrio o plástico se exhibieron como agrumadas, globosas, a veces con refringencia y también oscurecidas. No se pudo demostrar que esas alteraciones fueran diferentes para cada extracto o que cada uno de



Resultados y Discusión

ellos ejerciera un daño particular. Tampoco pudo evidenciarse una relación dosis-respuesta es decir, dichas alteraciones estructurales no fueron mayores a concentraciones más elevadas del extracto ensayado. Los sistemas celulares no tratados con los extractos (controles), exhibieron una morfología normal durante toda la experiencia.



**Figura 20.** Aspectos morfológicos de células Vero en monocapas tratadas con concentraciones tóxicas de extractos acuosos y orgánicos obtenidos de *A. satureioides*





Los valores de concentraciones tóxicas obtenidos mediante este método se encuentran dentro de los informados por otros investigadores. El análisis bibliográfico muestra que las MCNC se encuentran en el orden de tres dígitos y en microgramos. Los datos vertidos por *Kott et al.*, (1999) trabajando con extractos acuosos de numerosas plantas medicinales de Argentina indican valores de MCNC >450 µg/ml. De igual forma las MCNC expresadas por *Schnitzler et al.*, (2008) para extractos acuosos y etanólicos de la planta *Salvia officinalis* cultivada en Alemania bajo condiciones climáticas diferentes, señalan valores del orden 272,3 µg/ml.

El análisis comparativo de las MCNC de los extractos polares obtenidos de *Achyrocline satureioides* con las de extractos acuosos de otras plantas, permitió deducir que la MCNC fue mayor para el EAF y el valor del EAC fue semejante a los obtenidos sobre células Vero para: *Lithraea molleoides*; *Sebastiania brasiliensis* y *Sebastiania klotzschiana* cuyos valores de MCNC fueron mayores que 250 µg/ml; en tanto que *Myrcianthes cisplatensis* resultó más tóxica ya que arrojó un valor de 100 µg/ml; y la toxicidad de *Polygonum punctatum* fue semejante a la del EAF, con un valor superior a 450 µg/ml, (*Kott et al.*, 1999).

Por otra parte, si se correlacionan los valores de MCNC determinados para los extractos acuosos de *A. satureioides* con el del extracto etanólico de la misma especie vegetal informado por *Zanon*, (2005), este último presentó una MCNC de 470 µg/ml semejante al valor del EAF (480 µg/ml).

Los datos registrados en estos ensayos y comparados con otros estudios, confirman que el comportamiento de los extractos acuosos y orgánicos de *A. satureioides*, en relación a su potencial citotóxico, se encuentra dentro de los parámetros generales y normales registrados para los extractos obtenidos de numerosas plantas medicinales, (*Kudi y Myint*, 1999; *Wang et al.*, 2008).

#### 5.4.1.2. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>)

La determinación de la MCNC es un indicador válido del grado de toxicidad del extracto estudiado pero no deja de ser un estudio subjetivo, ya que se basa en resultados cualitativos y que dependen del criterio del observador.

En ocasiones es frecuente encontrar cambios morfológicos visibles al microscopio que no se correlacionan con la viabilidad celular. Por esta razón resultó necesario cuantificar la viabilidad de los cultivos tratados por las técnicas de captación de RN y



reducción de MTT ya que estas metodologías permiten conocer valores de  $CC_{50}$ , imprescindibles para calcular el Índice de Selectividad (IS). Este parámetro se describe como la relación entre la actividad citotóxica y antiviral de una sustancia (*Chiang et al., 2002; Cheng et al., 2008; Schnitzler et al., 2008*) y en general esa relación es en función de valores activos medios: Concentración Citotóxica 50% ( $CC_{50}$ ) y Concentración Inhibitoria viral 50% ( $CI_{50}$ ).

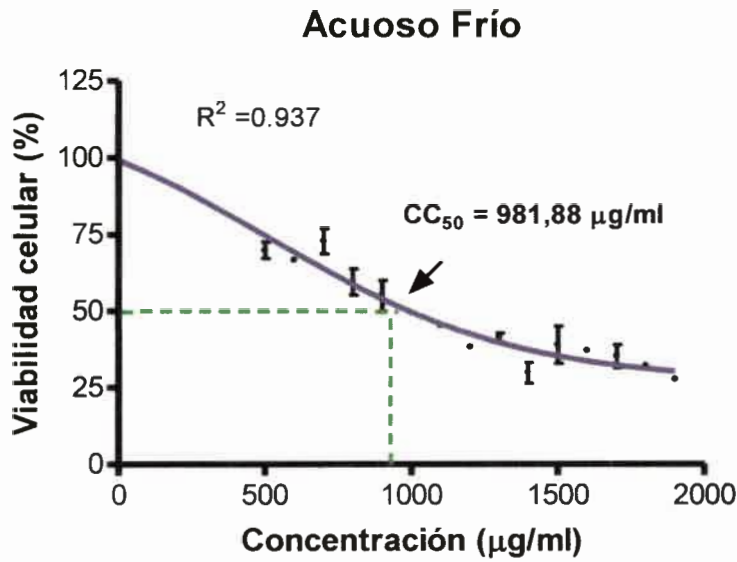
Estos datos son fundamentales para definir la selectividad de acción de los extractos con el propósito de obtener nuevas drogas útiles para tratamientos antivirales; las que serían de mucha utilidad para tratar enfermedades producidas por los virus del género *Alphavirus* causantes de encefalitis, enfermedad que provoca graves pérdidas económicas.

#### 5.4.1.2.a. Por captación del Rojo Neutro (RN)

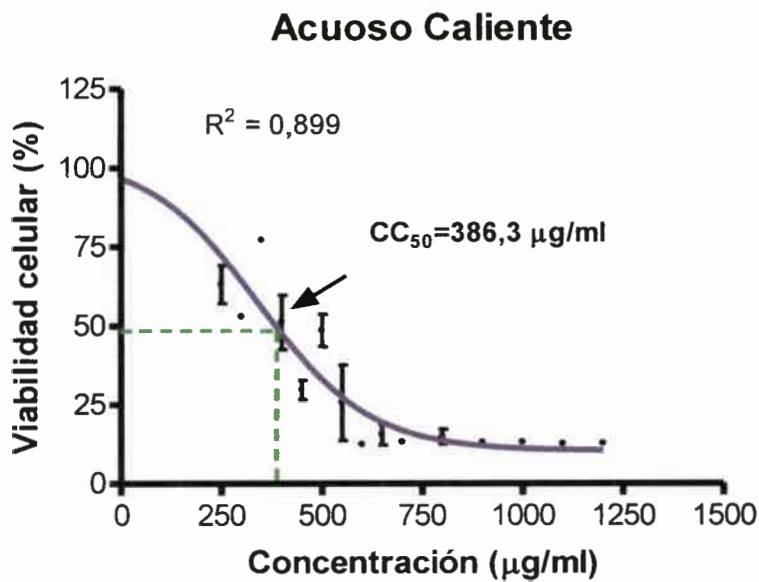
Cuando se estudiaron los extractos de *A. satureioides* mediante la prueba del RN, se obtuvieron los valores de  $CC_{50}$  para todos ellos. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular luego del tratamiento respecto de los valores obtenidos en el sistema control. Las  $CC_{50}$  fueron calculadas por intrapolación de las curvas dosis-respuesta exhibidas en las **Figuras 21A-B y 22A-B**. En todos los casos, los valores del coeficiente de determinación  $R^2$  fueron superiores a 0,90 validando el método, indicando la correlación entre los puntos graficados y confirmando una relación dosis-respuesta.

Los valores expresados en las figuras representan el promedio de tres determinaciones independientes.



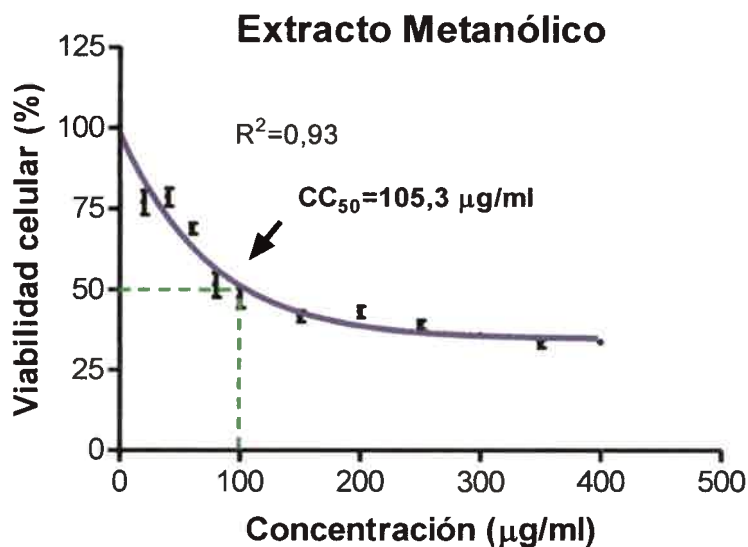


EAF ( $\mu\text{g/ml}$ )	Promedio % Viabilidad
0	100
500	70
600	66,7
700	72,6
800	60
900	55,1
1000	49,6
1100	45,3
1200	38,1
1300	41,4
1400	29,2
1500	39
1600	37
1700	35,3
1800	32,2
1900	27,4

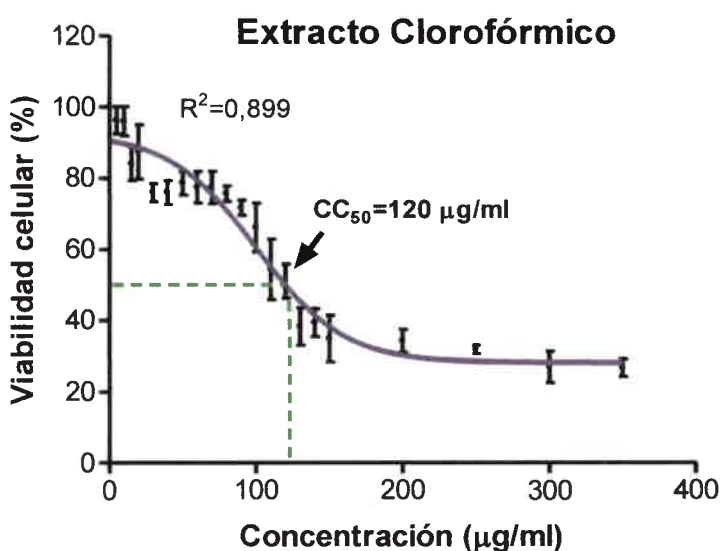


EAC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Promedio % Viabilidad
0	100
250	67,8
300	52,5
350	62,7
400	48,34
450	28
500	36
550	36,4
600	22,6
650	19,2
700	20,17
800	17,5
900	13,85
1000	13,2
1100	12,7
1200	12,85

**Figura 21A-B.** Curvas de sobrevivencia de células Vero en fase estacionaria, determinadas por captación de RN, luego del tratamiento con extractos de *A. satureioides*: (A) EAF; (B) EAC



EM ( $\mu\text{g/ml}$ )	Promedio % Viabilidad
0	100
20	76,70
40	78,63
60	68,87
80	51,40
100	47,32
150	41,65
200	42,96
250	39,11
300	35,57
350	33,13
400	33,39



EC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Promedio % Viabilidad
0	100
5	96,23
10	96,23
15	84,06
20	65,52
30	76,00
40	76,00
50	78,56
60	77,50
70	77,41
80	75,66
90	71,76
100	66,2
110	54,4
120	51,06
130	38,26
140	39,35
150	34,86
200	34,26
250	31,83
300	26,93
350	26,73

**Figura 22A-B.** Curvas de supervivencia de células Vero en fase estacionaria, determinadas por captación de RN, luego del tratamiento con extractos de *A. satureioides*: (A) EM; (B) EC

Los valores de  $CC_{50}$  obtenidos mediante captación de RN, calculados de las figuras precedentes se presentan en la **Tabla 4** junto con los valores de MCNC, con el propósito de efectuar un análisis comparativo entre ellos.



**Tabla 4.** Valores de Máxima Concentración No Citotóxica y  $CC_{50}$ , cuantificada por captación de RN, de extractos acuosos y orgánicos de *A. satureioides* en células Vero.

Extractos de <i>A. satureioides</i>	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )		Toxicidad creciente
	MCNC	$CC_{50}$ (%)	
Acuoso frío	480	809,3	↓
Acuoso caliente	260	386,3	
Clorofórmico	50	120	
Metanólico	40	105,3	

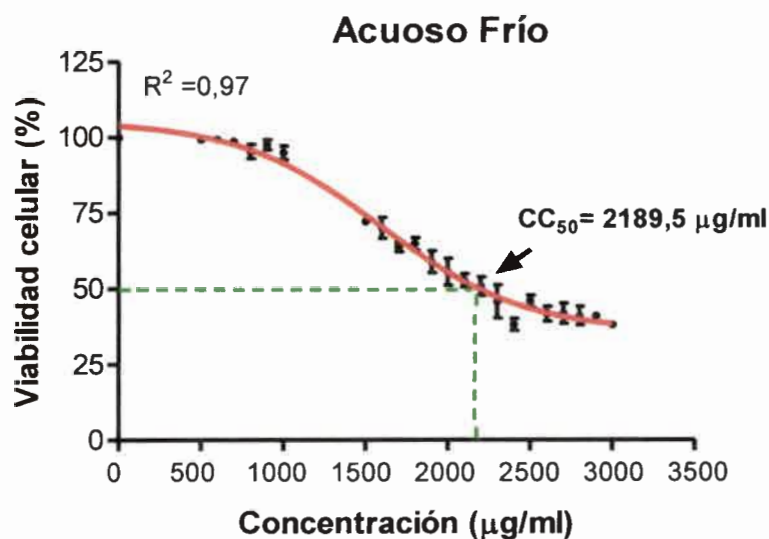
En función de las determinaciones realizadas pudo establecerse un orden de toxicidad creciente por ambos métodos, el que fue consistente ya que hubo correlación entre los datos, indicando que el EM fue el más tóxico de todos los extractos evaluados y el EAF resultó el mejor tolerado por las células a altas concentraciones. Es probable que las moléculas presentes en el EAF, arrastradas con un solvente muy polar y en frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ) tengan una naturaleza química que no induzcan daño celular porque estarían imposibilitadas de interactuar con los componentes lipoproteicos de membrana, en contraposición a aquellas moléculas que estarían presentes en el EAC.

#### 5.4.1.2.b. Por reducción de MTT

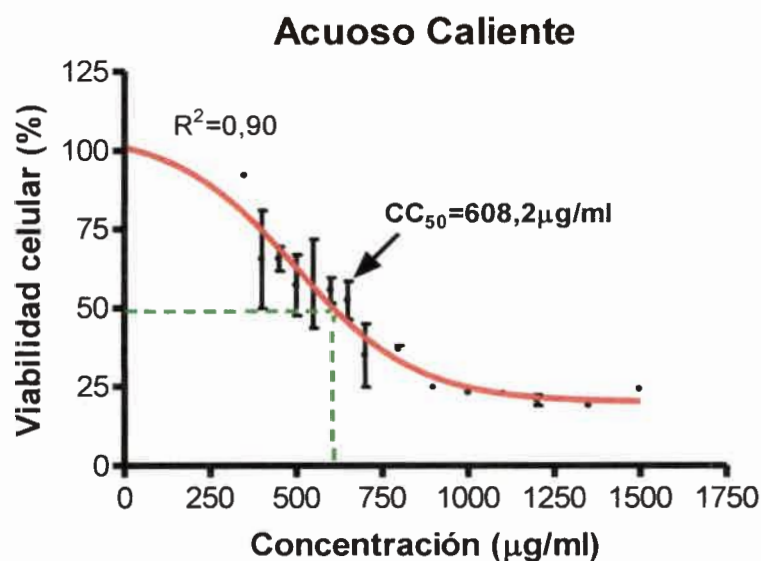
Para la determinación de los valores de  $CC_{50}$  de los extractos de *A. satureioides* se llevó a cabo la metodología detallada en el apartado 4.4.1.2.b. Los resultados fueron expresados como porcentaje de viabilidad celular remanente luego del tratamiento respecto de los valores obtenidos en el control celular sin tratar. Las  $CC_{50}$  fueron calculadas por intrapolación de las curvas dosis-respuesta exhibidas en las **Figuras 23A-B** y **24A-B**. En todos los casos los valores del coeficiente de determinación  $R^2$  fueron superiores a 0,90 validando el método, indicando la correlación entre los puntos graficados y confirmando una relación dosis-respuesta.



Resultados y Discusión



EAF (µg/ml)	Promedio % Viabilidad
0	100
500	100
600	100
700	99
800	93,1
900	96,3
1000	90,5
1500	72
1600	66,5
1700	63,5
1800	64
1900	58,6
2000	55,6
2100	52,6
2200	50,8
2300	45,7
2400	38,3
2500	45,9
2600	41,6
2700	42
2800	41,03
2900	40,8
3000	38,1

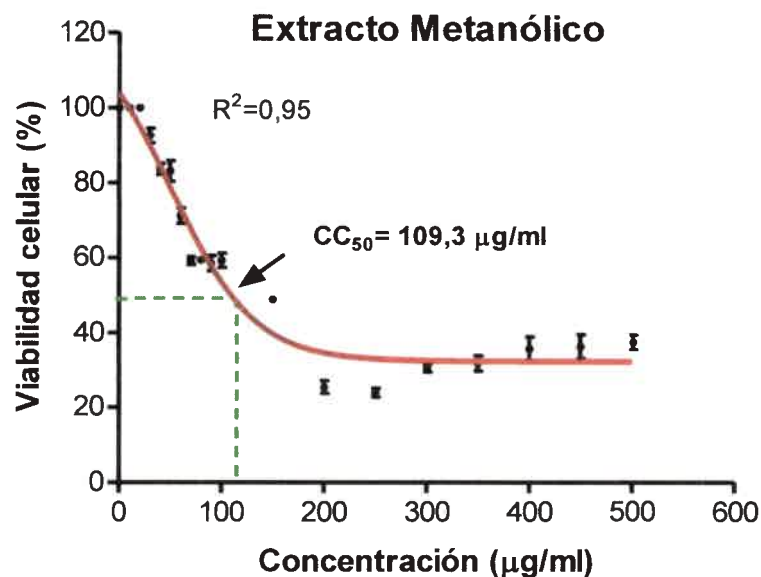


EAC (µg/ml)	Promedio % Viabilidad
0	100
350	84
400	72
450	64
500	53
550	47,4
600	52
650	48
700	31
800	40,4
900	30,3
1000	22
1100	23,7
1200	24
1350	19,5
1500	25

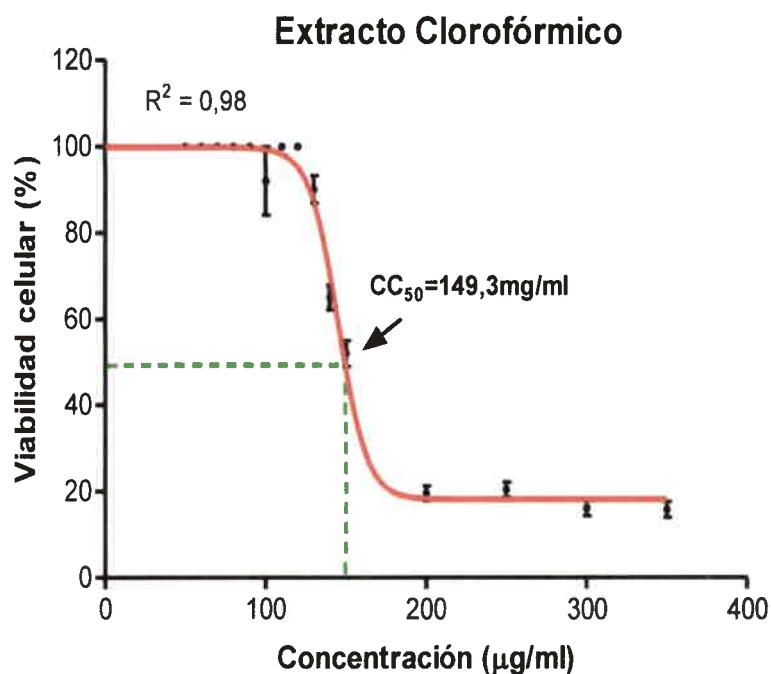
Figura 23A-B. Curvas de sobrevivencia de células Vero en fase estacionaria, determinadas por reducción de MTT, luego del tratamiento con extractos de *A. saturoioides*: (A) EAF; (B) EAC



Resultados y Discusión



EM ( $\mu\text{g/ml}$ )	Promedio % Viabilidad
0	100
10	100
20	100
30	92,56
40	83,62
50	83,14
60	71,28
70	59,22
80	59,41
90	58,57
100	59,32
150	48,77
200	25,42
250	23,91
300	30,51
350	31,82
400	35,78
450	36,34
500	37,38



EC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Promedio % Viabilidad
0	100
50	100
60	100
70	100
80	100
90	100
100	92,1
110	100
120	100
130	90,2
140	65,1
150	52
200	19,56
250	20,46
300	16,1
350	15,8

Figura 24A-B. Curvas de supervivencia de células Vero en fase estacionaria, determinadas por reducción de MTT, luego del tratamiento con extractos de *A. satureioides*: (A) EM; (B) EC



Los valores de  $CC_{50}$  obtenidos mediante reducción de MTT, calculados de las figuras precedentes se presentan en la **Tabla 5** junto con los valores de MCNC, con el propósito de efectuar un análisis comparativo entre ellos.

**Tabla 5.** Valores de Máxima Concentración No Citotóxica y  $CC_{50}$  cuantificada por reducción de MTT, de extractos acuosos y orgánicos de *A. satureioides* en células Vero.

Extractos de <i>A. satureioides</i>	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )		Toxicidad creciente
	MCNC	$CC_{50}$ (%)	
Acuoso frío	480	2189,5	↓
Acuoso caliente	260	608,2	
Clorofórmico	50	143,9	
Metanólico	40	109,3	

El análisis de los datos precedentes nuevamente permitió establecer un orden de toxicidad creciente para la  $CC_{50}$  por reducción de MTT respecto de la MCNC, siendo dichos valores igualmente consistentes, con absoluta correlación.

La  $CC_{50}$ , valorada por cualquiera de los dos métodos seleccionados, representa un valor de toxicidad donde el 50% de células están vivas, mientras que la MCNC indicaría un valor de concentración de cada extracto vegetal en la que el 100% de las células permanecen viables y tendrían un comportamiento similar al sistema control.

Para verificar si lo expresado anteriormente se corrobora, se extrapola en cada curva de viabilidad celular post-tratamiento con los distintos extractos vegetales el valor de cada MCNC alcanzado. Este análisis indicó que en general no hubo buena correlación, ya que la viabilidad de las células tratadas a la MCNC alcanzó valores cercanos al 75%, a excepción del EAC y el EC los que evaluados por MTT arrojaron valores superiores al 95% de células viables, (**Tabla 6**).





**Tabla 6.** Correlación entre valores de viabilidad celular porcentual obtenidos por tres métodos diferentes en células Vero.

Extractos de <i>A. satureioides</i>	MCNC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Viabilidad celular porcentual alcanzada al valor de MCNC por	
		RN	MTT
Acuoso Frío	480	72	75
Acuoso Caliente	260	75	95
Metanólico	40	67,5	79
Clorofórmico	50	85	99,8

Esta diferencia de viabilidad alcanzada indicaría efectos intracelulares debido a la exposición a los extractos antes de que ocurra cualquier daño permanente en la membrana celular. La diferencia en sensibilidad entre la determinación de la MCNC respecto de los valores de  $CC_{50}$  puede ser debida a que MCNC solo refiere a modificaciones morfológicas y su cuantificación se hace por métodos menos precisos ya que están acotados a la visualización, con la limitante de la interpretación de quien la evalúa, mientras que la  $CC_{50}$  indica citotoxicidad por alteraciones fisiológicas y al evaluarse por métodos colorimétricos, su lectura depende de aparatos más sensibles que la simple visualización.

Si sólo se analizan los datos de  $CC_{50}$  obtenidos con los dos métodos colorimétricos desarrollados puede notarse que para todos los extractos vegetales ensayados la técnica de RN resultó más sensible que el ensayo de MTT, (Tabla 7).

**Tabla 7.** Datos comparativos de valores de  $CC_{50}$  alcanzados por métodos colorimétricos diferentes empleando células Vero en monocapas.

Extractos de <i>A. satureioides</i>	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	RN	MTT
Acuoso Frío	809,3	2189,5
Acuoso Caliente	386,3	608,2
Metanólico	105	109,3
Clorofórmico	120	143,9



Se aprecia claramente que por la técnica de RN se requirió, en general, menor concentración de los extractos para inducir muerte celular en el 50% del sistema, respecto de lo alcanzado por MTT. Puede aseverarse que inicialmente se vería más afectada la actividad lisosomal de las células y luego su capacidad mitocondrial.

Se ha indicado que la inhibición de la respiración mitocondrial induce la aparición de moléculas reactivas del oxígeno que se relacionan con la muerte celular. Dichas moléculas pueden ser generadas dentro de la mitocondria y consecuentemente dañar otros componentes mitocondriales, (Koizumi et al., 1996). Por lo tanto, un ensayo basado en la actividad respiratoria mitocondrial, tal el caso del MTT, estaría indicando signos tempranos de toxicidad a la hora de exponer células a sustancias tóxicas.

Tanto la captación de RN como la reducción de MTT son técnicas útiles, pero en forma individual reportan menor información que desarrolladas en conjunto. La combinación o comparación del efecto de un extracto cuando se aplican ambas técnicas, permite distinguir o precisar la organela más afectada.

Finalmente desde la observación de las **Figuras 21, 22, 23 y 24** claramente puede decirse que, si bien se demostró una relación dosis-respuesta, en ningún caso las mismas fueron lineales para ningún extracto y por ninguno de los dos métodos colorimétricos. Esto justificó la presentación y análisis de los datos como curva de tipo sigmoidea y con la necesidad del análisis del valor de regresión lineal  $R^2$  el que, como se indicó, al ser  $\geq 0,90$  validó todos los ensayos.

Sobre la base de los resultados de toxicidad obtenidos con los extractos de *Achyrocline satureioides* se pudo demostrar que estos presentaron valores de concentraciones citotóxicas del orden de microgramos, independientemente del método desarrollado. Esto se correlaciona con numerosos reportes bibliográficos de estudios abocados a la búsqueda de antivirales desde fuentes naturales, en particular de plantas medicinales y aromáticas, (Cella et al., 2004; Mestrimer et al., 2006; Melo et al., 2008).

Atento a las consideraciones vertidas por *National Cancer Institute* (Geran et al., 1972), que declaró que aquellas sustancias con  $CC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$  deben ser consideradas citotóxicas contra las células tratadas y deberían eventualmente ser estudiadas como potenciales antitumorales. Conforme a los resultados obtenidos en estos ensayos, se concluye que ninguno de los extractos de *A. satureioides* fueron tóxicos.

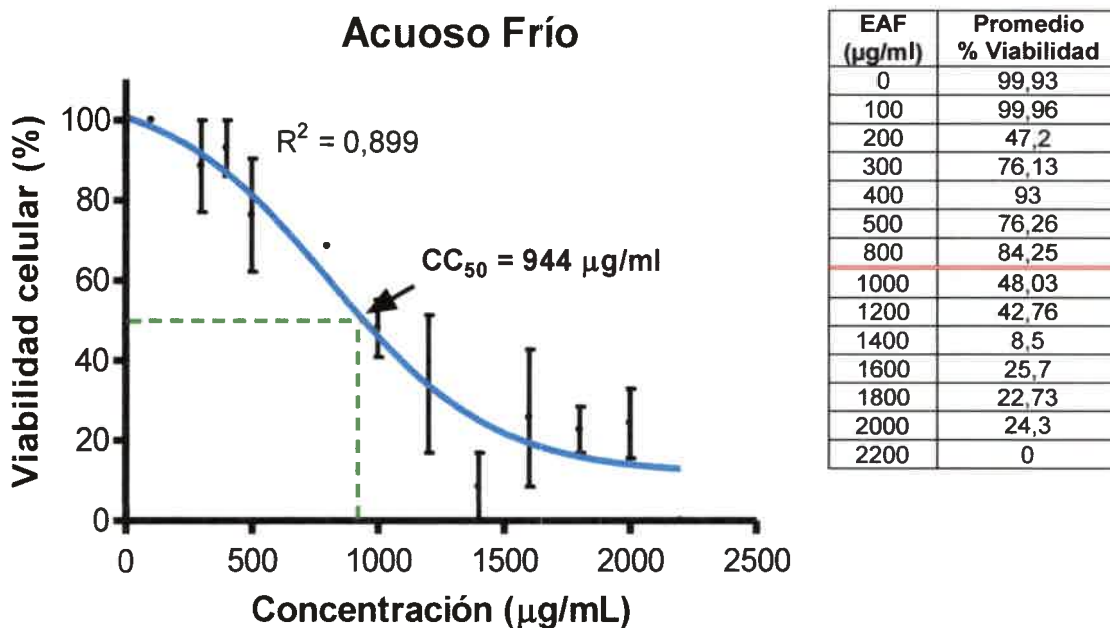
Considerando que los EAF y EAC fueron los menos tóxicos, se delinearon las investigaciones para estudios antivirales sólo con estos dos extractos, profundizándose



además el estudio de la capacidad citotóxica mediante la técnica de exclusión al azul tripán para el EAF exclusivamente.

#### 5.4.1.2.c. Por tinción por exclusión al azul tripán (AT)

Los estudios de la capacidad citotóxica del EAF de *A. satureioides* mediante esta técnica permitieron obtener el valor de  $CC_{50}$  que fue calculado por intrapolación de la curva dosis-respuesta exhibida en la **Figura 25**. El valor del coeficiente de determinación  $R^2$  fue de 0,899 validando el método, indicando la correlación entre los puntos graficados y confirmando una relación dosis-respuesta. Tal como se observa en la figura, el EAF mostró una  $CC_{50}$  de 944  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 25.** Curva de sobrevivencia de células Vero en fase estacionaria, determinada por exclusión al azul tripán, luego del tratamiento con EAF de *Achyrocline satureioides*

Mediante el análisis comparativo de los valores de  $CC_{50}$  obtenidos por MTT (2189,5  $\mu\text{g/ml}$ ) y RN (809,30  $\mu\text{g/ml}$ ) se puede inferir que el valor arrojado por la técnica de exclusión a la tinción al azul tripán es semejante al obtenido por RN. Teniendo en cuenta que esta última técnica brinda información del funcionamiento de la fagocitosis, proceso que involucra membranas, se puede pensar que la similitud entre estos valores es lógica y coherente, indicando además, confiabilidad de los resultados.



#### 5.4.2. Evaluación de la actividad antiviral de los extractos acuosos frente al virus WEE

Para el estudio de compuestos con potencial actividad antiviral se disponen de diferentes técnicas metodológicas tales como la disminución del ECP, la disminución de la producción viral y la reducción en el número de placas de lisis.

En este trabajo se seleccionó esta última técnica debido a que es un ensayo cuantitativo y por lo tanto objetivo, y por otra parte de igual sensibilidad que el método de inhibición de la producción viral pero con las ventajas de ser menos laborioso y requerir menos tiempo que este último, (Pujol, 1995).

##### 5.4.2.1. Screening antiviral durante todo el ciclo replicativo viral

En este estudio los extractos acuosos estuvieron presentes en los cultivos celulares durante todo el ciclo de replicación del virus, es decir desde el momento de la infección hasta la liberación de las partículas virales hijas.

Los resultados de estas experiencias sobre el análisis de acción inhibitoria frente al virus WEE de los extractos acuosos obtenidos de *Achyrocline satureioides* se resumen en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Actividad inhibitoria de extractos acuosos de *Achyrocline satureioides* contra el virus de la *Encefalitis Equina del Oeste*.

Extractos Acuosos	Concentración (µg/ml)	Actividad Antiviral (%)
Frío	200	99
	400	100
	800	100
Caliente	100	92
	200	100
	400	100

Puede observarse que ambos extractos presentaron una fuerte actividad inhibitoria contra el virus WEE a todas las concentraciones estudiadas, valores que



fueron menores a las  $CC_{50}$  determinadas por la técnica de captación de RN, que como se mencionó resultó la más sensible en las condiciones ensayadas.

Los resultados indican que todas las concentraciones ensayadas de cada extracto, ejercieron prácticamente el mismo valor porcentual de inhibición viral el que fue significativamente muy elevado.

#### 5.4.2.2. Efecto antiviral de los extractos en distintos pasos de la replicación viral

##### 5.4.2.2.a. Ensayo sobre adsorción y penetración viral

Los resultados que se presentan en la **Tabla 9**, demostraron que a las concentraciones ensayadas el EAF inhibió el desarrollo viral en un porcentaje menor al 50%, en tanto que el EAC presentó una inhibición no superior al 35%.

**Tabla 9.** Acción antiviral ejercida por EAF y EAC de *A. satureioides* sobre la adsorción y penetración del virus WEE en células Vero.

Extractos Acuosa	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Actividad Antiviral (%)
Frío	200	49
	400	30
	600	33
	800	38
Caliente	100	23
	200	35
	300	30
	400	32

No pudo demostrarse que el empleo de mayores concentraciones de extracto influyera sobre la capacidad replicativa viral; la población de virus tratada pudo amplificarse entre un 60 a 70%. Notoriamente la presencia del extracto vegetal en el sistema celular previo a la infección viral, no influyó sustancialmente en la producción de viriones hijos llevando a pensar que aquella acción antiviral demostrada en las pruebas de *screening* debe estar ejerciéndose en etapas posteriores a la adsorción/penetración del virus a las células.





#### 5.4.2.2.b. Ensayo post adsorción y penetración viral: replicación intracelular

El análisis de los datos muestran que ambos extractos ejercieron acción inhibitoria sobre el virus en etapas del ciclo replicativo posteriores a la adsorción y penetración del virus en la célula en porcentajes elevados: 99-100% para EAF y 92-100% para EAC, (Tabla 10).

**Tabla 10.** Porcentajes de inhibición de la multiplicación del virus WEE por EAF y EAC de *A. satureioides* incorporados posteriores a la adsorción y penetración viral.

Extractos Acuosa	Concentración (µg/ml)	Actividad Antiviral (%)
Frío	200	99
	400	99
	600	100
	800	100
Caliente	100	92
	200	100
	300	100
	400	100

Resultados similares fueron obtenidos por Zanon *et al.*, (1999), quienes reportaron un fuerte efecto antiviral de un extracto etanólico de *Achyrocline satureioides* cuando éste fue agregado posterior a la adsorción y penetración del virus *Herpes suis tipo 1* en la misma línea celular.

Por otra parte, Bettega *et al.*, (2004), informaron que el extracto hidroetanólico de esta especie vegetal también mostró acción inhibitoria en estadios posteriores a la penetración del virus en sus investigaciones con el virus *Herpes*.

#### 5.4.2.2.c. Pre-tratamiento celular

Los valores hallados demuestran que la inhibición del desarrollo viral no superó el 50% cuando las células se pre-trataron con EAF y menos aún cuando los pre-tratamientos se realizaron con EAC (Tabla 11).





**Tabla 11.** Acción antiviral de los EAC y EAF de *A. satureioides* sobre la replicación del virus WEE en células Vero pre-tratadas.

Extractos Acuosa	Concentración (µg/ml)	Actividad Antiviral (%)
Frio	200	28
	400	43
	800	15
Caliente	100	4
	200	2
	400	0

Una incubación de los cultivos celulares con la muestra vegetal por una hora previo a la infección viral induciría a pensar que el compuesto podría estar interfiriendo en el primer paso del ciclo de replicación viral, es decir en la adsorción y/o penetración por ocupación o modificación química del receptor celular que el virus utiliza como puerta de entrada a su huésped. No obstante, los resultados aquí presentados no validan esta hipótesis.

Solamente una de las concentraciones ensayadas de EAF (400 µg/ml) ejerció un porcentaje de inhibición próximo al 40%, mostrando las demás concentraciones de ambos extractos una capacidad antiviral despreciable.

#### 5.4.2.3 Pre-tratamiento del virus libre: acción virucida

Si bien los extractos acuosa de esta especie vegetal han demostrado ser efectivos en la inhibición del virus WEE durante la replicación intracelular, fue interesante investigar si los mismos podían inactivar extracelularmente las partículas virales. Para ello, se realizaron los ensayos descritos en el punto 4.4.2.3. y los resultados, expresados como valores porcentuales de inactivación, se presentan en la **Tabla 12**. Puede observarse que el grado de acción virucida fue dependiente de la concentración adicionada de cada extracto. El EAF ejerció una inhibición del 91% cuando se ensayó a 800 µg/ml, máxima concentración probada; en tanto que el EAC inactivó al virus en un 82% a la máxima dosis estudiada que correspondió a 400 µg/ml.



**Tabla 12.** Inactivación del virus WEE por EAC y EAF de *A. satureioides*.

Extractos Acuosa	Concentración (µg/ml)	Acción Virucida (%)
Frío	200	33
	400	45
	600	61
	800	91
Caliente	100	49
	200	53
	300	39
	400	82

#### 5.4.2.4. Determinación de la Concentración Inhibitoria 50% (CI<sub>50</sub>)

En conocimiento que ambos extractos acuosa de *A. satureioides* ejercieron una fuerte actividad antiviral post adsorción y penetración viral, y con el objeto de relacionar dicha actividad con la acción citotóxica de los mismos, se calculó la CI<sub>50</sub>. La relación entre ambas concentraciones permite conocer el Índice de Selectividad (IS) del compuesto estudiado. En este ensayo se desarrolló la metodología descrita en el punto 4.4.2.4.

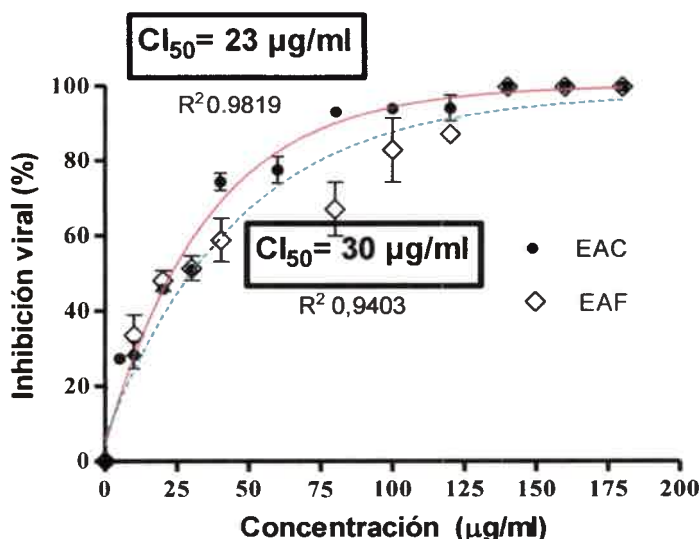
En la **Tabla 13** se expresan las concentraciones de los extractos acuosa que se utilizaron en un rango de 5 a 200 µg/ml, y los porcentajes de inhibición viral correspondientes. Estos valores permitieron la construcción de la **Figura 26** que a partir del análisis estadístico se calcularon las CI<sub>50</sub> para ambos extractos. Estas resultaron ser de 23 y de 30 µg/ml para el EAC y el EAF, respectivamente.



**Tabla 13.** Porcentajes de inhibición de WEE luego del tratamiento con EAF y EAC de *A. satureioides*, incorporados posteriores a la adsorción y penetración viral.

Concentración (µg/ml)	Promedio Inhibición viral (%)	
	EAC	EAF
0	0	0
5	27,4	ND*
10	28,3	33,6
20	45,9	48,1
30	51	51,4
40	74,4	58,9
60	77,5	ND
80	93	67,2
100	94	82,9
120	94,1	87,2
140	99,9	90,5
160	99,9	91
180	100	94
200	100	99,9

ND: No determinado



**Figura 26.** Curva dosis-respuesta de la inhibición del virus WEE por EAF y EAC de *Achyrocline satureioides* en cultivos de células Vero

#### 5.4.2.5. Cálculo del Índice de Selectividad (IS)

Para la determinación del IS de cada extracto se tuvieron en cuenta las CC<sub>50</sub> determinadas por las técnicas de captación de RN y reducción de MTT, por lo que se calcularon dos IS para cada muestra vegetal. Para el EAF fueron de 27 y 73 por RN y MTT, respectivamente; en tanto que para el EAC tuvieron un valor de 16,8 por RN y 26,4 por MTT (Tabla 14).

**Tabla 14.** Índice de selectividad de los extractos EAF y EAC frente al virus WEE.

Extracto	CC <sub>50</sub> (µg/ml)		CI <sub>50</sub> (µg/ml)	IS (CC <sub>50</sub> /CI <sub>50</sub> )	
	RN	MTT		RN	MTT
EAF	809,3	2189,5	30	27 (809,3/30)	73 (2189,5/30)
EAC	386,3	608,2	23	16,8 (386,3/23)	26,4 (608,2/23)

Los resultados demuestran que ambos extractos acuosos de *A. satureioides* poseen un significativo efecto antiviral selectivo *in vitro*, por lo que pueden considerarse



como potenciales quimioterápicos, ya que los índices de selectividad fueron superiores a 10, siendo este valor un importante indicador de la efectividad de un antiviral.

Si se compara sólo la actividad antiviral de ambos extractos, se podría decir que el EAC es más efectivo que el EAF porque con menor concentración de muestra se ejerce el mismo grado de inhibición viral. No obstante, dicho extracto presentó valores de  $CC_{50}$  menores que el EAF lo que indica una mayor toxicidad en el sistema celular. Por lo tanto es de fundamental importancia relacionar los dos parámetros para definir la capacidad antiviral selectiva, que se expresa por el IS. En función de todo lo expresado, el EAF resultó ser más selectivo que el EAC.

#### **5.4.2.6. Actividad antiviral a diferentes tiempos post adsorción y penetración viral**

Se demostró la capacidad de EAF y EAC de inhibir la replicación del virus WEE en una etapa posterior a la adsorción y penetración del virus a las células. Como consecuencia, resultó necesario conocer con más detalle en qué etapa del ciclo de replicación viral actúan los extractos y así lograr una aproximación al conocimiento del mecanismo de acción. Para ello, monocapas celulares infectadas fueron incubadas con extracto a diferentes tiempos post adsorción y penetración viral. Para el desarrollo de este estudio se seleccionó una concentración de extracto no citotóxica para las células y con una acción inhibitoria del 100% frente al virus.

Como se observa en la **Tabla 15**, los cultivos infectados e incubados con EAF a las 2, 4 y 6 horas post adsorción y penetración viral, mostraron una reducción de la producción viral de alrededor del 100%. En tanto que, esta capacidad inhibitoria decae en un 40% aproximadamente a partir de las 8 hasta las 14 horas. El mismo comportamiento presentó EAC, indicando que probablemente ambos extractos podrían contener componentes comunes responsables de dicha actividad.



**Tabla 15.** Actividad antiviral de los extractos acuosos frío y caliente de *A. satureioides* frente al virus WEE a diferentes tiempos post adsorción y penetración viral.

Extracto	Porcentaje de inhibición viral a diferentes tiempos (h) post adsorción y penetración						
	2	4	6	8	10	12	14
EAF (400 µg/ml)	100	100	97	60,5	67,7	55,3	63
EAC (300µg/ml)	100	100	97	61,3	63	82	31

Para dilucidar en qué momento del ciclo del virus estaría/n actuando el/los principio/s activo/s presentes en los extractos acuosos de *A. satureioides*, se utilizó la curva de multiplicación de un solo paso del virus (**Figura 16**) y la información bibliográfica referida al ciclo de replicación de los Togavirus (*Sindbis* y *Semliki Forest*) presentada en la introducción. Como se puede observar en la curva de multiplicación del virus a las 10 horas post infección se detectan partículas virales infectivas asociadas a las células y recién a las 12 horas aparecen extracelularmente. Esto indica que este virus puede gemar a partir de membranas intracitoplasmáticas. Por otra parte, los resultados obtenidos muestran que el ciclo de replicación del virus WEE demanda alrededor de 12 horas.

Teniendo en cuenta que el virus fue fuertemente inhibido entre las 0 y las 6 horas, y que a partir de las 8 horas dicha acción se reduce, se podría tratar de deducir qué eventos ocurren en el período comprendido entre las 6 y las 8 horas, ya que ésta es la etapa en la cual ejercen sus bioactividades los extractos estudiados. Se puede pensar que el/los principio/s activo/s presentes en los extractos acuosos estarían ejerciendo su acción en eventos moleculares tardíos, tales como clivaje de poliproteínas para la formación de las proteínas estructurales, o en la maduración y el transporte de las glicoproteínas virales hacia las membranas celulares.

Dicha hipótesis está respaldada por la literatura, en ella se describe que en ese período de tiempo (6-8 h) ya han acontecido ciertos eventos biomoleculares tales como la traducción temprana y la replicación del genoma. Se sabe que la replicación se incrementa durante las 3-3,5 h después de la infección y que a ese tiempo también han





comenzado a sintetizarse poliproteínas tardías. Por otra parte, se puede afirmar que no ejercen su acción en las etapas de ensamble, maduración ni gemación de las partículas virales hijas debido a que estos eventos suceden a tiempos posteriores a la etapa de mayor actividad antiviral.

Es conocido que extractos de *A. satureioides* ejercen actividad antiviral frente a otros virus envueltos pero de diferente naturaleza genómica que WEE. Así, *Bettega et al. (2004)*, demostraron que un extracto hidroetanólico de esta especie vegetal ejerció inhibición frente al virus *Herpes simplex tipo 1* en estadios posteriores a la adsorción y penetración, resultados semejantes a los obtenidos con los extractos acuosos de la misma planta frente a WEE, en esta tesis. A pesar de las diferencias de duración de los ciclos de replicación entre los virus *Herpes* (alrededor de 20 h) y WEE (12 h aproximadamente), ambos extractos ejercieron su acción en etapas tardías del ciclo replicativo ya que el extracto hidroetanólico fue activo entre la segunda y novena hora post-adsorción, y los extractos acuosos lo fueron desde tiempo cero hasta la sexta hora post adsorción y penetración.

Tanto el extracto empleado por estos investigadores como los extractos acuosos frío y caliente son de naturaleza polar, por lo que se puede pensar que dichos solventes podrían estar extrayendo compuestos similares o tal vez los mismos a los cuales se le pudiera atribuir la bioactividad. Por todo lo expuesto, resulta posible que dichos compuestos polares posean un mecanismo de acción semejante en el ciclo de multiplicación viral.

### **5.4.3. Evaluación de la actividad antiviral frente al virus *Herpes suis tipo 1***

#### **5.4.3.1. Screening antiviral durante todo el ciclo replicativo viral**

En este estudio los extractos acuosos vegetales estuvieron presentes en los cultivos celulares durante todo el ciclo de replicación del virus, es decir desde el momento de la infección hasta la liberación de las partículas virales hijas. Los resultados de la acción inhibitoria de los extractos acuosos se resumen en la **Tabla 16**.



**Tabla 16.** Actividad inhibitoria de extractos acuosos de *A. satureioides* contra el virus *H. suis*.

Extractos Acuosos	Concentración (µg/ml)	Actividad Antiviral (%)
Frio	200	40
	400	50
	800	80
Caliente	100	29
	200	46
	400	96

Puede observarse que ambos extractos presentaron una actividad inhibitoria contra el virus *H. suis* que fue dependiente de la concentración de extracto adicionada. Los resultados logrados a 200 µg/ml para ambos extractos muestran un grado de acción inhibitoria semejante, no obstante a 400 µg/ml el EAC prácticamente duplicó el porcentaje de inhibición respecto a la inhibición ejercida por EAF a la misma concentración.

#### 5.4.3.2. Efecto antiviral de los extractos en distintos pasos de la replicación viral

Sobre la base de los resultados obtenidos con los extractos EAF y EAC sobre la replicación del virus *H. suis* fue necesario realizar diversos estudios antivirales que permitieran conocer en qué paso de la replicación del virus podrían estar actuando las muestras vegetales.

Para todas las experiencias se emplearon concentraciones no citotóxicas de extracto, seleccionadas de acuerdo a la viabilidad celular determinada por la técnica de RN que resultó la más sensible para estos extractos.

##### 5.4.3.2.a. Ensayo sobre adsorción y penetración viral

Para investigar si los extractos acuosos de *A. satureioides* ejercen actividad inhibitoria durante la adsorción y penetración viral se siguió la metodología detallada en el



punto 4.4.3.2.a. Los resultados presentados en la **Tabla 17** demuestran que a las menores concentraciones ensayadas el EAF inhibió el desarrollo viral en un porcentaje de alrededor del 45%, alcanzando un valor aproximado al 80% a la mayor concentración empleada (800 µg/ml), indicando que posee una considerable capacidad inhibitoria del virus durante la etapa de adsorción y penetración. Estos resultados revelan que los compuestos presentes en el EAF actúan sobre el receptor celular, la partícula viral libre, o quizás sobre el mecanismo de penetración del virus en la célula.

Resultados similares fueron informados por *Yip et al.*, (1991), quienes reportaron la actividad del extracto etanólico de *Bidens pilosa* (Asteraceae) frente a *Citomegalovirus* (Herpesviridae) sobre la misma etapa de replicación viral. También *García et al.* (1999), demostraron que la capacidad inhibitoria de extractos acuosos de *Achyrocline flaccida*, frente a diferentes virus de la familia Herpesviridae, fue ejercida en la etapa de adsorción del virus a la célula.

Por otra parte y tal como se observa en la tabla, el EAC mostró una inhibición del 54% a la máxima concentración tolerada por el sistema celular, valor próximo al obtenido por el EAF a la misma concentración.

**Tabla 17.** Acción antiviral de EAF y EAC de *A. satureioides* sobre la adsorción y penetración del virus *H. suis* en células Vero.

Extractos Acuosos	Concentración (µg/ml)	Actividad Antiviral (%)
Frío	200	41
	400	49
	800	79
Caliente	100	25
	200	44
	400	54



#### 5.4.3.2.b. Ensayo post adsorción y penetración viral: replicación intracelular

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antiviral durante la adsorción y penetración viral para el EAC no se condicen con los hallados en el *screening* antiviral durante todo el ciclo replicativo viral, se puede pensar que dicha actividad, superior al 90%, estaría aconteciendo en etapas posteriores a la penetración del virus.

Por otra parte, estudios previos demostraron que el EAF presentó una considerable actividad durante la etapa de adsorción y penetración. No obstante, resultó interesante realizar el ensayo de tratamiento post adsorción y penetración ya que dicho extracto podría poseer, además, principios que fueran activos en etapas del ciclo de replicación del virus dentro de la célula.

Con el propósito de demostrar lo enunciado anteriormente, se realizó la técnica detallada en el punto 4.4.3.2.b. Los resultados de estas experiencias (**Tabla 18**) demuestran que el EAF también ejerció actividad inhibitoria durante esta etapa, alcanzando un porcentaje próximo al 70% a la mayor concentración ensayada. El EAC inhibió en un 96% lo que indica que su actividad antiviral ocurre en alguna etapa del ciclo de replicación dentro de la célula. Este porcentaje representa el máximo valor hallado en todos los estudios de actividad antiviral realizados con los extractos acuosos de *A. satureioides* frente al virus *H. suis*.

**Tabla 18.** Porcentajes de inhibición del virus *H. suis* por EAF y EAC de *A. satureioides* incorporados posteriores a la adsorción y penetración viral.

Extractos Acuosos	Concentración (µg/ml)	Actividad Antiviral (%)
Frío	200	34
	400	37
	800	69
Caliente	100	29
	200	49
	400	96



Si se comparan estos resultados con los hallados para el virus WEE, se puede inferir que los extractos acuosos de *A. satureioides* ejercen acción inhibitoria sobre ambos virus en etapas intracelulares posteriores a la penetración del virus a la célula, siendo el EAF, además, activo frente a *H. suis* durante la adsorción y penetración, como ya se indicó.

Resultados similares fueron informados por Zanon *et al.*, (1999), quienes demostraron un fuerte efecto antiviral de un extracto etanólico de *A. satureioides* frente al mismo virus, *Herpes suis* tipo 1, cuando el extracto fue agregado posterior a la adsorción y penetración.

#### 5.4.3.2.c. Pre-tratamiento celular

Cuando se realizó el pre-tratamiento de las células con diferentes concentraciones de los extractos, pudo notarse que tanto EAF como EAC mostraron una débil inhibición del virus y la misma fue dependiente de la concentración de extracto adicionada. Los mayores porcentajes de bioactividad, 55 y 56%, correspondieron a las concentraciones de 800 y 400  $\mu\text{g/ml}$  para EAF y EAC, respectivamente (Tabla 19).

**Tabla 19.** Acción antiviral de EAF y EAC de *A. satureioides* sobre la replicación del virus *H. suis* en células Vero pre-tratadas durante 1 hora.

Extractos Acuosos	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Actividad Antiviral (%)
Frío	200	37
	400	40
	800	55
Caliente	100	29
	200	43
	400	56

La incubación de los cultivos celulares con el extracto vegetal por una hora antes de proceder a la infección viral, llevaría a pensar que el compuesto podría estar interfiriendo en el primer paso del ciclo de replicación viral, es decir en la adsorción y/o



penetración por ocupación física o modificación química del receptor celular, que el virus utiliza para ingresar en la célula huésped. Por otra parte, se podría pensar que el compuesto podría generar un estado refractario o tipo interferón en las células haciéndolas "resistentes" a la infección viral. Sin embargo, los resultados aquí presentados no validan estas hipótesis ya que los porcentajes no superan el 90% de inhibición, valor utilizado como criterio para considerar antiviral a un determinado compuesto.

Los resultados obtenidos en los ítems 5.4.3.2.a., b. y c., que hacen referencia a los estudios de la acción antiviral de los extractos vegetales en las diferentes etapas del ciclo de replicación viral, demuestran que el EAC a la mayor concentración ensayada, posee mayor capacidad antiviral contra el virus *H. suis* que el EAF y que tal capacidad se ejerce cuando los extractos fueron agregados post adsorción y penetración viral, por lo que se puede afirmar que el EAC tiene como blanco de acción alguna etapa intracelular de la multiplicación viral. Por el contrario, el EAF presentó la mayor capacidad inhibitoria cuando el mismo fue agregado simultáneamente con la suspensión viral a los sustratos celulares.

Considerando que el EAC mostró un fuerte poder inhibitorio frente al virus *H. suis* y que una de las concentraciones ensayadas ejerció 50% de actividad, lo que representa la  $CI_{50}$ , fue posible determinar el índice de selectividad (IS). Como ya se mencionó, este valor indica la relación entre la actividad tóxica que ejerce un compuesto sobre un sistema celular y la capacidad del mismo de inhibir a un determinado virus. Teniendo en cuenta que para el EAC los valores de  $CC_{50}$  fueron 386,3  $\mu\text{g/ml}$  determinado por RN y 608,2  $\mu\text{g/ml}$  por MTT, y que la  $CI_{50}$  fue de 200  $\mu\text{g/ml}$ , los índices hallados son 1,93 (RN) y 3,04 (MTT). Este valor indica que el extracto tiene selectividad de acción frente al virus *Herpes suis*, debido a que fue superior a 1. Si se comparan estos índices con los del EAC (16,8 por RN y 26,4 por MTT) frente al virus WEE, la diferencia entre dichos valores refleja que la actividad antiviral del EAC es mucho más selectiva sobre este último virus que sobre *Herpes suis*.

#### 5.4.3.3. Pre-tratamiento del virus libre: acción virucida

Para concluir los estudios de actividad antiviral de los extractos EAF y EAC frente al virus *H. suis*, fue interesante investigar si los mismos podían inactivar extracelularmente las partículas virales. Para ello, se realizaron los ensayos descritos en el punto 4.4.3.3. y los resultados logrados se presentan en la **Tabla 20**.





**Tabla 20.** Inactivación del virus *H. suis* por EAF y EAC de *A. satureioides*.

Extractos Acuosa	Concentración (µg/ml)	Actividad Antiviral (%)
Frío	200	10
	400	27
	800	57
Caliente	100	0
	200	0
	400	14

Se puede observar que el grado de acción virucida de ambos extractos fue débil frente a *H. suis*. De todos modos, el EAF ejerció una inhibición mayor que el EAC alcanzando un porcentaje del 57% cuando se trató al virus con 800 µg/ml. Este valor fue semejante al hallado en el ensayo de pre-tratamiento celular, indicando que el extracto posee compuestos que son activos sobre los receptores celulares y también sobre la partícula viral libre, por lo que quizás la suma de estas acciones serían las responsables de una mayor inhibición lograda cuando el extracto es adicionado durante la etapa de adsorción y penetración viral (79%).

Por otra parte, el EAC prácticamente no inactivó al virus extracelular a ninguna de las concentraciones estudiadas. Basándose en este resultado se podría afirmar que los porcentajes de inhibición hallados durante la adsorción y penetración viral (54% a 400 µg/ml) sumados a la acción del extracto en el ensayo de pre-tratamiento celular (56% a la mayor concentración ensayada), se deben a la interacción de los compuestos del extracto con la célula y no con el virus.

### 5.5. Estudios de genotoxicidad de EAF y EAC

Actualmente para garantizar la inocuidad de un producto no sólo es necesario realizar pruebas toxicológicas sino pruebas de actividad genética del compuesto, debido a que en estudios previos se ha informado que existen compuestos que mostraron actividad genotóxica sin haber tenido antecedentes de toxicidad manifiesta, (Díaz García, 2002).



### 5.5.1. Test de *Allium cepa* L

De las múltiples técnicas diseñadas para la evaluación del potencial tóxico, genotóxico y/o mutagénico mencionadas en introducción, se seleccionó el test de *Allium cepa* L por ser uno ensayo de corta duración y con resultados confiables, (Cotelle et al., 1999; Yi y Meng, 2003; Lerda et al., 2005).

#### 5.5.1.a. Pruebas de mutagenicidad

La administración sostenida de un medicamento durante un tiempo prolongado, por ejemplo 5 días, ofrece la ventaja de poder evaluar la influencia en el genoma del huésped de una dosis diaria de un fármaco en una terapia tradicional de aproximadamente una semana.

#### 5.5.1.b. Prueba de reversión de mutagenicidad

Los resultados obtenidos al aplicar esta metodología permiten establecer una relación con lo que ocurriría en un organismo al administrar dosis de un quimioterápico durante dos días como también evaluar el proceso de depuración del potencial genotóxico del mismo.

#### 5.5.1.c.1. Evaluación del daño macroscópico inducido por EAF

En los ensayos previos al desarrollo del test de *Allium cepa* L, la evaluación de la radiculación indicó que no hubo un 100% de bulbos germinados. Esto se atribuye, entre otras circunstancias posibles, a la presencia de químicos empleados para la preservación de los bulbos en el comercio. Aquellos especímenes cuyas raíces presentaron un buen desarrollo fueron finalmente seleccionados para este estudio, pues garantizan la validez de los ensayos. La **Figura 27** muestra un bulbo con radiculación normal luego del tratamiento durante 48 h con agua mineral; se observan raíces blancas, consistentes y de longitud variable.



**Figura 27.** Radiculación normal de un bulbo de *Allium cepa* L tratado con agua mineral durante 48 h a temperatura ambiente



En la evaluación del daño macroscópico inducido por los extractos se tuvo en cuenta la inhibición del crecimiento de las raíces y las anomalías macroscópicas. El parámetro inhibición del crecimiento de las raíces, en particular, es considerado un claro indicador de toxicidad, (Fiskesjö, 1985). Para ambos extractos fueron considerados la cuantificación de las longitudes radiculares, así como el número de raíces presentes y diferentes anomalías tales como tumoración, gelificación, necrosis y presencia de ganchos radiculares.

La **Tabla 21** exhibe los datos macroscópicos hallados cuando se sometieron los bulbos a un tratamiento sostenido durante 5 días.

**Tabla 21.** Valores promedio del número y longitud de raíces de *Allium cepa* L, y anomalías luego del tratamiento por 5 días con concentraciones de EAF de *A. satureioides*.

Parámetro Evaluado	Tratamientos								
	C (-)	C (+)	EAF de <i>A. satureioides</i> (mg/ml) durante 5 días					Total	
			0,5	1	2	3	4		
<b>Nº Raíces (X)</b>	54	37	67	41	46,5	60,5	56		
<b>Longitud promedio de raíces (mm) (± SEM)</b>	20,41 (±2,006)	13,97 (±0,654)	10,03 (±0,622)	7,78 (±0,562)	8,42 (±0,718)	7,51 (±0,600)	6,61 (±0,447)		
<b>Crecimiento porcentual</b>	100	25,87	49,14	38,2	41,25	36,39	32,39		
<b>Anormalidades</b>	<b>Ga</b>	8	32	11	0	2	10	3	<b>66</b>
	<b>Ge</b>	0	0	0	10	14	16	25	<b>65</b>
	<b>Ne</b>	0	0	16	17	6	4	0	<b>43</b>
	<b>Tu</b>	10	5	2	0	0	0	1	<b>18</b>
<b>Total de anomalías</b>	<b>18</b>	<b>37</b>	<b>29</b>	<b>27</b>	<b>22</b>	<b>30</b>	<b>29</b>		

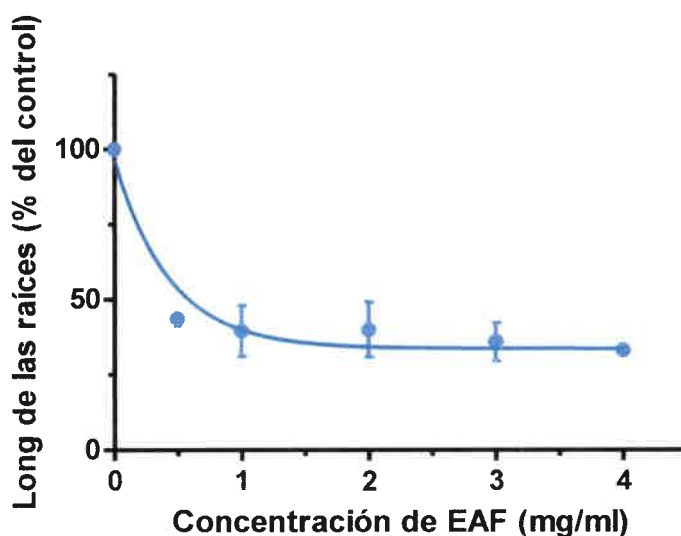
Ga: gancho; Ge: gelificación; Ne: necrosis; Tu: tumor.

Al analizar los datos de la **Tabla 21** puede afirmarse que la cantidad de raíces promedio por bulbo en los controles fue normal, incluso hay autores que han descrito un promedio no superior a 35 raíces, (Tülay y Özlem, 2010). Estos investigadores sometieron los bulbos de su estudio para inducir la radiculación sólo a agua corriente, en nuestras experiencias hemos trabajado con agua mineral, más rica en iones, pudiendo



ser ésta la causa de una mejor radiculación. La comparación entre el número de raíces de los controles vs. los diferentes tratamientos no reveló diferencias notorias. No sorprende este dato si se considera que todos los bulbos fueron tratados con agua mineral sola durante 48 h antes del tratamiento con el vegetal. No obstante podría suponerse que si el EAF fuera extremadamente tóxico podría generar desprendimiento radicular, que disminuiría el número de raíces influyendo sobre este parámetro. Esto no aconteció por lo que se podría aseverar que el parámetro N° de raíces no se vio modificado por EAF de *A. satureioides*.

Siguiendo con el análisis de la **Tabla 21**, los datos referidos a la longitud promedio de las raíces fueron tomados para la construcción de la **Figura 28** expresando los valores de desarrollo radicular de manera porcentual respecto del sistema control negativo, el cual se asume creció un 100%.



**Figura 28.** Inhibición porcentual del crecimiento radicular de bulbos de *Allium cepa L* tratados con diferentes concentraciones de EAF de *A. satureioides* durante 5 días

El análisis de estos valores reveló diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos vs. el sistema control negativo, con un  $p < 0,05$ .

En contraposición no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con el extracto. El análisis de los porcentajes de inhibición radicular indica que un tratamiento con 0,5 mg/ml afectó alrededor del 50% el crecimiento de las raíces, mientras que las concentraciones de 1, 2 y 3 mg/ml produjeron una inhibición aproximadamente del 60% y 4 mg/ml lo inhibió en un 70%. Por lo tanto, es de destacar

además de no existir una relación dosis-respuesta, todas las dosis excepto 0,5 mg/ml tienen un efecto inhibitorio considerable en el desarrollo radicular. Lo expuesto anteriormente se muestra en la **Figura 29**.



**Figura 29.** Bulbos de *Allium cepa* L. tratados durante 5 días con concentraciones crecientes de EAF de *A. satureioides* vs. bulbos sin tratar

Cuando se evaluaron las anomalías macroscópicas pudo notarse que en el sistema control negativo sólo fue posible evidenciar la presencia de ganchos radiculares y de tumores con baja frecuencia. Estas alteraciones espontáneas son normales y coinciden con lo que describen *Fiskesjö, (1994)* y *Bidau et al. (2004)*. La presencia de ganchos se asocia con alguna alteración del proceso de división de las células meristemáticas apicales que han detenido en parte su desarrollo por un proceso mutagénico espontáneo. Respecto de los tumores también se conoce que se producen debido a una mutación en el genoma.

Estas dos anomalías pueden aumentar en número cuando el meristema apical es expuesto a compuestos xenobióticos. Para este estudio fue necesaria la inclusión de una droga que induzca anomalías y que constituyó el sistema control positivo. Para el test de *Allium cepa* L. una droga ampliamente utilizada es el paracetamol. Esta sustancia es un fármaco analgésico, antipirético, no esteroide, utilizado para combatir el dolor, (*El Garbulli y Bashasha, 2008*). El efecto genotóxico del paracetamol ha sido registrado en muchos sistemas de ensayos tales como la malformación congénita de embriones, (*Ying y Yi, 2000*), la inhibición de síntesis del ADN y el incremento de intercambio de cromátides hermanas en células de hámster, (*Hongslo et al., 1990*).



En nuestro sistema, su comportamiento sobre las raíces tratadas reveló una alta incidencia de ganchos radiculares, que representaron casi el 50% del total de este tipo de anomalías, mientras que el control negativo sólo mostró un 12,1% de incidencia. Esta droga también indujo la aparición de tumores, cuya frecuencia fue llamativamente inferior al sistema control negativo.

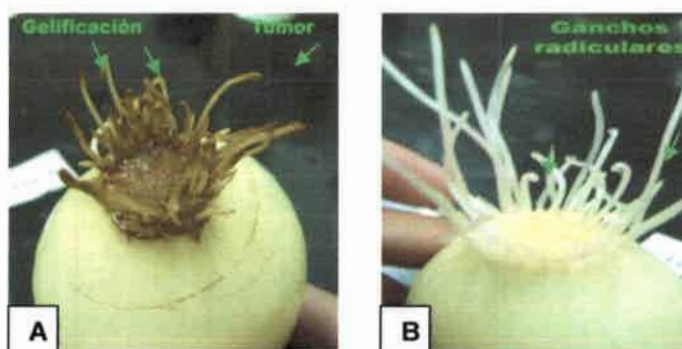
La modificación de la longitud promedio de las raíces de los bulbos del sistema control positivo respecto del negativo evidenció el potencial del paracetamol para interactuar con el genoma de las células apicales. Hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos sistemas controles con un  $p < 0,01$ . El comportamiento general del paracetamol validó los ensayos.

Con respecto al tratamiento con EAF pudo notarse que ninguna de las concentraciones ensayadas influye en la inducción del desarrollo de ganchos, es decir no hubo una frecuencia mayor y significativa a la observada en el sistema control negativo. Además, se observa que todas las concentraciones de EAF tuvieron un comportamiento notoriamente diferente al paracetamol. En relación a la presencia de tumores ningún tratamiento con extracto generó valores significativos de esta anomalía.

Tampoco pudo observarse en ninguna de las raíces de los sistemas controles la presencia de gelificación ni necrosis. Por el contrario, estas alteraciones sí fueron observadas, con distinta frecuencia, en los 5 tratamientos con extracto.

Respecto de la gelificación, podría decirse que hubo una relación dosis-respuesta, pues este parámetro fue más notorio conforme aumentó la concentración de EAF. Se observó que al aumentar la gelificación hubo una disminución de la necrosis, lo cual resulta lógico.

Las alteraciones macroscópicas descritas se exhiben en la **Figura 30** y el valor porcentual de las mismas se resume en la **Tabla 22**.



**Figura 30.** Alteraciones macroscópicas observadas en raíces de cebollas tratadas (A) y sin tratar (B) con EAF de *A. satureioides*





**Tabla 22.** Valores de anomalías macroscópicas presentes en las raíces tratadas durante 5 días con distintas concentraciones de EAF de *A. satureioides*.

Tratamiento (5 días) EAF (mg/ml)	Raíces Totales	Raíces anormales	Porcentaje de raíces anormales
C (-)	108	18	16,67
0,5	134	29	29,75
1	82	30	36,59
2	93	22	23,66
3	121	29	23,97
4	112	29	25,89
C (+)	74	37	50

Aunque está descripto que las anomalías espontáneas del sistema control negativo deberían estar en el orden del 10 al 12%, (Fiskesjö, 1997; Bidau et al., 2004), en estos ensayos el grupo control negativo alcanzó un valor del 16%. No obstante, ese comportamiento fue menor al del grupo control positivo, con diferencias estadísticas significativas con un  $p < 0,01$ .

Al comparar el porcentaje de anomalías totales inducidas por todas las concentraciones de EAF pudo notarse que no se registraron diferencias estadísticamente significativas respecto del control negativo, pero sí las hubo en relación al comportamiento del control positivo con un  $p < 0,05$ . Estos resultados permiten concluir que el EAF de *A. satureioides*, empleado en un rango de concentraciones de 0,5 a 4 mg/ml durante un tratamiento sostenido de 5 días, no genera en las raíces de *Allium cepa* L daños macroscópicos que fueran iguales al paracetamol, que como se conoce, aumenta la frecuencia de anomalías en las raíces de los meristemas apicales.

A continuación se exponen los resultados correspondientes al tratamiento de los bulbos de *Allium cepa* L con EAF durante 2 días, y luego sometidos a tratamiento con agua mineral durante 3 días más; diseño experimental que permite evaluar la recuperación del daño ejercido.



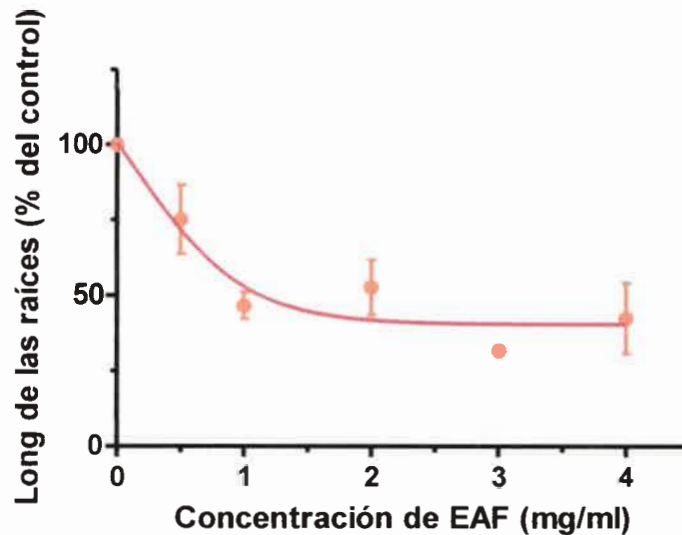
**Tabla 23.** Valores promedio del número y longitud de raíces de *Allium cepa* L, y anomalías luego del tratamiento por 2 días con concentraciones de EAF de *A. satureioides* y luego sometidas a depuración con agua mineral.

Parámetro Evaluado	Tratamientos								
	C (-)	C (+)	EAF de <i>A. satureioides</i> (mg/ml) durante 2 días						
			0,5	1	2	3	4	Total	
Nº Raíces (X)	48,5	34,5	43,5	62,5	39	38	39,5		
Longitud promedio de raíces (mm) ( $\pm$ SEM)	25,91 ( $\pm$ 2,628)	17,55 ( $\pm$ 0,936)	18,98 ( $\pm$ 1,479)	11,51 ( $\pm$ 0,636)	13,07 ( $\pm$ 1,030)	7,91 ( $\pm$ 0,659)	10,95 ( $\pm$ 0,861)		
Crecimiento Porcentual	100	67,73	73,25	44,42	50,44	30,53	42,26		
Anormalidades	Ga	10	20	7	5	10	6	4	<b>62</b>
	Ge	0	0	0	15	6	15	37	<b>73</b>
	Ne	0	0	12	17	1	0	18	<b>48</b>
	Tu	9	5	0	1	3	0	0	<b>18</b>
<b>Total de anomalías</b>	<b>19</b>	<b>25</b>	<b>19</b>	<b>38</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>59</b>		

Ga: gancho; Ge: gelificación; Ne: necrosis; Tu: tumor.

En la **Tabla 23** se puede observar que para todos los parámetros evaluados: número, longitud promedio, crecimiento porcentual y frecuencia de aparición de raíces anormales, la tendencia fue similar a la descripta para el tratamiento de 5 días, mereciendo el mismo nivel de discusión.

El comportamiento del parámetro más importante, longitud de las raíces, para cada concentración de extracto utilizado, se muestra en el **Figura 31**.

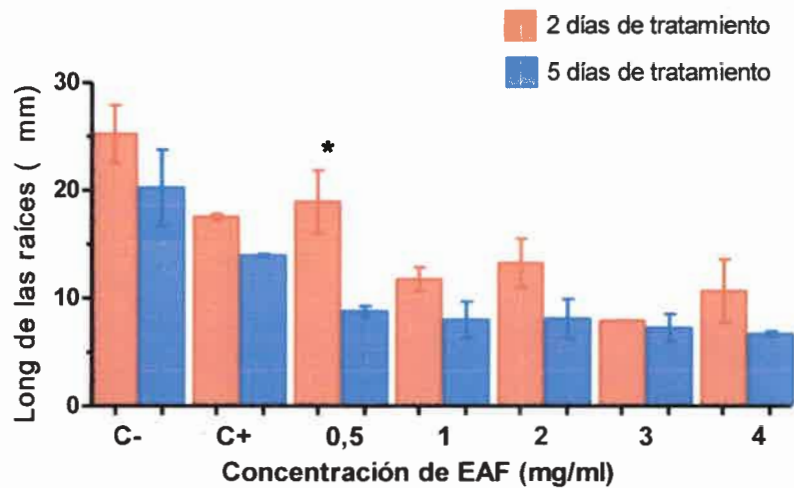


**Figura 31.** Inhibición porcentual del crecimiento radicular de bulbos de *Allium cepa* L. tratados con concentraciones de EAF de *A. satureioides* por 2 días y sometidas a depuración con agua mineral.

El análisis estadístico de estos valores no reveló diferencias significativas entre los tratamientos de 0,5 y 2 mg/ml vs. el sistema control negativo, mientras que para las concentraciones restantes de EAF sí la hubo, con un  $p < 0,05$ . No se justifica por qué los bulbos tratados con 1 mg/ml no se comportaron de manera semejante a los del control negativo cuando sí lo hicieron aquellos tratados con 2 mg/ml, a excepción de que en los sistemas biológicos los factores intrínsecos inherentes a cada individuo condicionan los resultados sin poder ponderarlos.

La **Figura 31** muestra que, igual que en el tratamiento continuo de 5 días con el extracto, todas las concentraciones inhibieron el desarrollo radicular en valores próximos al 50%, a excepción del tratamiento con 0,5 mg/ml, donde las raíces fueron afectadas sólo en un 27%, sin que se demuestre una relación dosis-respuesta.

Lo llamativo del resultado se presenta en realidad analizando la **Figura 32** que muestra comparativamente el comportamiento de los bulbos, en relación a la longitud radicular, en los tratamientos de 2 vs. 5 días.



**Figura 32.** Comparación entre longitud de raíces de bulbos de *Allium cepa* L tratadas con concentraciones de EAF de *A. satureioides* durante 5 días vs. raíces tratadas 2 días y luego sometidas a depuración con agua mineral

El promedio de longitudes radiculares para el tratamiento de 2 días con EAF siempre fue mayor al determinado en los ensayos de 5 días aunque no se haya revelado diferencia estadísticamente significativa dentro de una misma concentración considerada. La excepción fue la concentración de 0,5 mg/ml de EAF que arrojó una diferencia significativa con un valor de  $p < 0,001$  (\*), indicando la recuperación de las raíces por acción del agua mineral luego del tratamiento con extracto. Los resultados sugieren que los bulbos tienen capacidad de recuperación del daño inducido por esta concentración de extracto.

Respecto a las anomalías macroscópicas que se muestran en la **Tabla 24**, se observa que en el sistema control negativo sólo fue posible evidenciar ganchos radiculares y tumores, con una frecuencia más elevada que aquella descripta en el tratamiento durante 5 días. Se observó además en los bulbos tratados con el extracto, la presencia de raíces con necrosis y gelificación aunque no pudo demostrarse para ambas anomalías, una relación dosis-respuesta. Las anomalías para cada grupo de tratamiento, incluidos el control negativo y positivo, tuvieron distinta frecuencia de presentación, sin embargo la gelificación fue la anomalía más marcada en los bulbos tratados con extracto, siendo particularmente más notoria en las concentraciones de 3 y 4 mg/ml.

En la **Tabla 24**, que refiere a los porcentajes totales de raíces anormales observadas en los bulbos tratados durante 2 días, pudo observarse que todas las



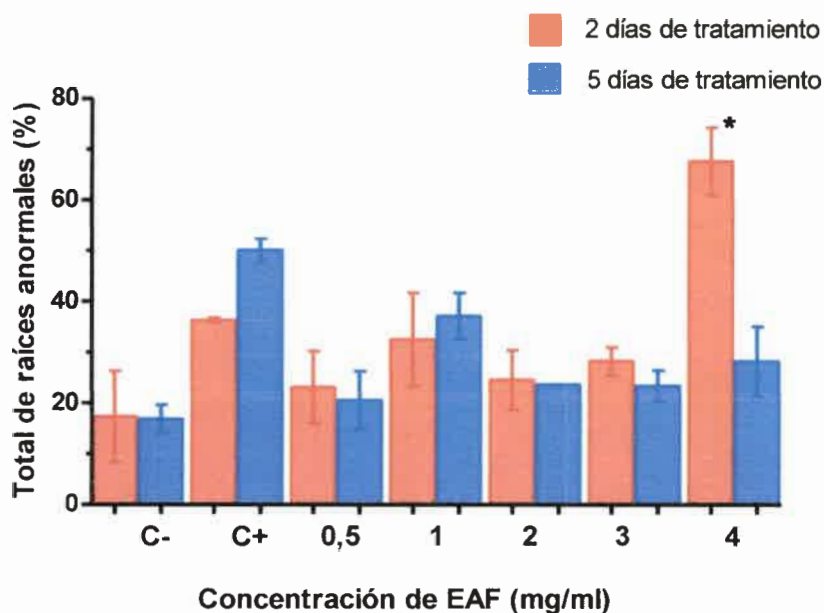
concentraciones de EAF tuvieron un comportamiento similar al sistema control negativo, excepto la concentración de 4 mg/ml que mostró ser tóxica incluso más que el paracetamol, con diferencia estadística y un valor de  $p < 0,05$ .

**Tabla 24.** Valores de anomalías macroscópicas en raíces tratadas durante 2 días con concentraciones de EAF de *A. satureioides* y luego sometidas a depuración con agua mineral

Tratamiento (2 días) EAF (mg/ml)	Raíces totales	Raíces anormales	Porcentaje de raíces anormales
C (-)	97	19	19,59
0,5	87	20	22,99
1	125	38	30,4
2	78	20	25,64
3	76	21	27,63
4	79	54	68,35
C (+)	69	25	36,23

Para finalizar con el análisis de las anomalías macroscópicas de los bulbos sometidos al EAF, se presenta la **Figura 33** que resume los resultados obtenidos en los dos tratamientos, 5 días y 2 días.





**Figura 33.** Comparación entre porcentajes de anomalías totales de raíces de bulbos de *Allium cepa* L tratadas con EAF de *A. satureioides* durante 5 días vs. 2 días y luego sometidas a depuración con agua mineral

El análisis estadístico de estos datos reveló que el comportamiento entre los dos sistemas controles mostró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Además, en el control positivo hubo diferencia significativa entre los bulbos tratados durante 2 y 5 días. En contraposición, ninguno de los tratamientos con el extracto evidenció un comportamiento con significancia estadística al comparar los bulbos tratados durante 2 y 5 días, a excepción de los bulbos tratados con 4 mg/ml, que sí tuvieron diferencia con un  $p < 0,05$  (\*). Llamativamente, para este tratamiento la exposición al extracto durante 2 días provocó la mayor frecuencia de anomalías en las raíces llegando ese valor a un promedio de 68%. Se supone que al tratar con tan alta concentración de extracto, éste ejerce un efecto tóxico y consecuentemente provoca una inhibición del desarrollo radicular, que indirectamente compromete la aparición de anomalías, las cuales se asocian a la división celular. Probablemente es lo que ocurrió en el tratamiento de 2 días y luego reversión, ya que el retorno a la mitosis llevaría a la aparición de errores en la división aumentando la incidencia de anomalías. No obstante, es muy importante destacar que dosis tan elevadas no son empleadas en determinaciones *in vitro* de actividades antimicrobianas (antibacterianas, antimicóticas y antivirales). Los resultados de actividad antiviral frente a WEE y *H. suis* indican dosis activas del orden de los





microgramos, por lo tanto se descarta la utilización de dosis superiores a 1 mg/ml, concentración en la que no se observó un comportamiento tóxico aplicado durante 2 días.

### 5.5.1.c.2. Evaluación del daño macoscópico inducido por EAC

A continuación se presentan los resultados obtenidos del análisis de las alteraciones macroscópicas inducidas por los tratamientos con el extracto acuoso caliente de *A. satureioides*. La **Tabla 25** exhibe los valores hallados cuando se sometieron los bulbos a un tratamiento sostenido durante 5 días.

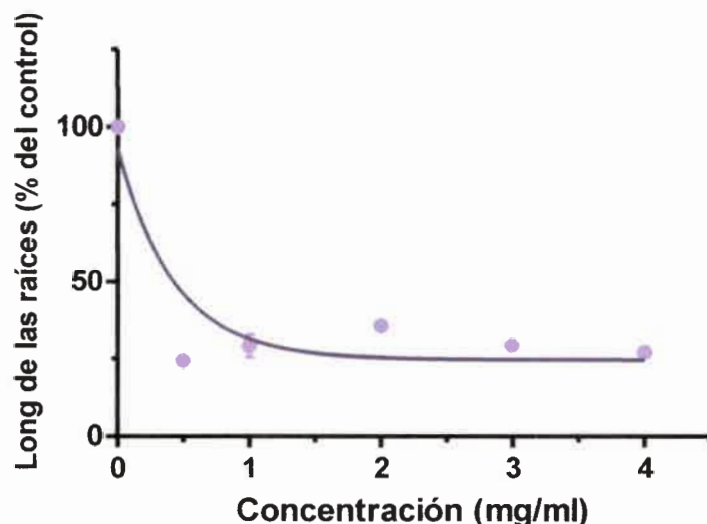
**Tabla 25.** Valores promedio del número y longitud de raíces de *Allium cepa* L, y anomalías luego del tratamiento por 5 días con concentraciones de EAC de *A. satureioides*.

Parámetro Evaluado	Tratamientos								
	C (-)	C (+)	EAC de <i>A. satureioides</i> (mg/ml) durante 5 días						
			0,5	1	2	3	4	Total	
Nº Raíces (X)	47	37	46	55,5	31,5	38	51		
Longitud promedio de raíces (mm)(±SEM)	25,35 (±2,435)	13,97 (±0,654)	6,18 (±0,381)	7,65 (±0,464)	9,02 (±0,790)	7,26 (±0,496)	6,79 (±0,567)		
Crecimiento porcentual	100	55,11	24,38	30,18	35,58	28,64	26,79		
Anormalidades	Ga	6	32	4	3	0	0	3	48
	Ge	0	0	0	4	0	5	13	22
	Ne	0	0	2	28	14	25	11	80
	Tu	2	5	0	0	0	0	0	7
<b>Total de anomalías</b>	<b>8</b>	<b>37</b>	<b>6</b>	<b>35</b>	<b>14</b>	<b>30</b>	<b>27</b>		

Ga: gancho; Ge: gelificación; Ne: necrosis; Tu: tumor.

En relación al número de raíces, los valores encontrados para todos los grupos de ensayos indicaron una radiculación normal.

En lo que refiere al parámetro longitud promedio de las raíces, los resultados obtenidos fueron tomados para la construcción de la **Figura 34**, expresando los valores de desarrollo radicular de manera porcentual.



**Figura 34.** Inhibición porcentual del crecimiento radicular de bulbos de *Allium cepa* L. tratados con diferentes concentraciones de EAC de *A. satureioides* durante 5 días

El análisis estadístico de estos valores reveló diferencia significativa entre el sistema control negativo y todos los tratamientos con un  $p < 0,001$ . No hubo, en cambio, diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, lo cual indicó una ausencia de relación dosis-respuesta entre el acortamiento de la longitud de las raíces y las concentraciones de EAC aplicadas.

Al realizar un estudio comparativo se observó que el comportamiento de los bulbos tratados con las diferentes concentraciones de EAC durante 5 días fue similar al de aquellos tratados con EAF durante el mismo tiempo (**Figura 28**). Sin embargo, se observa que para todas las concentraciones de EAC los crecimientos porcentuales fueron inferiores, con valores que rondaron el 25-30%, en contraposición a los obtenidos con el EAF cuyos valores de crecimiento porcentual oscilaron alrededor del 50%. Estos datos revelan que el extracto acuoso de *A. satureioides* obtenido en caliente resultó ser más tóxico y, además son consistentes con los resultados de citotoxicidad *in vitro*.

La evaluación de las anomalías macroscópicas presentes en los bulbos reveló que el comportamiento de los controles, tanto positivo como negativo, fue el mismo que el observado para los controles del tratamiento con EAF, evidenciándose presencia de ganchos y tumores y, ausencia de gelificación y necrosis radicular. Cabe remarcar que en el caso del EAC la incidencia de tumores en el control negativo fue inferior a la ocurrida con EAF (2 vs.10), no obstante la frecuencia de esta anomalía está dentro de los parámetros normales, (*Fiskesjö, 1997; Bidau et al., 2004*).



En los distintos tratamientos durante 5 días con EAC se pudo observar, en general, que los ganchos y las gelificaciones se encontraron en menor frecuencia que en aquellos tratados con EAF. Contrariamente, la necrosis estuvo notablemente incrementada, duplicando prácticamente la cantidad observada en EAF y, sumado a la ausencia de tumores (por falta de división celular debido a la toxicidad) reafirman una mayor toxicidad por parte de EAC.

La distribución porcentual de las aberraciones macroscópicas encontradas para cada concentración de extracto se exhibe en la **Tabla 26**.

**Tabla 26.** Valores de anomalías macroscópicas presentes en las raíces tratadas durante 5 días con concentraciones de EAC de *A. satureioides*.

Tratamiento (5 días) EAC (mg/ml)	Raíces totales	Raíces anormales	Porcentaje de raíces anormales
Control (-)	94	8	8,51
0,5	92	6	6,52
1	111	35	31,53
2	63	15	23,81
3	76	28	36,84
4	102	38	37,25
Control (+)	74	37	50

El análisis realizado a estos datos indicó que hubo diferencia estadísticamente significativa entre los sistemas controles positivo y negativo con  $p < 0,05$ . Aunque no se demostró diferencias estadísticas entre los resultados obtenidos para los tratamientos de 1 a 4 mg/ml de EAC y el control positivo, claramente el comportamiento del extracto a esas concentraciones indicó ser menos tóxico que el paracetamol pues la frecuencia de aberraciones porcentuales fue menor al valor inducido por la droga pura que rondó el 50%.

También se pudo observar que no hubo diferencias estadísticas entre los bulbos tratados con las diferentes concentraciones de extracto entre sí a excepción del tratamiento con 0,5 mg/ml, que se comportó como el sistema control negativo indicando



ausencia de capacidad tóxica pues además la estadística arrojó también diferencia significativa respecto del paracetamol, con un valor de  $p < 0,05$ .

Los mismos parámetros macroscópicos fueron evaluados para un tratamiento de bulbos durante 2 días, con las distintas concentraciones de EAC de *A. satureioides*. Estos resultados se muestran en la **Tabla 27**.

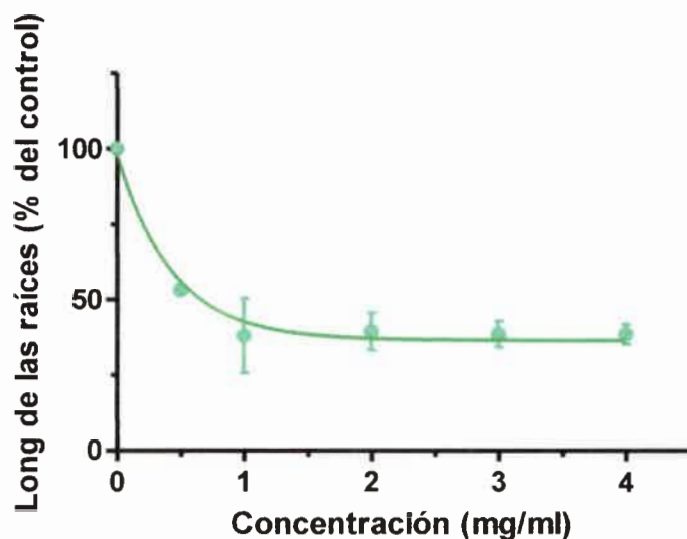
**Tabla 27.** Valores promedio del número y longitud de raíces de *Allium cepa* L, y anomalías luego del tratamiento durante 2 días con EAC de *A. satureioides* y sometidas a depuración con agua mineral.

Parámetro Evaluado	Tratamientos								
	C (-)	C (+)	EAC de <i>A. satureioides</i> (mg/ml) durante 2 días					Total	
			0,5	1	2	3	4		
<b>Nº Raíces (X)</b>	40,5	34,5	49	47,5	45	38	46,5		
<b>Longitud promedio de raíces (mm) (<math>\pm</math> SEM)</b>	31,88 ( $\pm 3,336$ )	17,55 ( $\pm 0,936$ )	18,06 ( $\pm 1,700$ )	13,17 ( $\pm 1,279$ )	13,30 ( $\pm 1,040$ )	13,29 ( $\pm 1,213$ )	13,24 ( $\pm 0,890$ )		
<b>Crecimiento porcentual</b>	100	55,05	56,65	41,31	41,72	41,69	41,53		
<b>Anormalidades</b>	<b>Ga</b>	3	20	0	3	10	0	6	<b>26</b>
	<b>Ge</b>	0	0	1	9	6	6	20	<b>42</b>
	<b>Ne</b>	0	0	17	16	1	24	15	<b>73</b>
	<b>Tu</b>	4	5	1	0	3	0	0	<b>9</b>
<b>Total de anomalías</b>	<b>7</b>	<b>25</b>	<b>19</b>	<b>28</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>35</b>		

*Ga: gancho; Ge: gelificación; Ne: necrosis; Tu: tumor.*

En la **Figura 35**, se muestra la longitud porcentual alcanzada por las raíces, respecto del sistema control negativo.



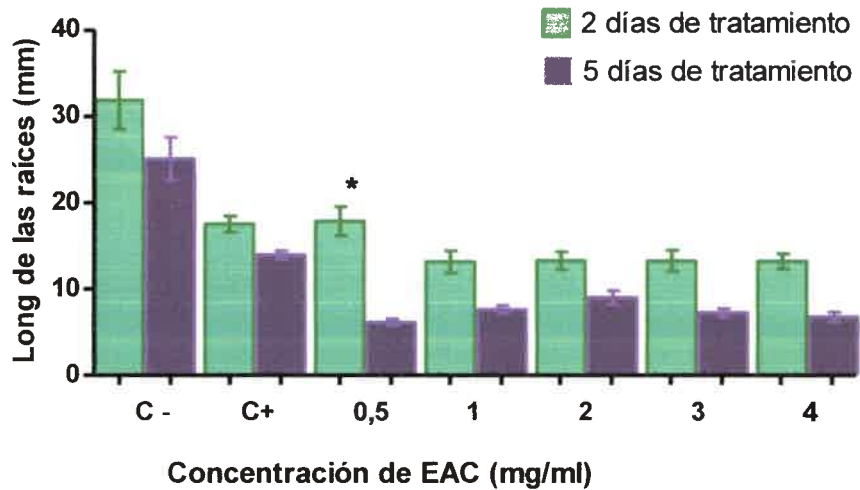


**Figura 35.** Inhibición porcentual del crecimiento radicular de bulbos de *Allium cepa* L. tratados con EAC de *A. satureioides* por 2 días y sometidas a depuración con agua mineral

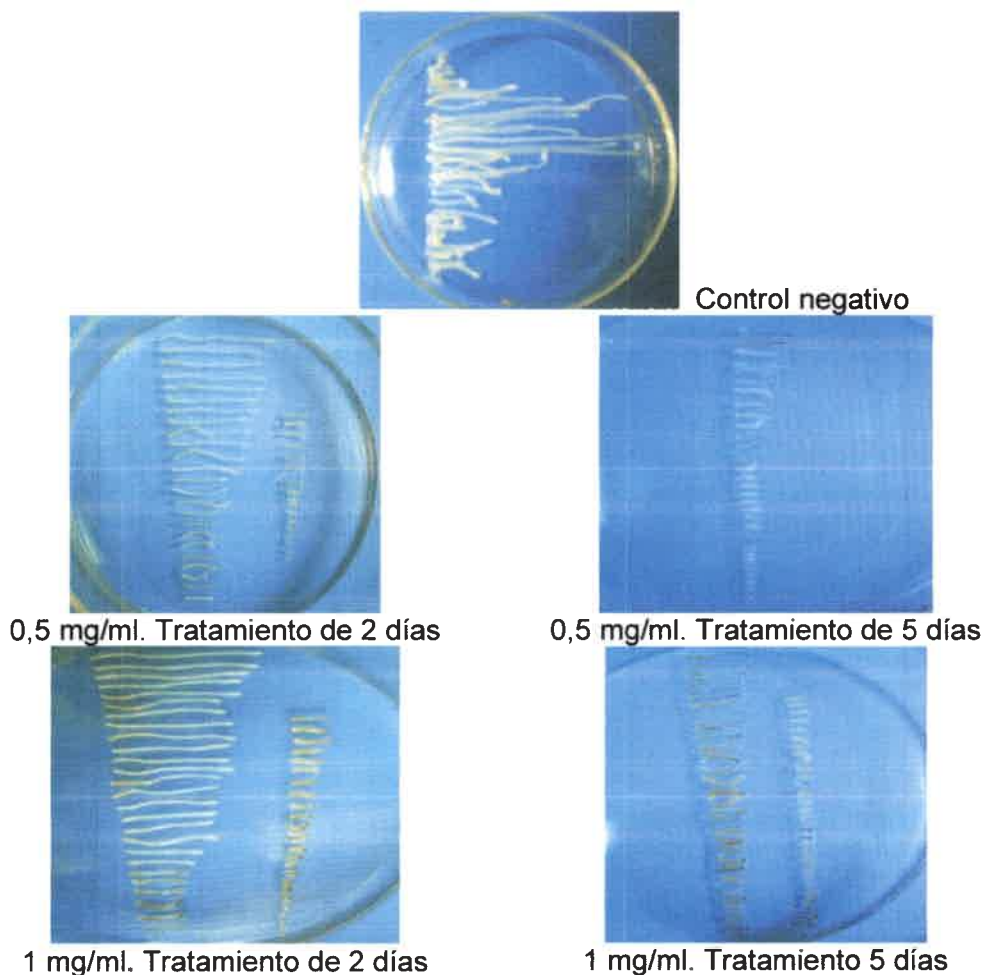
En relación al parámetro longitud radicular, en estos ensayos se demostró que hubo diferencia estadísticamente significativa entre el sistema control negativo y positivo con  $p < 0,05$  y no hubo diferencias entre todos los tratamientos y el sistema control positivo.

El análisis estadístico de estos datos reveló diferencias significativas entre el sistema control negativo y todos los tratamientos con un  $p < 0,05$  indicando que el extracto presentó un comportamiento tóxico. Esta aseveración está apoyada por la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos vs. control positivo ya indicada.

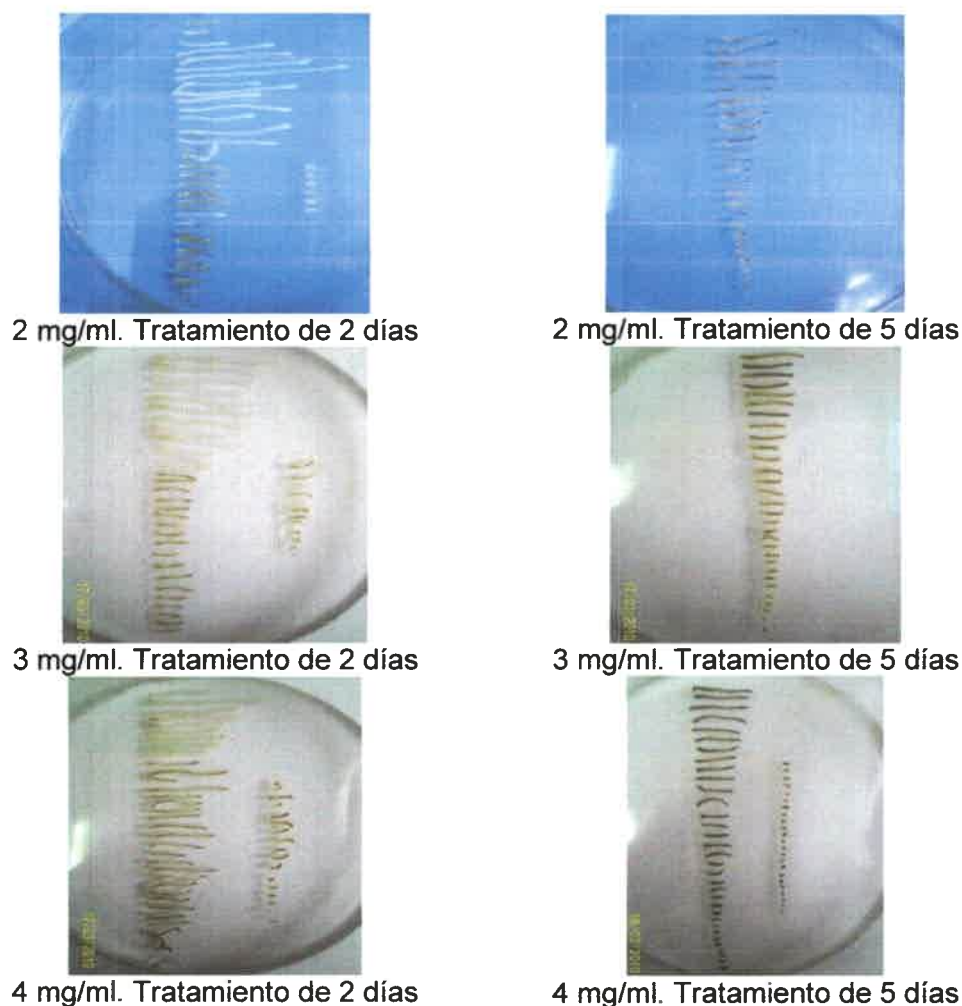
Además, pudo evidenciarse que el promedio de la longitud de las raíces en los tratamientos de 2 días fue mayor que aquellas encontradas en los tratamientos durante 5 días con el extracto, indicando mayor poder tóxico del mismo al aplicarse más días, como se observa en las **Figuras 36 y 37**.



**Figura 36.** Comparación entre longitud de las raíces de los bulbos de *Allium cepa* L tratadas con concentraciones de EAC de *A. satureioides* durante 5 días vs. aquellas tratadas durante 2 días y sometidas a depuración con agua mineral







**Figura 37.** Longitud de raíces de bulbos tratadas con concentraciones de EAC por 2 y 5 días

El análisis estadístico comparativo entre ambos ensayos mostró que no hubo diferencia significativa en ningún par de tratamiento, excepto para la concentración de 0,5 mg/ml que mostró una diferencia significativa con  $p < 0,001$ , indicando recuperación del sistema radicular cuando los bulbos se trataron sólo por 48 h con esta concentración.

Retomando el análisis de la **Tabla 27** y considerando las anomalías macroscópicas presentes en el ensayo con EAC por 2 días, se observó nuevamente que en los sistemas controles sólo se evidenció la presencia de ganchos y tumores. En los tratamientos con las distintas concentraciones de EAC se mostró además la presencia de gelificación y necrosis con diferente frecuencia.



En la **Tabla 28** se exhiben los valores porcentuales de anomalías encontradas en el tratamiento durante 2 días con el extracto obtenido en caliente.

**Tabla 28.** Valores de anomalías macroscópicas en las raíces tratadas durante 2 días con EAC de *A. satureioides* y luego sometidas a depuración con agua mineral.

Tratamiento (2 días) EAC (mg/ml)	Raíces Totales	Raíces anormales	Porcentaje de raíces anormales
Control (-)	81	7	8,64
0,5	98	20	20,41
1	95	27	28,42
2	90	20	22,22
3	76	28	36,84
4	93	42	45,16
Control (+)	69	25	36,23

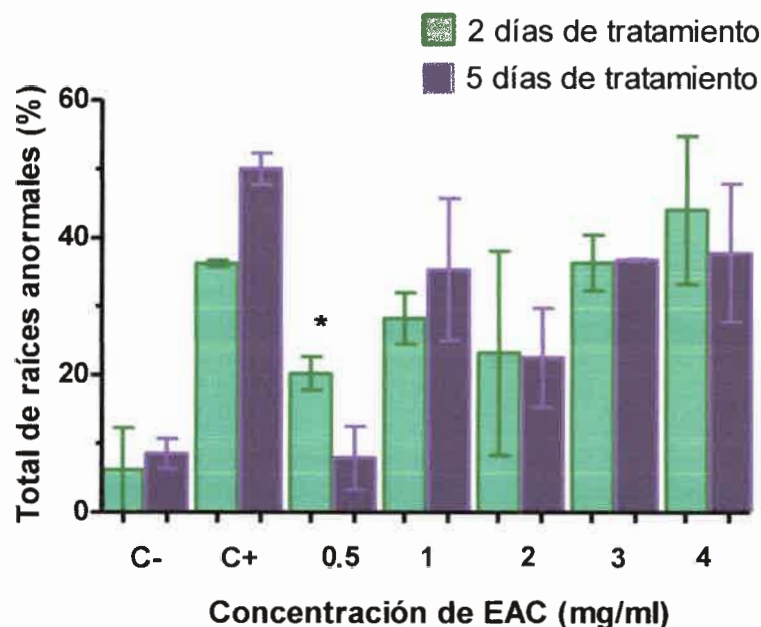
El análisis de las anomalías macroscópicas en raíces tratadas durante 2 días con diferentes concentraciones de EAC reveló que todos los tratamientos indujeron la presencia de dichas anomalías con diferencias estadísticas respecto del control negativo ( $p < 0,05$ ) y con un comportamiento tóxico que fue en aumento conforme aumentó la concentración del extracto, tendiendo a asemejarse y/o superar el comportamiento tóxico del paracetamol.

De forma comparativa en la **Figura 38** se muestran los porcentajes totales de raíces anormales encontradas en cada par de tratamiento para las exposiciones de los bulbos a EAC durante 2 y 5 días.

El análisis estadístico de estos datos reveló que el comportamiento entre los dos sistemas controles mostró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Además, en el control positivo hubo diferencia significativa entre los bulbos tratados durante 2 y 5 días. En contraposición, en ninguno de los tratamientos con el extracto se evidenció un comportamiento con significancia estadística al comparar los bulbos del mismo par de ensayos tratados durante 2 y 5 días, a excepción de aquellos tratados con 0,5 mg/ml, que sí tuvieron diferencia con  $p < 0,05$ (\*), observándose más anomalías en el tratamiento



por 2 días. Este resultado es lógico porque las raíces sometidas a esta concentración presentaron mayor longitud que las de 5 días. La longitud se asocia a la división celular y la división celular favorece la aparición de anomalías, las que pueden aumentar en frecuencia si está presente una sustancia tóxica. Finalmente los resultados revelan una recuperación de los individuos tratados con la más baja concentración de EAC de *A. satureioides* evaluada.



**Figura 38.** Comparación entre porcentajes de anomalías totales de raíces de bulbos de *Allium cepa* L. tratadas con concentraciones de EAC de *A. satureioides* durante 5 días vs. aquellas tratadas durante 2 días y luego sometidas a depuración con agua mineral

#### 5.5.1.d. Estudios citogenéticos

El bioensayo que utiliza los bulbos de *Allium cepa* L., permite evaluar toxicidad de sustancias en función de, tal como se indicó, parámetros macroscópicos como el crecimiento y la forma de las raíces y de parámetros microscópicos citológicos como los tipos y frecuencias de aberraciones cromosómicas y divisiones celulares anormales. Es conocido que el crecimiento de un organismo, está cuidadosamente controlado mediante un ciclo celular perfectamente regulado. En las plantas, las raíces continúan creciendo mientras buscan agua y nutrientes. Estas regiones de crecimiento sirven para estudiar el



ciclo celular, porque en cualquier momento se pueden encontrar células que están sufriendo mitosis.

Un parámetro considerado en numerosas investigaciones es el Índice Mitótico (IM), es decir el análisis cuantitativo de células en división. También se consideró el Índice de Fases (IF), cuya determinación se efectúa con el recuento de células en división que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular, (*Rank, 2003; Rank y Nielsen, 1998; Chauhan et al., 1999; Bushra et al., 2002*).

#### **5.5.1.d.1. Evaluación de los daños microscópicos inducidos por EAF**

El recuento de células presentes en las distintas fases del ciclo celular permitió calcular los índices mitóticos 1, 2 y 3 de las raíces de los bulbos tratadas con EAF, así como los respectivos índice de fases, (**Tablas 29, 30 y 31**).



**Tabla 29.** Valores de los parámetros microscópicos en raíces de *Allium cepa* L tratadas por 2 días con concentraciones de EAF de *Achyrocline satuireioides*.

Tratamiento	PARÁMETROS EVALUADOS																		
	Bulbo	NÚMERO DE CÉLULAS POR FASES DEL CICLO CELULAR										Total	ÍNDICE MITÓTICO 1 (%) / IM promedio	ÍNDICES DE FASES (%)					
		Interfase		Profase		Metafase		Anafase		Telofase				Prof	Met	Anaf	Telof		
Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*	Tot	A*	Total	Prof	Met	Anaf	Telof					
Control negativo	A	2516	0	59	0	4	0	16	4	22	0	2617	3,86	4,36	58,42	3,96	15,84	21,78	
	B	2600	0	92	0	14	0	24	0	20	0	2750	5,45		61,33	9,33	16	13,33	
	C	3215	0	93	0	19	0	27	0	18	0	3372	4,66		59,24	12,10	17,20	11,46	
	D	2400	0	60	0	8	0	6	0	13	0	2487	3,50		68,97	9,20	6,90	14,94	
EAF (mg/ml) 2 días	0,5	A	2125	0	46	0	4	1	5	0	5	0	2185	2,75	3,41	76,67	6,67	8,33	8,33
		B	3440	0	74	0	2	0	18	2	18	0	3552	3,15		66,07	1,79	16,07	16,07
		C	1915	0	25	0	2	0	3	0	3	0	1948	1,69		75,76	6,06	9,09	9,09
		D	2000	0	93	0	11	0	13	2	12	0	2129	6,06		72,09	8,53	10,08	9,30
	1	A	3210	0	40	0	6	0	8	0	24	0	3288	2,37	1,95	51,28	7,69	10,26	30,77
		B	1460	16	2	0	-	-	-	-	-	-	1462	0,14		100	0	0	0
		C	1010	11	7	0	1	0	-	-	1	0	1019	0,88		77,78	11,11	0	11,11
		D	2090	0	83	0	4	0	2	1	7	0	2186	4,39		86,46	4,17	2,08	7,29
	2	A	580	40	14	0	-	-	-	-	-	-	594	2,36	1,15	100	0	0	0
		B	1050	0	9	0	-	-	-	-	-	-	1059	0,85		100	0	0	0
		C	2147	22	16	0	-	-	-	-	-	-	2163	0,74		100	0	0	0
		D	455	0	3	0	-	-	-	-	-	-	458	0,66		100	0	0	0
	3	A	365	0	1	0	-	-	-	-	-	-	366	0,27	0,71	100	0	0	0
		B	1625	165	31	0	-	-	-	-	-	-	1656	1,87		100	0	0	0
		C	1172	2	4	0	-	-	-	-	-	-	1176	0,34		100	0	0	0
		D	2407	47	8	0	-	-	-	-	1	0	2416	0,37		88,89	0	0	11,11
4	A	647	12	4	0	-	-	-	-	-	-	651	0,61	0,27	100	0	0	0	
	B	1495	190	2	0	-	-	-	-	-	-	1497	0,13		100	0	0	0	
	C	485	22	-	-	-	-	-	-	-	-	485	0		-	-	-	-	
	D	1220	60	1	0	-	-	-	-	-	-	1221	0,08		100	0	0	0	

A\*: células con anomalías. IM: índice mitótico. (-): ausencia de células.





**Tabla 30.** Valores de los parámetros microscópicos en raíces de *Allium cepa* L tratadas por 5 días con concentraciones de EAF de *Achyrocline satureioides*.

Tratamiento	PARÁMETROS EVALUADOS																		
	Bulbo	NÚMERO DE CÉLULAS POR FASES DEL CICLO CELULAR										Total	ÍNDICE MITÓTICO 2 (%)/IM promedio		ÍNDICES DE FASES (%)				
		Interfase		Profase		Metafase		Anafase		Telofase					Prof	Met	Anaf	Telo	
		Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*								
Control negativo	C	2750	0	149	0	13	0	22	2	14	0	2948	6,72	4,80	75,25	6,57	11,11	7,07	
	D	3030	0	73	0	4	0	5	0	8	0	3120	2,88		81,11	4,44	5,56	8,89	
Control positivo	C	2795	62	44	0	24	3	7	4	16	0	2953	5,01	5,19	51,37	28,82	5,85	13,9	
	D	2873	107	38	0	19	3	5	2	12	0	3009	5,37		54,07	27,92	4,95	13,0	
EAF (mg/ml) 5 días	0,5	C	3055	0	126	0	12	2	15	1	16	0	3224	5,24	4,78	74,56	7,10	8,88	9,47
		D	1415	0	42	0	6	0	4	1	12	0	1479	4,33		65,63	9,38	6,25	18,7
	1	C	1570	0	45	0	3	0	-	-	2	0	1620	3,09	4,04	90	6	0	4
		D	2092	122	96	0	3	0	6	2	5	0	2202	5		87,27	2,73	5,45	4,55
	2	C	790	0	10	0	1	0	-	-	-	-	801	1,37	1,18	90,91	9,09	0	0
		D	200	0	2	0	-	-	-	-	-	-	202	0,99		100	0	0	0
	3	C	255	0	-	-	-	-	-	-	-	-	255	0	0,26	-	-	-	-
		D	197	0	1	0	-	-	-	-	-	-	198	0,51		100	0	0	0
	4	C	260	0	-	-	-	-	-	-	-	-	260	0	0	-	-	-	-
		D	317	22	-	-	-	-	-	-	-	-	317	0		-	-	-	-

A\*: células con anomalías. IM: índice mitótico. (-): ausencia de células.



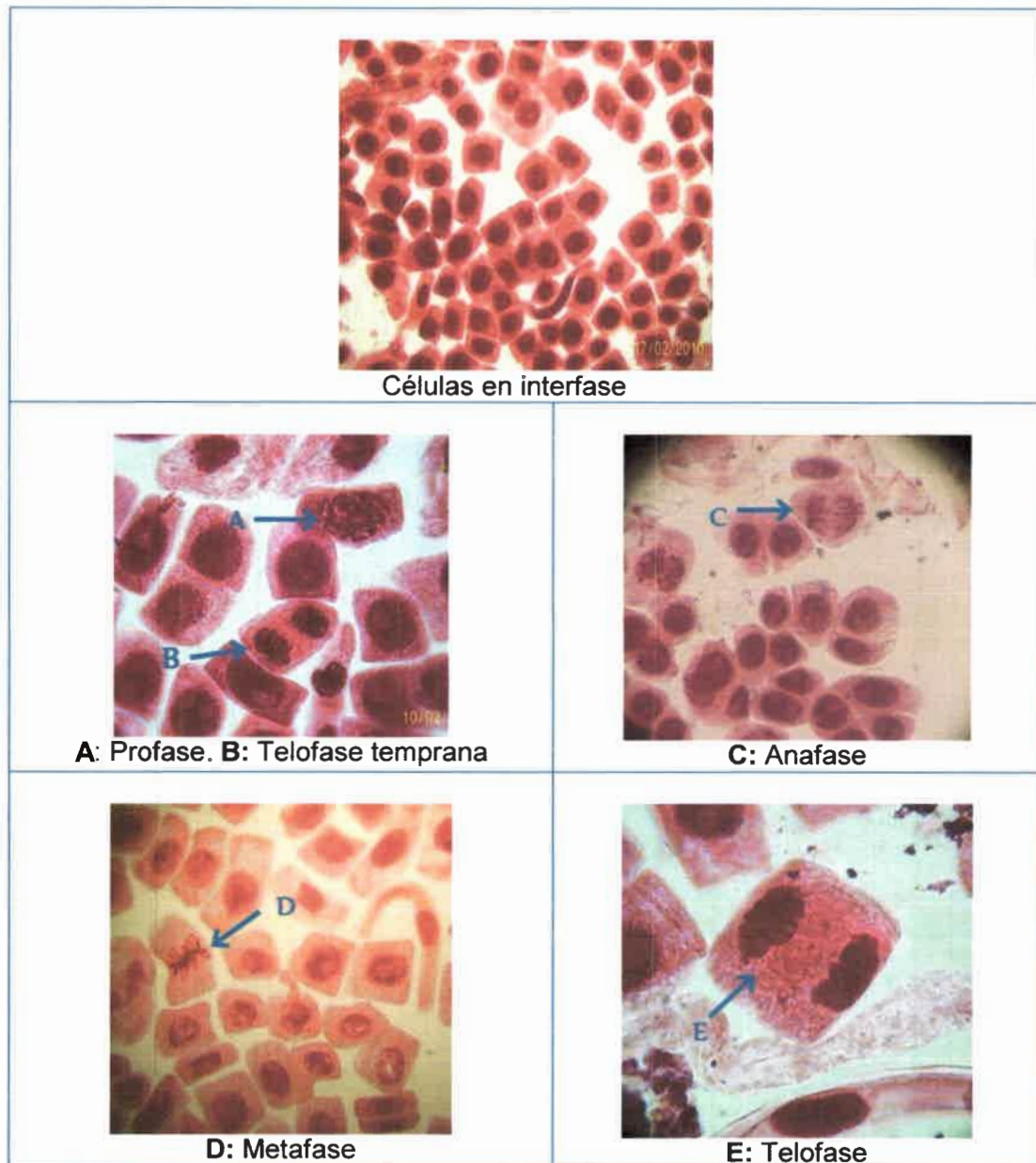


**Tabla 31.** Valores de los parámetros microscópicos en raíces de *Allium cepa* L tratadas durante 2 días con concentraciones de EAF de *Achyrocline satureioides* y luego con 3 días de agua mineral (reversión).

Tratamiento		PARÁMETROS EVALUADOS																	
		Bulbo	NÚMERO DE CÉLULAS POR FASES DEL CICLO CELULAR										Total	ÍNDICE MITÓTICO 3 (%) / IM Promedio (±SEM)		ÍNDICES DE FASES (%)			
			Interfase		Profase		Metafase		Anafase		Telofase					Prof	Met	Anaf	Telof
Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*								
Control Negativo	A	1820	0	63	0	10	0	8	3	15	0	1916	5,01	7,82	65,63	10,42	8,33	15,63	
	B	2370	0	215	0	15	0	23	5	29	0	2652	10,63		76,24	5,32	8,16	10,28	
EAF (mg/ml) 2 días+ 3 de agua	0,5	A	1920	0	126	0	8	0	18	3	19	0	2091	8,18	6,97	73,68	4,68	10,53	11,11
		B	2845	0	134	0	12	3	17	2	11	0	3019	5,76		77,01	6,90	9,77	6,32
	1	A	2415	0	91	0	22	1	22	4	22	0	2572	6,10	6,60	57,96	14,01	14,01	14,01
		B	2350	0	131	0	15	4	14	0	20	0	2530	7,11		72,78	8,33	7,78	11,11
	2	A	1525	0	68	0	5	1	5	1	13	0	1616	5,63	5,70	74,73	5,49	5,49	14,29
		B	1390	35	45	0	11	1	16	2	13	0	1475	5,76		52,94	12,94	18,82	15,29
	3	A	1950	0	111	0	13	0	23	5	37	0	2134	8,62	4,35	60,33	7,07	12,50	20,11
		B	1220	580	1	0	-	-	-	-	-	-	1221	0,08		100	0	0	0
	4	A	1040	30	29	0	2	0	3	0	3	0	1077	3,44	6,84	78,38	5,41	8,11	8,11
		B	1235	0	129	0	-	-	5	1	7	0	1376	10,25		91,49	0	3,55	4,96

A\*: células con anomalías. IM: índice mitótico. (-): ausencia de células.

La información presentada referida a un ciclo celular normal permite realizar el análisis de los datos precedentes. En relación al sistema control negativo, dicho análisis reveló que todos los IM evaluados estuvieron dentro de los registros normales. Pudieron observarse células, con distinta frecuencia, que estaban transitando normalmente por cada etapa del ciclo de la división celular (**Figura 39**).



**Figura 39.** Células meristemáticas de raíces de *Allium cepa* L en interfase y en los diferentes estadios de la división celular (control negativo)

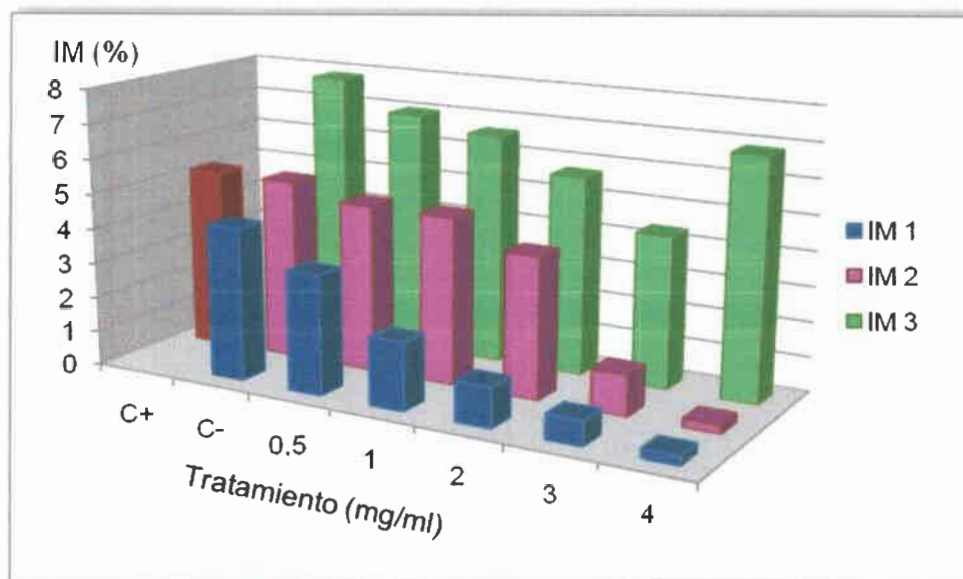


En contraposición, el tratamiento durante 2 días con las diferentes concentraciones de EAF indicó modificación de las etapas del ciclo celular (**Tabla 29**). Claramente se observa que para las más altas concentraciones empleadas (2, 3 y 4 mg/ml) no fue posible llevar a cabo el registro de células que estuvieran durante las etapas de metafase, anafase ni telofase, muy pocas entraron en profase y la gran mayoría fue registrada en la etapa de interfase. Estos datos permiten concluir que el extracto influyó en la división celular induciendo un arresto en interfase, verificado por los valores de IF, modificando entonces la capacidad de las células para dividirse, lo cual claramente se constata observando los valores de IM1. Este parámetro además, reveló una relación dosis-respuesta, es decir a mayor concentración de extracto utilizado, mayor inhibición de la división celular.

Respecto del análisis de los datos de la **Tabla 30** en relación a los IM2 (tratamiento sostenido durante 5 días) se verificó nuevamente la relación dosis-respuesta, reafirmando el carácter tóxico de EAF ya que a la concentración de 4 mg/ml no pudo registrarse ni siquiera, ningún valor de división celular cuando los bulbos fueron expuestos al extracto por tiempos más prolongados. El IM de 4 mg/ml durante 2 días fue similar al IM de 3 mg/ml aplicado 5 días ( $0,27 \approx 0,26$ ).

Finalmente, el análisis de los datos vertidos en la **Tabla 31**, donde se muestra el tratamiento de los bulbos con EAF y luego sometidos 3 días con agua sola (con el propósito de evaluar posible reversión de daño) indica efectivamente que aquella alteración en el ciclo de división celular ejercida por el extracto en estudio fue totalmente revertida. El comportamiento de las raíces de los bulbos tratadas con todas las concentraciones de prueba del extracto fue similar al de las raíces del sistema control, (tratamiento vs. control e IM1 vs. IM3).

Los datos de IM vertidos en las **Tablas 29, 30 y 31** fueron utilizados para la construcción de la **Figura 40**.



**Figura 40.** Comparación entre los índices mitóticos 1, 2 y 3 de las raíces correspondientes a los bulbos de *Allium cepa* tratados con las distintas concentraciones de EAF de *A. satureioides*

El análisis visual de la **Figura 40** permite aseverar que las distintas concentraciones de EAF de *A. satureioides*, independientemente del tiempo de exposición de los bulbos de *Allium cepa*, indujeron una disminución de la división celular que se reflejó en los valores de los índices mitóticos. Contrariamente los bulbos sin tratar mostraron un desarrollo normal de ciclo celular no habiendo diferencia significativa entre los individuos de los sistemas controles.

El análisis estadístico de los datos correspondientes al índice mitótico de los bulbos tratados durante 2 días (IM1), mostró que no hubo diferencia significativa entre el sistema control negativo y los tratamientos de 0,5 y 1 mg/ml, lo cual indica que estos no ejercen toxicidad ya que se comportan de manera semejante al control negativo. Por el contrario, sí hubo diferencia entre el control negativo y las concentraciones 2 mg/ml ( $p < 0,05$ ), 3 y 4 mg/ml ( $p < 0,01$ ). Como se afirmó, los 3 tratamientos con concentraciones más elevadas ejercen, en diferente medida, una inhibición de la división celular, impidiendo un desarrollo radicular normal.

En lo que respecta a los índices mitóticos de los bulbos tratados sostenidamente durante 5 días (IM2), el análisis estadístico indicó también en este caso, ausencia de diferencia significativa entre el control negativo y las concentraciones 0,5 y 1 mg/ml. Por





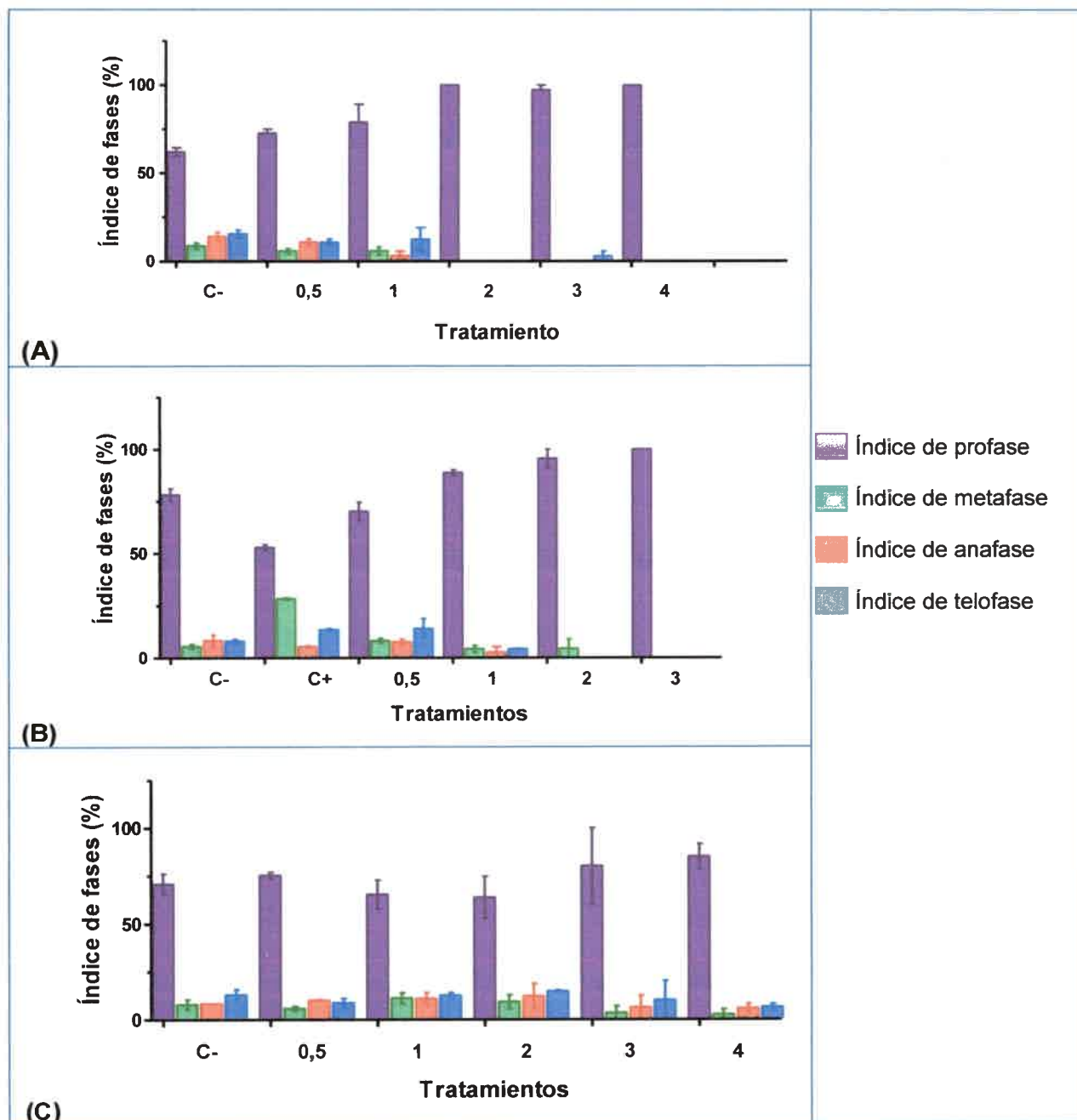
el contrario, el control negativo y las concentraciones restantes mostraron diferencia con un  $p < 0,001$ .

Con respecto a los valores de IM3 no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, ni entre tratamientos vs. control negativo indicando la capacidad de las raíces para depurar la acción tóxica de EAF.

Al realizar un análisis comparativo entre IM1 vs. IM3 para una misma concentración se pudo observar que a todas las dosis de extracto hubo diferencia significativa con un  $p < 0,05$ , lo que demuestra que el daño producido por EAF durante 2 días se revirtió por el tratamiento con agua mineral.

Estos resultados se condicen con los obtenidos en el análisis macroscópico, donde se observó que las raíces tratadas durante 5 días con EAF tuvieron una longitud promedio inferior a aquellas tratadas durante 2 días y luego sometidas a agua mineral.

En las **Tablas 29, 30 y 31**, se puede observar además los resultados referidos a cantidad de células presentes en cada fase del ciclo celular, en los sistemas controles y en los tratamientos. Dichos datos fueron utilizados para construir las **Figuras 41A, B y C**.



**Figura 41.** Índices de fases de raíces tratadas con distintas concentraciones de EAF de *A. satureioides* vs. sistemas controles: **(A)** durante 2 días, **(B)** durante 5 días, **(C)** durante 2 días y luego sometidas a recuperación con agua mineral

Al analizar la figura relacionada al tratamiento de sólo 2 días (**Figura 41A**) con respecto al **índice de profase**, pudo demostrarse que hubo diferencia estadísticamente





significativa entre el control negativo y los tratamientos de 2, 3 y 4 mg/ml ( $p < 0,001$ ), pero no con las concentraciones 0,5 y 1 mg/ml.

El análisis comparativo del **Índice de metafase** de los tratamientos vs. el control negativo sólo fue posible de realizar para las concentraciones 0,5 y 1 mg/ml, e indicó ausencia de diferencia estadística significativa. Las restantes concentraciones no permitieron encontrar células en este estadio, no pudiendo realizarse un análisis estadístico.

De igual forma, respecto al **Índice de anafase** el control negativo no tuvo diferencia con 0,5 mg/ml de EAF, pero sí la hubo con el tratamiento de 1 mg/ml con un  $p < 0,01$ .

Finalmente, para el **Índice de telofase** el control negativo no tuvo diferencia estadísticamente significativa respecto de los tratamientos con 0,5, 1 y 3 mg/ml. Para las concentraciones de EAF del orden 2 y 4 mg/ml, al no haber células en este estadio, no se pudo efectuar el análisis.

Estos resultados indican que la fase que prevaleció en las células meristemáticas en división tratadas con las distintas concentraciones del extracto fue la profase, siendo este hecho más marcado en las concentraciones de 2, 3 y 4 mg/ml. Los índices de las demás fases disminuyeron en estas concentraciones, revelando un arresto de la división celular en profase inducido por las concentraciones de 2, 3 y 4 mg/ml, indicando toxicidad. Los tratamientos de 0,5 y 1 mg/ml mostraron un comportamiento igual al sistema control negativo, reflejando que estas concentraciones no fueron tóxicas.

Cabe destacar que durante la profase la cromatina se condensa completamente, es el período más largo de la mitosis. Por este motivo es normal que si se realiza un preparado en un momento dado, haya mayor probabilidad de hallar células dividiéndose en el estadio de profase que en cualquiera de las otras etapas de la mitosis.

El análisis estadístico de la **Figura 41B**, que representa los datos del tratamiento durante 5 días, respecto al **Índice de profase** reveló diferencia estadísticamente significativa entre ambos sistemas controles ( $p < 0,01$ ). No hubo diferencia estadística entre el control negativo y los tratamientos de 0,5 y 1 mg/ml, pero sí la hubo entre este control y las concentraciones 2 y 3 mg/ml ( $p < 0,05$ ). La mayor concentración ensayada, 4 mg/ml, no presentó índice mitótico, por lo cual al no haber células en división no se pudo realizar el análisis de los índices de fases.



El paracetamol, empleado como control positivo, mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a todas las concentraciones de prueba empleadas de EAF. Estos datos sugieren que el extracto no se comporta como la droga. El EAF a altas concentraciones indujo arresto en profase, mientras que el paracetamol permitió que la cromatina se condensara completamente, facilitando la separación de los pares de centriolos, su migración hacia los polos de la célula y la formación del huso mitótico. Los cromosomas permanecieron unidos a ese huso mitótico, no obstante no pudieron migrar, quedando retenidos en metafase de tal forma que el próximo período anafásico se vio comprometido.

Respecto al Índice de metafase, hubo diferencia entre ambos controles siendo mayor el valor registrado para el control positivo, tal como se indicó. En cambio, no se revelaron diferencias entre el control negativo y ninguna de las concentraciones ensayadas que mostraron células en este estadio; quedando excluidas entonces las concentraciones de 3 y 4 mg/ml de EAF.

Por el contrario, en el Índice de anafase no hubo diferencia significativa entre los controles, ni entre estos y las concentraciones de 0,5 y 1 mg/ml.

En el Índice de telofase tampoco hubo diferencia entre los controles, ni entre el control negativo y los tratamientos de 0,5 y 1 mg/ml.

Nuevamente para un tratamiento de 5 días con EAF, al igual que en el tratamiento de 2 días, la fase que prevaleció en las células meristemáticas en división fue la profase, siendo este hecho más marcado aún para las concentraciones de 2 y 3 mg/ml. Se desprende que el comportamiento del extracto estaría generando un compromiso molecular que afecta la formación de los cromosomas sin permitir que los mismos se ubiquen en la placa ecuatorial de la célula. Si esta fase se supera o si las células han sorteado este inconveniente no tendrían en principio problemas para migrar. Esta afirmación se apoya en la ausencia de diferencia estadísticamente significativa en el comportamiento entre el control negativo y los tratamientos con el extracto que no alteraron la anafase ni la telofase.

En los estudios de reversión (**Figura 41C**) el análisis estadístico reveló ausencia de diferencia significativa en los índices de fases de las raíces tratadas con las distintas concentraciones de extracto vs. control negativo, lo cual indica que aquellas modificaciones o alteraciones inducidas por EAF (**Figuras 41A y B**), son revertidas por el



tratamiento con agua mineral. Estos resultados indican que la mitosis se llevó a cabo normalmente, lo cual se corrobora además por el valor del IM3. Los resultados en conjunto son relevantes pues indican que no produce un daño irreversible si se aplica el extracto en alguna terapia que implique la participación de células eucariota.

Hasta aquí se han discutido aspectos asociados a la toxicidad de EAF, siendo necesario además evaluar las anomalías registradas en cada fase del ciclo celular así como su frecuencia de aparición. El parámetro “*anormalidad*”, claramente definido como aberraciones fisiológicas o clastogénicas, es más relevante a la hora de determinar genotoxicidad, (Tablas 32, 33 y 34).

El análisis de la **Tabla 32** muestra que el sistema control negativo presentó aberraciones espontáneas que se observaron sólo en células en división y que se manifestaron exclusivamente con la escasa presencia de cromosomas pegajosos y algunas anafases demoradas. La frecuencia de la presencia de estas aberraciones fue escasa, 4%, no superando el 10% indicado como normal para células sin tratar. En contraposición, en los bulbos tratados durante 2 días con EAF, se demostró la presencia de células con núcleos cuyas modificaciones estructurales fueron compatibles a cuerpos apoptóticos, (**Figura 42**). Estos cambios en la estructura cromosomal se observaron en las raíces tratadas a partir de la concentración de 1 mg/ml. En función del valor promedio de los índices de aberraciones pudo demostrarse una relación dosis-respuesta que concordó con aquella relación expresada para los índices mitóticos. Tales alteraciones no pudieron ser registradas en el sistema control ni en las raíces de los bulbos sometidos a un tratamiento con 0,5 mg/ml del extracto.



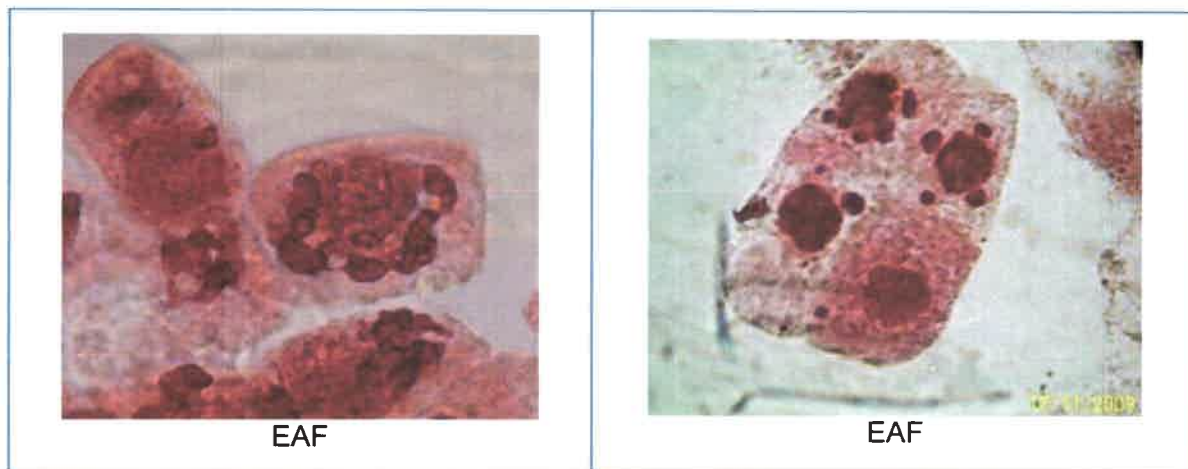
**Tabla 32.** Índices de aberraciones y diferenciación de anomalías microscópicas en raíces tratadas con concentraciones de EAF de *Achyrocline satureioides* durante 2 días.

Tratamiento	Bulbo	Índice de aberraciones (IA)				Tipos de aberraciones						
		Interfase <sup>a</sup> / promedio		División <sup>b</sup> / promedio		En interfase Probables cuerpos apoptóticos	En división					
		P	CA	CR	CP		AD					
Control negativo	A	0	0	3,96	0,99	-	-	-	-	1	3	
	B	0		0		-	-	-	-	-	-	
	C	0		0		-	-	-	-	-	-	
	D	0		0		-	-	-	-	-	-	
EAF (mg/ml) 2 días	0,5	A	0	1,67	1,25	-	-	-	-	1	-	
		B		0		1,79	-	-	-	-	1	-
		C		0		0	-	-	-	-	-	-
		D		0		1,55	-	-	-	-	-	2
	1	A	0,55	0	0,26	-	-	-	-	-	-	
		B		1,10		0	16	-	-	-	-	-
		C		1,09		0	11	-	-	-	-	-
		D		0		1,04	-	-	1	-	-	-
	2	A	1,98	6,90	0	40	-	-	-	-	-	
		B		0		0	-	-	-	-	-	
		C		1,02		0	22	-	-	-	-	-
		D		0		0	-	-	-	-	-	-
	3	A	3,07	0	0	-	-	-	-	-	-	
		B		10,15		0	165	-	-	-	-	-
		C		0,17		0	2	-	-	-	-	-
		D		1,95		0	47	-	-	-	-	-
	4	A	3,77	1,85	0	12	-	-	-	-	-	
		B		12,71		0	190	-	-	-	-	-
		C		4,54		0	22	-	-	-	-	-
		D		4,92		0	60	-	-	-	-	-

ÍA<sup>a</sup>: Fórmula: N° células anormales en interfase/ N° total de células en interfase x 100; ÍA<sup>b</sup>: Fórmula: N° células anormales en división/ N° total de células en división x 100, (Amat et al., 2002); P<sup>1</sup>: puentes; CA<sup>2</sup>: cromosomas adelantados; CR<sup>3</sup>: cromosomas retardados; CP<sup>4</sup>: cromosomas pegajosos; AD<sup>5</sup>: anafase demorada.

Es escasa la información relacionada a la descripción de la presencia de cuerpos apoptóticos mediante el desarrollo del test de *Allium cepa* L, sin embargo los cambios estructurales descritos aquí, también fueron observados en células de *Allium cepa* por Kuras et al., (2006) cuando evaluaron la acción genotóxica del extracto acuoso de *Uncaria tomentosa* (Willd.).





**Figura 42.** Aberraciones en células meristemáticas de *Allium cepa* compatibles con cuerpos apoptóticos, inducidas por el tratamiento con EAF de *A. satureioides*

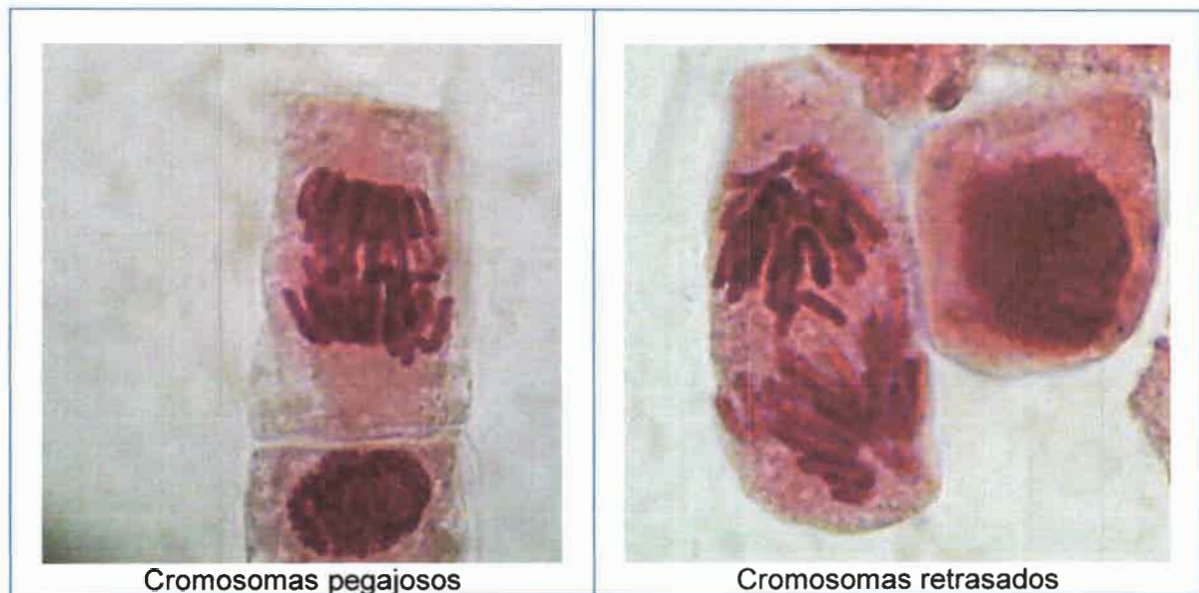
Está descrito que el proceso de apoptosis o muerte celular programada es un fenómeno fisiológico claramente distinguible de la necrosis en donde acontece una secuencia de eventos que implican cambios en la membrana plasmática, en las mitocondrias y en el núcleo que terminan destruyendo la célula apoptótica. En relación a los cambios nucleares, el aspecto del núcleo de una célula apoptótica se convierte en lo más característico. Aunque existen variaciones entre los distintos tipos celulares, en general se produce un aumento en la densidad de la cromatina que comienza formando parches alrededor de la envoltura nuclear y terminan dando lugar a una o varias esferas densas en las últimas etapas. Los cambios iniciales se acompañan con reducción del núcleo. Este tipo de alteraciones morfológicas se han podido registrar en nuestros estudios tal como se observan con claridad en la **Figura 42**.

Estos cambios morfológicos se asocian con alteraciones de la cromatina que son fruto de la ruptura de la lámina nuclear, estructura que se encuentra bajo la membrana nuclear y que participa en su estabilidad. También durante la apoptosis, se produce la fragmentación del ADN en una escalera de subunidades regulares que resultan del corte al azar entre los nucleosomas, ([www.escuela.med.puc.cl/publ/PatologiaGeneral/Patol\\_033](http://www.escuela.med.puc.cl/publ/PatologiaGeneral/Patol_033)).

Otras aberraciones a nivel cromosomal fueron posibles de ser visualizadas. En las células en mitosis, se pudieron observar alteraciones fisiológicas tales como cromosomas



pegajosos, cromosomas retardados y/o adelantados en anafases alteradas (**Figura 43**). No fue posible registrar imágenes de células binucleadas, células con micronúcleos ni c-mitosis en ninguno de los tratamientos, incluyendo el control.



**Figura 43.** Aberraciones en células meristemáticas en división de *Allium cepa* inducidas por EAF de *A. satureioides* aplicado durante 2 días

Los datos de la **Tabla 32** muestran la frecuencia de las aberraciones totales que permitieron calcular los Índices correspondientes. El valor del índice de aberraciones, que pudo calcularse sólo para las células del sistema control y de los bulbos tratados con 0,5 y 1 mg/ml, fue similar y de escasa significancia como evento biológico que demuestre que EAF de *A. satureioides* aplicado durante 2 días genere un daño genotóxico. A este mismo resultado se pudo arribar cuando se efectuó el análisis de los valores presentados en la **Tabla 33** en relación a un tratamiento sostenido durante 5 días con EAF. Las dos concentraciones menores (0,5 y 1 mg/ml) se comportaron similares al control negativo. El control positivo (paracetamol) exhibió una marcada acción genotóxica y las raíces tratadas con 2, 3 y 4 mg/ml del extracto, donde las células no se dividieron, no evidenciaron alteraciones.



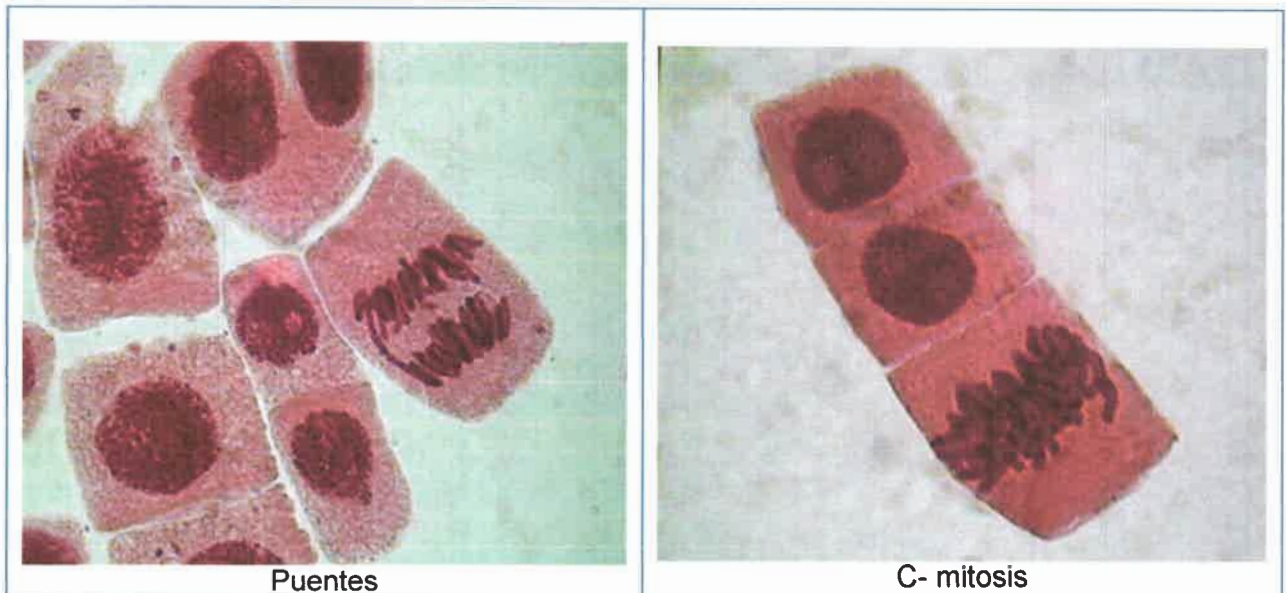


**Tabla 33.** Índice de aberraciones y diferenciación de anomalías microscópicas de raíces tratadas con concentraciones de EAF de *Achyrocline satureioides* durante 5 días.

Tratamiento	Bulbo	Índice de aberraciones				Tipos de aberraciones						
		Interfase <sup>a</sup> /promedio		División <sup>b</sup> /promedio		En interfase	En división					
						Probables cuerpos apoptóticos	P <sub>1</sub>	CA <sub>2</sub>	CR <sub>3</sub>	CP <sub>4</sub>	AD <sub>5</sub>	C-M <sub>6</sub>
Control Negativo	C	0	0	1,01	0,51	-	-	1	-	-	1	-
	D	0		0		-	-	-	-	-	-	-
Control Positivo	C	2,22	2,97	6,99	6,48	-	2	-	-	1	2	2
	D	3,72		5,97		-	-	1	-	2	1	1
EAF (mg/ml) 5 días	0,5	C	0	1,78	1,67	-	1	-	-	1	-	1
		D		1,56		-	1	-	-	-	-	-
	1	C	2,92	0	0,91	-	-	-	-	-	-	-
		D		5,83		1,82	122	-	-	-	2	-
	2	C	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-
		D		0		0	-	-	-	-	-	-
	3	C	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-
		D		0		0	-	-	-	-	-	-
	4	C	3,97	0	0	-	-	-	-	-	-	-
		D		6,94		0	22	-	-	-	-	-

Í<sup>a</sup>: Fórmula: N° células anormales en interfase/ N° total de células en interfase x 100; Í<sup>b</sup>: Fórmula: N° células anormales en división/ N° total de células en división x 100, (Amat et al., 2002); P<sup>1</sup>: puentes; CA<sup>2</sup>: cromosomas adelantados; CR<sup>3</sup>: cromosomas retardados; CP<sup>4</sup>: cromosomas pegajosos; AD<sup>5</sup>: anafase demorada; C-M<sup>6</sup>: c- mitosis. En el control positivo se encontraron en interfase micronúcleos y células binucleadas.

Como se observa, además de las anomalías descritas fue posible visualizar puentes entre cromosomas y c-mitosis (**Figura 44**). Se destaca que la frecuencia de cuerpos compatibles a apoptosis se evidenció con menor frecuencia.



**Figura 44.** Aberraciones en células meristemáticas de *Allium cepa* inducidas por el tratamiento con EAF de *A. satureioides* aplicado durante 5 días

Finalmente la evaluación de los datos obtenidos en los estudios de reversión (Tabla 34) revela un comportamiento consistente al encontrado en los índices mitóticos. Como para todas las concentraciones empleadas de EAF hubo recuperación del sistema huésped, cuyas células meristemáticas entraron en división, fue posible observar alteraciones microscópicas en las raíces de los bulbos de todos los tratamientos. Los escasos valores de índices de anormalidades totales revelaron un comportamiento homogéneo entre el sistema control negativo y todas las soluciones de prueba del extracto, a excepción de la concentración más elevada (4 mg/ml) que al resultar más tóxica afectó la división celular disminuyendo consecuentemente la aparición de células con anormalidades.



**Tabla 34.** Índice de aberraciones y diferenciación de anomalías microscópicas de raíces tratadas con concentraciones de EAF de *A. satureioides* por 2 días y luego con agua mineral.

Tratamiento	Bulbo	Índice de aberraciones				Tipos de aberraciones							
		Interfase <sup>a</sup> / promedio		División <sup>b</sup> / promedio		En interfase	En división						
						Probables cuerpos apoptóticos	P <sub>1</sub>	CA <sub>2</sub>	CR <sub>3</sub>	CP <sub>4</sub>	AD <sub>5</sub>	C-M <sub>6</sub>	
Control negativo	A	0	0	3,13	2,45	-	1	1	-	-	1	-	
	B	0		1,77		-	3	-	-	1	1	-	
EAF (mg/ml) 2 días+ 3 agua	0,5	A	0	1,75	2,31	-	-	1	-	1	1	-	
		B	0	2,87		-	1	1	-	2	-	1	
	1	A	0	0	3,18	2,70	-	1	-	-	2	2	-
		B	0		2,22		-	-	-	-	2	-	2
	2	A	0	1,26	2,20	2,75	-	1	-	-	1	-	-
		B	2,52		3,53		35	-	-	-	2	1	-
	3	A	0	23,77	2,72	1,36	-	3	-	1	-	1	-
		B	47,54		0		580	-	-	-	-	-	-
	4	A	2,88	1,44	0	0,36	30	-	-	-	-	-	-
		B	0		0,71		-	-	-	1	-	-	-

Í<sup>a</sup>: Fórmula: N° células anormales en interfase/ N° total de células en interfase x 100; Í<sup>b</sup>: Fórmula: N° células anormales en división/ N° total de células en división x 100, (Amat et al., 2002); P<sup>1</sup>: puentes; CA<sup>2</sup>: cromosomas adelantados; CR<sup>3</sup>: cromosomas retardados; CP<sup>4</sup>: cromosomas pegajosos; AD<sup>5</sup>: anafase demorada; C-M<sup>6</sup>: c- mitosis.

El análisis estadístico de los datos representados en la **Figura 45**, correspondientes al tratamiento durante 2 días con EAF de *A. satureioides*, reveló ausencia de diferencia significativa entre el control negativo y los tratamientos de 0,5 y 1 mg/ml, los cuales presentaron anomalías en división.

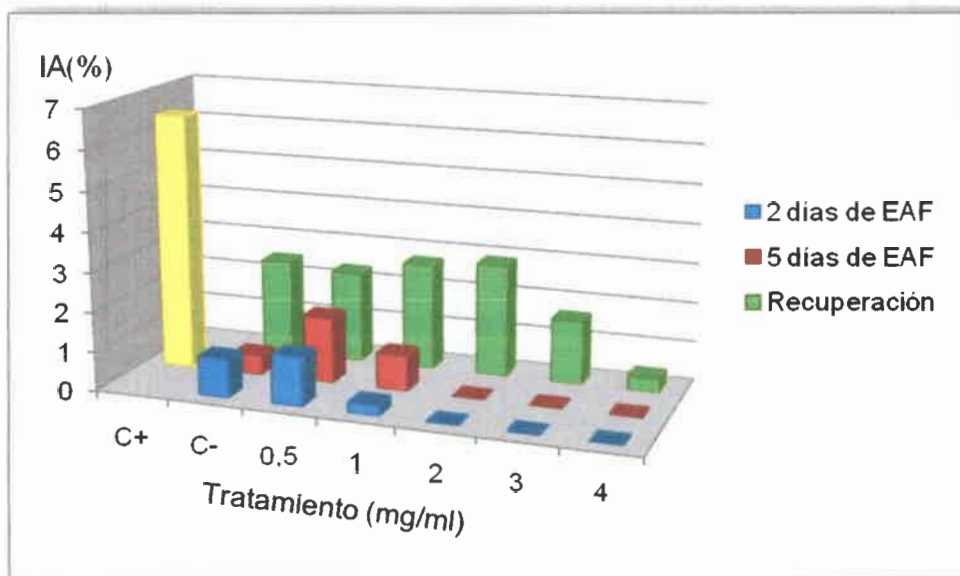
Para los bulbos tratados durante 5 días hubo diferencia estadísticamente significativa entre el control negativo y el control positivo, y entre este último y todas las concentraciones ensayadas que presentaron células en algún estadio de la mitosis, con un  $p < 0,001$ . Por el contrario, el control negativo no presentó diferencias significativas respecto de las anomalías registradas en raíces de los bulbos tratados con 0,5 y 1 mg/ml, indicando que el EAF a estas concentraciones no resulta genotóxico ni aún aplicado durante 5 días.





En cuanto a los bulbos sometidos a los tratamientos de reversión, no hubo diferencia significativa entre el control negativo y ninguna de las concentraciones ensayadas, reafirmando la recuperación de la división celular. Por este motivo poseen anomalías en división en un porcentaje semejante a las raíces sin tratar.

Al realizar un análisis entre los diferentes tiempos de exposición para los bulbos tratados con una misma concentración de extracto se observó diferencia estadísticamente significativa entre los bulbos tratados durante 2 días y aquellos sometidos a reversión en las concentraciones 1 y 2 mg/ml ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  respectivamente). En los restantes tratamientos no se halló diferencia al efectuar el mismo análisis.



**Figura 45.** Índices de anomalías cromosómicas en raíces tratadas con concentraciones de EAF de *A. satureioides* durante 2 días, 5 días y, 2 días más 3 días con agua mineral

#### 5.5.1.d.2. Evaluación de los daños microscópicos inducidos por EAC

El recuento de células presentes en las distintas fases del ciclo celular permitió calcular los índices mitóticos 1, 2 y 3 de las raíces de los bulbos tratados con EAC, así como los respectivos índices de fase, (Tablas 35, 36 y 37).

**Tabla 35.** Valores de los parámetros microscópicos en raíces de *Allium cepa* L luego del tratamiento durante 2 días con concentraciones de EAC de *Achyrocline satureioides*.

Tratamiento	PARÁMETROS EVALUADOS																		
	Bulbo	NÚMERO DE CÉLULAS POR FASES DEL CICLO CELULAR										Total	Índice Mitótico 1 (%)/IM Promedio	ÍNDICES DE FASES (%)					
		Interfase		Profase		Metafase		Anafase		Telofase				Prof	Met	Anaf	Telof		
Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*								
Control negativo	A	2735	0	112	0	8	0	10	1	24	0	2889	5,33	5,79	72,73	5,19	6,49	15,58	
	B	2710	0	97	0	13	0	17	1	34	0	2871	5,61		60,25	8,07	10,56	21,12	
	C	3100	0	121	0	12	0	14	4	22	0	3269	5,17		71,60	7,10	8,28	13,02	
	D	2790	0	129	0	23	0	24	1	36	0	3002	7,06		60,85	10,85	11,32	16,98	
EAC (mg/ml) 2 días	0,5	A	2365	0	46	0	5	0	7	1	11	0	2434	2,83	2,38	66,67	7,25	10,14	15,94
		B	1417	0	37	0	1	0	3	1	6	0	1464	3,21		78,72	2,13	6,38	12,77
		C	2662	210	-	-	-	-	-	-	-	-	2662	0		-	-	-	-
		D	2877	0	79	0	8	0	6	0	13	0	2983	3,55		74,53	7,55	5,66	12,26
	1	A	2238	43	23	0	0	-	0	-	2	0	2263	1,10	0,50	92	0	0	8
		B	1510	255	1	0	0	-	0	-	1	0	1512	0,13		50	0	0	50
		C	2301	340	11	0	2	0	1	0	4	0	2319	0,78		61,11	11,11	5,56	22,22
		D	2302	78	0	-	0	-	0	-	0	-	2302	0		-	-	-	-
	2	A	2755	35	5	0	0	-	0	-	1	0	2761	0,22	0,18	83,33	0	0	16,67
		B	1622	20	1	0	0	-	0	-	1	0	1624	0,12		50	0	0	50
		C	2460	170	4	0	1	0	0	-	2	0	2467	0,28		57,14	14,29	0	28,57
		D	1255	15	1	0	0	-	0	-	0	-	1256	0,08		100	0	0	0
	3	A	1747	5	20	0	1	0	0	-	0	-	1758	1,19	1,58	95,24	4,76	0	0
		B	1541	0	45	0	7	0	3	0	15	0	1611	4,35		64,29	10	4,29	21,43
		C	1660	0	9	0	0	-	0	-	1	0	1670	0,60		90	0	0	10
		D	2167	70	2	0	0	-	0	-	2	0	2171	0,18		50	0	0	50
4	A	1367	45	6	0	2	1	1	0	2	0	1378	0,80	0,45	54,55	18,18	9,09	18,18	
	B	735	25	2	0	1	0	0	-	1	0	739	0,54		50	25	0	25	
	C	2029	14	5	0	0	-	0	-	0	-	2034	0,25		100	0	0	0	
	D	1170	0	2	0	0	-	1	0	0	-	1173	0,26		66,67	0	33,33	0	

A\*: células con anomalías. IM: índice mitótico. (-): ausencia de células.



**Tabla 36.** Valores de los parámetros microscópicos en raíces de *Allium cepa* L luego del tratamiento durante 5 días con concentraciones de EAC de *Achyrocline satureioides*.

Tratamiento	PARÁMETROS EVALUADOS																		
	Bulbo	NÚMERO DE CÉLULAS POR FASES DEL CICLO CELULAR										Total	Índice Mitótico 2 (%)/IM Promedio		ÍNDICES DE FASES (%)				
		Interfase		Profase		Metafase		Anafase		Telofase					Prof	Met	Anaf	Telof	
		Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*								
Control negativo	C	3300	0	107	0	24	0	19	3	39	0	3489	5,42	5,89	56,61	12,70	10,05	20,63	
	D	3200	0	145	0	15	0	17	4	40	0	3417	6,35		66,82	6,91	7,83	18,43	
Control positivo	C	2795	62	44	0	24	3	7	4	16	0	2953	5,65	5,19	51,37	28,82	5,85	13,96	
	D	2873	107	38	0	19	3	5	2	12	0	3009	4,73		54,07	27,92	4,95	13,06	
EAC (mg/ml) 5 días	0,5	C	660	0	1	0	0	-	1	0	2	0	664	0,60	1,63	25	0	25	50
		D	3013	13	52	0	0	-	6	0	24	0	3095	2,65		63,41	0	7,32	29,27
	1	C	1479	6	18	0	1	0	0	-	9	0	1507	1,86	1,45	64,29	3,57	0	32,14
		D	2469	0	21	0	0	-	2	0	3	0	2495	1,04		80,77	0	7,69	11,54
	2	C	696	0	0	-	0	-	0	-	0	-	696	0	0	0	0	0	0
		D	763	0	0	-	0	-	0	-	0	-	763	0		0	0	0	0
	3	C	1393	0	3	0	2	0	0	-	0	-	1398	0,36	0,61	60	40	0	0
		D	2755	0	17	0	2	1	2	1	3	0	2779	0,86		70,83	8,33	8,33	12,50
	4	C	1095	0	15	0	0	-	0	-	0	-	1100	1,35	1,42	100	0	0	0
		D	1190	0	9	0	3	2	1	0	5	0	1208	1,49		50	16,67	5,56	27,78

A\*: células con anomalías. IM: índice mitótico. (-): ausencia de células.





**Tabla 37.** Valores de los parámetros microscópicos en raíces de *Allium cepa* L luego del tratamiento durante 2 días con concentraciones de EAC de *Achyrocline satureioides* y luego con 3 días de agua mineral (reversión).

Tratamiento	Bulbo	PARÁMETROS EVALUADOS																	
		NÚMERO DE CÉLULAS POR FASES DEL CICLO CELULAR										Total	Índice Mitótico 3 (%)/IM Promedio	ÍNDICES DE FASES (%)					
		Interfase		Profase		Metafase		Anafase		Telofase				Prof	Met	Anaf	Telof		
Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*								
Control negativo	A	2200	0	108	0	17	0	12	7	22	0	2359	6,74	6,64	67,92	10,69	7,55	13,84	
	B	3100	0	136	0	19	1	21	5	41	0	3317	6,54		62,67	8,76	9,68	18,89	
EAC (mg/ml) 2 días+ 3 de agua	0,5	A	2815	0	142	0	10	0	15	6	27	0	3009	6,45	6,32	73,20	5,15	7,73	13,92
		B	3000	0	120	0	14	0	15	3	49	0	3198	6,19		60,61	7,07	7,58	24,75
	1	A	1102	0	54	0	5	2	2	0	10	0	1173	6,05	5,64	76,06	7,04	2,82	14,08
		B	2049	0	53	0	12	0	14	3	34	0	2162	5,23		46,90	10,62	12,39	30,09
	2	A	1664	0	36	0	4	0	2	0	19	0	1725	3,54	5,70	59,02	6,56	3,28	31,15
		B	1325	0	71	0	5	0	11	6	26	0	1438	7,86		62,83	4,42	9,73	23,01
	3	A	1911	8	32	0	8	0	5	1	22	0	1978	3,39	4,10	47,76	11,94	7,46	32,84
		B	1150	0	39	0	6	2	1	0	12	0	1208	4,80		67,24	10,34	1,72	20,69
	4	A	1083	0	35	0	6	2	3	2	13	0	1140	5	2,62	61,40	10,53	5,26	22,81
		B	878	0	2	0	0	-	0	-	0	-	880	0,23		100	0	0	0

A\*: células con anomalías. IM: índice mitótico. (-): ausencia de células.

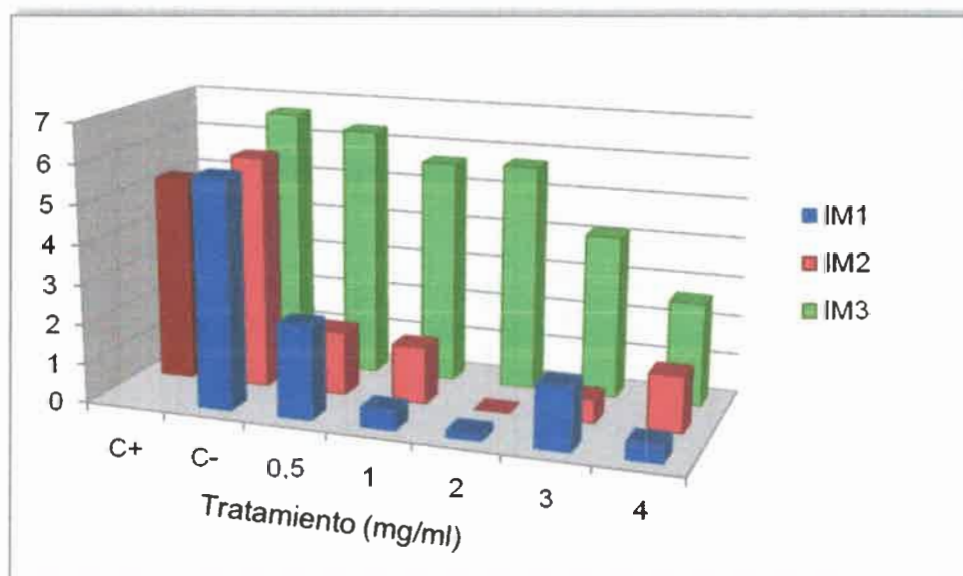


En el diseño experimental donde se trataron los bulbos durante 2 días con EAC de *A. satureioides* pudo demostrarse que los IM del control negativo estuvieron dentro de los registros normales (**Tabla 35**). Pudieron observarse células, con distinta frecuencia, que estaban transitando normalmente por cada etapa del ciclo de la división celular. En contraposición, el tratamiento durante 2 días con las diferentes concentraciones de EAC indicó modificación de las etapas del ciclo celular. Los valores de índices mitóticos revelaron que el extracto indujo disminución de la división celular para todas las concentraciones empleadas, siendo menos marcada esta acción a la concentración de 0,5 mg/ml. Los bulbos de este sistema de prueba evidenciaron células que estaban transitando por las distintas etapas de la división celular, igual que las células del sistema control. Contrariamente, los bulbos tratados con las 4 concentraciones mayores fallaron en su división normal y carecieron de una u otra fase del ciclo celular revelando toxicidad del extracto. Sin embargo, el extracto no indujo arresto de la división celular en ninguna fase en particular.

La misma aseveración puede enunciarse respecto del tratamiento con EAC durante 5 días (**Tabla 36**) donde incluso aquella menor concentración (0,5 mg/ml), que aplicada 2 días resultó inocua, aquí una exposición más prolongada indujo una marcada modificación de la capacidad de división celular influyendo en la aparición regular de cada fase del ciclo. Hubo diferencias en el comportamiento entre los dos sistemas controles y entre el control positivo respecto de todos los tratamientos con el extracto, ya que el paracetamol aunque disminuyó los índices mitóticos permitió que todas las fases del ciclo de la división celular estuvieran presentes.

En relación a los ensayos para evaluar reversión de daño citogenotóxico (**Tabla 37**) puede notarse que el tratamiento de los bulbos durante 3 días con agua, posteriores al tratamiento con el extracto durante 48 h, fue efectivo ya que aquellas alteraciones ejercidas en el ciclo de división celular fueron revertidas. La excepción fue el resultado de la mitad de los bulbos tratados con 4 mg/ml, cuyas células fueron arrestadas en profase en un 100%. Aunque esta mayor concentración parece seguir siendo citogenotóxica, las variaciones encontradas dentro del mismo tratamiento pueden atribuirse a factores intrínsecos del huésped.

Los datos presentados en la **Tablas 35, 36 y 37**, relacionados a los índices mitóticos fueron utilizados para la construcción de la **Figura 46**.



**Figura 46.** Comparación entre los índices mitóticos 1, 2 y 3 de las raíces de los bulbos de *Allium cepa* tratadas con concentraciones de EAC de *A. satureioides*

El análisis estadístico de la figura del tratamiento de los bulbos durante 2 días (IM1) reveló que todas las concentraciones ensayadas presentaron diferencia significativa con el control negativo, con un  $p < 0,01$  para 0,5 mg/ml y un  $p < 0,001$  para las concentraciones restantes.

Con respecto al IM2 (5 días de tratamiento con EAC) no hubo diferencia significativa entre los controles positivo y negativo. Por el contrario, sí hubo diferencia estadística entre los controles (negativo y positivo) y todas la concentraciones ensayadas ( $p < 0,001$ ).

Comparando estos resultados con los obtenidos para EAF se puede afirmar que EAC resultó más tóxico, ya que indujo una disminución significativa del índice mitótico en las raíces expuestas por 2 y 5 días.

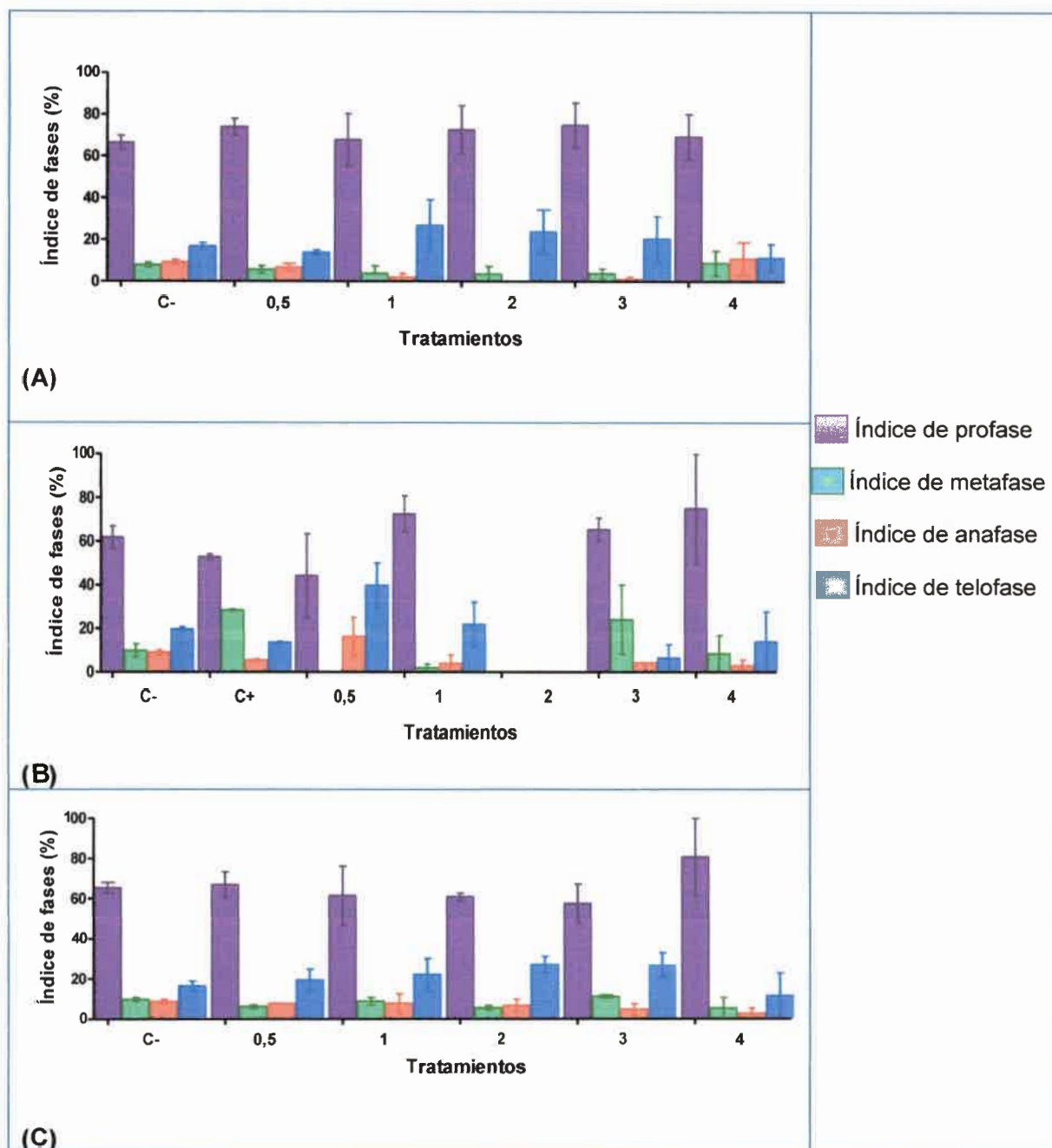
El análisis del IM3 (ensayos de reversión) reveló que el control negativo no tuvo diferencia estadísticamente significativa con las concentraciones de 0,5, 1, 2 y 3 mg/ml; por el contrario sí la hubo respecto del tratamiento con 4 mg/ml con un  $p < 0,05$ .

Al realizar un análisis comparativo entre el IM1 y el IM3 para las diferentes concentraciones empleadas, los resultados revelaron que hubo diferencia significativa para 0,5 mg/ml ( $p < 0,01$ ), 1 mg/ml ( $p < 0,001$ ), 2 mg/ml ( $p < 0,01$ ), y 3 mg/ml ( $p < 0,05$ ). Para



4 mg/ml no hubo diferencia significativa, es decir los IM1 e IM3 fueron muy similares, reafirmando que a esta elevada concentración de extracto se inducen alteraciones irreversibles, que no se condicen con los resultados obtenidos, para esta misma concentración de EAF demostrando una mayor capacidad tóxica de EAC.

Considerando la cantidad de células encontradas en las diferentes fases del ciclo de división, luego de los tratamientos con las 5 concentraciones de EAC de *A. satureioides*, se construyeron las **Figuras 47A, B y C**.



**Figura 47.** Índices de fases de raíces tratadas con distintas concentraciones de EAC de *A. satureioides* vs. sistemas controles: (A) durante 2 días, (B) durante 5 días, (C) durante 2 días y luego tratadas con agua mineral





El análisis estadístico de la **Figura 47A** referido al **índice de profase** reveló ausencia de diferencia significativa entre el sistema control negativo y todas las concentraciones de extracto ensayadas.

De igual forma, todos los tratamientos se comportaron similares al testigo negativo para los **índices de metafases, anafases y telofases** ya que tampoco se demostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Al analizar estadísticamente los datos referidos al tratamiento durante 5 días con EAC (**47B**), el **índice de profase** no reveló diferencia entre los controles positivo y negativo, ni tampoco entre los controles y los tratamientos. Esta conducta se repite en los índices de las restantes fases.

Finalmente, la **Figura 47C**, correspondiente al tratamiento de reversión, muestra que los **índices de fases** de todos los tratamientos no presentaron diferencia significativa con el control negativo.

El registro de las diferentes anormalidades microscópicas y los consecuentes índices de aberraciones, generados por EAC de *A. satureioides* se muestran en las **Tablas 38, 39 y 40**.

El análisis de la **Tabla 38** muestra que el sistema control negativo presentó aberraciones espontáneas en división con escasa presencia de cromosomas pegajosos, algunas anafases demoradas y puentes entre cromosomas. La frecuencia de estas aberraciones fue muy baja, alcanzando sólo un 1% y fue semejante a la hallada para los bulbos tratados con 0,5 mg/ml. La mayor concentración de EAC mostró un índice de aberraciones en división de 2,27%, no obstante este valor no indica una real capacidad del extracto de inducir daños morfológicos dado que hubo muy pocas células en división y la aparición de una única aberración modifica sustancialmente tal índice.

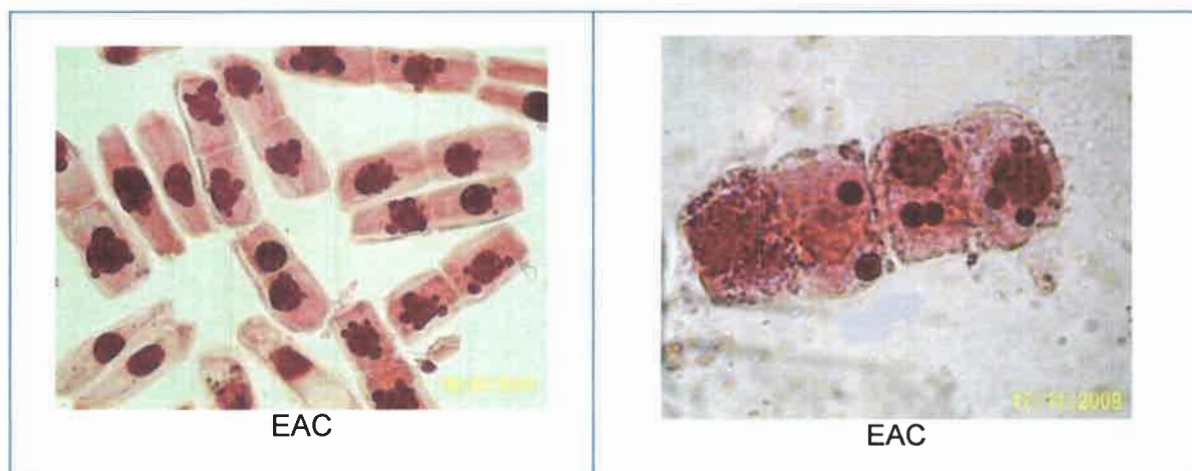


**Tabla 38.** Índice de aberraciones y diferenciación de anomalías microscópicas de raíces tratadas con concentraciones de EAC de *Achyrocline satureioides* durante 2 días.

Tratamiento	Bulbo	Índice de aberraciones				Tipos de aberraciones					
		Interfase <sup>a</sup> / promedio		División <sup>b</sup> / promedio		En interfase Probables cuerpos apoptóticos	En división				
		P	CA	CR	CP		AD				
Control negativo	A	0	0	0,65	1,03	-	-	-	-	1	
	B	0		0,62		-	-	-	-	1	
	C	0		2,37		-	1	-	-	3	
	D	0		0,47		-	-	-	1	-	
EAC (mg/ml) 2 días	0,5	A	1,97	1,45	0,90	-	-	-	-	1	
		B		0		2,13	-	-	-	-	1
		C		7,89		0	210	-	-	-	-
		D		0		0	-	-	-	-	-
	1	A	9,25	0	0	43	-	-	-	-	-
		B		16,89		0	255	-	-	-	-
		C		14,78		0	340	-	-	-	-
		D		3,39		0	78	-	-	-	-
	2	A	2,65	0	0	35	-	-	-	-	-
		B		1,23		0	20	-	-	-	-
		C		6,91		0	170	-	-	-	-
		D		1,20		0	15	-	-	-	-
	3	A	0,88	0	0	5	-	-	-	-	-
		B		0		0	-	-	-	-	
		C		0		0	-	-	-	-	
		D		3,23		0	70	-	-	-	-
	4	A	1,85	9,09	2,27	45	-	-	-	-	1
		B		3,40		0	25	-	-	-	-
		C		0,69		0	14	-	-	-	-
		D		0		0	-	-	-	-	-

Í<sup>A</sup>: Fórmula: N° células anormales en interfase/ N° total de células en interfase x 100; Í<sup>B</sup>: Fórmula: N° células anormales en división/ N° total de células en división x 100, (Amat et al., 2002); P<sup>1</sup>: puentes; CA<sup>2</sup>: cromosomas adelantados; CR<sup>3</sup>: cromosomas retardados; CP<sup>4</sup>: cromosomas pegajosos; AD<sup>5</sup>: anafase demorada; C-M<sup>6</sup>: c- mitosis.

Todos los tratamientos con EAC generaron la aparición de células con núcleos compatibles a cuerpos apoptóticos siendo numéricamente más marcada en la concentración de 1 mg/ml. Para el valor promedio de los índices de aberraciones, tanto en interfase como en división, no se pudo demostrar una relación dosis-respuesta. Llamativamente, con 3 y 4 mg/ml hubo menos cuerpos apoptóticos, (Figura 48).



**Figura 48.** Aberraciones en células meristemáticas de *Allium cepa* compatibles con cuerpos apoptóticos, inducidas por el tratamiento con EAC de *A. satureioides*

En el tratamiento sostenido durante 5 días, los bulbos del control negativo no presentaron células con cuerpos apoptóticos (**Tabla 39**). La frecuencia de aberraciones en división también estuvo dentro de los parámetros normales (3,3%). Sólo se encontraron cuerpos apoptóticos en los bulbos tratados con 1 mg/ml. Los índices de aberraciones más elevados en células en división correspondieron a las dos mayores concentraciones ensayadas, y resultan de alteraciones presentes en pocas células que entraron en división.



**Tabla 39.** Índice de aberraciones y diferenciación de anomalías microscópicas de raíces tratadas con concentraciones de EAC de *Achyrocline satureioides* durante 5 días.

Tratamiento	Bulbo	Índice de aberraciones				Tipos de aberraciones						
		Interfase <sup>a</sup> / promedio		División <sup>b</sup> / promedio		En interfase Probables cuerpos apoptóticos	En división					
		P	CA	CR	CP		AD	C-M				
Control Negativo	C	0	0	4,76	3,30	-	-	2	-	1	2	4
	D	0		1,84		-	-	-	-	4	-	
Control Positivo	C	2,22	2,97	6,99	6,48	-	2	-	-	1	2	2
	D	3,72		5,97		-	-	1	-	2	1	1
EAC (mg/ml) 5 días	0,5	C	0	0	0,61	-	-	-	-	-	-	-
		D	0	1,22		-	-	-	-	-	1	-
	1	C	0,41	0,21	0	0	6	-	-	-	-	-
		D	0		0		-	-	-	-	-	-
	2	C	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
		D	0		0		-	-	-	-	-	-
	3	C	0	0	0	4,17	-	-	-	-	-	-
		D	0		8,33		-	-	-	-	-	1
	4	C	0	0	0	5,55	-	-	-	-	-	-
		D	0		11,11		-	-	-	-	-	-

ÍA<sup>a</sup>: Fórmula: N° células anormales en interfase/ N° total de células en interfase x 100; ÍA<sup>b</sup>: Fórmula: N° células anormales en división/ N° total de células en división x 100, (Amat et al., 2002); P<sup>1</sup>: puentes; CA<sup>2</sup>: cromosomas adelantados; CR<sup>3</sup>: cromosomas retardados; CP<sup>4</sup>: cromosomas pegajosos; AD<sup>5</sup>: anafase demorada; C-M<sup>6</sup>: c- mitosis.

Finalmente, la evaluación de los resultados obtenidos en los estudios de reversión (Tabla 40) revela un comportamiento consistente al encontrado en los índices mitóticos. Como para todas las concentraciones empleadas de EAC hubo recuperación del sistema huésped, cuyas células meristemáticas entraron en división, fue posible observar aberraciones microscópicas. Los escasos valores de índices de anomalías totales revelaron un comportamiento homogéneo entre el sistema control negativo y todas las concentraciones de prueba del extracto.





**Tabla 40.** Índice de aberraciones y diferenciación de anomalías microscópicas de raíces tratadas con concentraciones de EAC de *Achyrocline satureioides* durante 2 días y luego sometidas a recuperación con agua mineral.

Tratamiento	Bulbo	Índice de aberraciones				Tipos de aberraciones							
		Interfase <sup>a</sup> / promedio		División <sup>b</sup> / promedio		En interfase	En división						
						Probables cuerpos apoptóticos	P <sub>1</sub>	CA <sub>2</sub>	CR <sub>3</sub>	CP <sub>4</sub>	AD <sub>5</sub>	C-M <sub>6</sub>	
Control negativo	A	0	0	3,77	3,27	0	3	2	1	-	1	-	
	B	0		2,76		0	-	-	-	-	5	1	
EAC (mg/ml) 2 días+ 3 agua	0,5	A	0	0	0,76	0	-	-	-	-	6	-	
		B		0		1,52	0	-	-	-	-	3	-
	1	A	0	2,82	2,74	0	-	-	-	-	-	2	
		B		0		2,65	0	1	-	-	-	2	-
	2	A	0	0	2,66	0	-	-	-	-	-	-	
		B		0		5,31	0	2	1	0	0	3	-
	3	A	0,42	0,2	1,49	2,47	8	-	1	-	-	-	-
		B	0		3,45		0	-	-	-	2	-	-
	4	A	0	0	7,02	3,51	0	-	-	-	-	2	2
		B			0		0	0	-	-	-	-	-

Í<sup>a</sup>: Fórmula: N° células anormales en interfase/ N° total de células en interfase x 100; Í<sup>b</sup>: Fórmula: N° células anormales en división/ N° total de células en división x 100, (Amat et al., 2002); P<sup>1</sup>: puentes; CA<sup>2</sup>: cromosomas adelantados; CR<sup>3</sup>: cromosomas retardados; CP<sup>4</sup>: cromosomas pegajosos; AD<sup>5</sup>: anafase demorada; C-M<sup>6</sup>: c-mitosis.

Aunque la familia Asteraceae incluye algunas de las plantas más antiguas y valoradas como medicinales (Paulsen, 2002), diferentes géneros de esta familia presentan compuestos tóxicos como los ácidos tánico, cianhídrico, fórmico y málico, (Duke, 2002). Es posible que altas concentraciones de algunos de estos compuestos químicos tengan un efecto inhibitorio o estimulante en el ciclo celular, como ha demostrado la cafeína en *Drosophila prosaltans* (Itoyama et al., 1997), la mefloquina (droga antimalárica) en linfocitos humanos (Grisolia et al. 1995), y los extractos de *Alpinia nutans* y *Pogostemon heyneanus* en células de raíces de *Allium cepa* L, (Dias y Takahashi, 1994).

Los resultados de nuestro estudio mostraron que los extractos acuosos de "marcela", inhibieron la división celular sólo a las concentraciones de 3 y 4 mg/ml. Esto indica una capacidad antiproliferativa de los extractos acuosos de esta planta a estas concentraciones, resultados coincidentes con estudios realizados por Fachinetti et al.,





(2007). Estos autores demostraron, por el test de *Allium cepa* L, que las infusiones de flores de *Achyrocline satureioides* tuvieron capacidad citotóxica a las concentraciones de 5 y 20 mg/ml.

Teniendo en cuenta también los resultados de genotoxicidad, se deduce que la capacidad citotóxica ejercida por extractos acuosos obtenidos de partes aéreas de la planta no se acompañó con la capacidad genotóxica, es decir, no se demostró poder mutagénico. Por otra parte, la acción citotóxica del extracto acuoso caliente fue marcadamente superior que la del frío.

Sin embargo, para ambos extractos, la citotoxicidad fue revertida cuando se retiró la solución de prueba, reafirmando que las alteraciones morfofisiológicas no se acompañan con daños genéticos permanentes, a pesar de la marcada presencia de cuerpos apoptóticos, los cuales tampoco se asocian con genotoxicidad. La ausencia de potencial mutagénico en extractos de *A. satureioides* está respaldada por los estudios de *Arisawa*, (1994), quien empleando células tumorales *in vitro* demostró que un 67% de las mismas fueron inhibidas en su desarrollo por estos extractos vegetales sin causar daño genético sobre ellas.

Respecto del potencial tóxico, nuestros resultados pueden ser cotejados con los de *Casero et al.*, (2007), quienes trabajando con la decocción de *A. satureioides* demostraron que una concentración de 0,47 mg/ml indujo modificaciones tanto en el número como en la longitud de las raíces, con aparición de aberraciones morfofisiológicas, disminución de la división celular y modificación de las fases del ciclo de replicación celular, revelándose diferencia estadísticamente significativa respecto del sistema control. La diferencia entre los resultados informados por estos autores y los nuestros, radica en los valores de concentraciones empleadas. *Casero et al.*, (2007) describieron estas modificaciones con 0,47 mg/ml mientras que en nuestras experiencias una concentración de 0,5 mg/ml no mostró ninguna actividad citogenotóxica. Esta diferencia podría atribuirse a que los investigadores emplearon decocciones, cuya producción implicó una ebullición del material vegetal por 20 min, lo que podría facilitar la extracción de gran cantidad de sustancias tóxicas.

Se ha demostrado en la literatura que los taninos poseen capacidad tóxica sobre células meristemáticas de *Allium* y que la misma está asociada a una inhibición enzimática, (*Teixeira et al.*, 2003). Probablemente, estos compuestos jueguen un rol importante en la acción citotóxica ejercida por los extractos de *A. satureioides* debido a



que estudios químicos de caracterización preliminar de ambos extractos acuosos, presentados en esta tesis, indicaron la presencia de taninos.

Finalmente la acción tóxica mostrada *in vivo* se condice con los resultados obtenidos *in vitro* al emplear monocapas de células Vero, que permitieron definir concentraciones tóxicas sobre células eucariota y establecer al EAF como más tóxico que el EAF de *Achyrocline satureioides*.

Todos los resultados referidos a citogenotoxicidad son relevantes porque los valores de concentraciones tóxicas son marcadamente superiores a aquellas concentraciones con capacidad inhibitoria *in vitro* frente a virus con genoma ADN y ARN demostrados por Zanon *et al.*, 1999; Sabini *et al.*, 2009; 2010; 2011. Esta diferencia de concentraciones revela selectividad de acción, ya que los extractos en estudio pueden ejercer acción antiviral con garantía de ausencia de toxicidad y mutagenicidad sobre las células del huésped.

### 5.5.2. Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón

En la toxicología genética se acepta que una sola prueba no puede detectar con exactitud o predecir confiablemente los efectos genotóxicos de una sustancia en el ser humano; por este motivo se seleccionó el test de micronúcleos en médula ósea de ratón para completar los estudios de genotoxicidad de los extractos acuosos de *Achyrocline satureioides*, (Zúñiga González y Gómez Meda, 2006).

#### 5.5.2.a. Citogenotoxicidad de EAF

Durante este ensayo no pudieron demostrarse alteraciones fisiológicas en los animales inoculados con las concentraciones de 50, 100 y 250 mg/kg de EAF de *A. satureioides*. Durante las 24 h post-tratamiento los animales que recibieron esas dosis tuvieron un comportamiento normal, similar a los del grupo control negativo, sin modificación en sus hábitos de alimentación. En el grupo control positivo tampoco se registraron animales con modificaciones conductuales ni hubo registro de muertes, pues la dosis de ciclofosfamida empleada sólo induce daño genotóxico pero no resulta letal, según la base de datos, ([http://salunet.minsal.gov.cl/pls/portal/docs/page/seremis/seremi\\_vi/normativa2011/marconormativo2011/209\\_05valorestoxicidad](http://salunet.minsal.gov.cl/pls/portal/docs/page/seremis/seremi_vi/normativa2011/marconormativo2011/209_05valorestoxicidad))

Los resultados de mortalidad, presentados en la **Tabla 41**, indican que fue posible determinar la DL<sub>50</sub> para el EAF cuyo valor fue 500 mg/kg de peso de ratón. Además, se puede observar que los individuos sobrevivientes de los grupos de ratones tratados con



500 y 750 mg/kg registraron hipotermia como signo de toxicidad. Cabe destacar que en el grupo tratado con 500 mg/kg los 3 animales sobrevivientes fueron machos. De la misma manera, en el grupo tratado con 750 mg/kg el individuo que sobrevivió fue macho. Se podría pensar que esta situación se debe a una mayor tolerancia al tratamiento con el extracto por parte de los machos, o quizás a una pequeña diferencia en peso entre los ratones de ambos sexos.

Rivera *et al.*, (2004) estudiaron la toxicidad aguda, en ratones inoculados por vía intraperitoneal, de un extracto acuoso de *A. satureioides* (partes aéreas), recolectada en Uruguay (en el mismo período estacional que el de nuestra recolección). Los resultados indicaron que los ratones tratados con dosis igual o superior a 180 mg/kg mostraron signos de toxicidad, por el contrario las experiencias realizadas en esta tesis (**Tabla 41**) muestran claramente que el tratamiento con EAF aún a 250 mg/kg no indujo signos de toxicidad.

**Tabla 41.** Mortalidad y signos de toxicidad en ratones inoculados intraperitonealmente con EAF de *A. satureioides* observados a las 24 h (n=6).

EAF (mg/kg)	Mortalidad (%)	Signos de toxicidad	Animales con signos (%)
50	0	-	-
100	0	-	-
250	0	-	-
500	50	hipotermia	50
750	83,33	hipotermia	16,67

Los resultados de la cuantificación del daño a nivel de ADN por los tratamientos con diferentes dosis de EAF en ratones Balb/C se expresan como media  $\pm$  desviación estándar y se presentan en la **Tabla 42**.



**Tabla 42.** Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones tratados con EAF de *A. satureioides*.

Tratamiento	Animales	IT ± DS	Media EPCMN/1000±DS
Control negativo (solución fisiológica)	6	3,40 ±0,804	4,25 ±0,89
50 mg/kg	6	2,78 ±0,528	4,67 ±1,73
100 mg/kg	6	2,11 ±0,236	2,83 ±1,11
250 mg/kg	6	1,54 ±0,244	1,75 ±0,86
Control positivo (ciclofosfamida)	6	3,1 ±1,060	20,7 ±3,20

IT: Índice de toxicidad = EPC (eritrocitos policromáticos) / ENC (eritrocitos normocromáticos).  
EPCMN: eritrocitos policromáticos micronucleados.

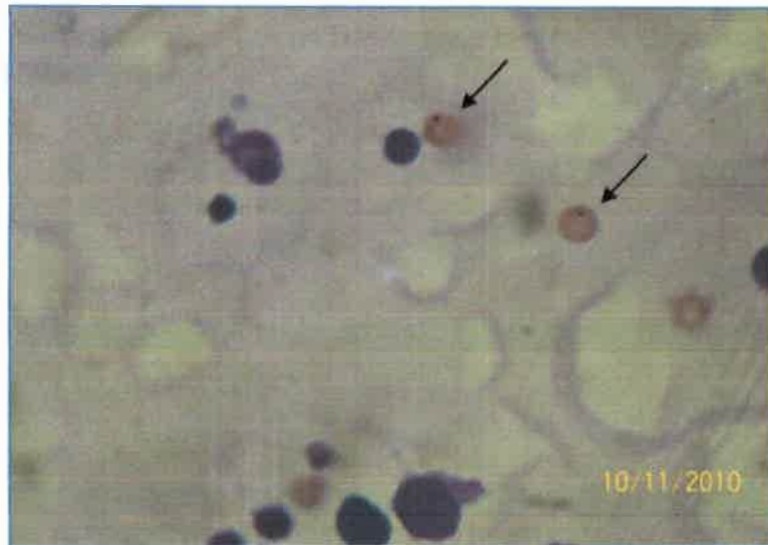
Resulta fundamental la utilización de un control negativo pues las respuestas genotóxicas y tóxicas de los extractos se cotejan con los valores de sus respectivos controles. Respecto al promedio del índice de genotoxicidad (EPCMN/1000), este control correspondió a 4,25 ( $\pm 0,89$ ), valor coincidente con los registrados por otros autores, (Santos-Mello *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2009; Cariddi *et al.*, 2010). Por el contrario, los ratones tratados con ciclofosfamida (control positivo) mostraron un alto índice de genotoxicidad, igual a 20,7 ( $\pm 3,20$ ) ( $p < 0,001$ ). Los índices de genotoxicidad de los tratamientos con 50 y 100 mg/kg exhibieron un comportamiento similar al sistema control negativo, sin diferencias significativas entre los valores de índices de genotoxicidad: 4,25 ( $\pm 0,89$ ) vs. 4,67 ( $\pm 1,73$ ) y 4,25 ( $\pm 0,89$ ) vs. 2,83 ( $\pm 1,11$ ). En cambio, hubo diferencia con significancia ( $p < 0,005$ ) para el tratamiento de 250 mg/kg respecto del tratamiento con solución fisiológica. Esta solución arrojó un valor de índice de genotoxicidad más elevado que aquel registrado para dicha concentración de extracto 4,25 ( $\pm 0,89$ ) vs. 1,75 ( $\pm 0,86$ ). Este dato no debe interpretarse como que la solución fisiológica sea una droga genotóxica, sino que, por el contrario, este comportamiento induce a pensar que probablemente las moléculas químicas presentes en el extracto podrían ser internalizadas en la célula a través de algún receptor de membrana que se vería saturado al aumentar la concentración de extracto empleada. Al no conocerse cuáles son los





componentes del extracto y la cantidad relativa de ellos, es difícil predecir cómo serían internalizados por la célula de forma que pudieran llegar al núcleo celular y dañar al ADN.

En la **Figura 49** se observan micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón luego del tratamiento por 24 h con 100 mg/kg de EAF.



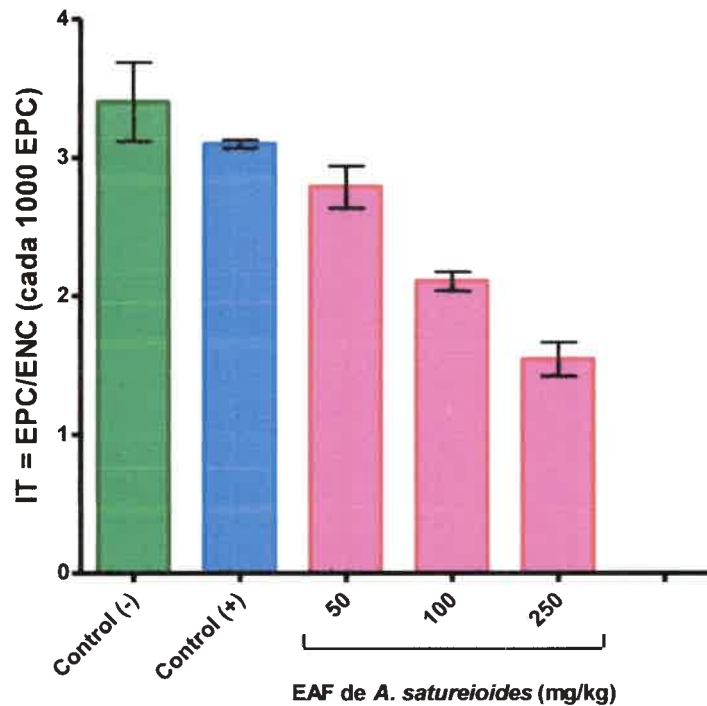
**Figura 49.** Micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón Balb/C luego del tratamiento con 100 mg/kg de EAF de *A. satureioides*

Considerando nuevamente los resultados exhibidos en la **Tabla 42** y respecto a los Índices de Toxicidad (EPC/ENC), el grupo control mostró un valor de 3,40, que es ligeramente superior a los reportados por otros investigadores cuyo valores rondan entre 1,10 y 1,69 para ratones Balb/C, (*Rodrigues et al., 2009; Aquino et al., 2011; Escobar et al., 2011*). No obstante, para otras cepas de ratones tal como *Mus musculus* se informaron índices de toxicidad (IT) de hasta 3,48 para los grupos controles negativos, (*Remigio Montero et al., 2001*). Dichos investigadores atribuyen el valor más elevado a causas como eritropoyesis medular acelerada que se presenta en ratones menores de 7 semanas de vida y en animales bajo condiciones ambientales estresantes o efectos tóxicos anteriores, o también puede influir la tinción de los extendidos. Alguno de estos argumentos podría ser válido para justificar el valor hallado para el control negativo en nuestro estudio.



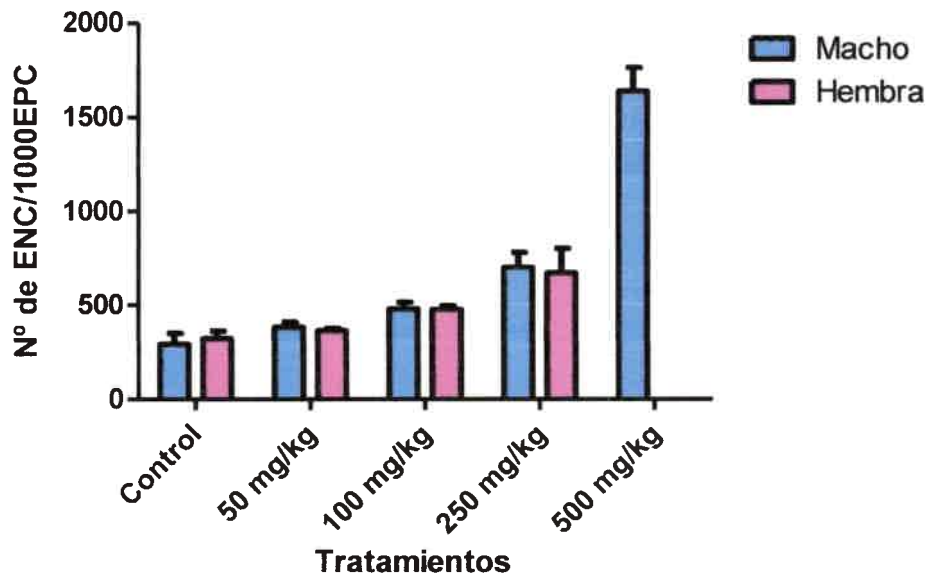


El análisis estadístico del IT no reveló diferencia significativa entre 50 mg/kg y el control negativo. Por el contrario, sí la hubo respecto a los tratamientos de 100 y 250 mg/kg ( $p < 0,001$ ) cuyo IT fueron  $2,11 (\pm 0,236)$  y  $1,54 (\pm 0,244)$ , (**Figura 50**).



**Figura 50.** Índice de toxicidad (EPC/ENC cada 1000 EPC) en células de médula ósea de ratones Balb/C tratados con diferentes concentraciones de EAF de *A. satureioides*. Control (-): solución fisiológica. Control (+): ciclofosfamida 20 mg/kg

En ninguno de los grupos se observó diferencia significativa de toxicidad entre sexos (**Figura 51**).



**Figura 51.** Recuento de Eritrocitos Normocromáticos (ENC) en médula ósea de ratones tratados con concentraciones de EAF de *A. satureioides*, de acuerdo al sexo

Este estudio de genotoxicidad demostró que EAF de *A. satureioides*, a las concentraciones ensayadas, no induce efectos mutagénicos en células de médula ósea de ratón. Además, por el análisis de IT se demostró ausencia de toxicidad (50 mg/kg) aportando seguridad y ampliando los conocimientos sobre las propiedades biológicas de la especie vegetal, contribuyendo a la estimación del riesgo-beneficio que puede derivarse del uso de esta planta por el hombre como fitoterápico.

*Cardoso et al., (1998)*, también demostraron ausencia de efectos genotóxicos a través de esta metodología cuando evaluaron un extracto hidroetanólico obtenido de inflorescencias de *A. satureioides*.

Puede notarse claramente que existe una correlación lógica entre los datos de genotoxicidad y toxicidad expresados en la **Tabla 42**, puesto que fue menor la presencia de micronúcleos contabilizables conforme fue aumentando la concentración del extracto, y a mayor cantidad de droga vegetal administrada mayor fue la toxicidad registrada la que se tradujo en muerte de los eritroblastos o células germinales hematopoyéticas condicionando el número de EPC y modificando la relación entre éstos y los ENC. Los datos de citogenotoxicidad, por lo tanto, resultaron coherentes.



### 5.5.2.b. Citogenotoxicidad de EAC

Teniendo en cuenta la mayor toxicidad que ejerció el EAC al ser evaluado *in vitro* en células Vero (apartado 5.4.1.), se decidió probar sólo 3 concentraciones de este extracto (100, 200 y 500 mg/kg), con el propósito de completar el estudio genotóxico del mismo.

Los resultados muestran que a las concentraciones ensayadas no se registraron signos de toxicidad ni mortalidad, por lo que el valor de la DL<sub>50</sub> fue superior a 500 mg/kg de peso de ratón para EAC (Tabla 43).

**Tabla 43.** Mortalidad y signos de toxicidad en ratones inoculados intraperitonealmente con EAC de *A. satureioides* observados a las 24 h (n=6).

EAC (mg/kg)	Mortalidad (%)	Signos de toxicidad	Animales con signos (%)
100	0	-	-
200	0	-	-
500	0	-	-

En la **Tabla 44** se muestran los resultados de la cuantificación de micronúcleos, obtenidos por el tratamiento con diferentes concentraciones de EAC, en células de médula ósea de ratón. Para este estudio la media de índice de genotoxicidad (EPCMN/1000) del control negativo arrojó un valor de 5 ( $\pm 1$ ) correspondiéndose con el resultado hallado para el grupo control negativo de EAF. El control positivo mostró un valor de 62 ( $\pm 13$ ) reflejando la alta capacidad de la droga (ciclofosfamida) de dañar al ADN. El análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa entre 100 mg/kg y el control negativo, mientras que sí hubo diferencia entre este último y las concentraciones restantes con un ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, el control positivo mostró diferencia significativa con el control negativo y con todos los tratamientos con EAC. En resumen, una dosis de 100 mg/kg no daña al ADN de las células en tanto que las restantes concentraciones si bien fueron genotóxicas no se comportaron como la ciclofosfamida.



Tabla 44. Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones tratados con EAC de *A. satureioides*.

Tratamiento	Animales	IT $\pm$ DS	Media EPCMN/1000 $\pm$ DS
Control negativo (solución fisiológica)	6	1,38 $\pm$ 0,35	5 $\pm$ 1
100 mg/kg	6	0,23 $\pm$ 0,02	4 $\pm$ 1
200 mg/kg	6	0,22 $\pm$ 0,08	12 $\pm$ 3
500 mg/kg	6	0,30 $\pm$ 0,05	28 $\pm$ 5
Control positivo (ciclofosfamida)	6	3,1 $\pm$ 1,06	62 $\pm$ 13

IT: Índice de toxicidad = EPC (eritrocitos policromáticos) / ENC (eritrocitos normocromáticos).  
EPCMN: eritrocitos policromáticos micronucleados.

El análisis estadístico de los IT reveló diferencia significativa entre todos los tratamientos y el grupo control negativo indicando que el EAC a todas las dosis ensayadas, es decir de 100 a 500 mg/kg, afecta la eritropoyesis ya que se produce una disminución de eritrocitos inmaduros en la médula ósea (**Figura 52**).

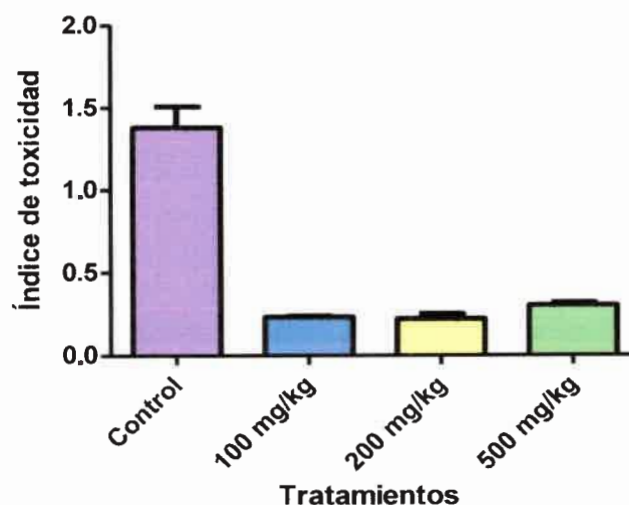


Figura 52. Índices de toxicidad (EPC/ENC) de distintas concentraciones de EAC de *A. satureioides*



Si bien el EAC de *A. satureioides* a bajas concentraciones no induce mutagenicidad en células normales, resultó tóxico para los glóbulos rojos de médula ósea de ratón a todas las concentraciones ensayadas.

Al comparar los estudios de genotoxicidad y toxicidad de ambos extractos acuosos, por el ensayo de micronúcleos, podemos deducir que EAF fue menos tóxico que EAC. Estos resultados son coincidentes con los hallados por el test de *Allium cepa* L y con los estudios de citotoxicidad *in vitro* en células Vero. Además, no se demostró poder genotóxico para EAF por ensayo de micronúcleos, ni por *Allium cepa* L. El EAC a las mayores concentraciones estudiadas presentó un ligero poder genotóxico cuando se evaluó por el ensayo de micronúcleos. Por el contrario, este extracto no mostró genotoxicidad por el test de *Allium cepa* L a las concentraciones estudiadas.

*Rodrigues et al.*, (2009) estudiaron un extracto acuoso de *Baccharis trímera*, otra especie de la familia Asteraceae, por el ensayo de micronúcleos y demostraron un poder clastogénico dosis dependiente. Este comportamiento es semejante al que ocurrió con EAC de *A. satureioides*, pero difiere del comportamiento presentado por EAF de la misma especie, que mostró no poseer capacidad mutagénica.

#### **5.6. Caracterización química preliminar de los extractos acuosos de *A. satureioides***

Como se observa en la **Tabla 45**, los extractos acuosos de *A. satureioides* contienen compuestos fenólicos tales como taninos hidrolizables y flavonoides glicosilados y también poseen saponinas e hidratos de carbono reductores.





Tabla 45. Grupos de compuestos químicos presentes en EAF y EAC.

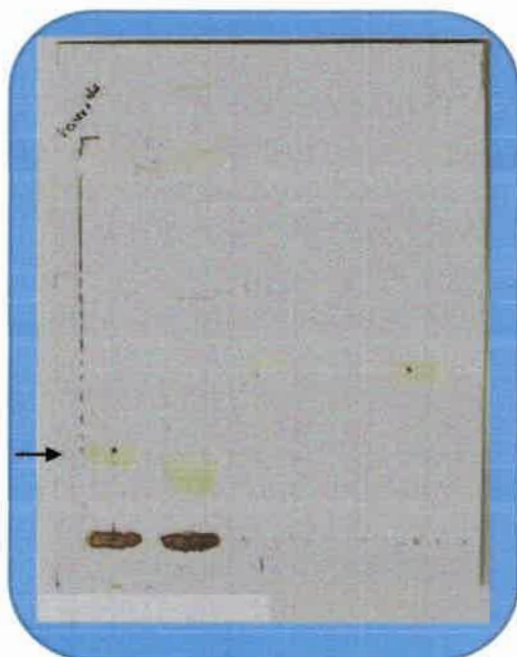
Compuestos químicos	EAF	EAC
Taninos	+(azul-negrusco)	+(azul-negrusco)
Proantocianidinas	-	-
Saponinas	+	+
Carbohidratos reductores	+	+
Antraquinonas glicósidos	-	-
Antraquinonas aglicones	-	-
Flavonoides glicósidos	+	+
Flavonoides aglicones	-	-
Flavonoides sulfatados	-	-
Alcaloides	-	-
Asperulósido	-	-

## 5.7. Caracterización química de EAF

### 5.7.1. Determinación de grupos químicos por TLC

#### 5.7.1.a. Determinación de azúcares

A través de ensayos preliminares fue posible ajustar los parámetros en cuanto a la concentración del extracto y del reactivo revelador adecuado para visualizar los componentes de la muestra. En la TLC para azúcares, se observaron bandas a 254 nm, mientras que a 366 nm se observaron manchas fluorescentes en el frente de corrida que corresponden a polifenoles y se confirmaron con el reactivo de productos naturales (RPN). Por otro lado, se observó una banda con un Rf de 0,23 que corresponde a un trisacárido o a un disacárido diferente a la sacarosa cuyo Rf fue de 0,415 (**Figura 53**). Contrariamente, no se observaron bandas correspondientes a monosacáridos.



**Figura 53.** Determinación de azúcares del EAF por TLC, revelado a 254 nm

#### 5.7.1.b. Determinación de saponinas

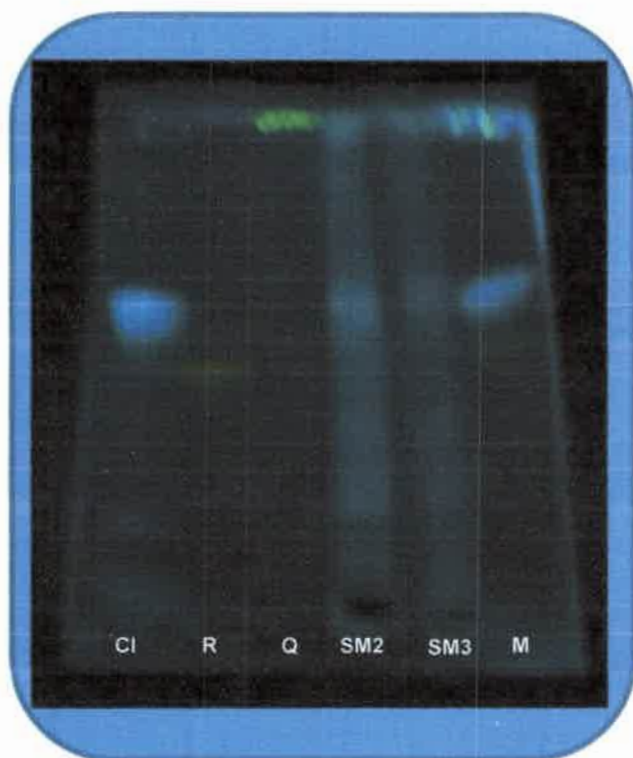
Por TLC se detectaron bandas fluorescentes de diferentes colores (UV 366 nm): celeste ( $R_f=0,31$ ), azul ( $R_f=0,83$ ) y azul verdosa ( $R_f=0,88$ ). Luego del revelado, se observaron a la luz visible 2 bandas de color rosado con  $R_f$  de 0,67 y 0,77 y que corresponden a saponinas triterpénicas. El testigo  $\alpha$ -hederina presentó una banda rosada con  $R_f$  de 0,67, coincidiendo en ambos aspectos con una de las bandas de EAF. Luego, se calculó el valor de  $R_x$  para la banda cuyo  $R_f$  fue 0,67 respecto a  $\alpha$ -hederina y se obtuvo un valor igual a 1 confirmándose su identidad. Además se visualizó una banda de color amarillo que posiblemente corresponda a un flavonoide.

#### 5.7.1.c. Determinación de cafeilquínicos y flavonoides glicosilados

La evaluación del cromatograma bajo UV a 366 nm reveló la presencia de mayor cantidad de bandas en SM2 que en SM3. Se observaron bandas de diferentes colores: amarronada ( $R_f=0,14$ ), celeste verdosa ( $R_f=0,54$ ) coincidiendo en  $R_f$  y color con la del testigo ácido clorogénico, naranja ( $R_f=0,94$ ) que coincide en  $R_f$  y color con el testigo quercetina, y dos 2 bandas con  $R_f$  de 0,29 y 0,68 cuyo color se extinguió rápidamente (**Figura 54**). No se observó en el cromatograma ninguna banda de  $R_f$  coincidente con el testigo rutina. Luego del revelado con RPN se visualizaron (a luz visible) 2 bandas, una



de color tostado ( $R_f=0,21$ ) y otra amarilla en el frente de corrida que también se observa en los testigos quercetina y la mezcla de testigos.



**Figura 54.** Determinación de cafeilquínicos y flavonoides glicosilados en EAF por TLC, revelado a 366 nm. CI: ácido clorogénico; R: rutina; Q: quercetina; M: mezcla de testigos

#### 5.7.1.d. Determinación de flavonoides aglicones

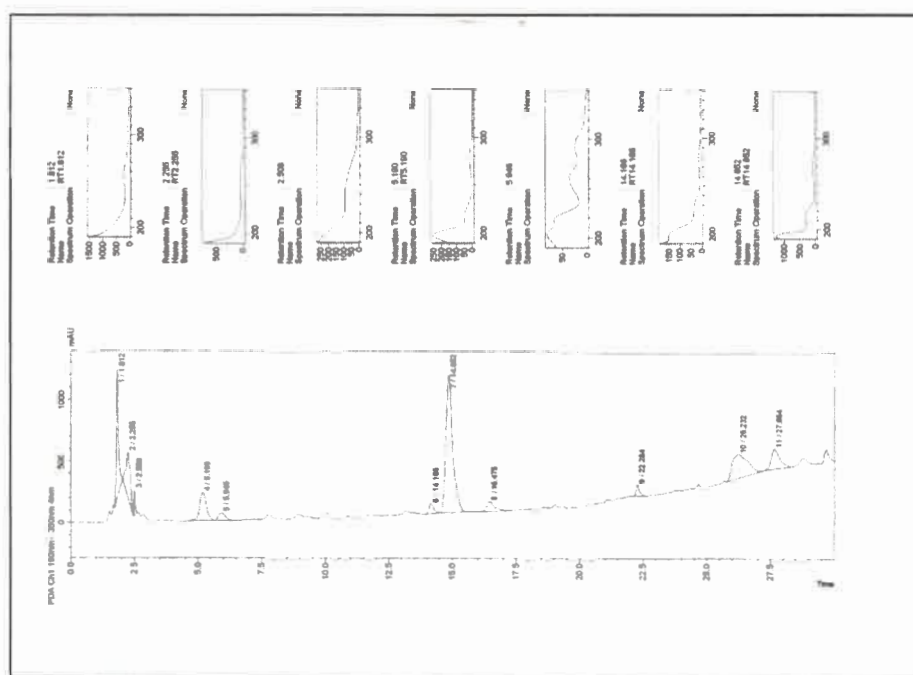
Por TLC para flavonoides aglicones, se observaron diferentes bandas bajo luz UV 366 nm presentando los siguientes colores: amarilla y próxima al lugar de siembra, naranja ( $R_f=0,43$ ) coincidente en  $R_f$  y color con el testigo quercetina, amarilla ( $R_f=0,69$ ), celeste ( $R_f=0,74$ ), verde ( $R_f=0,81$ , se extingue con el tiempo), celeste ( $R_f=0,86$ ) y rojo ( $R_f=0,93$ ). Con luz UV 254 nm se pudo observar una banda con  $R_f$  de 0,63. Luego del revelado con RPN se observó una banda color amarillo con  $R_f$  y color iguales a quercetina. Las diferentes bandas fluorescentes se corresponden con polifenoles.

Resumiendo, los estudios por cromatografía en capa delgada del EAF de *A. satureioides* indicaron la presencia de los siguientes compuestos: tri o disacárido

diferente a la sacarosa, dos saponinas triterpénicas siendo una de ellas  $\alpha$ -hederina, ácido clorogénico, quercetina, flavonoides y otros polifenoles no caracterizados.

### 5.7.2. Análisis químico por HPLC/DAD

El cromatograma correspondiente a EAF (10 mg/ml) de *A. satureioides* obtenido por análisis de HPLC-DAD se muestra en la **Figura 55**. Un total de 11 constituyentes fueron detectados en el extracto.



**Figura 55.** Cromatograma (HPLC-UV/DAD) de EAF de *A. satureioides* (30min)

Ninguno de los picos detectados fueron coincidentes con los picos de los compuestos estándar utilizados, cuyos tiempos de retención (tR) fueron: ácido clorogénico 8,86 min; ácido cafeico 10,54 min; rutina 14,53 min; quercetina 21,8 min y kaempferol 23,38 min. Por otra parte, los tiempos de retención, con sus respectivos espectros de UV, de los seis picos principales de EAF se exhiben en la **Tabla 46**.

Dentro de estos picos, los más importantes son el pico con tR 2,508 (aprox) que corresponde a un compuesto aromático e hidrófilo y, el pico con tR de 14,852. Ninguno de los picos presenta máximos de absorción en la región visible. Si bien se detectó un pico que coincidió en el tiempo de retención con la quercetina (dato coincidente con los



resultados obtenidos por TLC), el espectro UV mostró que este pico no correspondía a quercetina ya que se diferenciaban en dicho espectro.

**Tabla 46.** Tiempos de retención y espectros UV de los picos principales observados en el cromatograma de EAF de *A. satureioides*, obtenido por HPLC/DAD.

Tiempo de retención ( $t_R$ )	Espectro UV
1,812	249 (máx)
2,508	240,1 (máx); 217 (mín)
5,946	203,2; 217,3; 293,75 (máx); 213;236,2;278,51 (mín)
14,852	269,5 (máx), 244 (mín)
22,284	254; 289 (máx); 280; 315 (mín)
27,654	273,9 (máx); 262,6 (mín)

Estos resultados permiten decir que los compuestos estándar testeados, es decir ácido clorogénico, quercetina, rutina, kaempferol y ácidos dicafeoilquínicos no están presentes en EAF de *A. satureioides*. Por lo tanto, la importante actividad inhibitoria frente a los virus WEE y *H. suis* demostrada para el EAF de *A. satureioides* no se puede atribuir a la presencia de estos compuestos, sino que se debe a otro aún no identificado. Estos hallazgos incentivan continuar la búsqueda de la identidad del compuesto responsable ya que podría corresponder a una molécula aún no caracterizada y constituir un avance importante en el campo de la fitoquímica.

### 5.8. Fraccionamiento de EAF por cromatografía en columna

Se recogieron volúmenes de 75 ml obteniéndose 4 fracciones del extracto que mostraron diferentes colores: F1: amarillo claro, F2: marrón claro, F3: ámbar, F4: casi transparente, (**Figura 56**). En el lugar de siembra de la columna, quedó retenido parte del extracto. Éste fue retirado de la columna, disuelto en H<sub>2</sub>O y filtrado, constituyendo la fracción 5 (F5) que presentó color marrón oscuro. Luego del secado, se obtuvieron 202,4 mg de F1, 58,6 mg de F2, 19,9 mg de F3, 18,6 mg de F4 y 277,3 mg de F5.





**Figura 56.** Fraccionamiento por cromatografía en columna de EAF de *A. satureioides*

Estas fracciones se sometieron, posteriormente, a estudios antivirales frente al virus *Encefalitis Equina del Oeste*.

## 5.9. Determinación de las bioactividades de las fracciones de EAF

### 5.9.1. Evaluación de acción citotóxica por captación del RN

Los estudios de citotoxicidad de las fracciones de EAF por RN, indicaron que F1, F3, F4 y F5 no fueron tóxicas a la más alta concentración estudiada (100  $\mu\text{g/ml}$ ) en la línea celular Vero. Por el contrario, a las condiciones experimentales ensayadas, F2 resultó tóxica arrojando un valor de  $\text{CC}_{50}$  de 41,6  $\mu\text{g/ml}$  (**Figura 57**). Estos resultados permitieron seleccionar concentraciones seguras para ser empleadas en los estudios de actividad antiviral.

Los resultados obtenidos en estos ensayos se muestran en forma conjunta con los de actividad antiviral en la **Tabla 47**.

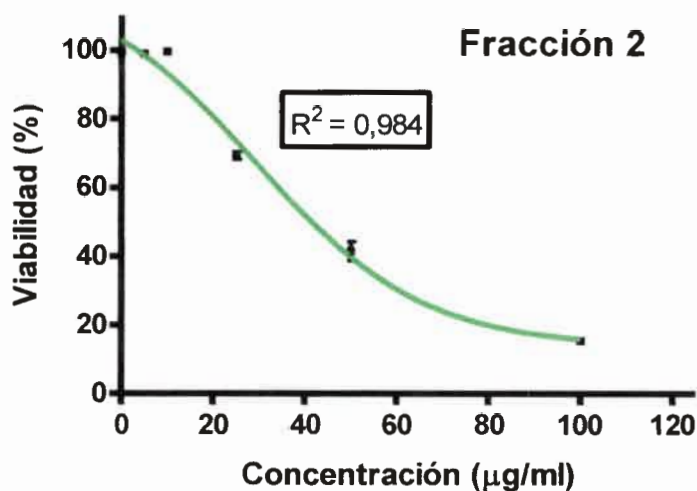


Figura 57. Curva de sobrevivencia de células Vero en fase estacionaria, determinada por RN, luego del tratamiento con F2 de *Achyrocline satureioides*

### 5.9.2. Actividad antiviral frente al virus WEE durante la replicación intracelular

Los estudios de actividad antiviral de las distintas fracciones permitieron determinar que la única fracción activa frente al virus WEE fue F3. Esta fracción ejerció una importante acción inhibitoria de la replicación viral, correspondiendo a un 82% (Tabla 47).

Estos interesantes hallazgos estimulan aún más la continuidad de estudios dirigidos a dilucidar la estructura de los compuestos presentes en dicha fracción, aplicándose métodos espectroscópicos apropiados ( $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, IR, UV-Vis, EM).

Tabla 47. Citotoxicidad por RN y actividad antiviral de las fracciones obtenidas de EAF de *A. satureioides* frente al virus *Encefalitis Equina del Oeste*.

Actividad	Fracción				
	F1	F2	F3	F4	F5
CC <sub>50</sub> (µg/ml)	>100	41,6	>100	>100	>100
ANTIVIRAL	-	-	+ (82%)	-	-

*CONCLUSIONES*



## 6. CONCLUSIONES

- Los estudios de la citotoxicidad de todos los extractos de *Achyrocline satureioides* sobre células Vero, permitieron establecer que los extractos acuosos frío y caliente resultaron los menos tóxicos. Se demostró que los componentes, responsables de la toxicidad, presentes en ambos extractos ejercen un daño que compromete más la función lisosomal que la capacidad respiratoria mitocondrial de las células tratadas.
- Los extractos acuosos de *A. satureioides*, a concentraciones no citotóxicas, ejercieron acción virucida y antiviral *in vitro* frente al virus WEE, siendo más importante la capacidad antiviral. Su acción se efectuó en etapas tardías de la replicación del virus tales como clivaje de poliproteínas estructurales, o maduración y transporte de las glicoproteínas del virus. Los altos índices de selectividad, principalmente de EAF, demuestran la selectividad de acción de la especie vegetal y permiten pensar en su potencial aplicabilidad como quimioterápico natural para el tratamiento de las encefalitis causadas por el virus WEE.
- Los extractos acuosos frío y caliente ejercieron una potente acción antiviral frente al virus *Herpes suis tipo 1*. Los estudios indicaron que EAF actúa durante la adsorción y penetración viral, afectando el receptor celular, la partícula viral libre, o quizás el mecanismo de penetración del virus en la célula. En contraposición, el extracto caliente, que mostró mayor capacidad, inhibió al virus en etapas posteriores a la adsorción y penetración.
- Los resultados obtenidos con el test de *Allium cepa* L demostraron que los extractos acuosos de *A. satureioides*, a las concentraciones activas frente a los virus WEE y *H. suis*, no ejercieron poder citogenotóxico *in vivo*.
- El estudio de genotoxicidad *in vivo* del extracto acuoso frío por el ensayo de micronúcleos reveló que a las concentraciones ensayadas no induce efectos



mutagénicos en células de la médula ósea de ratón, ni tampoco produce toxicidad a 50 mg/kg, aportando seguridad y ampliando los conocimientos sobre las propiedades biológicas de la especie.

- ▶ Del análisis químico preliminar de los extractos acuosos de *A. satureioides* se desprende que ambos extractos poseen saponinas, taninos hidrolizables, flavonoides glicosilados e hidratos de carbono reductores.
- ▶ El análisis por HPLC/DAD de EAF de *A. satureioides* reveló la presencia de seis picos mayoritarios, descartándose como constituyentes ácido clorogénico, ácido cafeico, quercetina, rutina y kaempferol.
- ▶ De las cinco fracciones parcialmente purificadas, obtenidas del EAF, sólo la fracción F3 fue activa frente al virus WEE, con un alto poder inhibitorio a concentración no citotóxica.
- ▶ Este trabajo de investigación permitió demostrar la capacidad de los extractos acuosos de la especie *Achyrocline satureioides* de inhibir *in vitro* a virus con genoma ADN (*Herpes suis tipo 1*) y ARN (*Encefalitis Equina del Oeste*) a concentraciones no citogenotóxicas, y certificar las propiedades medicinales folclóricas de la especie vegetal para ser aplicada como potencial fitofármaco en el tratamiento de infecciones virales con garantía de inocuidad.



# *BIBLIOGRAFÍA*



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre H.F.**, Bettinotti C.M., Vanella J.M. 1964. Encefalomiелitis equina en el verano 1957-58. Aislamiento de virus en Córdoba, R. A., y estudios de cepas de otras procedencias. *Gaceta Veterinaria* **26**: 493-506.
- Alonso J.** 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Corpus Ed. Santa Fe, Argentina.
- Álvarez R.Q.**, Martínez J.M., Ayón F.G. 1998. Contenido del aceite esencial en el follaje de *Pinus caribaea*. *Revista Cubana Farmacéutica* **32** (1): 63-67.
- Amat A.G.**, Yajia M.E., Gonzalez C.F., Lorca G.L., Sanchez Gonzalez F., Riglos A.G., Veron J.R. 2002. Evaluation of Cytological Parameters Induced by Aqueous Extracts of Seven Plants Used as Antihypertensive Agents in Argentine Folk Medicine. *Acta Farmacéutica Bonaerense* **21** (1): 37-42.
- Ambrogi A.**, Giraudo J.A., Busso J.J., Bianco O., Bagnat E., Segura de Aramburu M., Ramos B.A., Ceriatti F.S. 1981. Primer diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky en cerdos en la República Argentina. *Gaceta Veterinaria*, Buenos Aires. Tomo XLIII, N° 357: 58-64.
- Andrei G.**, Coto C.E. y De Torres R. 1985. Ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral de extractos crudos y semipurificados de hojas verdes de *Melia azedarach* L. *Revista Argentina de Microbiología* **17**: 187-194.
- Andrei G.**, De Clercq E. Quimioterapia de las infecciones virales. Cap. 67: 616-625. En Microbiología Biomédica. Basualdo J.A., Coto C.E., De Torres R.A. Edit. Atlante. Buenos Aires, Argentina. 1996.
- Andrei G.M.** 1988. Caracterización y purificación de un factor antiviral presente en la planta superior *Melia azedarach* L. Determinación de su mecanismo de acción. Tesis Doctoral. Fac. Cs. Ex. y Nat. UBA.
- Aquino I.**, Ferreira Perazzo F., Maistro E.L. 2011. Genotoxicity assessment of the antimalarial compound artesunate in somatic cells of mice. *Food and Chemical Toxicology* **49**: 1335-1339.
- Arencibia Arrebola D.**, Rosario Fernández L., Curveco Sánchez D. 2009. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Retel* (revista de toxicología) en línea: 40-52.
- Arisawa M.** 1994. Cell growth inhibition of KB cells by plant extracts. *Nature Medicine* **48**: 338-347.
- Arredondo M.**, Blasina F., Echeverry C., Morquio A., Ferreira M., Abin-Carriquiry J., Lafon L., Dajas F. 2004. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology* **91** (1): 13-20.
- Avilés G.**, Bianchi T., Daffner J., Sabattini M. 1993. Actividad post-epizoótica del virus de la Encefalitis Equina del Oeste en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* **25**: 88-99.
- Avilés G.**, Sabattini M., Mitchell C. 1990. Peroral susceptibility of *Aedes albifasciatus* and *Culex pipiens* complex mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Argentina to Western Equine Encephalitis virus. *Revista de Saúde Pública*. (S. Paulo) **24**: 265-269.
- Avilés G.**, Sabattini M., Mitchell C. 1992. Transmission of Western Equine Encephalomyelitis virus by Argentine *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* **29**: 850-853.
- Baskerville A.**, McFerran J.B., Dow C. 1973. Aujeszky's disease in pigs. *The Veterinary Bulletin* **43**: 465-480.
- Berría M.** Familia Herpetoviridae. Cap.19: 327-338. En Virología Médica. Carballal G. y Oubiña J. 3° ed. Ed. El Ateneo, Buenos Aires. 1998.



- Bettega J.M.**, Teixeira H., Bassani V.L., Barardi C.R., Simões C.M. 2004. Evaluation of the antihyperthermic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phytotherapy Research* **18** (10): 819-23.
- Bianchi T.** 1991. Caracterización biológica y serológica de un nuevo virus del complejo de la *Encefalitis Equina del Oeste* recientemente aislado en la Argentina. Tesis Doctoral. Fac. Cs. Qcas. UNC.
- Bianchi T.**, Avilés G., Monath T., Sabattini M. 1993. *Western Equine Encephalomyelitis*: virulence markers and their epidemiologic significance. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **49**: 322-328.
- Bianchi T.**, Daffner J., Sabattini M. 1990. Infección experimental de equinos con cepas enzoóticas y epizoóticas del virus de la *Encefalitis Equina del Oeste*. Tercer Congreso Argentino de Virología (Santa Fe). Abstract 73.
- Bidau C.J.**, Amat, A.G., Yajia M., Martí D.A., Riglos A.G., Silvestroni A. 2004. Evaluation of the Genotoxicity of Aqueous Extracts of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) using the *Allium* Test. *Cytologia* **69** (2): 109-117.
- Bolin C.A.**, Bolin C., Kluge J., Mengeling W. 1985. Pathologic effects of intrauterine deposition of *Pseudorabies* virus on the reproductive tract of swine in early pregnancy. *American Journal of Veterinary Research* **46**: 1039-1042.
- Borenfreund G.**, Puernen A. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alteration and RN absorption. *Toxicology Letters* **24**:119-124.
- Broussalis A.**, Ferraro G., Gurni A., Coussio J. 1988. Phenolic constituents of four *Achyrocline* species. *Biochemical Systematics and Ecology* **16**: 401-402.
- Broussalis A.**, Ferraro G., Gurni A., Coussio J. 1989. Aspectos fitoquímicos de especies argentinas del género *Achyrocline*. *Acta Farmacéutica Bonaerense* **8**: 11-16.
- Bushra A.M.**, Abul F.M., Niamat A., Waseem A. 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutation Research* **514** (1-2): 105-113.
- Cabrera G.L.**, Rodríguez D.M. 1999. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutation Research* **426**: 211-214.
- Calisher C.**, Karabatsos N. Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution: 19-57. In *The Arboviruses. Epidemiology and Ecology*. Ed. Monath TP., CRC Press, Boca Ratón, Florida. 1988.
- Calisher C.**, Monath T., Mitchell C., Sabattini M., Cropp B., Kerschner J., Hunt A., Lazuick J. 1985. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. III Identification and characterization of virus isolated, including new subtypes of *Western* and *Venezuelan Equine Encephalitis* viruses and four new Bunyaviruses (Las Maloyas, Resistencia, Barranqueras and Anquetera). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **34** (5): 956-965.
- Calisher C.**, Shope R.E., Brandt W., Casals J., Karabatsos N., Murphy F.A., Tesh R.B. and Wiebe M.E. 1980. Proposed antigenic classification of registered arboviruses. I. *Togaviridae*, *Alphavirus*. *Intervirology* **14**: 229-232.
- Calixto J.B.** 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **33**: 179-189.





- Calvo D.**, Cariddi N., Grosso M., Demo M., Maldonado A.M. 2006. *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): Actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus spp.* y efectos inmunomoduladores sobre linfocitos humanos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **48** (3-4): 247-255.
- Cañigueral S.**, Vila R., Wichtl M. 1998. Plantas Medicinales y Drogas Vegetales para infusión y tisana. OEMF International S.R.L., Milán. P. 606.
- Cardoso V.V.**, Jacob M., Casadebaig J., Aboy A.L., Gimmler-Luz M.C., Bassani V.L. 1998. Effect of *Achyrocline satureioides* spray-dried powder on spontaneous and cyclophosphamide induced frequencies of micronuclei in adult and fetal mice. *American Association Pharmaceutical Scientists Annual Meeting*.
- Cariddi L.N.**, Escobar F.M., Sabini M.C., Torres C.V., Zygadlo J.A., Sabini L.I. 2010. First approaches in the study of cytotoxic and mutagenic damage induced by cold aqueous extract of *Baccharis articulata* on normal cells. *Molecular Medicinal Chemistry* **21**: 4-7.
- Casero C.**, Escobar F., Gallucci N., Oliva M.M., Demo M., Sabini L. 2007. Estudio de la capacidad citogenotóxica de decocción de *Achyrocline satureioides* por el test de *Allium cepa* L. En libro de resúmenes del XVI Congreso Italo- Latinoamericano Di Etnomedicina "Carlo L. Spegazzni". La Plata. 72-P, pp: 140- 141.
- Castro L.S.**, Perazzo F.F., Maistro E.L. 2009. Genotoxicity testing of *Ambelania occidentalis* (Apocynaceae) leaf extract in vivo. *Genetics and Molecular Research* **8** (2): 440-447.
- Cella M.**, Riva D.A., Coulombie F.C., Mersich S.E. 2004. Virucida activity presence in *Trichilia glabra* leaves. *Revista Argentina de Microbiología* **36**: 136-138.
- Ceriatti F.S.**, Sabini L.I., Bettera S.G., Zanon S.M., Ramos B.A. 1992. Infección experimental de cerdas preñadas con el virus de la Enfermedad de Aujeszky. *Revista Argentina de Microbiología* **24** (2): 102-112.
- Chauhan L.K.**, Saxena P.N., Gupta S.K. 1999. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Environmental and Experimental Botany* **42** (3): 181-184.
- Cheng H-Y.**, Lin L-T., Huang H-H., Yang C-M., Lin C-C. 2008. Yin Chen Hao Tang, a Chinese prescription, inhibits both *herpes simplex virus type-1* and *type-2* infections in vitro. *Antiviral Research* **77**:14-19.
- Chiang L.C.**, Chiang W., Chang M.Y., Ng L.T., Lin C.C. 2002. Antiviral activity of *Plantago major* and related compounds in vitro. *Antiviral Research* **55**: 53-62.
- Contigiani M.** Togaviridae. Cap. 79: 726-735. En Microbiología Biomédica. Basualdo J.A., Coto C.E., De Torres R.A. Edit. Atlante, Buenos Aires, Argentina. 1996.
- Cotelle S.**, Masfaraud J.F., Ferard J. 1999. Assesment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* micronucleous and the *Tradescantia*. *Mutation Research* **426**: 167-171.
- Cowan M.** 1999. Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 564-582.
- Damonte E.B.** 1996. Agentes antivirales que actúan en las etapas tempranas del ciclo viral. *Revista Argentina de Microbiología* **28**: 204-216.
- De Clerq E.** 1979. New trends in antiviral chemotherapy. *Archives Internationales de Physiologie de Biochimie et de Biophysique* **87**: 353-395.
- De Cristófolo M.A.**, Livellara B.I., De Torres R.A. *Herpes Virus*. Cap. 72: 655-690. En Microbiología Biomédica. Basualdo J. A.; Coto C. E. y De Torres R. Ed. Atlante, Buenos Aires, Argentina. 1996.



- Delfraro A.**, Burgueño A., Morel N., González G., García A., Morelli J., Pérez W., Chiparelli H., Arbiza J. 2011. Fatal Human Case of Western Equine Encephalitis, Uruguay. *Emerging Infectious Diseases*. [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid). DOI: 10.3201/eid1705.101068
- De Souza K.**, Bassani V.L., Schapoval E. 2007. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. *Phytomedicine* **14** (2-3): 102-108.
- De Souza K.**, Schapoval E., Bassani V. 2002. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **28** (3-4): 771-777.
- Denizot F.**, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell grow and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* **89**: 271-277.
- Dias F.L.**, Takahashi C.S. 1994. Cytogenetic evaluation of the effect of aqueous extracts of the medicinal plants *Alpinia nutans* Rose (Zingiberaceae) and *Pogostemon heyneanus* Benth (Labiatae) on wistar rats and *Allium cepa* Linn. (Liliaceae) root tip cells. *Revista Brasileira de Genética* **17**: 175-180.
- Díaz García G.M.** 2002. Evaluación del Efecto Genotóxico de *Xhantium Strumarium* L. (Guisazo de caballo). Tesis de Magister. [www.ilustrados.com](http://www.ilustrados.com).
- Domínguez X.** Métodos de investigación fitoquímica. 1º Ed. Limusa, S. A. México. 1973.
- Duke J.A.** Toxins: their toxicity and distribution in plant genera, pp: 525-568. In Handbook of medicinal herbs. CRC Press. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. 2002
- Dulbecco R.** 1962. Production of plaques in monolayer tissue culture by single particles of an animal virus. *Proceeding Natural Academic Science (USA)* **38**: 747-752.
- Dyer A.F.** 1963. The use of lacto-propionic orcein in rapid squash method for chromosome preparation. *Stain Technology* **38**: 85-90.
- Early E.**, Peralta P.H., Johnson K.M. 1967. A plaque neutralization method for Arbovirus. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine* **25**: 741-747.
- El Garbulli F.R.**, Bashasha J.A. 2008. Hazard of Paracetamol Addiction on Cell Division. Garyounis University Press. *Journal of Science and Its Applications* **2** (1): 6-11.
- Escobar F.M.**, Sabini M.C., Zanon S.M., Cariddi L.N., Tonn C.E., Sabini L.I. 2011. Genotoxic Evaluation of a Methanolic Extract of *Verbascum thapsus* using Micronucleus Test in Mouse Bone Marrow. *Natural Product Communications* **6** (7): 989-991.
- Fachinettto J.M.**, Bagatini M.D., Durgon J., da Silva A.C., Tedesco S.B. 2007. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **17** (1): 49-54.
- Farnham A.E.** 1958. The formation of microscopic plaques by *Herpes virus* in HeLa cells. *Virology* **6**: 317.
- Farnham A.E.**, Newton A.A. 1959. The effect of some environmental factors of *Herpesvirus* grown en HeLa cells. *Virology* **7**: 449.
- Fernández Calvo M.I.** Cromatografía en capa fina de los componentes del cannabis. I.S.B.N.: 978-84-692-6534-5. Ed. Sector de Enseñanza de CSI-F en Sevilla, Sevilla. 2009.
- Ferraro G.**, Norbedo C., Coussio J. 1981. Flavonoids from Argentine Medicinal Plants. Part 12. Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. *Phytochemistry* **20**: 2053-2054.





- Filot Da Silva L.**, Langeloh A. 1994. A Comparative Study of Antispasmodic Activity of Hydroalcoholic 80% (V/V) Extracts of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae) with Papaverine and Atropine on Rat Isolated Jejunum. *Acta Farmacéutica Bonaerense* **13** (1): 35-40.
- Fiskesjö G.** 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* **102**: 99-109.
- Fiskesjö G.** 1993. The *Allium* test in wastewater monitoring. *Environmental Toxicology and Water quality* **8**: 291- 298.
- Fiskesjö G.** 1994. *Allium* test II: Assessment of a chemical genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cells divisions in root tips of *Allium cepa*. *Environmental Toxicology and Water quality* **9**: 235- 241.
- Fiskesjö G.** *Allium* test for screening chemicals: evaluation of cytological parameters: 307-333. In *Plants for Environmental Studies*. Wang W., Gorsuch J., Hughes J.S. CRC, Lewis Publishers, New York. 1997.
- Fotakis G.**, Timbrell J. 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* **160**: 171-177.
- García G.**, Cavallaro L., Broussalis A., Ferraro G., Martino V., Campos R. 1999. Biological and chemical characterization of the fraction with antiherpetic activity from *Achyrocline flaccida*. *Planta Medica* **65** (4): 343-346.
- García G.H.**, Campos R., De Torres R., Broussalis A., Ferraro G., Martino V., Coussio J. 1990. Antiherpetic Activity of some Argentine Medicinal Plants. *Fitoterapia* **LXI**: 542-546.
- García G.** 1999. Estudio de la actividad antiviral de plantas medicinales argentinas. Tesis Doctoral. Fac. Farm. y Bioquímica. UBA.
- Geran R.I.**, Greenberg N.H., Macdonald M.M., Schumacher A.M., Abbcott B.J. 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports* **3**: 59-61.
- Ghosh P.**, Adhikari U., Ghosal P., Pujol C., Carlucci M., Damonte E., Ray B. 2004. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. *Phytochemistry* **65**: 3151-3157.
- Giménez-Martin G.**, De la Torre C., Lopez-Sáez J. Cell division in higher plants: 261-307. In *Mechanism and control of cell division*. Ed. Rost T, Pennsylvania. 1977.
- Grisolia C.K.**, Takahashi C.S., Ferrari I. 1995. *In vitro* and *in vivo* tests in humans confirm that the antimalarial drug mefloquine is not mutagenic. *Brazilian Journal of Genetics* **18**: 611-615.
- Gutiérrez M.C.** 2002. Separación de colorantes por cromatografía de capa fina. *Boletín intexter* (U.P.C.) Nº 122.
- Gutleb A.C.**, Morrison E.Y., Murk A.J. 2002. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **11**: 309-320.
- Guzmán Cano A.** 2008. Estudio del potencial genotóxico del E 58-42, un fármaco experimental antipsicótico con afinidad por el receptor sigma, y del mecanismo de inducción de eritrocitos micronucleados en ratón mediante hipotermia. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Harborne J.B.** *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall. London, UK. 1984.
- Hayashi K.**, Kamira M., Hayashi T. 1995. Virucida Effects of the Steam Distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, Influenzae and HIV. *Planta Medica* **61**: 237-241.



- Hayashi M.** In Vivo Rodent Micronucleus Assay: 257-270. In Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health. Günter Obe and Vijayalaxmi (Eds.). 2007
- Hnatyszyn O.,** Moscatelli V., Rondina R., Costa M., Arranz C., Balaszczuk A., Coussio J., Ferraro G. 2004. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig corpus cavernosum. *Phytomedicine* **11** (4): 366-369.
- Hongslo J.,** Bjorge C., Schwarze P., Brogger A., Mann G., Thelander L., Holme J. 1990. Paracetamol Inhibits Replicative DNA Synthesis and Induced Sister Chromatid Exchange and Chromosomal Aberration by Inhibition of Ribonucleotide Reductases. *Mutagenesis* **5** (5): 475-480.
- [http://salunet.minsal.gov.cl/pls/portal/docs/page/seremis/seremi\\_vi/normativa2011/marconormativo2011/209\\_05valorestoxicidad](http://salunet.minsal.gov.cl/pls/portal/docs/page/seremis/seremi_vi/normativa2011/marconormativo2011/209_05valorestoxicidad).
- Hudson J.** Antiviral compounds from plants. CRC Press, Florida. 1990.
- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).** 2004. Estudios en domesticación y cultivos de especies medicinales y aromáticas nativas. Estación experimental Las Brujas. Ruta 48 Km 10, Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay.
- Itoyama M.,** Bicudo H.E., Cordeiro J.A. 1997. Effects of caffeine on mitotic index in *Drosophila prosaltans* (Diptera). *Brazilian Journal of Genetic* **20**: 655-657.
- Kadarian C.,** Broussalis A., Miño J., Lopez P., Gorzalczany S., Ferraro G., Acevedo C., 2002. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (LAM). *Pharmacology Research* **45** (1): 57-61.
- Kaloga M.,** Hansel R., Cybulski E. 1983. Isolation of a Kawa-Pyrone from *Achyrocline satureioides*. *Planta Medica* **48**:103-104.
- Kluge J.P.,** Beran G.W., Hill H.T., Platt K.B. Pseudorabies (Aujeszky's disease). Cap. 24: 312-323. In Disease of Swine. Leman A., Straw B., Mangelling W., D'Allaire, Taylor D. 7<sup>th</sup> ed. Iowa State University. Press Ames. Iowa, USA. 1992.
- Kluge J.P.,** Maré C.J. 1974. Swine Pseudorabies: Abortion, clinical disease, and lesions in pregnant gilts infected with *Pseudorabies virus* (Aujeszky's disease). *American Journal of Veterinary Research* **35**: 911-915.
- Koizumi T.,** Shirakura H., Kumagai H., Tatsumoto H., Suzuki K.T. 1996. Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane. *Toxicology* **114**: 125-134.
- Kott V.,** Barbini L., Cruaños M., Muñoz J., Vivot E., Cruaños J., Martino V., Ferraro G., Cavallaro L., Campos R. 1999. Antiviral activity in Argentina medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **64**: 79-84.
- Kristensson K.,** Lycke E., Roytta M., Svennerholm B., Vahne A. 1986. Neuritic transport of *Herpes simplex* virus in rat sensory neurons in vitro. Effects of substances interacting with microtubular function and axonal flow. *Journal of General Virology* **67**: 2023-2028.
- Kudi A.C.,** Myint S.H. 1999. Antiviral activity of some Nigerian medicinal plant extract. *Journal of Ethnopharmacology* **68**: 289-294.
- Kuras M.,** Nowakowska J., Sliwinska E., Pilarski R., Ilasz R., Tykarska T., Zobel A., Gulewicz K. 2006. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology* **107**: 211-221.
- Kurokawa M.,** Basnet P., Ohsugi M., Kadota S., Namba T., Kawana T., Shiraki K. 1999. Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* in vitro and in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **289** (1): 72-78.



- Labuckas D.**, Maestri D., Grosso N., Zygadlo J. 1999. Essential oils of *Achyrocline satureioides*, *Achyrocline alata* and *Achyrocline tomentosa*. *Planta Medica* **65**: 184-186.
- Lamaty G.**, Menut C., Bessiere J., Schenkel E., Dos Santos M., Basan V. 1991. The chemical composition of some *Achyrocline satureioides* and *Achyrocline alata* oils from Brazil. *Journal Essential Oil Research* **3**: 317-321.
- Lennette E.**, Schmidt N.
- Eds. Diagnostic procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial infections. 5<sup>th</sup> Ed. Washington D. C. American Public Health Association, Inc. 1979.
- Lerda D.**, Biaggi Bistoni M., Peralta N., Ychari S., Vazquez M., Bosio G. 2005. Fumonisin in foods from Córdoba (Argentina), presence and genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* **43**: 691-698.
- Li Y.**, Ma S., Yang Y., Ye S., But P. 2002. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. *Journal of Ethnopharmacology* **79**: 365-368.
- Lorenzo D.**, Atti-Seraffini L., Santos A., Frizzo, Paroul C., Paz D., Dellacassa E., Moyna P. 2000. *Achyrocline satureioides* essential oils from Southern Brazil and Uruguay. *Planta Medica* **66**: 476-477.
- Martínez Crovetto R.** 1981. Plantas utilizadas en medicina en el NO de Corrientes. Ed. Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina.
- Melo F.**, Benati F., Roman W.A. Jr, de Mello J., Nozawa C., Linhares R. 2008. The *in vitro* antiviral activity of an aliphatic nitro compound from *Heteropteris aphrodisiaca*. *Microbiological Research* **163** (2):136-9.
- Mesquita A.**, Correa D., De Papua A., Guedes M., Gottlieb O. 1986. Flavonoids from four Compositae species. *Phytochemistry* **25**: 1255-1256.
- Mestrimmer F.A.**, Pires Rincao V., Benati F., Carvalho Linhares R., Galina K., Mendes de Toledo C., Lopes G., Palazzo de Mello J., Nozawa C. 2006. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on Poliovirus and Bovine Herpesvirus. *Biological Pharmaceutical Bulletin* **29** (6): 1092-1095.
- Mettenleiter T.**, Zsak L., Zuchermann F., Sugg N., Kern H., Ben-Porat T. 1990. Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparin-like substance mediates adsorption of pseudorabies virus. *Journal of Virology* **64**: 278-286.
- Mettler N.** 1966a. Estudios realizados con los sueros de la epidemia de la fiebre hemorrágica Argentina (1963) que no presentaron conversión serológica para virus Junín. *Medicina (BA)* **26**: 161-169.
- Mettler N.** 1966b. Dosaje de anticuerpos contra arbovirus grupos A y B en niños diarreicos de la ciudad de Buenos Aires y alrededores. *Medicina (BA)* **26**: 98-102.
- Mitchell C.**, Monath T., Sabbatini M., Cropp C., Daffner J., Calisher C., Jakob W., Christensen H. 1985. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. II Arthropod collections and virus isolations from argentine mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **34** (5): 945-955.
- Mitchell C.**, Monath T., Sabbatini M., Daffner J., Cropp C., Calisher C., Darsie R., Jakob W. 1987. Arbovirus isolations from mosquitoes collected during and after the 1982-1983 epizootic of Western Equine Encephalitis in Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **36**: 107-113.
- Mongini C.**, Waldner C. Metodologías para la evaluación de las células inmunocompetentes. Cap. 36: 730-771. En Inmunología e Inmunquímica. Margni, R.A. 5<sup>o</sup> ed. Edit. Médica Panamericana, Buenos Aires. 1996.





- Montanha J.A.**, Amoros M., Boustie J., Girre L. 1995. Anti herpes virus activity of aporphine alkaloids. *Planta Medica* **61**: 419-424.
- Morquio A.**, Rivera-Megret F., Dajas F. 2005. Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* (marcela). *Phytotherapy Research* **19** (6): 486-90.
- Mossman T.** 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **65**: 55-63.
- Ooi L.**, Wang H., Luk C., Ooi V. 2004. Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *Journal of Ethnopharmacology* **94**: 117-122.
- Pauli R.**, Sabattini M. 1976. Aspectos epizootiológicos de la encefalitis equina durante el verano 1972-1973 en la provincia de Santa Fe. Primer Congreso de Microbiología y IV Jornadas Arg. de Microbiología. Abstract 32.
- Paulsen E.** 2002. Contact sensitization from Compositae containing herbal remedies and cosmetics. *Contact Dermatitis* **47**: 189-198.
- Pfeffer M.**, Dobler G. 2010. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasites & Vectors*. [www.parasitesandvectors.com/content/3/1/35](http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/35).
- Petrovick R.**, Knorst M. 1991. Characterization of a concentrated extract of *Achyrocline satureioides* as an intermediary product in the preparation of an ointment. *Phytotherapy Research* **5**: 237-238.
- Polydoro M.**, Souza K.C., Andrades M.E., Da Silva E.G., Bonatto F., Heydrich J., Dal-Pizzol F., Shapoval E.E., Bassani V.L., Moreir, J.C. 2004. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sciences* **74**: 2815-2826.
- Puhlmann J.**, Knaus U., Tubaro L., Schaffer W., Wagner H. 1992. Immunologically active metallicion-containing polysaccharides of *Achyrocline satureioides*. *Phytochemistry* **31**: 2617-2621.
- Pujol C.** 1995. Actividad antiviral y mecanismos de acción de polisacáridos sulfatados obtenidos a partir de las algas *Notogenia fastigiata* y *Pterocladia capillacea*. Tesis Doctoral. Fac. de Cs. Ex. y Nat. UBA.
- Rani G.**, Kaur K., Wadhwa R., Kaul S.C., Nagpal A. 2005. Evaluation of the anti-genotoxicity of leaf extract of *Ashwagandha*. *Food and Chemical Toxicology* **43**: 95-98.
- Rank J.** 2003. The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Ekologija* (Vilnius) **1**: 38-42.
- Rank J.**, Nielsen M.H. 1998. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **148** (2-3): 113-119.
- Reed L.S.** and Muench H.A. 1932. A simple method of estimating fifty per cent end points. *American Journal of Hygiene* **27**: 493-497.
- Reeves W.C.**, Hutson G.A., Bellamy R.E., Scrivani R.P. 1958. Chronic latent infections of birds with western equine encephalomyelitis virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **97**: 733-736.
- Reisen W.**, Monath T. Western Equine Encephalomyelitis: 89-138. In *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. Ed. Monath T., CRC Press. Boca Raton, Florida. 1988.
- Remigio Montero A.**, Pérez Arnáez G., Fernández Esperón N., Bada Barro A., Arteaga Pérez M., Mancebo Rodríguez A. 2001. Estudio genotóxico *in vivo* de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. *Revista de Toxicología* **18**: 75-78.



- Rivera F.**, Gervaz E., Sere C., Dajas F. 2004. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela). *Journal of Ethnopharmacology* **95**: 359-362.
- Rodrigues C.R.**, Dias J.H., de Mello R.N., Richter M.F., Picada J.N., Ferraz A.B. 2009. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **125**: 97-101.
- Roizman B.**, Aurelian L., Roane P.R. 1963. The multiplication of *Herpes simplex* virus. The programming of viral DNA duplication in HEP-2 cells. *Virology* **21**: 482-498.
- Roizman B.**, Sears A. *Herpes simplex* virus and their replication. Chapter 65: 1795-1842. In Fields Virology. Fields B.N., Knipe D.M. 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press, New York, USA. 1991.
- Rosth T.H.** Response of the plant cell cycle to stress: 111-143. In Mechanism and control cell division. Ed. Thomas I. Ross. Inc. Stroudsburg Pennsylvania. 1977.
- Ruffa M.J.**, Ferraro G., Wagner M.L., Calcagno M.L., Campos R.H., Cavallaro L. 2002. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology* **79**: 335-339.
- Sabattini M.** 2010. Importancia actual de los arbovirus en Argentina. Veterinaria Argentina, Bs. As., N° 266. Sitio Argentino de Producción Animal. Extraído de: Temas de Zoonosis IV, Editorial Asociación Argentina de Zoonosis. [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
- Sabattini M.**, Bianchi T., Díaz G., Vega V. 1984. Tipificación de cepas de los virus de las encefalitis equinas *Scientific Meeting Sociedad Argentina de Virología*. Abstract 23.
- Sabattini M.**, Avilés G.; Monath T. 1998. An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Ed. Travassos da Rosa P. A.; Vasconcelos, P. and Travassos da Rosa J. Belém Instituto Evandro Chagas.
- Sabattini M.**, Daffner J., Monath T., Bianchi T., Cropp C., Mitchell C, Avilés, G. 1991. Localized eastern equine encephalitis in Santiago del Estero province, Argentina, without human infection. *Medicina (BA)* **51**: 3-8.
- Sabini L.**, Ceriatti F., Ramos B., Zanon S. 1996. Sensibilidad al calor y la tripsina del virus *Herpes suis*, cepa RC/79. *Archivos de Medicina Veterinaria* **28**: 159-163.
- Sabini L.**, Zanon S., Lara L., Torres C., Sutil S., Rovera M., Ramos B. 2000. Study of *Pseudorabies Virus, RC/79 Strain*, Virulence Markers. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **42** (3): 95-144.
- Sabini L.I.** 1996. Caracterización del virus de la enfermedad de *Aujesky cepa RC/79*: estudios dirigidos al control y erradicación de la enfermedad. Tesis Doctoral. UNRC.
- Sabini M.C.**, Escobar F.M., Cariddi L.N., Contigiani M.S., Zanon S.M., Sabini L.I. 2011. Inhibition of *Herpes suis* virus type 1 by aqueous extract of *A. satureioides*. *Biocell* **35** (2): A 100.
- Sabini M.C.**, Escobar F.M., Tonn C.E., Zanon S.M., Contigiani S.M., Sabini L.I. 2010. Evaluation of antiviral activity of aqueous extracts from *A. satureioides* against *Western Equine Encephalitis* virus. *Natural Product Research*. DOI: 10.1080/14786419.2010.490216.
- Sabini M.C.**, Escobar F.M., Zanon S.M., Contigiani S.M., Sabini L.I. 2009. *Achyrocline satureioides*: virucidal and antiviral action of aqueous extract. *Biocell* **33**(3): A 265.
- Saddi M.**, Sanna A., Cottiglia F., Chisu L., Casu L., Bonsignore L., De Logu A. 2007. Antitherpesvirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **6**: 10.
- Saettone A.L.** 2003. Antivirales en dermatología. *Dermatología*, Perú, **13** (1): 42-56.





- Safrin S.** Antiviral Agents: 823-844. In Basic & Clinical Pharmacology. Katzung B. New York. McGraw-Hill. 2001.
- Santos-Mello R.**, Deimling L.I., Lauer Jr.C.M., Almeida A. 2002. Induction of micronuclei by alkaloids extracted from *Senecio brasiliensis* and stored for 23 years. *Mutation Research* **516** (1-2): 23-28.
- Schlesinger S.** and Schlesinger M.J. *Togaviridae*: The viruses and their replication: 825-841. In Fields B.N, Knipe D.M., Howley P.M, et al., eds. Fields Virology, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. 2001.
- Schmeda Hirschmann G.**, Silva M. 1982. Actividad antibacteriana de *Achyrocline satureioides* DC. Publicación de la Fac. de Cs. Químicas de Paraguay. N° 4.
- Schmid W.** 1975. The micronucleus test. *Mutation Research* **31**: 9-15.
- Schnitzler P.**, Nolkemper S., Stintzing F. C., Reichling J. 2008. Comparative *in vitro* study and the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. *Phytomedicine* **15**: 62-70.
- Senna E.**, Petrovick P., Ortega G., Bassani V. 1997. Preparation and characterization of spray-dried powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts. *Phytotherapy Research* **11**: 123-127.
- Tan M.**, Sulaiman S., Najimuddin N., Samian M., Tengku Muhammad T. 2005. Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. *Journal of Ethnopharmacology* **96**: 287-294.
- Taylor L.** 2005. The Healing Power of Rainforest Herbs. A guide to Understanding and Using Herbal Medicinals. Square One Publishers, Garden City Park. New York, pp. 345.
- Teixeira R.O.**, Camparoto M.L., Mantovani M.S., Vicentini V.E. 2003. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in *in vivo* assays. *Genetic Molecular Biology* **26**: 551-555.
- Theiler M.**, Downs W.G. 1973. The arthropod-borne viruses of vertebrates. An account of the Rockefeller Foundation Virus Program, 1951-1970. New Haven and London, Yale University Press, pp. 578.
- Tülay A.C.**, Özlem S.A. 2010. Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of *Inula viscosa* Leaf Extracts with *Allium* Test. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. D.O.I.: 10.1155/2010/189252.
- Vanden Berghe D.A.**, Vlietinck A.J., Van Hoof L. 1986. Plant products as potential antiviral agents. *Bulletin Institute Pasteur* **84**: 101-147.
- Vanella J.M.** Procedimientos y técnicas del laboratorio de virus. Inst. de Virología, UNC. 1964.
- Vicentini V.E.**, Camparoto M.L., Teixeira R.O., Mantovani M.S. 2001. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* L. Skeels and *Cissus sicyoides* L.: Medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. *Acta Scientiarum* **23**: 593-598.
- Wagner H.**, Bladt S. Plant Drug Analysis. A thin layer Chromatography Atlas. Editorial Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. 1996.
- Wang H.**, Ooi E.V., Ang P.O. 2008. Antiviral activities of extracts from Hong Kong seaweeds. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* **9** (12): 969-976.
- Waschman M.** 1987. Actividad antiviral de productos naturales. Tesis Doctoral. Fac. Cs. Exact. y Nat. UBA.



- Wudunn D.**, Spear P. 1989. Initial interaction of *Herpes simplex* virus with cells is binding to heparan sulphate. *Journal of Virology* **63**: 52-58.
- [www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/encefalomielitisequina.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/encefalomielitisequina.pdf). 2008. Encefalomiелitis Equina del Este, del Oeste y Venezolana.
- [www.economiadelasalud.com/Ediciones/03/03EnPortada/03en\\_plantasmedicinales](http://www.economiadelasalud.com/Ediciones/03/03EnPortada/03en_plantasmedicinales).
- [www.escuela.med.puc.cl/publ/PatologiaGeneral/Patol\\_033](http://www.escuela.med.puc.cl/publ/PatologiaGeneral/Patol_033).
- [www.iqb.es/cbasicas/farma/farma05/tox/tox01.htm](http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma05/tox/tox01.htm). Principios de toxicología.
- [www.natureduca.com](http://www.natureduca.com). Naturaleza educativa.
- [www.rain-tree.com](http://www.rain-tree.com). Raintree Nutrition.
- Yi H.**, Meng Z. 2003. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on roots tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutation Research* **537**: 109-114.
- Ying H.**, Yi L. 2000. Effect of aspirin and paracetamol on inner cell mass and Protein Expression of Rat Embryos in Preggastrulation Stage. *Biological Abstract* **107** (17): 253-261.
- Yip L.**, Pei S., Hudson J.B. and Towers G.H.N. 1991. Screening of medicinal plants from Yunnan Province in southwest China for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology* **34**:1-6.
- Zacks M.A.** and Paessler S. 2010. Review Encephalitic alphaviruses. *Veterinary Microbiology* **140**: 281-286.
- Zanon S.**, Ceriatti F., Rovera M., Sabini L.; Ramos B. 1999. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **41** (2): 59-62.
- Zanon S.M.** 2005. Acción antiviral de *Minthostachys verticillata*. Tesis Doctoral. UNRC.
- Zúñiga González G.**, Gómez Meda B. 2006. La prueba de micronúcleos. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana* **19** N°1.
- Zygadlo J.A.**, Maestri D.M., Lamarque Guzmán C., Velasco-Negueruela A., Pérez-Alonso M., García-Vallejos M., Grosso N. 1996. Essential oil variability of *Minthostachys verticillata*. *Biochemical Systematics and Ecology* **24**: 319-323.



## 8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Natural Product Research  
2010, 1–11, iFirst



### Evaluation of antiviral activity of aqueous extracts from *Achyrocline satureioides* against Western equine encephalitis virus

María Carola Sabini<sup>a</sup>, Franco Matias Escobar<sup>b</sup>, Carlos Eugenio Tonn<sup>c</sup>,  
Silvia Matilde Zanon<sup>b</sup>, Marta Silvia Contigiani<sup>a</sup> and Liliana Inés Sabini<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Ciencias Médicas, Instituto de Virología Dr. José María Vanella, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; <sup>b</sup>Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 km, 601 (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina; <sup>c</sup>Departamento de Química, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, INTEQUI-CONICET-UNSL, Universidad Nacional de San Luis, San Luis, Argentina

(Received 9 March 2010; final version received 23 April 2010)

*Achyrocline satureioides* (Asteraceae) is a medicinal plant traditionally used in Argentina for the treatment of intestinal infections and various digestive disorders. Its infusion is widely utilised for respiratory problems and viral infections. The objective of this study was to investigate cytotoxicity, virucidal and antiviral properties of the cold aqueous extract (CAE) and hot aqueous extract (HAE) of this plant against Western equine encephalitis virus (WEEV). Cytotoxicity in Vero cells was evaluated by maximum non-cytotoxic concentration (MNCC), neutral red (NR) uptake and MTT reduction methods. To study the antiviral activity of aqueous extracts, plaque reduction assay was performed after pre-treatment of host cells, adsorption, penetration and post-penetration of the virus. Extracellular virus inactivation was also analysed by the same method. Extracts showed strong inhibitory activity after virus penetration with selective index values of 32 (NR) and 63.3 (MTT) for the CAE, and 16.2 (NR) and 24.3 (MTT) for the HAE. Both extracts exhibited virucidal action with lower efficacy than their antiviral properties. The present results demonstrate that aqueous extracts of *A. satureioides* are active against WEEV. Further studies are needed in order to identify which compounds could be responsible for this effect, and how they exert antiviral action.

**Keywords:** *Achyrocline satureioides*; antiviral activity; aqueous extracts; WEEV; NR uptake; MTT assay

#### 1. Introduction

Many diseases caused by viruses are a problem to treat due to the limited availability of effective antiviral drugs, the toxic effect that they produce on the host cells, as well as the induction of resistance generated in the host following their prolonged use (Pujol, 1995).

\*Corresponding author. Email: lsabini@exa.unrc.edu.ar



2 M.C. Sabini et al.

Outbreaks of viral encephalitis are a health issue of increasing importance. Members of the *Alphavirus* genus (Togaviridae), such as Western equine encephalitis (WEE), Eastern equine encephalitis (EEE) and Venezuelan equine encephalitis (VEE) viruses are important aetiologic agents. Western equine encephalitis, a mosquito-borne disease in domestic animals and humans in North, Central and South America, is caused by the WEE virus. WEEV is responsible for large, periodic and extensive epizootics and epidemics of encephalitis in equines and humans (Hu et al., 2008; Johnston & Peters, 1996; Reisen & Monath, 1988). In infants and children the disease is more serious, often associated with seizures.

The WEE complex includes epizootic and enzootic strains. EEE and WEE viruses have caused epizootics in Argentina since the beginning of the last century. During the periods 1972–1973 and 1982–1983, there were epizootics of WEE with sporadic human cases. The latter period had the province of Santa Fe as its epicentre, and the epizootic spread to Viedma, Rio Negro province. WEEV was isolated from the mosquito *Ochlerotatus albifasciatus*, which induced 20–50% mortality in horses (Sabattini, Avilés, & Monath, 1998).

Numerous investigations have shown that various medicinal herbs exhibit antiviral effects, either by direct virucidal or prophylactic methods. These results suggest that the mechanism of action could be inactivating the viral proteins or interfering with virus adhesion to the cell. Other data also suggest that they may interfere in the replicative cycle of the pathogen by reducing the viral nucleic acid synthesis (Montanha, Amoros, Boustie, & Girre, 1995). Therefore, there is an increasing need for new antiviral drugs, for which plants are an important source.

The phytogeographic region named 'Monte', included in arid ecosystems, is characterised by many species of plants and herbs with medicinal folk tradition. One of the most relevant species is *Achyrocline satureioides*, which belongs to the family Asteraceae. This plant, commonly known as 'marcela del campo', is native to America and extends throughout the continent, as well as in Europe and Africa. In Argentina, it is often found in sandy and humid soils in the hills of Córdoba, San Luis and Buenos Aires (Tandil) (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, 2004). Numerous investigations have reported its bioactive properties, such as anti-inflammatory (De Souza, Bassani, & Schapoval, 2007), sedative (Hnatyszyn et al., 2004), hepatoprotective (Kadarian et al., 2002), antioxidant (Arredondo et al., 2004; Polydoro et al., 2004), immunomodulatory and antimicrobial (Calvo, Cariddi, Grosso, Demo, & Maldonado, 2006), antitumoural (Ruffa et al., 2002), antiviral (Bettega, Teixeira, Bassani, Barardi, & Simões, 2004; Zanon, Ccriatti, Rovera, Sabini, & Ramos, 1999) and photoprotective (Morquio, Rivera-Megret, & Dajas, 2005).

The plant is traditionally employed as an antispasmodic in cases of intestinal infections (because of its antibiotic properties) and various digestive disorders. Its infusion is widely utilised for the treatment of respiratory problems, including asthma, bronchitis and upper respiratory tract infections, as well as for viral infections. It has also been used in gynaecological wash preparations, and treatment of cardiovascular diseases (Filot Da Silva & Langeloh, 1994; Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, 2004; Taylor, 2005).

Numerous studies with *A. satureioides* point out its great ethnobotanical potential. However, investigations must be carried out to determine the inhibitory



ability of extracts at non-cytogenotoxic concentrations in the replication cycle of WEE virus.

Therefore, this study was conducted to evaluate the cytotoxicity, virucidal and antiviral properties of aqueous extracts from *A. satureioides* against the WEE virus.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Cytotoxicity

To discriminate antiviral activities from cytotoxic effects, cytotoxic concentrations that reduced viability of Vero cells by 50% as well as the MNCC were determined.

Cell treatment with CAE at concentrations ranging from 200 to 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  showed that 480  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was the MNCC. On the other hand, HAE was assayed at concentrations between 100 and 1400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , leading to a MNCC of 260  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Table 1).

For the determination of  $\text{CC}_{50}$  for CAE and HAE, concentrations varying from 100 to 1900  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and from 100 to 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were used, respectively. The values of  $\text{CC}_{50}$  and  $\text{CC}_{80}$ , which were determined by two methods, are given in Table 1.

The results of both methods indicated that the HAE exhibited more toxicity than the CAE. In addition, NR assay was more sensitive than the MTT method because it showed lower  $\text{CC}_{50}$  values than those achieved by the latter. It suggests that both extracts affect the phagocytic action at concentrations that are innocuous to the mitochondrial respiratory chain.

Results of cytotoxic studies of the methanolic extract of *A. satureioides* reported by Ruffa et al. (2002) indicated a  $\text{CC}_{50}$  value of 237  $\mu\text{g mL}^{-1}$  using the same cell system. A comparative analysis shows that our extracts were less toxic. On the other hand, considering the results of MNCC obtained herein, the CAE of *A. satureioides* was less toxic than the aqueous extracts of *Lithraea molleoides*, *Sebastiania brasiliensis*, *Sebastiania klotzschiana* (all with  $\text{MNCC} > 250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and *Myrcianthes cisplatensis* (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), and was similar to *Polygonum punctatum* (>450  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), assayed on the same cell line, while HAE toxicity was similar to the three former species, lower than *M. cisplatensis*, but higher than *P. punctatum* (Kott et al., 1999).

Table 1. Cytotoxicity of the CAE and HAE of *A. satureioides* determined by different methods.

Extracts	NR		MTT		MNCC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
	$\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$\text{CC}_{80}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$\text{CC}_{80}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
CAE	960	290	>1900	418	480
HAE	373	170	559	323	260





4 M.C. Sabini et al.

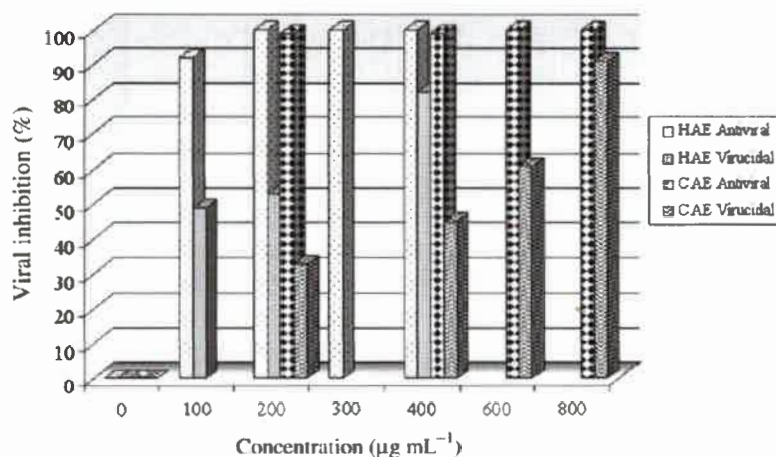


Figure 1. Influence of concentration of the HAE and CAE of *A. satureioides* on virucidal and antiviral activities against WEEV.

Note: Virus suspensions were incubated with different concentrations of extracts for 1 h at 37°C. Immediately, residual infectivity was titrated by plaque reduction assay. Virucidal activity was expressed as the percentage reduction of plaque. For antiviral tests, monolayers infected with virus and incubated for 1 h at 37°C were treated with increasing concentrations of extracts for 96 h. Thereafter the percentage inhibition was determined. Values are averages from three independent experiments.

## 2.2. Antiviral and virucidal activities

The inhibition induced by the extracts during viral adsorption and penetration was less than 50% for CAE, and less than 30% for HAE, while in the pre-treated cells the inhibition was less than 40% and 5% for CAE and HAE, respectively (data not shown).

WEEV was totally inhibited by the HAE at concentrations in the range 200–400 µg mL<sup>-1</sup> when it was added post-viral penetration, as shown in Figure 1, whereas the virucidal effect of this extract was concentration-dependent, reaching nearly 82%. Similarly, CAE showed excellent antiviral activities at concentrations of 200–800 µg mL<sup>-1</sup>, while virucidal action was dose-dependent. An important inactivation (>90%) was only observed at the maximum concentration assayed.

As can be seen, the antiviral activity occurred in a stage after viral penetration, thus suggesting selective interference with the replication cycle within the host cell. Further studies are needed in order to determine which step of the multiplicative viral cycle is affected by both polar extracts of this plant.

Additionally, Zanon et al. (1999) reported an important inhibitory effect in the replication of pseudorabies virus (*Herpes suis*) by the alcoholic extract of *A. satureioides* when the plant sample was added after viral penetration.

Other studies on the mechanism of the antiherpetic activity have demonstrated that the hydroethanolic extract of *A. satureioides* showed no virucidal effects, and did not affect the cell membrane's receptors to which the virus binds. Herpes simplex virus (HSV-1) DNA synthesis was not inhibited. The antiherpetic activity occurred



between the second and the ninth hour of the virus replication cycle, probably indicating a perturbation on the late stages of this cycle (Bettega et al., 2004).

There are no reports on the antiviral activity of medicinal plants against WEEV, but there are reports of strong inhibition of the cytopathic effect induced by this virus on Vero cells by mycelial fractions of *Agaricus blazei* Murill (Sorimachi et al., 2001).

Several investigations have reported inhibitory effects against *Sindbis* virus, another member of *Alphavirus*, with plant extracts from *Melia azedarach* L. (Meliaceae), *Bidens pilosa* (Asteraceae) and *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) (Beloin et al., 2005; Waschman, Andrei, Daelli, & Coto, 1984; Yip, Pei, Hudson, & Towers, 1991).

### 2.3. Determination of $EC_{50}$

The  $EC_{50}$  values found against WEEV were  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  for the CAE and  $23 \mu\text{g mL}^{-1}$  for the HAE (Figure 2). To evaluate the selective antiviral activity *in vitro*, the selectivity index (SI) was determined, as given in Table 2. The SI describes the ratio between the cytotoxic and antiviral activities of a substance. One of the most used criteria to consider antiviral effectiveness is an SI value above 10 (Wyde, Ambrose, Meyer, Zolinski, & Gilbert, 1990). The SI values were 32 (NR) and 63.3 (MTT) for the CAE and 16.2 (NR) and 24.3 (MTT) for the HAE, thus demonstrating that the CAE was more selective as an antiviral agent than HAE. These values are clearly higher than 10, suggesting that both aqueous extracts are effective antivirals.

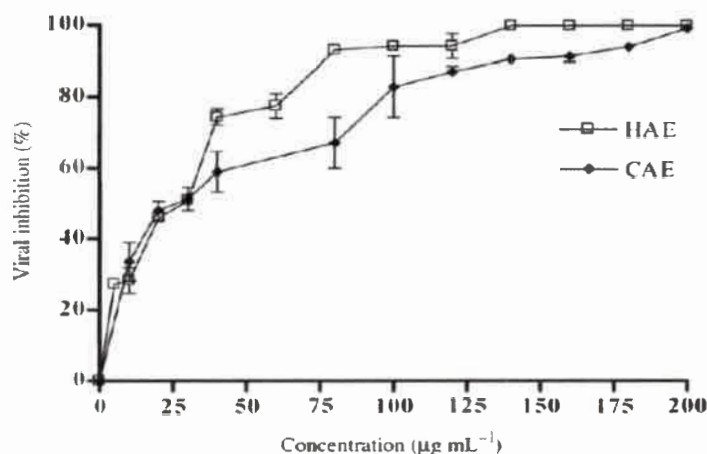


Figure 2. Determination of the  $EC_{50}$  of the HAE and CAE from *A. satureioides* against WEEV.

Note: Cell monolayers were infected with about 100 PFU per well, and incubated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . MEM-0.5% agarose with increasing concentrations ( $5\text{--}200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) of extract was added. After incubation for four days at  $37^\circ\text{C}$ , viral plaques were counted. Thereafter the percentage inhibition was calculated, and the  $EC_{50}$  was determined. Data account for the means of three separate experiments.



6 M.C. Sabini et al.

Table 2. Selectivity index of the CAE and HAE of *A. satureioides* on WEEV.

Extracts	CC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )			SI (CC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )	
	NR	MTT	EC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	NR	MTT
CAE	960	>1900	30	960/30 = 32	>1900/30 ≥ 63.3
HAE	373	559	23	373/23 = 16.2	559/23 = 24.3

For *A. satureioides*, the occurrence of flavonoids, such as luteolin, quercetin and 3-*O*-methylquercetin, in the aqueous extracts has been reported previously (De Souza, Schapoval, & Bassani, 2002). Other chemical constituents of this species are caffeic, chlorogenic and isochlorogenic acids, pyrone derivatives, kavapyrone, flavonoids, minerals, volatile oil and polysaccharides (Polydoro et al., 2004; Vendruscolo, Rates, & Mentz, 2005).

Other studies revealed that metabolites, such as dicaffeoylquinic acid, present in the aqueous extracts of the flowers of this genus, exhibited antiviral activity *in vitro* against HIV (Abdel-Malek et al., 1996; Robinson et al., 1996) and informed antiherpetic activity of 3,5-dicaffeoylquinic, 1-methoxy-3,5-dicaffeoylquinic and 3-*O*-methylflavones. On the other hand, the inhibitory action of saponins on HSV-1 DNA synthesis has also been reported (Alonso & Desmarchelier, 2006). Therefore, these compounds could be related to the detected antiviral activity of the extracts.

### 3. Experimental

#### 3.1. Plant material

*Achyrocline satureioides* plants were collected manually from Villa Jorcoricó, southern Córdoba hills (32°41'S; 64°43'W; 800m sea level) in May 2007. The plant material was identified by Dr Luis Del Vitto, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of San Luis, San Luis, Argentina. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the University of San Luis (No. 6362).

#### 3.2. Preparation of extracts

Aerial vegetal parts (leaves, stems and blooms) were submitted to extraction with cold (4°C) and hot water (70°C) sequentially (15 g of dried and pulverised material per 700 mL of water) for two days. The suspensions were filtered and lyophilised. These two solutions were identified as the cold aqueous extract (CAE) and hot aqueous extract (HAE), respectively. Stocks were prepared in phosphate buffered saline (PBS) at a concentration of 100 mg mL<sup>-1</sup> and centrifuged at 10,000 rpm for 30 min. The extracts were stored at -20°C.

#### 3.3. Cell culture and virus

Bioassays were performed in Vero cells (*Cercopithecus aethiops* green monkey kidney epithelial cell line; ATCC CCL-81) grown in Eagle's minimal essential medium



(EMEM; Gibco, USA) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated foetal calf serum (Natocor, Argentina), glutamine ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and gentamicin ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (all from Sigma-Aldrich, Italy). Cell cultures were maintained at  $37^\circ\text{C}$  in a 5% (v/v)  $\text{CO}_2$  humidified atmosphere.

WEEV strain Ag 80-646, an enzootic strain, was isolated in Chaco (Argentina) from *Culex (Melanoconion) ocossa* mosquitoes (Mitchell et al., 1985). The virus was propagated by intracerebral inoculation in infant mice (Rockefeller strain) and titrated by quantification of the plaques-forming unit (PFU) method for arbovirus (Early, Peralta, & Johnson, 1967). Viral stocks were stored at  $-70^\circ\text{C}$ .

### 3.4. Cytotoxicity assays

For cytotoxicity assays, the cells were cultured in 96-well culture plates (Cellstar, Greiner Bio-One, Germany). After incubation for 24 h at  $37^\circ\text{C}$ , cells were exposed to increasing concentrations of the extracts. Assays were carried out in triplicate. Monolayers incubated only with EMEM were used as controls for cellular viability.

Maximum non-cytotoxic concentration (MNCC) was determined microscopically by daily observations of morphological cell changes for 72 h (L. Ooi, Wang, Luk, & V. Ooi, 2004). The cytotoxic concentration of the extracts which reduced the viable cell number by 50% ( $\text{CC}_{50}$ ) was determined by neutral red (NR) uptake and MTT assays.

After the cells were treated with both extracts for 48 h, the microplates were incubated with NR solution at  $37^\circ\text{C}$  for 3 h and finally, with an extraction solution (49% distilled water: 50% ethanol: 1% acetic acid) for 15 min in a shaker. The absorbance was read on a multiwell spectrophotometer (Bio-Tek, ELx800, USA) at 540 nm (Rajbhandari, Wegner, Jülich, Schöpke, & Mentel, 2001; Seth, Yang, Choi, Sabeen, & Roberts, 2004).

The  $\text{CC}_{50}$  was also measured by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) method (Mosmann, 1983). Briefly, monolayers treated with extracts for 48 h at  $37^\circ\text{C}$  were incubated with MTT solution for 4 h at  $37^\circ\text{C}$ . Subsequently, the supernatant was removed and acid-isopropanol (0.04N HCl in isopropanol) was added. After gently shaking for 15 min, the absorbance was read on a multiwell spectrophotometer (Bio-Tek, ELx800) at 570 nm. Percentage survival fraction was calculated considering optical density (OD) of cultures treated versus controls.

### 3.5. Antiviral activity

In order to study the antiviral activity of the CAE and HAE, three experiments were performed by adding plant samples at different times and evaluating the inhibitory action by a plaque reduction assay.

#### 3.5.1. Pre-treatment cells

Monolayers grown in 24-well culture plates (Cellstar, Greiner Bio-One, Germany) were treated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  with different concentrations of the extracts. After





8 *M.C. Sabini et al.*

washing with PBS, the cells were exposed to 100 PFU of WEEV per well for 1 h at 37°C. Cultures were washed and overlaid with MEM-0.5% UltraPure Agarose (Invitrogen, USA) and further incubated for 96 h at 37°C.

### 3.5.2. Adsorption and penetration

Cell monolayers were infected with 100 PFU of virus per well in the presence of different concentrations of extracts. After adsorption for 1 h at 37°C, residual inoculum was removed, and MEM-0.5% agarose was added.

### 3.5.3. Post-penetration

Cells were infected with 100 PFU of virus per well, further incubated for 1 h at 37°C, and any unadsorbed virus was removed. Cells were washed with PBS, and then MEM-0.5% agarose with different extract concentrations was added. After incubation, cell monolayers were fixed with 10% formalin (Cicarelli, Argentina) and further stained with 1% crystal violet solution.

Controls of virus, cells and extracts were included in all assays. A positive antiviral control was not included because there are no effective antiviral drugs against WEEV.

The number of plaques of treated cells was compared to untreated controls to calculate the plaque reduction percentage.

## 3.6. Virucidal test

To determine the ability of extracts to inactivate the virus particles directly, equal volumes of WEEV (200 PFU 100  $\mu\text{L}^{-1}$ ) and extract (double concentration of those assayed in antiviral experiments) were mixed and incubated for 1 h at 37°C. Afterwards, each mixture was added to cultures (100  $\mu\text{L}$  per well), using three wells for each concentration, and these were incubated for 1 h at 37°C. Then, monolayers were washed and covered with MEM-0.5% agarose. After incubation for four days at 37°C, the cells were fixed with 10% formalin and stained with 1% crystal violet solution.

## 3.7. Determination of 50% effective concentration

Cell monolayers cultured in 24-well microplates were infected with about 100 PFU per well, and incubated for 1 h at 37°C. Residual inoculum was removed; cells were washed with PBS and MEM-0.5% agarose was added together with increasing concentrations of the extracts, CAE and HAE. After four days at 37°C, the cultures were fixed, stained and viral plaques were counted. The  $EC_{50}$  was calculated as the extract concentration that reduced the number of PFUs to 50% with respect to the viral control.





### 3.8. Data analysis

The  $CC_{50}$  and  $EC_{50}$  were calculated from concentration–effect plots by non-linear regression analysis (Boltzmann sigmoidal origin). The results account for the mean  $\pm$  standard error of the mean values of three different experiments.

### 4. Conclusion

The results obtained in this study conclude that aqueous extracts of *A. satureioides* exert high antiviral activities against WEEV, and a slight virucidal activity tested *in vitro*.

It can be suggested that the antiviral effect is more likely to occur after the entry of the virus to the host cell, in the subsequent stages of the cell culture replication. Nevertheless, the mechanism of their antiviral action has not yet been identified. Furthermore, additional studies are needed in order to identify which compounds could be responsible for this effect and how they exert antiviral action.

### Acknowledgements

The authors are grateful to CONICET, MinCyT of Córdoba, National University of Río Cuarto and the PICTOR programme, BID 1728 /OC-AR, for providing financial support. The authors are also grateful to Dr Luis Del Vitto for providing the taxonomic classification of the plant specimen.

### References

- Abdel-Malek, S., Bastien, J.W., Mahler, W.F., Jia, Q., Reinecke, M.G., Robinson Jr, W.E., et al. (1996). Drug leads from the Kallaway herbalists of Bolivia. 1: Background, rationale, protocol and anti-HIV activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 50, 157–166.
- Alonso, J.R., & Desmarchelier, C. (2006). Marcela. In J.R Alonso & C. Desmarchelier (Eds.), *Plantas medicinales autóctonas de la Argentina – Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud* (pp. 313–324). Buenos Aires: LOLA Editorial.
- Arredondo, M.F., Blasina, F., Echeverry, C., Morquio, A., Ferreira, M., Abin-Carriquiry, J.A., et al. (2004). Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 13–20.
- Beloin, N., Gbeassor, M., Akpagana, K., Hudson, J., de Soussa, K., Koumaglo, K., et al. (2005). Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 49–55.
- Bettega, J.M.R., Teixeira, H., Bassani, V.L., Barardi, C.R.M., & Simões, C.M.O. (2004). Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phytotherapy Research*, 18, 819–823.
- Calvo, D., Cariddi, L.N., Grosso, M., Demo, M.S., & Maldonado, A.M. (2006). *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Marcela): Antimicrobial activity on *Staphylococcus* spp. and immunomodulating effects on human lymphocytes. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48, 247–255.
- De Souza, K.C.B., Bassani, V.L., & Schapoval, E.E.S. (2007). Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. *Phytomedicine*, 14, 102–108.



10 M.C. Sabini et al.

- De Souza, K.C.B., Schapoval, E.E.S., & Bassani, V.L. (2002). LC determination of flavonoids: Separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, 771-777.
- Early, E., Peralta, P.H., & Johnson, K.M. (1967). A plaque neutralization method for Arbovirus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 125, 741-747.
- Filot Da Silva, L., & Langeloh, A. (1994). A comparative study of antispasmodic activity of hydroalcoholic 80% (V/V) extracts of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Asteraceae) with papaverine and atropine on rat isolated jejunum. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 13, 35-40.
- Hnatyszyn, O., Moscatelli, V., Rondina, R., Costa, M., Arranz, C., Balaszczuk, A., et al. (2004). Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig corpus cavernosum. *Phytomedicine*, 11, 366-369.
- Hu, W.-G., Chau, D., Wong, C., Masri, S.A., Fulton, R.E., & Nagata, L.P. (2008). Cloning, expression and purification of envelope proteins E1 and E2 of western equine encephalitis virus and potential use of them as antigens in immunoassays. *Veterinary Microbiology*, 128, 374-379.
- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. (2004). *Estudios en domesticación y cultivos de especies medicinales y aromáticas nativas*. Canelones, Uruguay: Estación experimental Las Brujas.
- Johnston, R.E., & Peters, C.J. (1996). Alphaviruses. In B.N.K.D.M. Fields & P.M. Howley (Eds.), *Fields' virology* (pp. 843-898). Philadelphia: Raven Press.
- Kadarian, C., Broussalis, A.M., Miño, J., Lopez, P., Gorzalczy, S., Ferraro, G., et al. (2002). Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. *Pharmacological Research*, 45, 57-61.
- Kott, V., Barbini, L., Cruañes, M., Muñoz, J.D., Vivot, E., Cruañes, J., et al. (1999). Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 79-84.
- Mitchell, C.J., Monath, T.P., Sabbatini, M.S., Cropp, C.B., Daffner, J.F., Calisher, C.H., et al. (1985). Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. II. Arthropod collections and virus isolations from Argentine mosquitoes. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 34, 945-955.
- Montanha, J.A., Amoros, M., Boustie, J., & Girre, L. (1995). Anti-herpes virus activity of aporphine alkaloids. *Planta Medica*, 61, 419-424.
- Morquio, A., Rivera-Megret, F., & Dajas, F. (2005). Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* ('Marcela'). *Phytotherapy Research*, 19, 486-490.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Ooi, L.S.M., Wang, H., Luk, C.-W., & Ooi, V.E.C. (2004). Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) D.C. (Asteraceae, Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 117-122.
- Polydoro, M., de Souza, K.C.B., Andrades, M.E., Da Silva, E.G., Bonatto, F., Heydrich, J., et al. (2004). Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sciences*, 74, 2815-2826.
- Pujol, C.A. (1995). *Actividad antiviral y mecanismos de acción de polisacáridos sulfatados obtenidos a partir de las algas *Notogenia fastigiata* y *Pterocladia capillacea**. Unpublished doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Rajbhandari, M., Wegner, U., Jülich, M., Schöpke, T., & Mentel, R. (2001). Screening of Nepalese medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 251-255.
- Reisen, W.K., & Monath, T.P. (1988). Western equine encephalitis. In T.P. Monath (Ed.), *The arboviruses: Epidemiology and ecology* (Vol. 5, pp. 89-137). Boca Raton: CRC Press.



- Robinson Jr, W.E., Cordeiro, M., Abdel-Malek, S., Jia, Q., Chow, S.A., Reinecke, M.G., et al. (1996). Dicafeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: Inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase. *Molecular Pharmacology*, 50, 846-855.
- Ruffa, M.J., Ferraro, G., Wagner, M.L., Calcagno, M.L., Campos, R.H., & Cavallaro, L. (2002). Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 335-339.
- Sabattini, M.S., Avilés, G.A., & Monath, T.P. (1998). Historical, epidemiological and ecological aspects of arboviruses in Argentina: Togaviridae, Alphavirus. In A.P.A. Travassos da Rosa, P.F.C. Vasconcelos, & J.F.S. Travassos da Rosa (Eds.), *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries* (pp. 135-153). Belém, Brazil: Instituto Evandro Chagas.
- Seth, R., Yang, S., Choi, S., Sabeian, M., & Roberts, E.A. (2004). *In vitro* assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, Hep G2. *Toxicology In Vitro*, 18, 501-509.
- Sorimachi, K., Ikehara, Y., Maezato, G., Okubo, A., Yamazaki, S., Akimoto, K., et al. (2001). Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of cytopathic effect induced by western equine encephalitis (WEE) virus on Vero cells *in vitro*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65, 1645-1647.
- Taylor, L. (2005). *The healing power of rainforest herbs: A guide to understanding and using herbal medicinals* (p. 345). Garden City Park, NY: Square One.
- Vendruscolo, G.S., Rates, S.M.K., & Mentz, L.A. (2005). Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15, 361-372.
- Waschman, M.B., Andrei, G.M., Daelli, M.G., Coto, C.E., & de Torres, R.A. (1984). Actividad antiviral asociada a una fracción polipeptídica obtenida de extractos de *Melia azedarach* L. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 3, 27-31.
- Wyde, P.R., Ambrose, M.W., Meyer, H.L., Zolinski, C.L., & Gilbert, B.E. (1990). Evaluation of the toxicity and antiviral activity of carbocyclic 3-deazaadenosine against respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses in tissue culture and in cotton rats. *Antiviral Research*, 14, 215-225.
- Yip, L., Pei, S., Hudson, J.B., & Towers, G.H.N. (1991). Screening of medicinal plants from Yunnan province in southwest China for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 34, 1-6.
- Zanon, S.M., Ceriatti, F.S., Rovera, M., Sabini, L.I., & Ramos, B.A. (1999). Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41, 59-62.





NPC

Natural Product Communications

2011  
Vol. 6  
No. 7  
995 - 998

## Evaluation of Cytogenotoxic Effects of Cold Aqueous Extract from *Achyrocline satureioides* by *Allium cepa* L test

María C. Sabini<sup>a</sup>, Laura N. Cariddi<sup>a</sup>, Franco M. Escobar<sup>a</sup>, Romina A. Bachetti<sup>a</sup>, Sonia B. Sutil<sup>a</sup>, Marta S. Contigiani<sup>b</sup>, Silvia M. Zanon<sup>a</sup> and Lilliana I. Sabini<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Córdoba, Argentina

<sup>b</sup>Instituto de Virología "José María Vanella". Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina

csabini@exa.unc.edu.ar

Received: December 14<sup>th</sup>, 2010; Accepted: March 16<sup>th</sup>, 2011

*Achyrocline satureioides* ("marcela del campo") is native to America. Numerous investigations have reported several bioactive properties such as anti-inflammatory, hepatoprotective, immunomodulatory, antimicrobial and antiviral. Nowadays, few medicinal plants have been scientifically evaluated to test its safety, efficacy and potential benefits, despite the great public interest in these herbs. The aim of this work was to evaluate the cytotoxic and genotoxic activities of cold aqueous extract obtained from *A. satureioides* using *Allium cepa* L test. The results demonstrated the absence of genotoxicity of the extract. Only higher concentrations induced cytotoxicity but interestingly this effect was reversible and was not associated with mutagenicity. The contribution of this research provides assurance of safety in the application of *Achyrocline satureioides* in treatment of microbial diseases and other pathologies helping to define selective toxicity.

**Keywords:** *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Allium cepa* L test, cytogenotoxicity, cold aqueous extract.

Asteraceae (Compositae) family includes some of the oldest and most valued plants for medicinal purposes [1a]. It is known that certain genus of this family contain toxic compounds such as tannic, cyanide, formic and malic acid [1b]. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. is a relevant species that belongs to the family Asteraceae. This plant, commonly known as "marcela del campo", is native to America and extends throughout the continent, as well as Europe and Africa. In our country it is often found in the hills of Córdoba, San Luis and Buenos Aires [2]. Numerous investigations have reported several bioactive properties, such as anti-inflammatory [3a], sedative [3b], hepatoprotective [3c], antioxidant [3d,3e], immunomodulatory and antimicrobial [3f], antitumoral [3g], antiviral [3h,3i,3j] and photoprotective [3k].

Nowadays, few medicinal plants have been scientifically evaluated to test its safety, efficacy and potential benefits, despite the great public interest in these herbs [4]. Regulatory worldwide authorities require information on the genotoxic potential of new drugs as part of the safety evaluation process. *Allium cepa* L test allows assessment of toxicity of substances in terms of macroscopic parameters such as growth and form of roots and, evaluation of genotoxicity from microscopic parameters such as types and frequencies of chromosomal aberrations and abnormal cell divisions.

For all previously described, it is of paramount importance to know the cytotoxicity and genotoxicity of extracts from *A. satureioides*. In order to evaluate the cytotoxic and genotoxic activities of cold aqueous extract (CAE) obtained from *Achyrocline satureioides* experiments were performed using *Allium cepa* L test with modifications.

Table 1 summarizes the results of the effects of CAE of *A. satureioides* on root of *Allium cepa*. Taking into account the number of bulbs roots, the different concentrations of CAE induced normal development, similar to control.

The analysis of length of roots treated with CAE for 5 days showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) among all treatments vs. negative control and absence of dose-response relationship. The inhibition of roots length was  $\geq 50\%$  ( $p < 0.05$ ) for all tested concentrations. Considering the bulbs treated for 2 days (with reversion), there were no significant differences between treatments of 0.5 and 2 mg/mL vs. negative control. By the contrary, there were significant differences for the remaining concentrations of CAE compared to negative control (Figure 1). The average root length for treatment of 2 days with CAE (with reversion) was always higher than of 5 days, although there was no statistically significant difference within the same concentration considered. The concentration of 0.5 mg/mL was the exception because it



Table 1: Macroscopic parameters analyzed in roots of *Allium cepa* L. after treatment with different concentrations of CAE of *A. satureioides* for 5 and 2 days.

PARAMETER	TREATMENTS (n = 4 bulbs)																	
	C (-)		C (+)		CAE (mg/ml) for 5 days						C (-)		C (+)		CAE (mg/ml) for 2 days			
Mean root number	54	37	67	41	46.5	60.5	56	48.5	34.5	43.5	62.5	39	38	39.5				
Mean root length (mm) ± SEM	20.41 ±2.00	13.97 ±0.65	10.03 ±0.62	7.78 ±0.56	8.42 ±0.72	7.51 ±0.60	6.61 ±0.45	25.91 ±2.63	17.55 ±0.94	18.98 ±1.48	11.51 ±0.64	13.07 ±1.03	7.91 ±0.66	10.95 ±0.86				
Abnormalities																		
H <sup>a</sup>	8	32	11	0	2	10	3	10	20	7	5	10	6	4				
Ge <sup>b</sup>	0	0	0	10	14	16	25	0	0	0	15	6	15	37				
Ne <sup>c</sup>	0	0	16	17	6	4	0	0	0	12	17	1	0	18				
Tu <sup>d</sup>	10	5	2	0	0	0	1	9	5	0	1	3	0	0				

H<sup>a</sup>: hook; Ge<sup>b</sup>: gelling; Ne<sup>c</sup>: necrosis; Tu<sup>d</sup>: tumor.

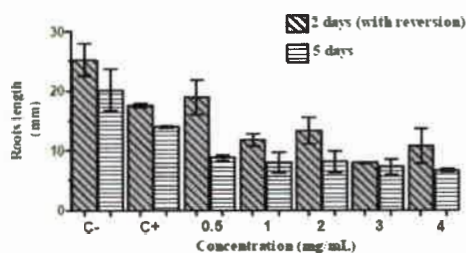


Figure 1: Roots length of bulbs of *Allium cepa* L. treated with different concentration of CAE of *A. satureioides* for 5 days vs. 2 days (with reversion).

showed a statistical difference ( $p < 0.001$ ), indicating the recovery of the roots by mineral water action, after treatment with the extract. This result suggests that bulbs would have the ability to recover from damage induced by this concentration of extract.

Respect to macroscopic abnormality, the study revealed the presence of hooks and tumours in negative control with low frequency. These spontaneous changes are normal and concordant with other authors [5a,5b]. Positive control, paracetamol (acetaminophen 0.3 mg/mL), showed a high incidence of root hooks and also induced the appearance of tumours. None of the roots treated with CAE induced the development of hooks. The results of all treatments with the extract were markedly different to the effect caused by paracetamol.

Gelling and necrosis were present with varying frequency, having the first one the highest incidence. Roots treated with extract did not show significant values in the number of tumours. Pigmentation was observed in most of roots treated due to intense colour of extract.

Statistical analysis of mitotic index of bulbs treated with CAE did not show significant difference between negative control and treatments with 0.5 and 1 mg/mL, for 2 days (MI 1) and 5 days (MI 2). So, these concentrations did not exert toxicity. In contrast, there were significant differences between negative control and treatments of 2, 3 and 4 mg/mL. These concentrations would exert an

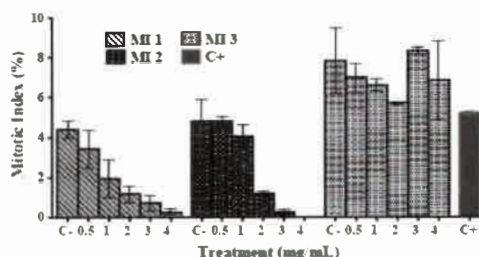


Figure 2: Comparison of mitotic indices 1, 2 and 3 of the roots of the *Allium cepa* bulbs treated with different concentrations of CAE of *Achyrocline satureioides*.

inhibition of cell division. For the MI 2, the trend of the curve revealed a drastic reduction for MI% at the concentrations 2, 3 and 4 mg/mL. This behaviour could be due to these concentrations are extremely toxic when they are used for 5 days. The values of MI 3 (treatment with reversion) did not show statistically significant differences between treatments, neither between these treatments and negative control, indicating the ability of roots to recovery of the toxic action of CAE. The comparative analysis of MI 1 vs. MI 3, for each concentration, showed significant difference ( $p < 0.5$ ), indicating that the damage was reversed (Figure 2).

Analysis of phases index for bulbs treated for 2 and 5 days showed that cell division in roots treated with 0.5 and 1 mg/mL was similar to negative control. By the contrary, cell cycle stages were modified in the bulbs treated with 2, 3 and 4 mg/mL. Prophase was the most observed phase, demonstrating an arrest of cell division at this stage. Application of CAE at these concentrations would be affecting the formation of chromosomes and avoiding their placement in equatorial plane of the cell.

Statistical analysis of the results obtained in treatment with reversion did not show significant differences in phase index of treated roots vs. negative control, indicating the reversion of the changes induced by CAE of *A. satureioides*. These results point out that mitosis was normally developed as it confirms by the value of MI 3. (Figure 3).



Cytogenotoxic evaluation of the extract of *Achyrocline satureioides* *Natural Product Communications* Vol. 6 (7) 2011 997

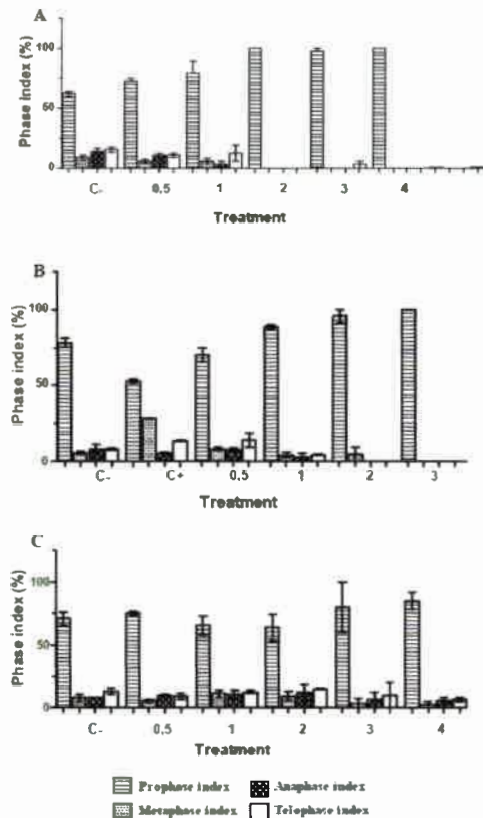


Figure 3: Phase index of cell division in roots treated with CAE of *Achyrocline satureioides* (A) MI 1, (B) MI 2, and (C) MI 3.

Microscopic evaluation of cells showed physiological and clastogenic aberrations as previously described [6]. The physiological aberrations observed were c-mitosis and sticky chromosomes, while the other ones presented chromosomal bridges. These alterations were found more often in roots with normal cell division. Similar figures to apoptotic bodies were observed in interphase cells treated for 2 and 5 days with CAE. (Figure 4).

This study demonstrated the absence of genotoxicity of CAE from *A. satureioides*. High concentrations of the extract induced cytotoxicity but this effect was reversible and was not associated with mutagenicity. The contribution of this research provides assurance of safety in the application of *Achyrocline satureioides* in treatment of microbial diseases and other pathologies helping to define selective toxicity. Nowadays, studies referred to chemical characterization of CAE from *A. satureioides* are in progress.

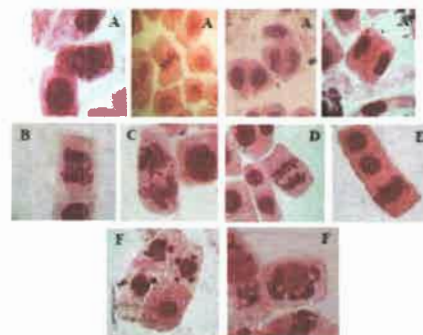


Figure 4: Macrophotographs of meristematic cells of root tips of *Allium cepa*. Squash preparations, stained in acetocarmum and observed in light microscope. (A) A typical view of different size, shape and basophilicity of nuclei and interphase and mitotic phases. (B) cells with sticky chromosomes. (C) cells with delayed chromosomes. (D) cells with chromosomal bridges. (E) physiological aberrations. (F) figures similar to apoptotic bodies in interphase cells.

#### Experimental

**Plant material:** Healthy plants of *A. satureioides* species were collected manually from Villa Jorcoricó, southern Córdoba hills in 2009. The plant material was identified by Dr. Luis Del Vitto, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de San Luis, San Luis, Argentina. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the University of San Luis (N° 6362).

**Obtention of cold aqueous extract:** Dried aerial vegetal parts (15 g) were submitted to extraction with 700 mL of cold water at 4°C for 2 days. The mixture was filtered and lyophilized. This extract was identified as cold aqueous extract (CAE).

**Determination of genotoxic activity of cold aqueous extract from *A. satureioides* by the *Allium cepa* test:** *Allium* test as described [“a.”b.”c] was developed with some modifications. Qualitative and quantitative changes, macro and microscopic, induced by treatment with CAE in plant cells were assessed.

Onion root tips of *Allium cepa* L grown in mineral water, in darkness, with aeration and constant temperature of 25 ± 0.5 °C were employed. CAE was assayed at 0.5, 1, 2, 3 and 4 mg/mL of mineral water. Positive (paracetamol 0.3 mg/mL) and negative (mineral water) controls were included in the system. Extract concentrations were applied for different times: 2 and 5 days, and 2 days followed by 3 days with water (reversion). At the end of each treatment, 2-3 root tips from these bulbs were cut and fixed in a mixture of absolute alcohol:glacial acetic acid (3:1, v/v). These roots were hydrolyzed in 1N HCL for 5 minutes after which they were washed in distilled water. Two root tips were then squashed on each slide, stained with acetocarmum for 10 min and cover slips carefully



lowered on to exclude air bubble. The cover slips were sealed on the slides with clear fingernail polish as suggested by [8]. These roots were reserved for evaluating the cytogenetic abnormalities (microscopic). Six slides were prepared for each concentration and controls (at 1000 cells per slide) were analyzed at  $\times 1000$  magnification for induction of chromosomal aberration. The mitotic index was calculated as the ratio between the number of cells in division and 1000 observed cells. In addition, phases indices were also calculated [7a,7c]. The percentage frequency of aberrant cells was calculated based on the number of aberrant cells per total cells scored at each concentration of the extract. [5b,7c,9].

Previously, macroscopic changes of the roots in terms of root number, length and presence of abnormalities, were evaluated.

Statistical significance was determined by analysis of variance (ANOVA) using *GraphPad Prism 5.0 software*.

**Acknowledgments** - The authors thank to CONICET, MinCyT of Córdoba, Universidad Nacional de Río Cuarto and the PICTOR programme. BID 1728 OC-AR, for providing financial support. The authors are also grateful to Dr Luis Del Vitto for taxonomic classification of the plant specimen.

**References**

[1] (a) Paulsen E. (2002) Contact sensitization from Compositae containing herbal remedies and cosmetics. *Contact Dermatitis*, **47**, 189-198; (b) Duke JA. (2000) Toxins: their toxicity and distribution in plant genera. In: Handbook of medicinal herbs, pp. 525-568.

[2] Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). (2004) Estudios en domesticación y cultivos de especies medicinales y aromáticas nativas. Estación experimental Las Brujas. Ruta 48 km 10. Rincón del Colorado. Canelones, Uruguay.

[3] (a) De Souza K, Bassani VL, Schapoval E. (2007) Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. extracts by oral route. *Phytomedicine*, **14**, 102-108; (b) Hnaryszyn O, Moscatelli V, Rondina R, Costa M, Arranz C, Balaszczuk A, Coussio J, Ferraro G. (2004) Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig corpus cavernosum. *Phytomedicine*, **11**, 366-369; (c) Kadarian C, Broussalis AM, Miño J, Lopez P, Gorzalcauz S, Ferraro G, Acevedo C. (2002) Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (LAM). *Pharmacology Research*, **45**, 57-61; (d) Arredondo M, Blasina F, Echeverry C, Morquio A, Ferreira M, Abin-Carriquiry J, Lafon L, Dajas F. (2004) Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology*, **91**, 13-20; (e) Polydoro M, Souza KC, Andrades ME, Da Silva EG, Bonatto F, Heydrich J, Dal-Pizzol F, Shapoval EE, Bassani VL, Moreir JC. (2004) Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sciences*, **74**, 2815-2826; (f) Calvo D, Cariddi N, Grosso M, Demo M, aldonado A. (2006) *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): Actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus spp.* y efectos inmunomoduladores sobre linfocitos humanos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **48**, 247-255; (g) Ruffa MJ, Ferraro G, Wagner ML, Calcagno ML, Campos RH, Cavallaro L. (2002) Cytotoxic effect of argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, 335-339; (h) Zanon SM, Ceriatti FS, Rovera M, Sabini LI, Ramos BA. (1999) Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **41**, 59-62; (i) Bettiga JMR, Teixeira H, Bassani VL, Barardi CRM, Simões CM. (2004) Evaluation of the antihyperthermic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phytotherapy Research*, **18**, 819-823; (j) Sabini MC, Escobar FM, Tonn CE, Zanon SM, Contigiani MS, Sabini LI. (2010) Evaluation of antiviral activity of aqueous extracts from *Achyrocline satureioides* against *Western equine encephalitis virus*. *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2010.490216; (k) Morquio A, Rivera-Megret F, Dajas F. (2005) Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* ('Marcela'). *Phytotherapy Research*, **19**, 486-90.

[4] Calixto JB. (2000) Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **33**, 179-189.

[5] (a) Fiskesjö G. (1994) *Allium* test II: Assessment of a chemical genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cells divisions in root tips of *Allium cepa*. *Environmental Toxicology and Water Quality*, **9**, 235-241; (b) Bidau CJ, Amat AG, Yajia M, Marti D, Riglos GA, Silvestroni A. (2004) Evaluation of the genotoxicity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) using *Allium* Test. *Cytologia*, **69**, 109-117.

[6] Rani G, Kaur K, Wadhwa R, Kaul SC, Nagpal A. (2005) Evaluation of the anti-genotoxicity of leaf extract of Ashwagandha. *Food and Chemical Toxicology*, **43**, 95-98.

[7] (a) Fiskesjö G. (1985) The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, **102**, 99-112; (b) Fiskesjö G, Levan A. (1993) Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium* test. *ATLA*, **21**, 139-149; (c) Fiskesjö G. (1997) *Allium* test for screening chemicals: evaluation of cytological parameters. *Plants for Environmental Studies*. CRC, Lewis Publishers, New York, pp. 307-333.

[8] Grant WF. (1982) Chromosome aberrations assays in allium report of the USEPA gene tox program. *Mutation Research*, **99**, 273-291.

[9] Bakare AA, Mosuro AA, Osibanjo O. (2000) Effect of simulated leachate on chromosomes and mitosis in roots of *Allium cepa* (L). *Journal of Environmental Biology*, **21**, 263-271.



71342

U.N.R.C.  
Biblioteca Central



71342