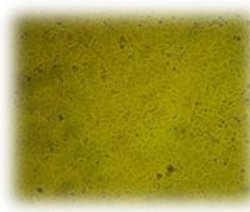




UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES



*Baccharis articulata: Acción biológica del
extracto acuoso caliente en células Vero y sobre
el virus Herpes suis*

Verónica Paola BALVERDI

Directora

Dra. Silvia M. ZANON

Co-Directora

Dra. Cristina V. TORRES

Río Cuarto – 2014

Este Trabajo Final fue realizado en el área de Virología del
Departamento de Microbiología e Inmunología de la
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Para obtener el título de:
MICROBIÓLOGA

.....
Verónica Paola Balverdi

TEMA:

*“Baccharis articulata: Acción biológica del extracto acuoso caliente
en células Vero y sobre el virus Herpes suis”*

.....
Directora: Dra. Silvia M. Zanon

.....
Co-Directora: Dra. Cristina V. Torres

.....
Dra. Silvia M. Zanon

.....
Dra. Susana Bettera

.....
Dra. Claudia Raspanti

Agradecimientos

A Dios, por bendecirme con el milagro de la vida, por nutrirla de bellas personas y por guiar mis pasos cada día.

A mis padres Olga y José, por todo el amor brindado y apoyo incondicional a lo largo de estos años.

A mi hermana Luciana, mi inseparable compañera, por estar a mi lado en cada momento y llenarme de felicidad.

A mi gran amiga Mariana, por ser parte de mi vida y por estar presente en cada etapa culminada.

A mis amigas, Microbiólogas, Adriana y Aldana, me considero afortunada por haber compartido los últimos años de la carrera con ustedes. Gracias por regalarme cada momento y hacerlo único.

A Jenny, por ayudarme desde un comienzo con este Trabajo Final, por aconsejarme y por sus palabras llenas de cariño.

A Silvia, por aceptar dirigirme y por su predisposición para llevar a cabo este Trabajo Final.

A mis compañeros del laboratorio de Virología, Liliana, Sonia, Franco, Carola y Noelia, por su compañerismo y ayuda.

A los jurados, por aportar su experiencia y permitir la finalización de esta Tesina.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por brindarme la posibilidad de formarme intelectualmente y llevar a cabo mis estudios universitarios.



ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Plantas medicinales	1
1.1.1. Usos por el hombre	1
1.1.2. Principios Bioactivos	3
1.2. Situación legal de los fitomedicamentos	6
1.3. Flora medicinal argentina	7
1.3.1. Flora medicinal del sur de Córdoba	8
1.4. Familia Asteraceae	9
1.4.1. Género <i>Baccharis</i>	9
1.4.1.1. Clasificación taxonómica	11
1.4.2. Especie <i>Baccharis articulata</i> (Lamarck) Persoon	11
1.4.2.1. Descripción botánica	11
1.4.2.2. Usos tradicionales	12



1.5. Virus	13
1.5.1. Familia Herpesviridae	13
1.5.1.1. Subfamilias	15
1.5.1.2. <i>Alfaherpesvirinae</i>	16
1.5.1.2.1. Ciclo replicativo	16
1.5.1.2.2. Virus <i>Herpes suis</i> tipo 1 cepa RC/79	18
1.6. Terapia Antiviral	19
1.7. Planteamiento del problema	22
1.8. Hipótesis	23
2. OBJETIVO GENERAL	24
2.1. Objetivos específicos	24
3. MATERIALES	25
3.1. Soluciones	25
3.1.1. Solución de azul tripán al 0,5%	25
3.1.2. Solución balanceada de fosfatos (PBS)	25
3.1.3. Solución de bicarbonato de sodio al 5%	25
3.1.4. Solución de bicarbonato de sodio al 2,8%	25
3.1.5. Solución de cristal violeta	26
3.1.6. Solución desteñidora de Rojo Neutro	26
3.1.7. Solución de formol al 10 %	26
3.1.8. Solución de gentamicina	26
3.1.9. Solución de glutamina	26
3.1.10. Solución de metilcelulosa al 1,5 %	27
3.1.11. Solución de Rojo Neutro (RN) 1:1000	27



3.1.12. Solución de Rojo Neutro (RN): Solución de trabajo	27
3.1.13. Solución de tripsina + EDTA 2X	27
3.2. MEDIOS	28
3.2.1. Medio de Crecimiento para células (MC)	28
3.2.2. Medio de Mantenimiento para células (MM)	28
3.2.3. Medio para placas (MP)	28
3.2.4. Medio thioglicolato	28
3.3. Material biológico	29
3.3.1. Cultivos celulares	29
3.3.2. Virus	29
3.3.3. Material vegetal	29
4. MÉTODOS	30
4.1. Propagación y mantenimiento de la línea celular Vero	30
4.2. Amplificación y titulación del virus <i>Herpes suis tipo 1</i>	30
4.2.1. Amplificación de la suspensión viral	30
4.2.2. Cuantificación de la infectividad viral por recuento de placas de lisis	31
4.3. Preparación del extracto acuoso caliente de <i>Baccharis articulata</i>	32
4.4. Estudios de citotoxicidad del extracto vegetal	33
4.4.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC)	33
4.4.2. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC ₅₀) por captación de Rojo Neutro	34
4.4.3. Cálculo de la Concentración Citotóxica 50% (CC ₅₀)	36
4.5. Evaluación de la actividad antiviral del EAC durante la etapa de adsorción y/o penetración viral	36
4.5.1. Determinación por reducción del número de placas de lisis	36



4.5.2. Determinación por reducción de la producción viral	37
4.5.3. Cálculo de la Concentración Efectiva 50% (CE ₅₀)	39
4.5.4. Cálculo del Índice de Selectividad	39
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
5.1. Propagación y mantenimiento de la línea celular Vero	40
5.2. Amplificación y titulación de la suspensión del virus <i>Herpes suis tipo 1</i>	41
5.2.1. Amplificación de la suspensión viral	41
5.2.2. Cuantificación de la infectividad viral por recuento de placas de lisis	42
5.3. Preparación del extracto acuoso caliente de <i>Baccharis articulata</i>	43
5.4. Estudios de citotoxicidad del extracto vegetal	44
5.4.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC)	44
5.4.2. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC ₅₀) por captación de Rojo Neutro	47
5.4.2.1. Cálculo de la Concentración Citotóxica 50% (CC ₅₀)	48
5.5. Evaluación de la actividad antiviral del EAC durante la etapa de adsorción y/o penetración viral	50
5.5.1. Determinación por reducción del número de placas de lisis	50
5.5.2. Determinación por reducción de la producción viral	52
5.5.3. Determinación de la Concentración Efectiva 50% (CE ₅₀)	56
5.5.4. Cálculo del Índice de Selectividad	58
6. CONCLUSIONES	59
7. BIBLIOGRAFÍA	60



TABLAS

Tabla 1: Compuestos activos extraídos de plantas medicinales con distintos solventes	5
Tabla 2: Actividades biológicas probadas de algunas especies del género <i>Baccharis</i>	10
Tabla 3: Características biológicas de los Herpesvirus	16
Tabla 4: Antivirales de uso clínico	20
Tabla 5: Efecto tóxico de EAC de <i>Baccharis articulata</i> sobre células Vero	45
Tabla 6: Viabilidad porcentual de células Vero tratadas con distintas concentraciones de EAC de <i>Baccharis articulata</i> , determinada por captación de RN	48
Tabla 7: Porcentajes de inhibición del virus <i>Herpes suis tipo 1</i> a diferentes concentraciones del EAC de <i>B. articulata</i> , durante la adsorción y /o penetración	51
Tabla 8: Porcentajes de inhibición del rendimiento de <i>Herpes suis tipo 1</i> a diferentes moi por el EAC de <i>B. articulata</i>	53
Tabla 9: Acción inhibitoria del EAC (700 µg/ml) de <i>B. articulata</i> sobre el virus <i>H. suis</i> (distintas moi) determinada por diferentes metodologías	55



FIGURAS

Figura 1: Papiro quirúrgico Edwin Smith	2
Figura 2: Mapa fitogeográfico de la República Argentina	8
Figura 3: Paisaje característico de las sierras del sur de Córdoba	9
Figura 4: Especie vegetal <i>Baccharis articulata</i> en las sierras del sur de Córdoba (Alpa Corral)	12
Figura 5: Partícula viral perteneciente a la familia Herpesviridae	15
Figura 6: Imagen del ciclo replicativo de la Familia Herpesviridae	18
Figura 7: Aspecto morfológico normal de un cultivo confluyente de células Vero	40
Figura 8: Células Vero infectadas con virus <i>Herpes suis tipo 1</i> cepa RC/79	41
Figura 9: Placas de lisis producidas por <i>Herpes suis tipo 1</i> en células Vero	42
Figura 10: Morfología de cultivos celulares Vero tratados por 72 h con concentraciones de EAC de <i>Baccharis articulata</i>	45
Figura 11: Actividad antiviral de EAC de <i>Baccharis articulata</i> frente al virus <i>Herpes suis tipo 1</i> , determinada por reducción del número de placas de lisis en células Vero	50
Figura 12: Inhibición de la producción viral del EAC de <i>B. articulata</i> (550 µg/ml) frente al virus <i>Herpes suis tipo 1</i> (moi de 0,01), determinada por reducción de la producción viral	55



DIAGRAMAS

Diagrama 1: Titulación del virus <i>Herpes suis</i> por recuento de placas de lisis	31
Diagrama 2: Obtención de EAC de <i>Baccharis articulata</i>	33
Diagrama 3: Determinación de MCNC y Viabilidad celular por captación de RN de EAC	35
Diagrama 4: Actividad antiviral por reducción del número de placa de lisis	37
Diagrama 5: Reducción de la producción viral durante la adsorción y/o penetración viral por el EAC	38



GRÁFICOS

Gráfico 1: Citotoxicidad porcentual de EAC de <i>B. articulata</i> por RN	49
Gráfico 2: Porcentaje de inhibición del rendimiento del virus <i>Herpes suis tipo 1</i> tratado con el EAC de <i>B. articulata</i>	53
Gráfico 3: Concentración Efectiva 50% de EAC de <i>B. articulata</i> frente al virus <i>H. suis tipo 1</i>	56



ABREVIATURAS

‰: Porcentaje

μ: Micra

μg: Microgramo

μl: Microlitro

a.C.: Antes de Cristo

atm: Atmósfera

ABAC: Asociación Banco Argentino de Células

ADN: Acido desoxirribonucleico

ANMAT: Administracion Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica

c.s.p.: Cantidad suficiente para

CC₅₀: Concentración Citotóxica 50

CE₅₀: Concentración Efectiva 50

DICC₅₀/ml: Dosis Infectiva Cultivo Celular 50% por ml

DO: Densidad óptica

DS: Desviación estándar

ECP: Efecto Citopático

EAC: Extracto acuoso obtenido en caliente

EAF: Extracto acuoso obtenido en frío

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

FS: Fracción De Supervivencia

g: Gramo

h: Hora



INAME: Instituto Nacional de Medicamentos

IS: Índice de Selectividad

mARN: Ácido ribonucleico mensajero

mg: Miligramo

min: Minutos

ml: Mililitro

moi: Multiplicidad de Infección

MC: Medio de crecimiento

MCNC: Máxima Concentración No Citotóxica

MEM: Medio Esencial Mínimo de Eagle

MM: Medio de mantenimiento

MP: Medio para Placa

nm: Nanómetro

Nº: Número

°C: Grado centígrado

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Solución balanceada de fosfatos

rpm: Revoluciones por minutos

RCV: Río Cuarto Vasculares

RN: Rojo Neutro

SFB: Suero fetal bovino

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

UFP: Unidades Formadoras de Placas

vs: Versus



VHH-1: Herpes simplex-1

VHH-2: Herpes simplex-2

VHH-3: Varicela-zoster

VHH-5: Citomegalovirus

VHH-6: Herpes humano-6

VHH-7: Herpes humano-7

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

VP-16: Proteína Viral 16

WHA: Asamblea Mundial de la Salud



RESUMEN

La forma más efectiva de combatir las enfermedades virales es mediante la prevención por la aplicación de vacunas, tal como ha ocurrido con la viruela, la poliomielitis, el sarampión, entre otras. Sin embargo, para las virosis de importancia sanitaria, como las producidas por los herpesvirus, no existen vacunas efectivas debido a que estos son capaces de inducir infecciones latentes que les permiten escapar de los principales efectores de la respuesta inmunológica. En estos casos, la única forma de enfrentar la enfermedad es mediante la aplicación de quimioterápicos antivirales. Los antivirales deben caracterizarse por ser activos frente al virus patógeno y no ejercer toxicidad sobre el huésped tratado. Si bien se disponen de compuestos sintéticos antiherpéticos, su elevada toxicidad y el desarrollo de resistencia han limitado su eficacia. Por este motivo existe una fuerte tendencia a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos de origen natural, especialmente aquellos provenientes de plantas. *Baccharis articulata* es una especie característica y abundante en las sierras de Córdoba, reconocida por sus importantes propiedades terapéuticas y utilizada en la medicina folklórica para la cura de diversas dolencias, por lo que resulta de gran interés investigar su potencial actividad antiviral contra los herpesvirus.

Este Trabajo Final tuvo como objetivo demostrar que el extracto acuoso caliente (EAC) de *B. articulata* inhibe la replicación del virus *Herpes suis tipo 1* durante las primeras etapas de la infección a concentraciones no citotóxicas y determinar su índice de selectividad en células Vero. Se evaluó su citotoxicidad sobre el cultivo celular Vero y se determinó la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC) que fue de 600 µg/ml; y por la técnica de captación del Rojo Neutro se calculó la Concentración Citotóxica 50% (CC₅₀) que correspondió a 718 µg/ml. Se analizó la capacidad antiviral del EAC a concentraciones no citotóxicas durante la etapa de adsorción y/o penetración viral, mediante la reducción del número de placas de lisis y de la producción viral. El grado de inhibición viral ejercida por el EAC fue dependiente de la metodología y de la concentración de virus empleadas. Por reducción de placas de lisis se calculó la Concentración Efectiva 50% (CE₅₀) cuyo valor fue de 445 µg/ml. Los valores de CC₅₀ y de CE₅₀ permitieron calcular el índice de selectividad (CC₅₀ / CE₅₀ = 1,61) indicando que el EAC de *B. articulata* es terapéuticamente eficaz.

Estos resultados permitieron demostrar la potencial actividad fitoterápica antiherpética del EAC de *B. articulata*.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Plantas medicinales

1.1.1. Usos por el hombre

El hombre ha hecho uso de los productos de la naturaleza desde tiempos inmemorables no sólo para satisfacer su apetito sino también con el fin de sanar sus enfermedades, cicatrizar sus heridas y elevar su estado de ánimo. En Irak se han encontrado restos arqueológicos de 60.000 años de antigüedad que evidencian que el hombre de Neandertal ya utilizaba plantas curativas como el malvavisco (*Althaea officinalis*, Malvaceae), la milenrama (*Achillea millefolium*, Asteraceae) y el senecio (*Senecio*, Asteraceae).

Aunque el uso de las hierbas con fines terapéuticos estaba asociado a ritos mágicos-religiosos y su carácter curativo era atribuido a las fuerzas divinas, cabe resaltar que el manejo estaba basado en un buen conocimiento de la planta, adquirido empíricamente y transferido, antes del nacimiento de la escritura, oralmente de padres a hijos a través de las generaciones hasta ser immortalizados en poemas sagrados, [Sagrera Ferrandiz, J., 1.993; Mangiaterra, P., 2.005].

El primer documento escrito de la historia de la humanidad con una antigüedad de más de 6.000 años, incluye ya descripciones de algunas hierbas medicinales. Los sumerios, pueblo que vivía al sur de los ríos Éufrates y Tigris (actual Irak), también mencionan 2.500 años a.C. diversas drogas vegetales, [Sagrera Ferrandiz, J., 1.993].

Las culturas asiáticas han manifestado desde sus inicios un gran interés por la fitoterapia (curación por plantas), dejando así inestimables escritos. Al emperador y médico chino Shen Nung pertenece el herbario más antiguamente conocido (año 3.000 a.C.). En él se recopila y describe más de 1.000 plantas medicinales, y se propone una forma más natural de vida, [Sagrera Ferrandiz, J., 1.993; Mangiaterra, P., 2.005].

La antigua civilización egipcia presentó gran interés por desarrollar y transmitir las virtudes curativas del mundo vegetal, ciencia que ha sido dada a conocer gracias a los papiros hieráticos. El más valioso de ellos es el de Smith (primera mitad del siglo XVII a.C.), copia de otro más antiguo (2.980-2.700 a.C.), denominado papiro quirúrgico Edwin Smith (**Figura 1**), [Mangiaterra, P., 2.005]. En los conservados documentos de los originarios mesopotámicos pueden detallarse más de 250 especies diferentes de hierbas medicinales, entre las que se encuentran azafrán (*Crocus sativus*, Liliaceae),

tomillo (*Thymus vulgaris*, Lamiaceae), ajo (*Allium sativum*, Liliaceae) y cebolla (*Allium cepa*, Liliaceae). Por otro lado, un papiro egipcio (1.500 años a.C.) describe las propiedades y aplicaciones terapéuticas de 700 plantas medicinales.



Figura 1: Papiro quirúrgico Edwin Smith. Extraído de <http://melysalazarg.blogspot.com.ar/2011/12/historia-del-uso-de-plantas-medicinales.html>.

Los griegos y posteriormente el Imperio Romano fueron los encargados de llevar el conocimiento egipcio a un nivel superior haciendo uso de las plantas para curar enfermedades y mantener un buen estado de salud. Las obras del físico griego Hipócrates (460-337 años a.C.), conocido universalmente como el padre de la medicina moderna, resultaron de fundamental importancia en el desarrollo de los conocimientos sobre las hierbas medicinales ya que las propiedades curativas de las mismas no estaban asociadas a ningún tipo de magia o superstición.

El médico Dioscórides (40-90 años a.C.) describió más de 500 fórmulas de origen vegetal que sentaron las bases para los grandes herbarios europeos en los subsiguientes siglos.

Aunque la Edad Media no fue una época de desarrollo científico vertiginoso, la cultura adquirida en los milenios anteriores logró perpetuarse gracias a la existencia de los monasterios. En ellos, los monjes, con sus conocimientos de latín y griego, se ocuparon de conservar el saber antiguo transcribiendo las clásicas obras. También crearon los primeros jardines de hierbas medicinales donde se cultivaban tanto las plantas de la región como las traídas por los peregrinos de lugares lejanos.

Con el Renacimiento, el incremento por el interés en lo empírico y el auge de los grandes viajes dió un nuevo impulso a la fitoterapia. Desde otros continentes llegaron a Europa nuevas y desconocidas plantas, [Sagrera Ferrandiz, J., 1.993].



Los pueblos nativos de América poseían un gran conocimiento de las plantas medicinales para tratar diversas dolencias, siendo principalmente los chamanes quienes dominaban dicho saber, que unidos a las prácticas de magia, los utilizaban para sanar enfermedades. Este aporte a la fitoterapia fue muy importante, particularmente la de América del Sur. Muchas plantas que han sido usadas como venenos tal es el caso de la tubocarina, con acción miorelajante, tienen importancia en la medicina moderna. En las cuevas de Perú se hallaron sacos de coca con una antigüedad de 5.000 años. Este vegetal no sólo era utilizado por sus propiedades anoréxicas y estimulantes sino que tenía también una aplicación medicinal. Sin embargo, la contribución peruana más significativa en este campo ha sido la quina, de la cual se extrae la quinina, febrífugo utilizado contra la fiebre de la malaria.

Hasta el siglo XVIII se habían determinado las propiedades curativas de las plantas, su efecto sobre el organismo y su modo de aplicación, pero aún se desconocían sus principios activos.

Es así como la etnofarmacología pudo nutrirse de todo el saber de los pueblos autóctonos acerca de la utilización de productos vegetales con el fin de prevenir, atenuar o curar un estado patológico, [Cañigueral y Vila, 1.998; Cañigueral y Vila, 2.001].

El hecho que muchas sustancias pudieron ser producidas artificialmente en el laboratorio proporcionó un desinterés, cada vez mayor, hacia el organismo vegetal del cual procedía. Sin embargo, los efectos secundarios provocados por muchas de estas sustancias, a veces peores que el mal que se combatía (como la Talidomida), condujo a la búsqueda de compuestos a partir de la medicina natural, ya que ésta será siempre mejor tolerada por el organismo, [Sagrera Ferrandiz, J., 1.993].

1.1.2. Principios Bioactivos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la medicina tradicional como las prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades, [Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2.002-2.005].



Por tradición popular y/o por investigación científica, se considera planta medicinal a aquella especie vegetal reconocida por sus valores terapéuticos, en la que toda o una parte de la misma está dotada de actividad farmacológica. Dichas plantas se utilizan usualmente como infusiones, decocciones, extractos fluidos o secos, jarabes, cápsulas, comprimidos, [Núñez y Cantero, 2.000].

Las plantas pueden ser consideradas como un laboratorio biosintético ya que a través de su metabolismo primario elaboran compuestos como hidratos de carbono, proteínas, grasas y además sintetizan una gran cantidad de sustancias químicas, producto de su metabolismo secundario, como alcaloides, terpenoides y polifenoles que ejercen efectos fisiológicos. Estos derivados metabólicos, generalmente responsables de las acciones y efectos farmacológicos que poseen las drogas vegetales, se conocen como constituyentes o principios activos, [Ratera y Ratera, 1.980; Mangiaterra, P., 2.005].

Entre los fitoquímicos bioactivos, además de los citados anteriormente, se encuentran quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, cumarinas, aceites esenciales, taninos, saponinas, lectinas, lignanos, polipéptidos y glucósidos, [Jassim and Naji, 2.003; Vicent Martínez C., 2.003]. Estos compuestos se pueden hallar en toda la planta, sólo en una parte como en hojas, semillas, flores y frutos o, en la parte aérea del vegetal. La producción de estos metabolitos puede variar en función de múltiples factores tales como época del año, características fisicoquímicas del suelo, temperatura y humedad, [Ratera y Ratera, 1.980; Cowan, M., 1.999].

Para la obtención de los principios activos se emplean solventes con diferentes grados de polaridad tales como agua, alcoholes y cloroformo. La **Tabla 1** resume diferentes metodologías para la extracción de diversos componentes químicos, [Cowan, M., 1.999].



Tabla 1: Compuestos activos extraídos de plantas medicinales con distintos solventes.

Agua	Etanol	Metanol	Cloroformo	Diclorometano	Éter	Acetona
Antocianina	Tanino	Antocianina	Terpenoide	Terpenoide	Alcaloide	Flavonol
Almidón	Polifenol	Terpenoide	Flavonoide		Terpenoide	
Saponina	Flavonol	Saponina			Cumarina	
Terpenoide	Terpenoide	Tanino			Ácidos	
Polipéptido	Esterol	Xantoxilina			grasos	
Lectina	Alcaloide	Totarol				
	Propolis	Quasinoide				
		Lactona				
		Flavona				
		Fenona				
		Polifenol				

Los fitomedicamentos, al conservar varios principios activos exhiben la propiedad de efectuar su acción farmacológica en múltiples sitios. Esta propiedad pleiotrópica es comúnmente observada en los medicamentos a base de plantas por la presencia de variados compuestos químicos naturales que pueden desarrollar funciones múltiples las que muchas veces están asociadas a acciones sinérgicas o antagónicas, [Morales Segura y Morales Montecinos, 2.009].

El avance de la ciencia, en especial la Biotecnología y la Bioquímica Molecular, ha permitido conocer más acerca de los principios activos de las plantas medicinales y su actividad en el organismo. Por ello, se ha logrado autorizar el uso de las diversas especies vegetales, [Alonso, J., 2.002].

Por otro lado, es imprescindible recordar que una planta benéfica puede resultar ser tóxica o perjudicial si se la aplica en dosis excesivas. Como consecuencia se recomienda emplearlas con suma prudencia ya que algunas, como el paico (*Chenopodium ambrosioides*) y yerba de pollo (*Alternanthera pungens*), pueden provocar graves trastornos, especialmente en niños, [Ratera y Ratera, 1.980].



1.2. Situación legal de los fitomedicamentos

Entre el año 2.002 y 2.005, la OMS elabora una guía para la formulación de estrategias para la medicina tradicional. El principal objetivo es el reconocimiento de la misma como parte integral de los sistemas de salud de cada país. Dicha publicación destaca el importante papel que tienen las hierbas en los trastornos que afectan a gran parte de la humanidad, tales como trastornos gastrointestinales, infecciones urinarias, patologías respiratorias y enfermedades dermatológicas.

Actualmente, dicha organización estima que sólo alrededor del 20% de la población mundial accede a los medicamentos procedentes de la industria farmacéutica moderna, mientras que el 80% restante hace uso de la medicina alternativa herbolaria para la preservación de la salud, [*Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2.002-2.005; Cazes Camarero, P., 2.003; Mangiaterra, P., 2.005; Morales Segura y Morales Montecinos, 2.009*]. Esta situación cobra relevancia en los países en vía de desarrollo donde la mayor parte de la población depende de la medicina folklórica.

En países industrializados, en las últimas décadas, el interés por las terapias naturales ha aumentado enormemente ya que el 25% de las drogas médicas, están basadas en la flora medicinal.

En nuestro país, la utilización de plantas medicinales y medicamentos herbarios es cada vez mayor. Estos medicamentos no sólo están destinados a la atención primaria de la salud sino también que reemplazan a los preparados convencionales, existiendo en la actualidad una demanda creciente de ellos.

Si bien los avances en el ámbito bioquímico facilitan el diseño de drogas sintéticas específicas, la probabilidad de obtener un compuesto efectivo a partir de fuentes naturales es mayor que la creación de uno completamente nuevo, [*Nuñez y Cantero, 2.000; Mangiaterra, P., 2.005*].

Los remedios a base de plantas tienen un menor costo de desarrollo que los fármacos de síntesis, además presentan un amplio rango terapéutico y tienen una baja toxicidad, características que los hacen más seguros, [*Morales Segura y Morales Montecinos, 2.009*].

La disposición 2.673/99 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) establece que los medicamentos utilizados en fitoterapia deben ajustarse a los actuales requerimientos de seguridad, eficacia y calidad. Es así como la OMS, de acuerdo a la resolución 4.243/89 de la Asamblea



Mundial de la Salud (WHA), lleva a cabo un listado de especies de plantas a ser incorporadas en las farmacopeas nacionales, las cuales se ajustan a los requisitos mencionados anteriormente por tratarse de productos para la salud humana.

Muchas de las drogas vegetales internacionalmente reconocidas y utilizadas como materia prima de medicamentos (manzanilla, pasiflora, hipérico, ginseng, ginkgo) ya tienen su incorporación en las farmacopeas internacionales, con normas que definen su identidad y calidad.

En el año 1.998 el Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación dió a conocer la resolución 144/98 en la que establece el marco legal necesario para la reglamentación de los medicamentos fitoterápicos. Dicha resolución fue pautaada por la ANMAT en las disposiciones 2.671, 2.672 y 2.673/99 teniendo en cuenta las recomendaciones de la OMS respecto al control de calidad y buenas prácticas de manufactura. Esto implica que como todo medicamento, los preparados fitoterápicos actualmente en nuestro país están regulados y controlados por el Instituto Nacional de Medicamentos (INAME), [*Mangiaterra, P.; 2.005; Alonso y Desmarchelier, 2.006*].

1.3. Flora medicinal argentina

El reino vegetal constituye una de las principales fuentes potenciales de compuestos útiles. Existen más de 250.000 especies de plantas superiores pero sólo una pequeña parte de ellas ha sido calificada y estudiada, [*Cazes Camarero, P., 2.003*].

Argentina es un país muy extenso y abarca gran variedad de climas, desde el cálido tropical hasta el frío polar, favoreciendo la existencia de una gran diversidad de especies vegetales. Algunas son muy exigentes en ciertos factores ambientales (suelo, precipitaciones, temperatura, radiación solar) y se desarrollan en lugares reducidos, en tanto que otras, más adaptables, prosperan en amplias áreas, [*Ratera y Ratera, 1.980*].

En la **Figura 2** se exhiben las distintas regiones fitogeográficas presentes en el territorio argentino.



Figura 2: Mapa fitogeográfico de la República Argentina. Extraída de www.geoantar.com.ar.

1.3.1. Flora medicinal del sur de Córdoba

La región sur de la provincia de Córdoba se caracteriza por poseer una variada y abundante flora autóctona, favorecida por el clima de la zona, (**Figura 3**).

Existen en ella alrededor de 400 especies (aproximadamente el 75% son nativas), muchas de las cuales presentan actividad farmacológica potencial y con uso comprobado en la región; las familias *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Verbenaceae* y *Solanaceae* constituyen el 43% de la flora medicinal nativa del sur de la provincia y el 42% de la flora medicinal argentina.

La industria alimenticia, farmacéutica y cosmética utilizan muchas de estas hierbas, como lo son el tomillo (*Hedeoma multiflora*), la peperina (*Minthostachys verticillata*), el poleo (*Lippia turbinata*) y la carqueja



(*Baccharis articulata*) para la elaboración de jugos, amargos y yerbas compuestas, [Nuñez y Cantero, 2.000].



Figura 3: Paisaje característico de las sierras del sur de Córdoba.

1.4. Familia Asteraceae

La familia Asteraceae (Compositae) reúne más de 23.000 especies por lo que es la familia de Angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica. Sus miembros se distribuyen desde las regiones polares hasta los trópicos, abarcando todos los hábitats disponibles, desde los desiertos secos hasta los pantanos y desde las selvas hasta los picos montañosos.

1.4.1. Género *Baccharis*

El género *Baccharis*, miembro de la familia Asteraceae, debe su nombre al Dios Bacchus=Baco, Dios romano del vino y de las vendimias haciendo referencia a las especias de sus raíces que en la antigüedad se consumían como postres acompañados de vino, por ello la vinculación con esta deidad pagana.

Su distribución es exclusivamente americana, desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el extremo austral de Argentina y Chile, [Cazes Camarero, P., 2.003; Mangiaterra, P., 2.005].

Las actividades biológicas descriptas para especies de este género se muestran en la **Tabla 2**.



Tabla 2: Actividades biológicas probadas de algunas especies del género *Baccharis*.

Especie	Propiedades biológicas
<i>Baccharis articulata</i>	Digestiva, protectora hepática [Palacios y col., 1.999], antiviral [Zanon et al., 1.999], antioxidante [De Oliveira et al., 2.003; Freire et al., 2.007], antifúngica [Vivot Lupi y col., 2.009] y antiproliferativa sobre células de linfoma [www.homeopatia.com.mx/ congreso26]
<i>Baccharis boliviensis</i>	Antibacteriano y alelopático [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis conferta</i>	Espasmolítico y antibacteriano [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis coridifolia</i>	Antiviral y antioxidante [Mongelli et al., 1.997], citotóxica e insecticida [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis crispa</i>	Antibiótico, antimicrobiano y antioxidante [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis genistelloides</i>	Antiviral [Abad et al., 1.999; Freire et al., 2.007], antiartrítico, hipoglicémico, hipotriglicéridémico [Coelho et al., 2.004] y gastroprotector [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis grisebachii</i>	Antioxidante [Tapia et al., 2.004] y antimicrobiano [Freire et al., 2.007; Hadad et al., 2.007]
<i>Baccharis heterophylla</i>	Antimicrobiano y espasmolítico [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis megapotamica</i>	Antileucémico, antibiótico, antiinflamatorio y analgésico [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis nítida</i>	Antibacteriano [Rangel y col., 2.001]
<i>Baccharis notoserghila</i>	Antibiótico [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis pedunculata</i>	Antifúngico [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis pentlandii</i>	Gastroprotector y antiviral [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis serrifolia</i>	Antiespasmódico [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis teindalensis</i>	Antiviral, antiúlceras y antidiarreico [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis tola</i>	Antibacteriano y antiinflamatorio [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis trimera</i>	Vasodilatador muscular, antimutagénico y hepatoprotector [Freire et al., 2.007]
<i>Baccharis trinervis</i>	Antiviral [Abad et al., 1.999; Sánchez Palomino et al., 2.002; Freire et al., 2.007], antifúngico [Marín Ocampo y col., 2.006], antiinflamatorio y antioxidante [Freire et al., 2.007]



En América del Sur existen unas 400 especies de *Baccharis* autóctonas pero no todas conocidas como “carquejas”. Las “carquejas” crecen sobre terrenos altos, suelos rocosos, praderas, bordes de caminos y en campos arenosos del sur de Brasil, Paraguay, Bolivia, Perú, Uruguay y Argentina. En Argentina tres especies del género *Baccharis* se conocen vulgarmente con el nombre de “carqueja” y son *B. articulata*, *B. crispa* y *B. trimera*.

Las especies *B. articulata* y *B. crispa* están incluidas en la Farmacopea Nacional Argentina desde 1.966, bajo el nombre de “carqueja”. Estas dos especies pueden diferenciarse macroscópicamente por la cantidad de alas de sus tallos. La primera posee tallos con dos alas estrechas y largas mientras que la segunda presenta tallos con tres alas más anchas. De esta manera el tallo bialado o trialado es un carácter anatómico diagnóstico entre las dos especies conocidas como “carqueja”, [Mangiaterra, P., 2.005; Alonso y Desmarchelier, 2.006].

1.4.1.1. Clasificación taxonómica

El género *Baccharis* se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera, [<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/1226/1/T-ESPE-025146.pdf>]:

- **Reino:** *Plantae*
- **División:** *Magnoliophyta*
- **Clase:** *Magnoliopsida*
- **Orden:** *Asterales*
- **Familia:** *Asteraceae*
- **Subfamilia:** *Asteroideae*
- **Tribu:** *Astereae*
- **Género:** *Baccharis*

1.4.2. Especie *Baccharis articulata* (Lamarck) Persoon

1.4.2.1. Descripción botánica

Arbusto perenne, dioico, de 0,5-1,5 metros de altura. Muy ramificado, glabro, tallos bialados y verdes con función fotosintética. Hojas reducidas a brácteas inconspicuas. Flores en capítulos pequeños, sésiles, en espigas laxas de los ápices de tallos.

Capítulos sésiles, solitarios o dispuestos en glomérulos de 2-6, ordenados en un racimo simple o en un racimo de espigas terminal. Flores numerosas de ápice desigualmente dentado, [Mangiaterra, P., 2.005; Alonso y Desmarchelier, 2.006].

Esta especie es una de los vegetales de mayor popularidad en la medicina tradicional de nuestro país y Sudamérica. Se la conoce también con el nombre de carquejilla, y en Paraguay como cola de yacaré y planta del yaguareté, nombres que provienen de la traducción del guaraní donde era conocida como yacaré tuguái y yagaraté-caá.

1.4.2.2. Usos tradicionales

Se le atribuyen principalmente propiedades colagogas, diuréticas, digestivas, hepatoprotectoras, tónicas, antihelmínticas, afrodisíacas y febrífugas y, es ingerida en forma de infusión o decocción. Además en forma de decocción se la suele usar como antidiarreica y para el tratamiento de infecciones respiratorias y urinarias. Externamente es empleada en úlceras y como antiséptico, en enfermedades de piel, lepra y reumatismo. Los campesinos de Argentina la usan para la impotencia masculina y la esterilidad femenina. A continuación se exhiben imágenes de esta especie vegetal crecida en la zona serrana cordobesa de Alpa Corral, (**Figura 4**), [Mangiaterra, P., 2.005; Alonso y Desmarchelier, 2.006].



Figura 4: Especie vegetal *Baccharis articulata* en las sierras del sur de Córdoba (Alpa Corral).



Desde hace más de 50 años se comercializa en Argentina y Brasil una gran cantidad de productos farmacéuticos conteniendo esta especie herbácea como materia prima ya sea en forma simple o combinada con otras especies vegetales.

La importancia de esta droga vegetal en el mercado farmacéutico se encuentra reflejada en la gran cantidad de productos que se comercializan actualmente en Argentina, como lo son Cachamai Colagoga y Cachamai Diurética (Laboratorio Cachamai S.A.C.I.F.I.) y Carqueja Trop (Laboratorio Byk), entre otros.

1.5. Virus

Este término proviene del latín y significa veneno. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza afectando a los organismos del reino animal, vegetal, protistas y hongos.

Son definidos como agentes infecciosos responsables de severas enfermedades producidas en el hombre y/o animales. Ocasionan graves problemas de salud pública y cuantiosas pérdidas económicas cuando afectan al ganado o a las plantas que se utilizan como alimento. La principal razón por la cual un virus causa daño se halla en su parasitismo intracelular obligado y su mayor peligrosidad está asociada a la capacidad de invadir y multiplicar en órganos vitales como el corazón, hígado o sistema nervioso central, [Basualdo y col.; 1.996].

1.5.1. Familia Herpesviridae

Los herpesvirus están ampliamente distribuidos en la naturaleza afectando a todos los miembros de la escala biológica y son importantes patógenos tanto en salud humana como animal, [Del Barrio Alonso y col., 2.008].

En el área veterinaria el estudio de ciertos herpesvirus ha provocado un marcado interés debido a las importantes pérdidas económicas que los mismos ocasionan, como es el caso del virus *Herpes bovino* y *Herpes suis*, [Ruíz y col., 2.008].

A nivel humano, estos agentes pueden producir desde infecciones subclínicas, afecciones relativamente leves hasta patologías graves y/o letales como la encefalitis, siendo relevantes en pacientes inmunodeprimidos como los trasplantados, antineoplásicos y los que padecen SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida), [Del Barrio Alonso y col., 2.008; Valdés y col.; 2.009].



Todos los miembros de esta familia viral, luego de una infección primaria en el huésped susceptible, establecen un estado de latencia en el organismo por lo que el virus permanece en el individuo durante toda su vida. En dicho período el ácido nucleico viral se encuentra, dentro del núcleo de la célula, circularizado o integrado al genoma celular y sólo algunos genes se expresan. Bajo ciertas circunstancias puede comenzar a replicarse nuevamente y causar una reactivación de la enfermedad, la cual está íntimamente relacionada con la depresión de la respuesta inmune del huésped, [Carballal y Oubiña, 1.998; Field and Whitley, 2.005].

Dentro de las características fisicoquímicas de la partícula viral y de su arquitectura, se pueden citar:

- Genoma constituido por ADN lineal de doble cadena, ovillado en una estructura proteica localizada en el centro de la nucleocápside. Codifica aproximadamente 70 proteínas.
- Cápside de simetría icosaédrica, formada por 162 capsómeros y con diámetro de 80-100 nm.
- Tegumento de naturaleza proteica, representado por una estructura de aspecto fibroso y distribución asimétrica, que conecta la cara externa de la cápside con la interna de la envoltura. En él se encuentran diferentes proteínas con funciones regulatorias tales como VP16, responsable de activar los primeros genes que se expresan en el ciclo de replicación viral.
- Envoltura de apariencia trilaminar e integrada por una bicapa de lípidos (proveniente de membrana de la célula huésped) y por proteínas transmembranas, ligadas covalentemente con hidratos de carbono constituyendo las espículas (o peplómeros).
- Diámetro total del virión de 180-200 nm.
- Inestabilidad relativa a temperatura ambiente y rápida inactivación por solventes de lípidos, [Carballal y Oubiña, 1.998].

A continuación se exhibe un esquema de la partícula viral (**Figura 5**).

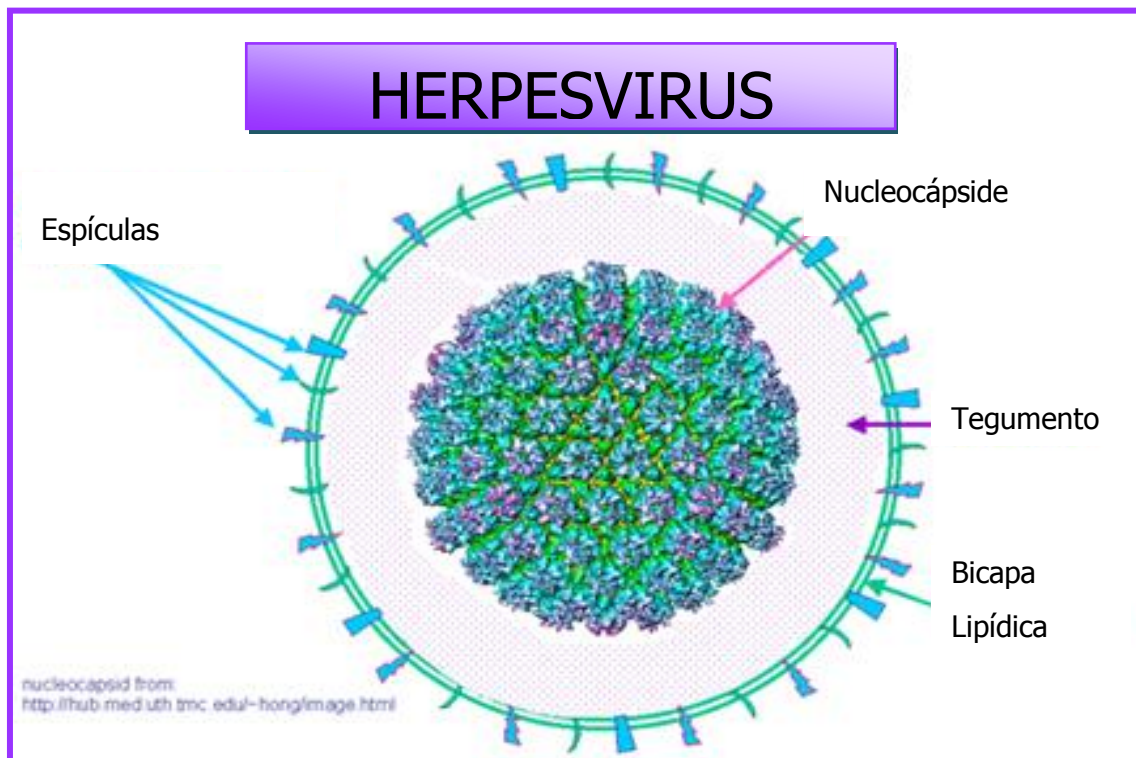


Figura 5: Partícula viral perteneciente a la familia Herpesviridae. Extraída de <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/dna15.jpg>.

1.5.1.1. Subfamilias

El Comité Internacional de Taxonomía Viral clasifica a los miembros de la familia Herpesviridae en tres subfamilias: *α-herpesvirinae*, *β-herpesvirinae* y *γ-herpesvirinae*. La **Tabla 3** presenta las características biológicas diferenciales de cada una de ellas, [Carballal y Oubiña, 1.998].



Tabla 3: Características biológicas de los Herpesvirus.

SUBFAMILIAS	CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	PATÓGENOS HUMANOS
<i>Alfaherpesvirinae</i>	Ciclo replicativo corto, crecimiento rápido en cultivo celular, eficiente destrucción de células infectadas. Células dianas: mucoepiteliales. Latencia en neuronas ganglionares.	<i>Herpes simplex-1 (VHH-1)</i> <i>Herpes simplex-2 (VHH-2)</i> <i>Varicela-zoster (VHH-3)</i> <i>Herpes suis tipo 1*</i>
<i>Betaherpesvirinae</i>	Ciclo replicativo prolongado, crecimiento lento en cultivo celular, agrandamiento en células infectadas. Células dianas: monocitos, linfocitos y epiteliales. Latencia en glándulas salivales y otros tejidos.	<i>Citomegalovirus (VHH-5)</i> <i>Herpes humano-6 (VHH-6)</i> <i>Herpes humano-7 (VHH-7)</i>
<i>Gammaherpesvirinae</i>	Todos replican “in vitro” en células linfoblásticas, algunos producen infección lítica en ciertos tipos de células epiteliales. Células dianas: linfocitos B y epiteliales. Latencia en tejido linfático.	<i>Epstein-Barr (VHH-4)</i> <i>Herpes humano-8 (VHH-8)</i>

*: Patógeno animal.

1.5.1.2. *Alfaherpesvirinae*

1.5.1.2.1. Ciclo replicativo

El ciclo de replicación de los virus de esta subfamilia demanda entre 18 y 24 horas e involucra diversos eventos que son comunes a todos los miembros de la familia. A continuación se detallan las etapas en las que se concreta la replicación viral, [Carballal y Oubiña, 1.998; Field and Whitley, 2.005].

- **Adsorción viral:** Interacción de las glicoproteínas víricas de la envoltura gC y gD con los receptores de superficie celular (heparán sulfato proteoglicano).
- **Penetración y desnudamiento:** La penetración se produce por endocitosis mediada por receptor o por fusión entre la envoltura viral y la membrana plasmática produciéndose así un desnudamiento parcial que se completa cuando a nivel de membrana nuclear el ADN pierde la cápside y penetra al núcleo. Inmediatamente el genoma viral se circulariza por sus extremos repetidos e invertidos.



- **Biosíntesis de macromoléculas:** Esta etapa comprende los eventos de transcripción, traducción de proteínas y replicación del genoma viral, los que se resumen de la siguiente manera:

- **Transcripción temprana inmediata (genes α) y síntesis de proteínas reguladoras:** la proteína VP16 activa la expresión de los genes α que se transcriben en RNAm tempranos inmediatos para ser traducidos a proteínas α a nivel de los polirribosomas citoplasmáticos.

- **Transcripción temprana tardía (genes β) y síntesis de proteínas principalmente enzimáticas involucradas en la replicación del genoma viral:** Las proteínas α activan los genes β que se transcriben en RNAm tempranos tardíos los cuales son traducidos a proteínas β . Dichas proteínas cumplen funciones enzimáticas tales como nucleasas, timidinquinasa, ADN polimerasa-ADN dependiente (replicasa). Además algunas de ellas son responsables de inactivar la expresión de los genes α .

- **Replicación del genoma viral:** La multiplicación del ácido nucleico viral se realiza por acción del complejo enzimático mencionado anteriormente.

- **Transcripción tardía (genes γ) y síntesis de proteínas estructurales:** Una vez producida la replicación genómica, se activan los genes γ responsables de la síntesis de los RNAm tardíos. La mayoría de estos mensajeros son traducidos a proteínas estructurales de cápside, de tegumento y glicoproteínas.

Armado y maduración: Preformada la cápside a nivel nuclear, el ADN viral penetra a la misma. Si bien la literatura cita la membrana interna nuclear como el lugar de gemación del virus, investigaciones recientes mencionan también al retículo endoplásmico y a otras estructuras membranosas como lugares de gemación para la adquisición de la envoltura, [Hunt, R.; *Microbiología e Inmunología on line*].

- **Liberación:** Este evento ocurre cuando la progenie viral sale al exterior de la célula por exocitosis o bien por disrupción de la membrana plasmática. Las células que sufren infección productiva, principalmente por los virus *Herpes simplex tipos 1 y 2*, concluyen con la lisis celular.

A continuación se muestra de manera esquemática el ciclo replicativo viral (**Figura 6**).

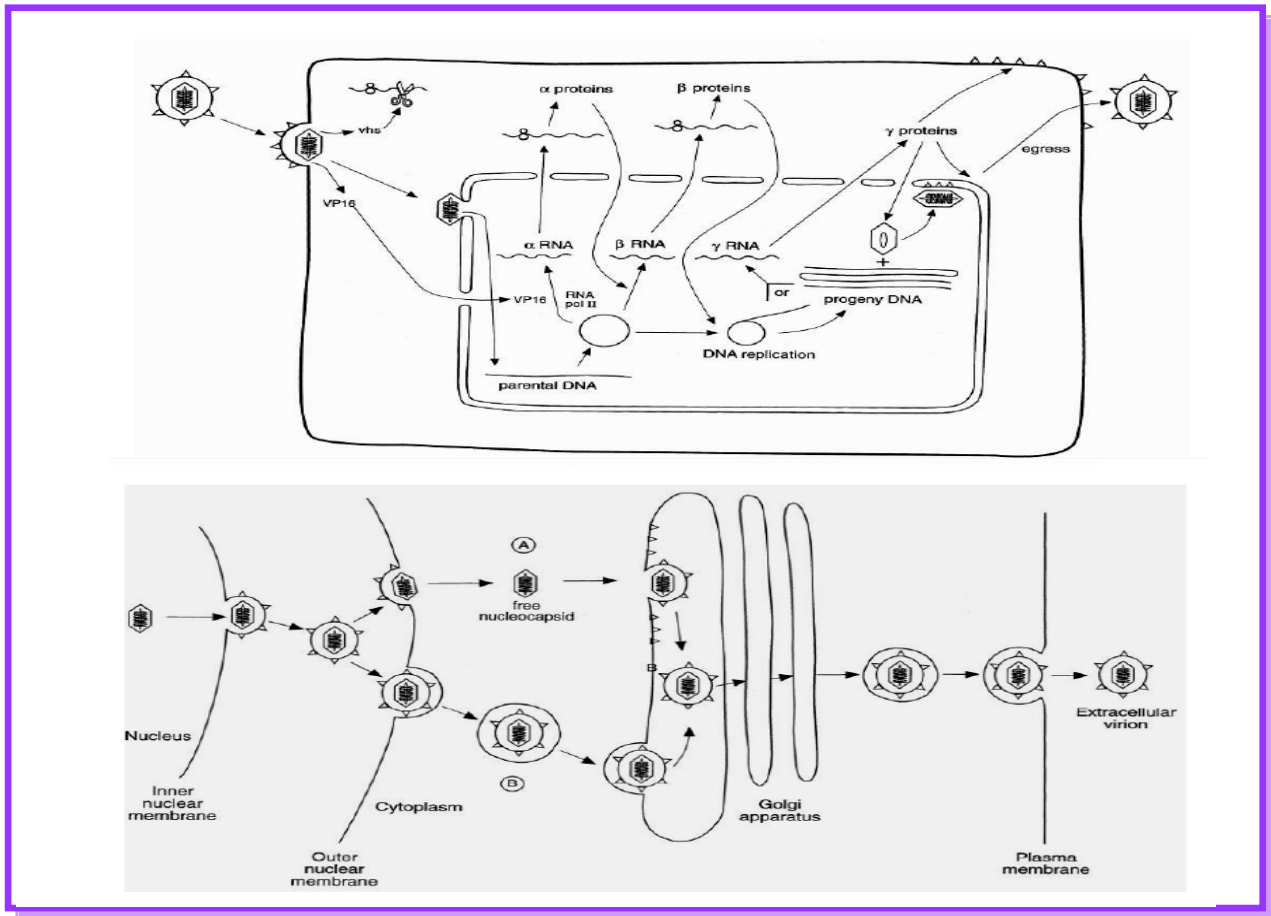


Figura 6: Imagen del ciclo replicativo de la Familia Herpesviridae. Extraída de <http://dc391.4shared.com/doc/NeleXVg0/preview007.png>

1.5.1.2.2. Virus *Herpes suis* tipo 1 cepa RC/79

Este virus es el agente causal de la enfermedad de Aujeszky en porcinos. La infección provoca distintos grados de severidad de acuerdo a la edad del animal infectado y la virulencia de la cepa viral. Fue detectado por primera vez en Hungría en 1.902 por Aladar Aujeszky quien dio nombre a la enfermedad. Produce encefalitis en lechones, abortos en cerdas preñadas y cuadros respiratorios en cerdos adultos y jóvenes detectándose en estos últimos el mayor índice de mortalidad. Otras especies animales tanto salvajes como domésticas (bovinos, ovinos, caprinos, caninos, felinos, ratas, ratones, conejos, venados y zorros) también pueden ser afectadas por este agente viral causando la muerte. Esta enfermedad también es conocida como pseudorrabia por su similitud con la rabia canina, por lo que este virus recibe además



el nombre de virus de la enfermedad de la Pseudorrabia, [Echeverría y Nosetto, 2.000].

La cepa empleada en este trabajo fue aislada en Río Cuarto en 1.979 en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo a partir de macerado de sistema nervioso central de cerdos afectados durante un brote epidémico, detectándose un título del orden de $10^{3.5}$ Dosis Infecciva Cultivo Celular 50% por ml (DICC₅₀/ml), [Ambrogi y col., 1.981].

1.6. Terapia Antiviral

La forma más efectiva de combatir las enfermedades virales es mediante la prevención por la aplicación de vacunas, tal como ha ocurrido con la viruela, la poliomielitis y el sarampión, entre otras. Sin embargo, para las virosis de importancia sanitaria, como las producidas por los herpesvirus, no existen vacunas efectivas debido a que estos son capaces de inducir infecciones latentes que les permiten escapar de los principales efectores de la respuesta inmunológica. En estos casos, la única forma de enfrentar la enfermedad es mediante la quimioterapia antiviral y la búsqueda de fármacos que reduzcan la multiplicación viral y, la intensidad y duración de los síntomas, y propicien su retorno al estado de latencia.

A diferencia de otros antimicrobianos que actúan directamente sobre la estructura del microorganismo, los antivirales operan dentro de la célula infectada por lo que cualquier inhibidor podría afectar también a la célula en menor o mayor grado. Por lo tanto el antivírico debe ser activo frente al virus manteniendo una toxicidad mínima sobre el huésped. [Barreto Penié y col., 1.998]. El avance de ciertas áreas como virología, química y biología molecular ha permitido distinguir entre las funciones de la célula hospedadora de las funciones virales específicas y como consecuencia la síntesis de compuestos con acción antiviral definida.

Los antivirales más reconocidos utilizados clínicamente en la actualidad se muestran en la **Tabla 4**, [Giménez Arnau, A., 1.992; Carballal y Oubiña, 1.998; Tuset y col., 2.003; Field and Whitley, 2.005; Aguilar y Michelli, 2.008].



Tabla 4: Antivirales de uso clínico.

Droga	Blanco de acción	Tratamiento de virus	Efectos adversos
Aciclovir	ADN polimerasa	<i>Herpes simplex</i> <i>Varicela zoster</i>	Alteraciones gastrointestinales, cefaleas, erupciones, insuficiencia renal, encefalopatía, flebitis e inflamación en la zona de infusión.
Amantadina/ Rimantadina	Adsorción, penetración y decapsidación	<i>Influenza A</i>	Alteraciones del sistema nervioso central.
Azidotimidina	Transcriptasa reversa	<i>VIH *</i>	Mielosupresión, miopatía y neutropenia.
Foscarnet	ADN polimerasa	<i>Herpes simplex, Varicela-zoster, Citomegalovirus.</i>	Alteraciones gastrointestinales, cefalea, toxicidad renal, anemia, fiebre, ulceraciones genitales y alteraciones electrolíticas.
Ganciclovir	ADN polimerasa	Todos los herpesvirus	Alteraciones gastrointestinales, fiebre, erupciones, nefrotoxicidad, neutropenia, trombocitopenia, anemia, y hepatotoxicidad.
Idoxiuridina/ trifluorotimidina	Timidilato sintetasa	<i>Herpes simplex</i>	Irritación ocular, conjuntivitis, edema, queratitis superficial, y retraso de la cicatrización.
Ribavirina	Transcripción	<i>Respiratorio sincicial, Sarampión, Influenza A y B, Hepatitis A y C, Parainfluenza, VIH *</i>	Anemia transitoria, elevados niveles de bilirrubina, reticulocitosis, erupción y conjuntivitis.
Vidarabina	ADN polimerasa	<i>Herpes simplex Varicela-zoster Citomegalovirus Epstein-Barr</i>	Gastrointestinales (náuseas, vómitos y diarrea), neurológicos (parestesia y ataxia), anemia megaloblástica, leucopenia y trombocitopenia.

*Virus de Inmunodeficiencia Humana.



Si bien se han obtenido compuestos antiherpéticos, su elevada toxicidad y el desarrollo de resistencia han limitado su eficacia. Por este motivo existe una fuerte tendencia a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos de origen natural, especialmente aquellos provenientes de plantas debido a que éstas poseen una gran variedad de sustancias bioactivas con potencial antimicrobiano, siendo empleadas para tratar enfermedades de distinto origen, incluyendo las infecciosas de origen viral, [Carballal y Oubiña, 1.998; Taborda y col., 2.007; Del Barrio Alonso y col., 2.008; Valdés y col.; 2.009; Matulewicz y Damonte, www.aqa.org.ar/iyq354.html]

En los últimos años el estudio de distintas algas rojas (*Nothogenia fastigiata*, *Pterocladia capillacea*) y algas pardas (*Leathessia difformis*, *Adenocystis utricularis*), ha permitido el aislamiento y evaluación de la efectividad antiviral de una gran diversidad de polisacáridos sulfatados, de variada estructura química que contienen galactanos, carragenanos, agaranos, mananos, fucanos y fucoidanos. Estos son efectivos inhibidores no sólo de los virus *Herpes simplex tipos 1 y 2*, asociados principalmente a infecciones recurrentes en el humano en las mucosas orales y genitales, sino también de virus tales como *Citomegalovirus*, *Estomatitis Vesicular*, *Influenza A*, *Respiratorio Sincicial*, *Junín*, *Tacaribe Sindbis* y *Semliki Forest*. El mecanismo de acción antiherpética de los polisacáridos mencionados se basa en su capacidad de interferir en la unión del anti-receptor viral (gC) al receptor de la célula hospedadora (heparán sulfato proteoglicano), bloqueando así la entrada del virus a la célula huésped y como consecuencia la infección, [Matulewicz y Damonte, www.aqa.org.ar/iyq354.html; Pujol y col., 1.995]

Las plantas también son fuente importante de diversos compuestos con propiedades medicinales. Investigaciones realizadas por Hayashi y col. (1.993), han reportado que flavonoides presentes en diversas especies vegetales muestran actividades biológicas tales como antiviral, anticarcinogénica, antiinflamatoria y antialérgica. El aceite esencial quimiotipo "carvona" de *Lippia alba* (Verbenaceae), planta medicinal empleada folklóricamente contra la hipertensión, problemas digestivos, náuseas y resfriados en Sudamérica y Norteamérica, exhibe actividad inhibitoria sobre el ciclo de replicación del virus *HSV-1*, [Solbay Agudelo Gómez y col., 2.010].

Una de las familias de plantas más estudiadas es la *Euphorbiaceae* con 8.000 especies, muchas de las cuales han sido de gran utilidad para el tratamiento de diversas enfermedades, por lo que varios estudios se han enfocado en la evaluación



de sus efectos, demostrando su potencial antiviral, antitumoral, antibacteriano y antioxidante. Varias especies de esta familia han manifestado actividad antiviral contra virus como *Herpes simplex*, *Polio*, *Hepatitis B*, *Inmunodeficiencia Humana*, entre otros, [Taborda y col., 2.007].

El sur de la provincia de Córdoba presenta una riqueza florística con propiedades medicinales como actividad antiviral, la cual está asociada a proteínas, fenoles, flavonoides, taninos, carbohidratos o alcaloides, entre otros, [Zanon et al., 1.999]. Dentro de las especies vegetales, como ya se mencionó, se encuentra el género *Baccharis* con actividad antiherpética.

1.7. Planteamiento del problema

La escasa disponibilidad de drogas antivirales y el aumento en el número de personas inmunodeprimidas que hay en la actualidad, como lo son infectados con *VIH*, pacientes con tratamiento antineoplásico o inmunosupresores en el caso de transplantados, establece la demanda de nuevos medicamentos con esta acción. Particularmente es importante en las infecciones herpéticas en las que los cuadros clínicos son más severos y en donde su tratamiento puede generar la aparición de más cepas resistentes.

La demanda de tratamientos menos agresivos, el aumento del interés de la población por los productos herbáceos y el incremento de las actividades de investigación en el campo de las plantas medicinales ha incentivado la búsqueda de compuestos de origen vegetal como nuevas drogas antivirales, debido a que las plantas poseen una gran variedad de sustancias bioactivas con potencial antimicrobiano.

En la medicina folclórica la especie *Baccharis articulata* es empleada frecuentemente para la cura de diversas dolencias y considerando que es particularmente abundante en nuestras serranías cordobesas, resulta de gran interés investigar su potencial actividad contra los herpesvirus. Considerando el parasitismo intracelular obligado de estos agentes resulta imprescindible determinar concentraciones del vegetal que no generen alteraciones en la morfología celular ni en la fisiología del sistema huésped empleado para el estudio de esta actividad antiviral.



1.8. Hipótesis

El extracto acuoso caliente de *Baccharis articulata* inhibe la replicación del virus *Herpes suis* tipo 1 durante las primeras etapas de la infección en células Vero a concentraciones no citotóxicas.



2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad inhibitoria del extracto acuoso caliente de *Baccharis articulata* frente al virus *Herpes suis tipo 1* durante la etapa de adsorción y/o penetración viral y determinar su índice de selectividad en células Vero.

2.1. Objetivos específicos

1. Mantenimiento y propagación de la línea celular Vero.
2. Amplificación y titulación del virus *Herpes suis tipo 1*.
 - 2.1. Amplificación de la suspensión viral.
 - 2.2. Cuantificación de la infectividad viral por recuento de placas de lisis.
3. Preparación del extracto acuoso caliente de *Baccharis articulata*.
4. Estudio de citotoxicidad del extracto vegetal.
 - 4.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC).
 - 4.2. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC₅₀) por captación de Rojo Neutro.
 - 4.2.1. Cálculo de la Concentración Citotóxica 50% (CC₅₀).
5. Evaluación de la actividad antiviral del EAC durante la etapa de adsorción y/o penetración viral.
 - 5.1. Determinación por reducción del número de placas de lisis.
 - 5.2. Determinación por reducción de la producción viral.
 - 5.3. Cálculo de la Concentración Efectiva 50% (CE₅₀).
 - 5.4. Cálculo del Índice de Selectividad (IS).



3. MATERIALES

3.1. Soluciones

3.1.1. 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.

3.1.2. Solución balanceada de fosfatos (PBS)

NaCl.....8 g

KCl.....0,200 g

Na₂PO₄H+ 2 H₂O.....1,44 g

KPO₄H₂.....0,200 g

Agua bidestilada c.s.p.....1000 ml

La solución se fraccionó en frascos de 200 ml aproximadamente, se esterilizó a 3/4 atm durante 30 min y se conservó a 4°C hasta su uso.

3.1.3. Solución de bicarbonato de sodio al 5%

NaCO₃H.....5 g

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

Se disolvió por agitación y se fraccionó en tubos de ensayo. Se esterilizó a 3/4 atm durante 20 min y se conservó a 4°C hasta su uso. Se utilizó para ajustar el pH de los medios de cultivos.

3.1.4. Solución de bicarbonato de sodio al 2,8%

NaCO₃H.....2,8 g

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

Se disolvió por agitación y se fraccionó en tubos de ensayo. Se esterilizó a 3/4 atm durante 20 min y se conservó a 4°C hasta su uso. Se utilizó para ajustar el pH de los medios de cultivos y particularmente de las suspensiones virales.



3.1.5. Solución de Cristal Violeta al 1%

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 madurar 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.

3.1.6. Solución desteñidora de Rojo Neutro

Agua bidestilada.....49 ml
Etanol.....50 ml
Acido acético..... 1 ml

Se preparó la cantidad necesaria en el momento de su uso.

3.1.7. Solución de formol al 10 %

Formol.....10 ml
Agua corriente c.s.p.....90 ml

Esta solución se preparó en la cantidad necesaria al momento de su uso.

3.1.8. Solución de gentamicina.

Sulfato de gentamicina.....80 mg
Agua bidestilada c.s.p.....16 ml

Se esterilizó por filtración con membrana de 0,22 μ de poro y se fraccionó en pequeños volúmenes. Se conservó a -20°C hasta su uso.

3.1.9. Solución de glutamina

Glutamina.....3 g
NaCl.....0,85 g



Agua bidestilada.....100 ml

Se agitó hasta disolución en baño de 37°C. Se esterilizó por filtración con membrana de 0,22 μ de poro, se fraccionó y se conservó a -20°C hasta su uso.

3.1.10. Solución de metilcelulosa al 1,5 %

Metilcelulosa.....1,5 g

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

Se disolvió en un erlenmeyer y se esterilizó en autoclave a 3/4 atm durante 25 min. Se conservó a 4°C hasta su uso.

3.1.11. Solución de Rojo Neutro (RN) 1:1000

Rojo neutro (B.D.H.)0,25 g

Agua bidestilada c.s.p.250 ml

Se disolvió por agitación y se filtró por papel de buena calidad. Se fraccionó en frascos tapados con tapa de gasa y algodón con envoltura de papel. Se esterilizó en autoclave a 3/4 atm durante 25 min y se conservó a 4°C.

3.1.12. Solución de Rojo Neutro (RN): Solución de trabajo

Se agregaron 0,5 ml de RN estéril (Gibco) a 30 ml de MM estéril, se dejó en estufa 24 h. Luego se centrifugó durante 30 min a 3500 rpm.

3.1.13. Solución de tripsina + EDTA 2X

NaCl.....16 g

KCl.....0,8 g

Dextrosa.....2 g

NaCO₃H.....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 se fraccionó en volúmenes de 50 ó 100 ml. Se conservó a -20°C hasta su uso.

3.2. Medios

3.2.1. Medio de Crecimiento para células (MC)

Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) en solución salina balanceada de Earle con glutamina (medio sintético Gibco), suplementado con 8% de suero fetal bovino (SFB) inactivado (Natocor) a 56°C por 30 min y 50 µg/ml de gentamicina; pH 7,2-7,4.

3.2.2. Medio de Mantenimiento para células (MM)

Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) en solución salina balanceada de Earle con glutamina (medio sintético Gibco), suplementado con 2% de SFB inactivado (Natocor) a 56°C por 30 min y 50 µg/ml de gentamicina; pH 7,4-7,8.

3.2.3. Medio para Placa (MP)

a) MEM 2X, suplementado con 2% de solución de glutamina, 4% de SFB, 100 µg/ml de gentamicina y bicarbonato de sodio al 5% hasta pH 7,4-7,8.

b) Solución de metilcelulosa al 1,5%.

Las soluciones a y b se conservaron a 4°C y volúmenes iguales de ambas soluciones se mezclaron en el momento de usar ajustando el pH a 7,2 - 7,4.

3.2.4. Medio thioglicolato

Thioglicolato (Difco).....29 g

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

Se esterilizó a 3/4 atm 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 empleadas en los cultivos celulares, [Sabini y Zanon; 2.005].



3.3. Material biológico

3.3.1. Cultivos celulares

En el desarrollo de las experiencias se empleó la línea celular Vero, clon 76 (línea continua de riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*) adquirida en la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC) de la ciudad de Pergamino, provincia de Buenos Aires.

3.3.2. Virus

Se empleó el virus *Herpes suis tipo 1, cepa RC/79*, aislado en Río Cuarto en el año 1.979 [Ambrogi y col., 1.981]. Una parte de esta semilla viral se conservó a 4°C y fue mantenida en el laboratorio por pasajes sucesivos, mientras que otra se almacenó como stock a -80°C fraccionada en eppendorf.

3.3.3. Material vegetal

Se empleó la especie *Baccharis articulata* que fue colectada en marzo del año 2.010 en su hábitat natural en la zona serrana de Alpa Corral y región aledaña Villa Jorcoricó, provincia de Córdoba. La identificación taxonómica fue realizada por la Profesora Margarita Grosso de la UNRC. Un espécimen del vegetal fue depositado en el Herbario de la Fac. de Cs. Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la UNRC, nombrado con la exsiccata RCV (Río Cuarto Vasculares) 1.810.



4. MÉTODOS

4.1. Propagación y mantenimiento de la línea celular Vero

Células Vero fueron sembradas en botellas tipo Cellstar de 25 ó 75 cm² de superficie. Cuando la monocapa celular alcanzó la confluencia, se lavó dos veces con PBS libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (apartado 3.1.2.) y se dispersó con solución de tripsina + EDTA 2X (apartado 3.1.13.). Una alícuota de la suspensión celular obtenida se homogeneizó con igual volumen de solución de Azul Tripán y por exclusión al colorante se determinó el número de células viables en cámara de Neubauer. Posteriormente se agregó un volumen adecuado de MC (apartado 3.2.1.) para obtener una concentración aproximada de 2x10⁵ células/ml. La suspensión celular homogeneizada se sembró en botellas de cultivo estériles y se incubó a 37°C hasta la formación de la monocapa, [Vanella J., 1.964; Lennette and Schmidt, 1.979].

Cuando el período de incubación fue prolongado, el MC que bañaba las monocapas celulares fue reemplazado por MM (apartado 3.2.2.).

Para todas las operaciones los reactivos se precalentaron a 37°C.

4.2. Amplificación y titulación del virus *Herpes suis* tipo 1

4.2.1. Amplificación de la suspensión viral

Células Vero crecidas en botellas planas de 25 cm² de superficie se infectaron con una multiplicidad de infección (moi) de 0,2 UFP (Unidades Formadoras de Placas)/célula. La moi es la relación que existe entre la concentración de virus y la cantidad de células expuestas a la infección. Los cultivos infectados se incubaron durante 1 h a 37°C, con agitación periódica cada 15-20 min para permitir una distribución homogénea del inóculo en la monocapa. Luego de 1 h de adsorción a 37°C se descartó el virus remanente (no adsorbido), las células se cubrieron con 6 ml de MM y se incubaron a 37°C durante 72 h. Cumplido ese tiempo, los cultivos infectados que mostraron alrededor de un 80% de efecto citopático (ECP) se sometieron a 1 ciclo de congelamiento y descongelamiento para facilitar la liberación de las partículas virales retenidas intracelularmente. El pH de la suspensión se controló y/o llevó a 7,2-7,4. Posteriormente dicha suspensión se centrifugó a 3.500 rpm durante 10-15 min y el stock obtenido a partir del sobrenadante fue conservado a - 20°C.



4.2.2. Cuantificación de la infectividad viral por recuento de placas de lisis

La suspensión viral obtenida fue cuantificada por el método de placas de lisis [Dulbecco R., 1.962] permitiendo así conocer la concentración inicial de virus a utilizar en los estudios de actividad antiviral.

Monocapas de células Vero desarrolladas en policubetas de 24 pocillos fueron infectadas con diluciones seriadas al décimo del stock viral en MM, por duplicado, a razón de 200 μ l por cavidad. Luego de 1 h de adsorción a 37°C, el virus remanente se descartó y cada pocillo se cubrió con 1 ml de MP (apartado 3.2.3.). Se incluyeron controles celulares que consistieron en monocapas no infectadas cubiertas con MP. Tanto los cultivos infectados y los controles se incubaron a 37°C durante 3 días. Finalmente las células se fijaron con formol al 10% (apartado 3.1.7.) durante 1 h y las placas se revelaron con solución de Cristal Violeta al 1% (apartado 3.1.5.) durante 20 min. Esta experiencia se resume en el **Diagrama 1**.

Concluido este procedimiento se contaron las placas de lisis y se calculó el título viral, expresado en Unidades Formadoras de Placas por ml (UFP/ml), empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Título (UFP/ml)} = N / V \times D$$

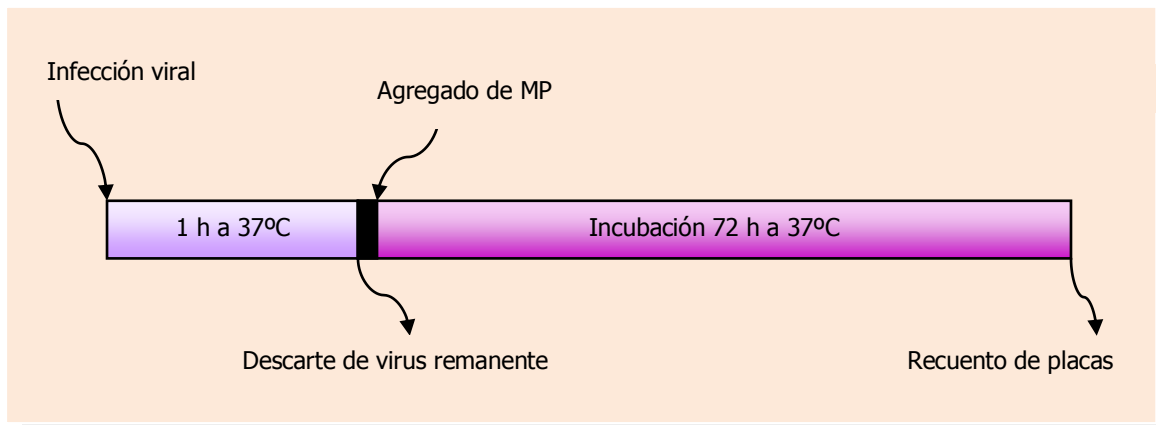
Donde:

N = número promedio de placas de lisis.

V = volumen del inóculo viral.

D = dilución viral empleada.

Diagrama 1: Titulación del virus *Herpes suis* por recuento de placas de lisis.





4.3. Preparación del extracto acuoso caliente de *Baccharis articulata*

Los especímenes vegetales fueron recolectados en forma manual respetando las pautas de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se realizaron cortes en los tallos dejando las raíces e individuos sin tocar para permitir la preservación y perpetuación de la especie vegetal.

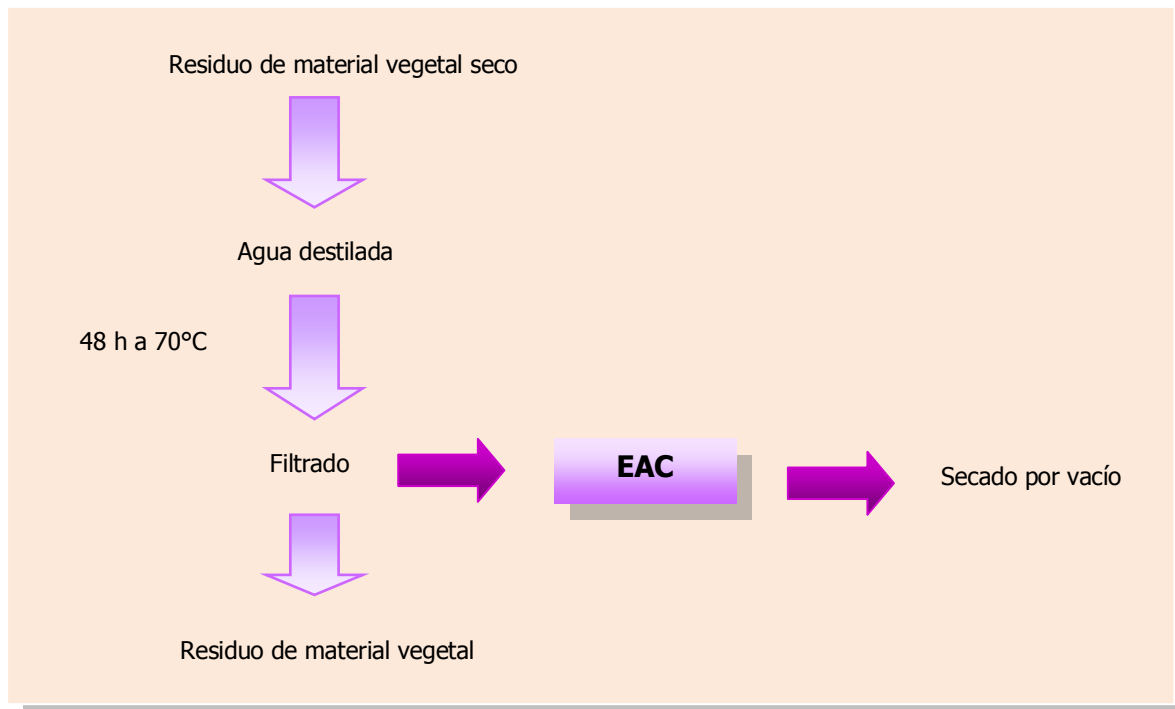
Partes aéreas del material vegetal que no mostraron alteraciones morfológicas visibles ni evidencias de infecciones, fueron lavadas reiteradamente con agua destilada, dejándose las secar al aire para impedir la putrefacción y en un ambiente cerrado para evitar el polvo ambiental. El material vegetal seco fue triturado y conservado a -80°C hasta el momento de su uso.

A partir de la especie *Baccharis articulata* se obtuvieron dos extractos acuosos. En primer lugar se preparó el acuoso frío y a partir del residuo vegetal se obtuvo el extracto acuoso caliente (EAC) el que fue empleado en todos los ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral en este trabajo de investigación. El EAF fue analizado en otro trabajo de tesis. Por este motivo sólo se detalla el procedimiento de obtención del EAC.

Para la preparación del EAC se tomó 800 g del material vegetal seco remanente de la obtención del EAF y se le agregó 3500 ml de agua destilada a 70°C, dicha mezcla se incubó a 70°C durante dos días. Posteriormente se filtró y el líquido colectado se rotuló como EAC. El material vegetal residual fue pesado para determinar el rendimiento porcentual peso/peso.

El extracto obtenido fue secado por vacío, fraccionado y conservado a -20°C hasta su uso, momento en el que fue disuelto en PBS para obtener una concentración de 10 mg/ml. Esta solución fue esterilizada por filtración a través de membranas Millipore de 0,22 µ de poro. La metodología se resume en el siguiente Diagrama.

Diagrama 2: Obtención de EAC de *Baccharis articulata*.



4.4. Estudios de citotoxicidad del extracto vegetal

En los dos ensayos de determinación de citotoxicidad se partió de una metodología común. Células Vero fueron sembradas en policubetas de 96 pocillos. Cuando los cultivos lograron la confluencia, el MC fue reemplazado por igual volumen (200 μ l) de MM conteniendo diferentes concentraciones (300-1000 μ g/ml en MM) del EAC de *B. articulata*. Cada ensayo se realizó por triplicado e incluyeron controles celulares (cultivos no tratados). Todos los cultivos fueron incubados a 37°C.

La toxicidad celular fue analizada a diferentes tiempos de tratamiento según la metodología empleada.

4.4.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC)

Los cultivos celulares tratados con la muestra vegetal y los controles del sistema fueron incubados a 37°C durante 72 h, tiempo que demandó este ensayo. La morfología de las células fue observada 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 (**Diagrama 3**).

Se consideraron citotóxicas aquellas concentraciones del extracto vegetal que produjeron alteraciones morfológicas visibles al microscopio en comparación con los controles celulares. La MCNC es definida como la máxima concentración del compuesto que no altera la monocapa celular a las 48- 72 h de incubación a 37°C, considerado tiempo límite de observación, [Zanon et al, 1.999; Li et al, 2.002; Ooi et al, 2.004].

Al mismo tiempo se cuantificó el daño celular producido y su evolución en función del tiempo empleando la siguiente escala de clasificación: 0 normal; + efecto escaso; ++ efecto apreciable; +++ efecto severo y ++++ efecto severo intenso, [Jagadeeswaran et al, 2.000].

4.4.2. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC₅₀) por captación de Rojo Neutro

La viabilidad celular fue determinada usando el test de captación de Rojo Neutro (RN) según las descripciones de *Borenfreund* (1.985), con modificaciones.

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.

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 conduce a una fragilidad lisosomal y a otros cambios que gradualmente se tornan irreversibles. Tales cambios resultan en una disminución de la captación y unión del RN. Así, es posible distinguir células muertas (o dañadas) y células vivas.

Siguiendo con la metodología detallada en el punto 4.4., los cultivos tratados y los cultivos controles fueron lavados con 200 µl de PBS/pocillo. Luego se agregaron 200 µl/pocillo de solución de RN (30 µg/ml en MEM) y la policubeta se llevó a incubar a 37°C por 2 h más 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 la solución desteñidora (apartado 3.1.6.).



Después de la agitación de los cultivos por 20 min se midieron los valores de absorbancia (D.O.) a 540 nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS), [Chiba et al, 1.998; Rajbhandari et al, 2.001, Gong et al, 2.004; Seth et al, 2.004] (**Diagrama 3**).

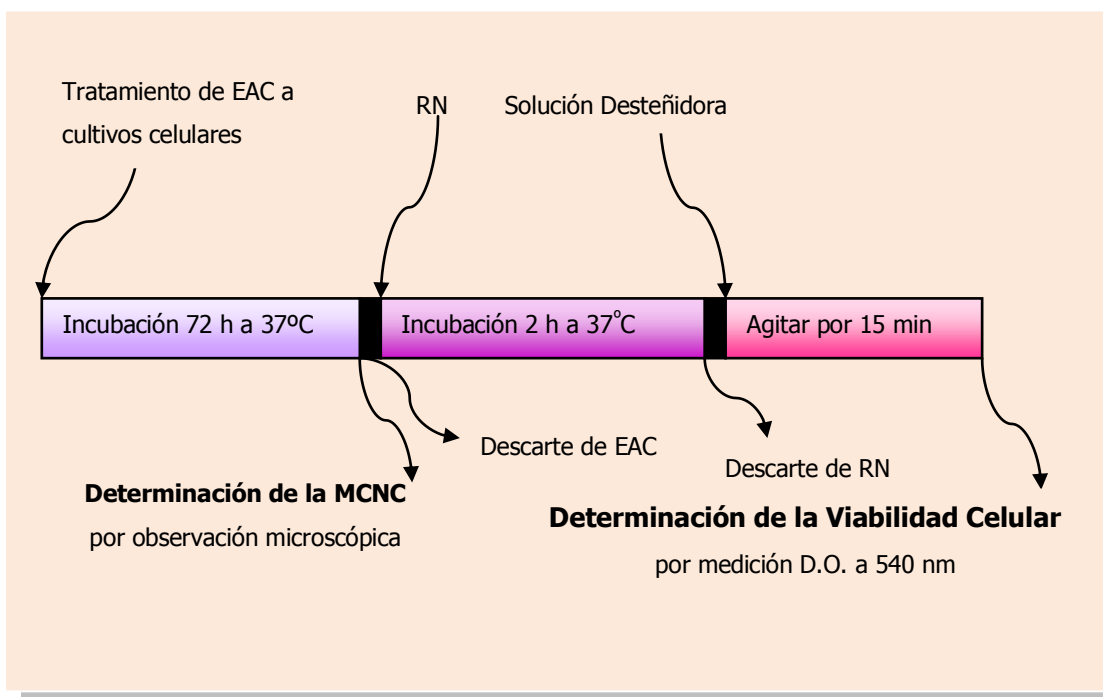
La viabilidad relativa en los cultivos tratados fue expresada como porcentaje de disminución de RN captado respecto de las células controles; y la fracción de sobrevivencia (FS) porcentual fue calculada según la siguiente fórmula:

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

Los valores obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico de regresión con un coeficiente de determinación $>0,90$, basado en la curva dosis-respuesta Boltzman sigmoideal y usando el programa *GraphPad Prism 5.0*.

El **Diagrama 3** resume la metodología detallada en los apartados 4.4.1 y 4.4.2.

Diagrama 3: Determinación de MCNC y Viabilidad celular por captación de RN de EAC.





4.4.3. Cálculo de la Concentración Citotóxica 50% (CC₅₀)

Los valores hallados en el punto 4.4.2 permitieron construir una gráfica de porcentajes de viabilidad celular en función de las diferentes concentraciones ensayadas para el extracto vegetal y por intrapolación, calcular el valor de CC₅₀. Los valores analizados estadísticamente (*software GraphPad Prism 5.0*) determinaron el R₂ del ensayo.

4.5. Evaluación de la actividad antiviral del EAC durante la etapa de adsorción y/o penetración viral

4.5.1. Determinación por reducción del número de placas de lisis

Las monocapas celulares desarrolladas en policubetas de 24 pocillos se infectaron, por duplicado, con 200 µl de virus *Herpes suis tipo 1* (60 UFP/pocillo) en presencia de EAC a diferentes concentraciones (400-700 µg/ml). Al cabo de 1 h de incubación a 37°C se descartó el inóculo viral remanente junto con el EAC y se agregó MP sin EAC. Los controles de este ensayo incluyeron:

- Control de infectividad viral: células infectadas con virus (60 UFP/pocillo).
- Control de inocuidad de extracto: células tratadas con EAC a las concentraciones ensayadas.
- Control del sistema celular: células no tratadas ni infectadas.

Luego de la incubación a 37°C por 72 h, se calcularon los títulos virales por recuento de placas de lisis en los cultivos controles y en los cultivos tratados con la muestra vegetal, tal como se describió en el apartado 4.2.2 (**Diagrama 4**).

La actividad antiviral se determinó mediante la reducción del número de placas de lisis en los cultivos tratados respecto al número de placas en los cultivos controles. El porcentaje de inhibición viral ejercido por el EAC se calculó a partir de la fórmula, [García et al, 1.990]:

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

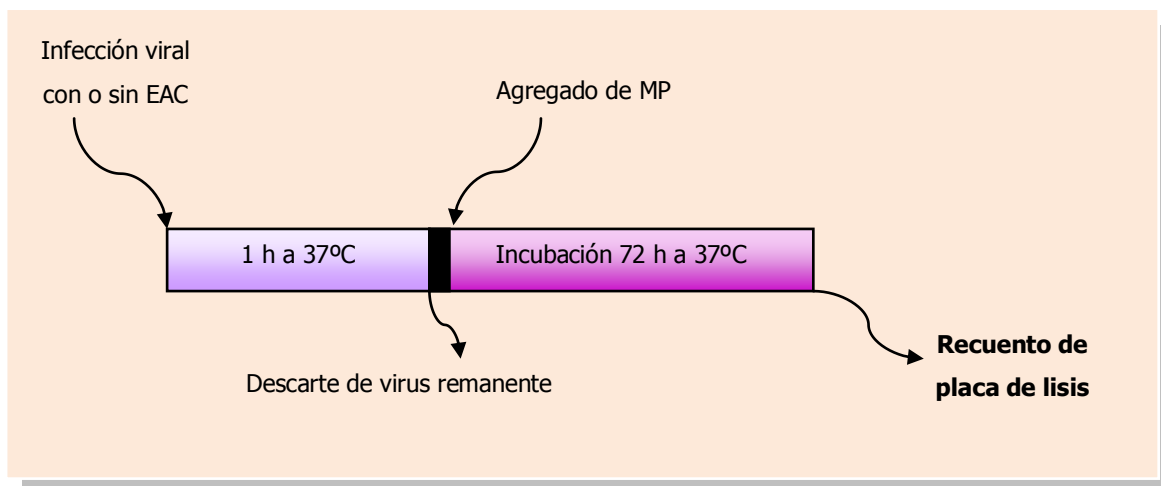


Siendo:

A = título viral en los cultivos tratados con el extracto.

B = título viral en los cultivos no tratados.

Diagrama 4: Actividad antiviral por reducción del número de placa de lisis.



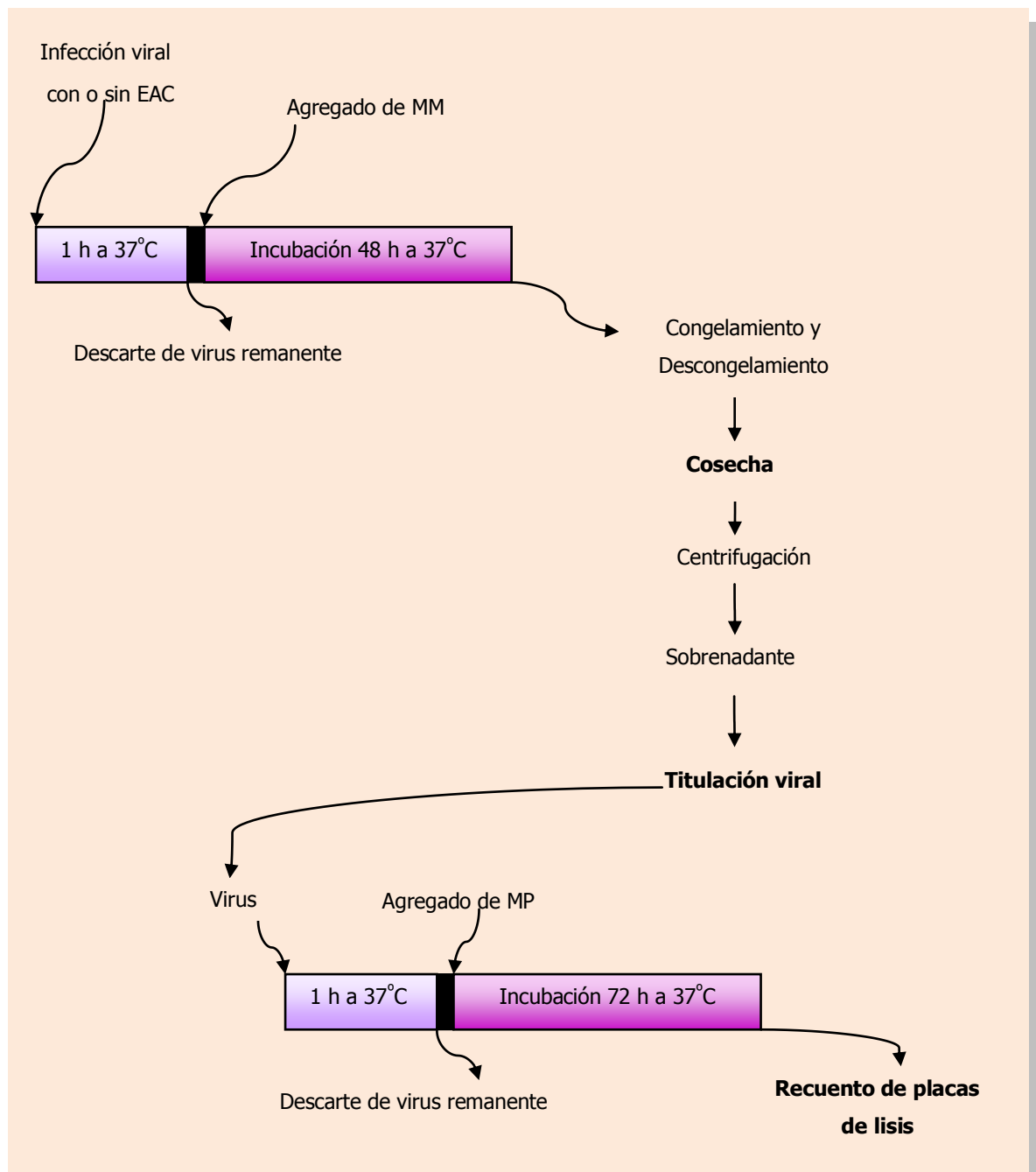
4.5.2. Determinación por reducción de la producción viral

Cultivos celulares confluentes desarrollados en botellas de cultivo de 3 ml de capacidad, fueron inoculados con 200 μ l de virus (moi de 0,1 y 0,01) en presencia o ausencia de EAC (550 y 700 μ g/ml). Los cultivos tratados y los controles (viral y celular) se incubaron por 1 h a 37°C para permitir la adsorción de los virus a las células. Posteriormente se descartó el inóculo residual y el extracto, y se agregaron 3 ml de MM sin EAC, incubándose por 48 h a 37°C. Los cultivos tratados y los controles virales se sometieron a 1 ciclo de congelamiento y descongelamiento para facilitar la liberación de todas las partículas virales. Luego se centrifugó a 3.000 rpm por 10-15 min para eliminar los restos celulares. A partir de los sobrenadantes obtenidos se determinó el título viral por recuento de placas de lisis, detallado en el apartado 4.2.2 (**Diagrama 5**).

El porcentaje de inhibición viral fue calculado de la misma manera que en el punto 4.5.1.



Diagrama 5: Reducción de la producción viral durante la adsorción y/o penetración viral por el EAC.





4.5.3. Cálculo de la Concentración Efectiva 50% (CE₅₀)

La CE₅₀ de un compuesto en estudio (extracto acuoso) se define como la concentración del mismo que inhibe el 50% de la infectividad viral respecto de los controles virales. Para su determinación se utilizaron los resultados de los tratamientos con EAC de los cultivos celulares infectados, cuya metodología se detalla en el apartado 4.5.1. Estos valores permitieron construir una gráfica de porcentajes de inhibición viral en función de las diferentes concentraciones ensayadas de la muestra vegetal y por intrapolación, calcular el valor de CE₅₀. Los valores analizados estadísticamente (*software GraphPad Prism 5.0*) determinaron el R₂ del ensayo.

4.5.4. Cálculo del Índice de Selectividad

Este índice revela la relación que existe entre la acción tóxica que ejerce un determinado compuesto sobre un sistema celular y la capacidad del mismo para inhibir al virus en estudio. Este valor es imprescindible para establecer la toxicidad selectiva de un nuevo agente antiviral.

Con el valor obtenido de CC₅₀ y de CE₅₀, (metodologías indicadas en apartados 4.4.3 y 4.5.3 respectivamente) se calculó el Índice de Selectividad (IS) mediante la siguiente fórmula:

$$IS = CC_{50} / CE_{50}$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Propagación y mantenimiento de la línea celular Vero

En esta tesina de grado resultó primordial realizar la propagación y mantenimiento de la línea celular Vero para efectuar posteriormente los ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral correspondientes, basados en la gran susceptibilidad de dicha línea celular frente al virus *Herpes suis tipo 1*, [Ben-Porat and Kaplan, 1.973; Cedeño y col., 1.998]. Es de destacar que en nuestro laboratorio el mantenimiento de esta línea celular está estandarizado y que la infección de la misma por este virus manifiesta un ECP característico.

Con el propósito de mantener y/o amplificar el stock celular se realizaron periódicamente subcultivos, siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.1.

La confluencia celular se obtuvo entre las 48 y 72 h post-siembra, evidenciando una morfología poliédrica y uniforme característica, coincidente con la descripción de Hsiung y Fong, (1.982), (**Figura 7**).

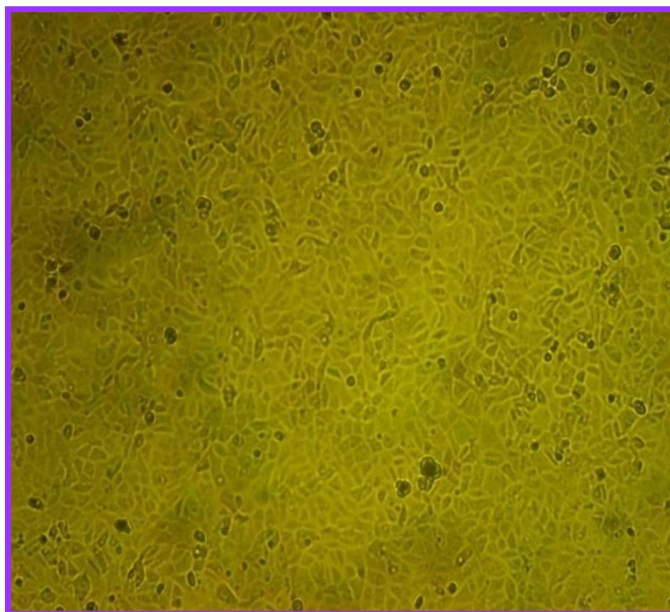


Figura 7: Aspecto morfológico normal de un cultivo confluyente de células Vero (20X).

Una vez lograda la confluencia celular fue posible mantener los cultivos con MM a 28°C durante aproximadamente 20-25 días, tiempo en el que se conservó esta morfología característica.

5.2. Amplificación y titulación de la suspensión del virus *Herpes suis tipo 1*

5.2.1. Amplificación de la suspensión viral

Con la finalidad de obtener un importante volumen y concentración viral para las subsiguientes experiencias, se procedió a amplificar y titular la suspensión del virus *Herpes suis tipo 1*, (apartado 4.2.1) cuantas veces fuera necesario.

Los cultivos infectados con el virus *Herpes suis tipo 1*, al observarse diariamente a través del microscopio óptico invertido, evidenciaron los ECP típicos producidos por esta cepa viral, [Sabini, L., 1.996].

La morfología de las células infectadas, inicialmente poliédricas, se modificó originando grupos de células agrandadas, redondeadas y refringentes que posteriormente llevaron a la formación de células gigantes multinucleadas o sincitios típicos (**Figura 8**). Posteriormente, a las 48-72 h post-infección, se constituyeron en focos de lisis con desprendimiento de las células de la superficie del recipiente, permitiendo observar verdaderos huecos en la monocapa. Un cierto número de células que no sufrieron lisis quedaron unidas a otras por conexiones citoplasmáticas, dando el aspecto de formaciones asteroides.

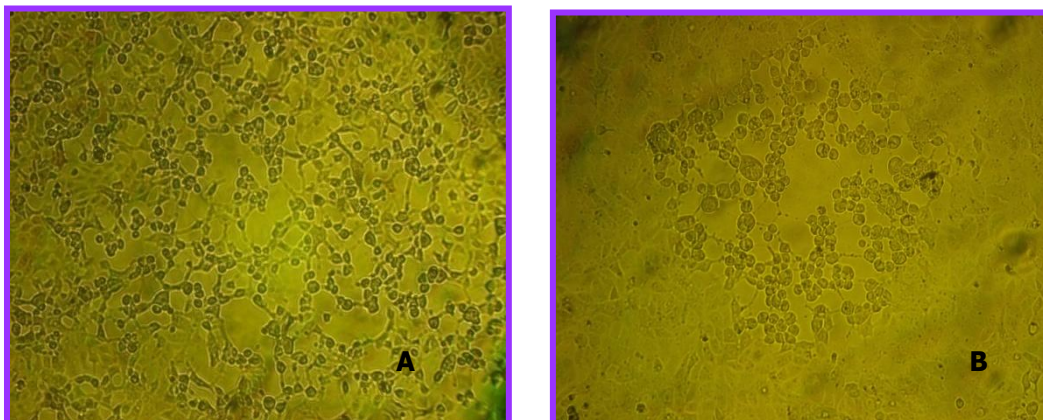


Figura 8: Células Vero infectadas con virus *Herpes suis tipo 1*, cepa RC/79. A) Células agrandadas, redondeadas, refringentes. B) Células gigantes multinucleadas y formaciones asteroides.

Un 80 - 90% de la monocapa celular presentó estas alteraciones a las 72 h post-infección, tiempo en el que se realizó la cosecha viral. Por el contrario, los cultivos no

infectados, que constituyeron los controles celulares, mantuvieron la morfología y confluencia durante todo el tiempo que duró la experiencia (**Figura 7**).

5.2.2. Cuantificación de la infectividad viral por recuento de placas de lisis

Una vez amplificada la semilla viral, se procedió a cuantificar su infectividad a través del recuento de placas de lisis, [Dulbecco, R., 1.962]. Para ello, cultivos celulares infectados con diferentes concentraciones del agente viral, a las 72 h fueron fijados y teñidos, según la metodología descrita en el apartado 4.2.2. De esta forma, se revelaron las placas de lisis, producidas por el virus *Herpes suis*, caracterizadas por presentar bordes nítidos y regulares (**Figura 9**).

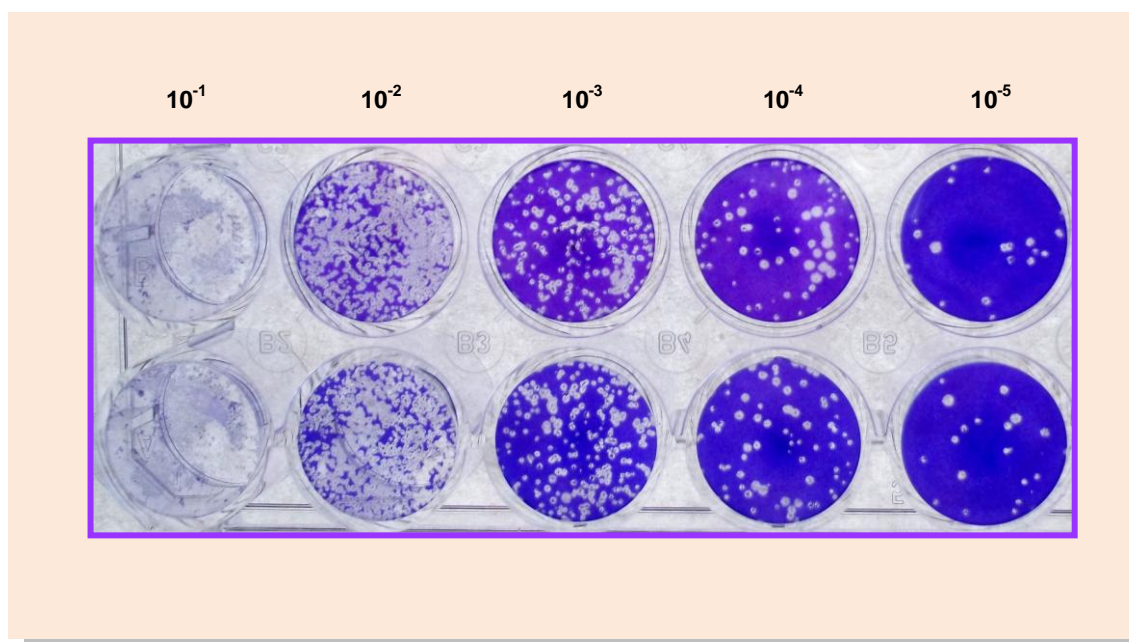


Figura 9: Placas de lisis producidas por *Herpes suis tipo 1* en células Vero. Puede observarse que el número de ellas disminuye en función de la concentración de virus empleada.

Los títulos virales obtenidos en estas experiencias fueron del orden de 10^5 - 10^6 UFP/ml. Estos valores resultaron ser similares a los informados en la caracterización de dicho agente viral por Sabini, L. (1.996) y en los estudios de actividad antiviral realizados por Zanon, S. (2.005).



Dado que el virus disminuye su infectividad durante la conservación a -20°C, el proceso de amplificación y posterior titulación fue realizado periódicamente.

5.3. Preparación del extracto acuoso caliente de *Baccharis articulata*

El estudio de plantas medicinales con posible acción biológica generalmente comienza con el análisis de extractos acuosos y/o alcohólicos debido a que en la medicina tradicional se consume a través de decocciones o infusiones. En este trabajo se evaluó el extracto acuoso caliente (EAC) obtenido de partes aéreas (tallo y hoja) de *B. articulata* siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.3.

En función de la relación peso inicial (17 g) vs. peso final (1,49 g) del material vegetal seco, se determinó el rendimiento porcentual del EAC de *B. articulata* que fue de 8,76%. Este valor fue superior al obtenido (3% p/p) con el extracto acuoso caliente de *Vernonia condensata*, especie perteneciente también a la familia Asteraceae [Monteiro y col., 2.001].

El resultado obtenido en este trabajo final se aproxima al 10%, promedio cercano a los valores de rendimiento informados en numerosas investigaciones para diferentes extractos acuosos calientes como decocciones y/o infusiones obtenidos de especies vegetales procedentes de diferentes familias botánicas. Estudios realizados por Koh y colaboradores (2.009) informan un rendimiento de la decocción de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae) del 11% y Shtukmaster y col., (2.010) valores de 11,5% para el extracto acuoso caliente obtenido de *Teucrium polium* (Lamiaceae).

Otras investigaciones indican rendimientos de peso seco para extractos acuosos de *Amaranthus muricatus* (Amaranthaceae), *Smilax campestris* (Smilacaceae) y *Bauhinia candicans* (Fabaceae) de 7,14, 8,35 y 6,05, respectivamente, resultando similares al obtenido en este trabajo final, [Debenedetti et al. 2.000].

La importancia de la determinación del rendimiento en un extracto vegetal se interpreta desde la bioactividad que el mismo pudiera estar presentando. Así, si se demuestra que los extractos ejercen acción antimicrobiana, desde el potencial terapéutico es más importante aquella planta que permite extraer de ella mayor cantidad de principios activos. El rendimiento en peso seco del EAC de *B. articulata* se encuentra dentro de lo esperado para un extracto acuoso caliente.



5.4. Estudios de citotoxicidad del extracto vegetal

5.4.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC)

Este concepto se utiliza para definir cuál es la máxima concentración de extracto vegetal que no ocasiona alteraciones visibles al microscopio óptico sobre los cultivos celulares pudiendo, en consecuencia, ser empleada en los ensayos de actividad antiviral. Los cultivos celulares expuestos a las diferentes concentraciones del extracto acuoso caliente de *Baccharis articulata* fueron observados diariamente hasta las 72 h por ser éste el periodo de tiempo límite para la cuantificación de la infectividad del virus *Herpes suis* utilizado en este trabajo.

La determinación de la MCNC garantiza que la inhibición de la multiplicación del virus problema sea debida exclusivamente a la acción del extracto y no a un efecto tóxico ejercido por el mismo sobre las células tratadas e infectadas, [Andrei y col., 1.985; Hudson J., 1.990; García G., 1.999].

Para cumplir este objetivo, monocapas celulares se incubaron con diferentes concentraciones (300-1000 µg/ml) de EAC, por triplicado, siguiendo la metodología detallada en el apartado 4.4.1.

Cuando los cultivos celulares fueron tratados con el EAC durante 72 h no se evidenciaron cambios aparentes en las concentraciones correspondientes a 300, 400, 500 y 600 µg/ml, ya que exhibieron una morfología compatible al aspecto del sistema control (células con MM solo). A las 24 h de tratamiento con 700 µg/ml de extracto pudo observarse la aparición de un efecto escaso que aumentó en función de la concentración empleada. Al cabo de las 72 h de tratamiento, como se observa en la **Figura 10**, los cultivos incubados con las mayores concentraciones presentaron claramente células redondeadas, retracción, ruptura de las uniones intercelulares y destrucción celular que generó la discontinuidad de la confluencia del cultivo.

En la **Tabla 5**, se resumen los efectos de las diferentes concentraciones del EAC sobre el cultivo celular a los tres tiempos de evaluación del ensayo, cuantificado según la escala de Jagadeeswaran, [Jagadeeswaran et al., 2.000].

Tabla 5: Efecto tóxico de EAC de *Baccharis articulata* sobre células Vero.

Concentración de EAC (µg/ml)	Tiempo de Incubación (h)		
	24	48	72
Control Celular	0	0	0
300	0	0	0
400	0	0	0
500	0	0	0
600	0	0	0
700	+	++	++
850	++	+++	+++
1000	+++	++++	++++

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla, la MCNC de EAC en células Vero correspondió a 600 µg/ml. La **Figura 10** muestra los cultivos celulares controles y tratados con concentraciones de EAC, en ésta se puede observar que la integridad de la monocapa tratada con el extracto a su MCNC se mostró igual que el control.

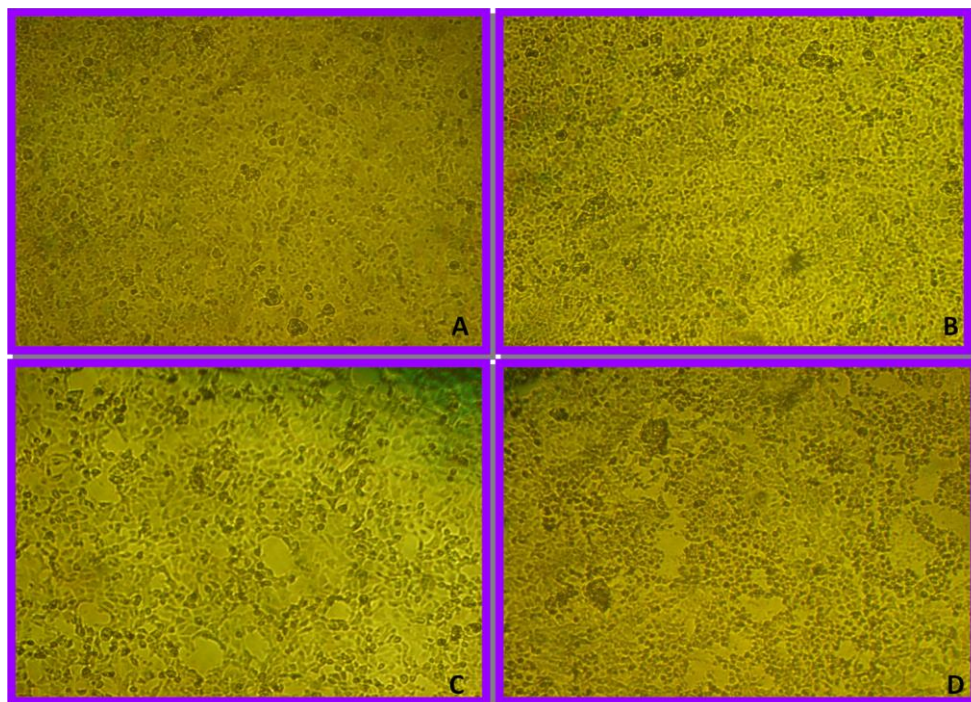


Figura 10: Morfología de cultivos celulares Vero tratados por 72 h con concentraciones de EAC de *Baccharis articulata*. A: Control celular; B: 600 µg/ml; C: 700 µg/ml y D: 1000 µg/ml. (20X).



El análisis comparativo del valor de MCNC del EAC de *Baccharis articulata* obtenido en este ensayo se realizó con los resultados conseguidos por *Schinitzler y col.*, (2.008) y *Bhanuprakash y col.*, (2.008), quienes utilizaron *Salvia officinalis* (Lamiaceae) y *Acacia arabica* (Mimosaceae), respectivamente, como material vegetal. Si bien ninguna de las especies estudiadas pertenece a la familia Asteraceae, la comparación es válida, dado que en ambos estudios se utilizó el agua como agente de extracción, al igual que en este trabajo. Los valores de MCNC presentados por estos investigadores fueron de 65 µg/ml y 99 µg/ml para *S. officinalis* y *A. arabica*, respectivamente. Por otra parte, estudios realizados por *Abad y colaboradores* (1.999), demostraron que el extracto acuoso de *Satureja boliviana* (Lamiaceae) ejerce toxicidad a valores superiores de 125 µg/ml. Todas estas investigaciones muestran valores muy inferiores a la MCNC del EAC de *B. articulata* obtenida en este estudio.

Abad y colaboradores (1.999) también establecieron valores de citotoxicidad para extractos acuosos de otras especies del género *Baccharis* (Asteraceae), la MCNC determinada para *B. genistelloides* y *B. rubricaulis* fue de 50 µg/ml en cultivos de células HeLa.

El mismo parámetro de citotoxicidad e idéntico sistema celular fue evaluado para el EAC obtenido de una especie perteneciente también al género *Baccharis* (*B. crispa*) por *Boris y colaboradores* (2.009), obteniendo un valor de 150 µg/ml. Este resultado indica que el EAC de *B. articulata* es menos tóxico que la especie antes mencionada.

El estudio realizado por *Zanon y colaboradores* (1.999) estableció la MCNC de extractos alcohólicos (etanólico) de miembros de la familia Asteraceae sobre la línea celular Vero. Entre las especies pertenecientes a esta familia se encontraban *Achyrocline satureioides* y *B. articulata* con valores de MCNC de 0,47 y 2,2 mg/ml, respectivamente. Estos resultados muestran que el extracto alcohólico de *A. satureioides* no supera el valor obtenido en este ensayo lo que indica que este extracto es más tóxico si se compara con el EAC de *B. articulata* ensayado en este trabajo final. En relación a los valores de MCNC de *B. articulata*, el extracto etanólico de esta especie resultó menos tóxico que el extracto acuoso caliente aquí analizado. Estos resultados indican la diferencia cualitativa y/o cuantitativa en la composición química del extracto vegetal, condicionada por el método de extracción empleado.

Es posible también efectuar una comparación entre valores de toxicidad en células Vero determinados por la misma metodología, de extractos acuosos calientes obtenidos de plantas de la misma especie pero de distinta procedencia. *Montanha y*



colaboradores (2.004), informaron una MCNC de 2,5 mg/ml para extractos acuosos de *B. articulata* recolectada en Brasil. Este resultado respecto de los obtenidos en este trabajo (0,6 mg/ml) revela que la especie de aquel país es menos tóxica en la línea celular Vero que la colectada en nuestras serranías. Esta situación podría deberse a diferencias químicas cualitativas y/o cuantitativas del vegetal en estudio, condicionadas a múltiples factores tales como variaciones climáticas (temperatura, precipitaciones, humedad relativa), características edáficas (composición química, permeabilidad, pH), relación entre especies botánicas que habitan en un mismo ambiente, período estacional de recolección, estado fenológico de la especie vegetal en el momento de su recolección, entre otros.

5.4.2. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC₅₀) por captación de Rojo Neutro

Como ya se mencionó en la sección métodos, el ensayo de captación del RN es una prueba que evalúa la sobrevivencia y viabilidad celular, basada en la capacidad de las células viables para incorporar y unir el RN.

Aplicando la metodología descrita en el inciso 4.4.2 se calculó el porcentaje de viabilidad celular correspondiente al tratamiento de los cultivos celulares con las mismas concentraciones del EAC ensayadas en el punto anterior. La **Tabla 6** expone dichos resultados.



Tabla 6: Viabilidad porcentual de células Vero tratadas con distintas concentraciones de EAC de *Baccharis articulata*, determinada por captación de RN.

EAC ($\mu\text{g/ml}$)	D.O.* (540 nm)			Viabilidad celular				
				Porcentajes			Promedio	\pm DS
Control	1,123	1,138	1,127	99,47	100,8	99,8	100	0,69
300	1,016	1,029	1,064	89,99	91,14	94,24	91,8	2,19
400	1,030	0,928	1,222	91,23	82,19	108,24	93,8	13,22
500	0,745	0,760	0,867	65,98	67,32	76,79	70	5,89
600	0,685	0,719	0,647	60,67	63,68	57,30	60,5	3,19
700	0,610	0,668	0,676	54,03	59,17	59,87	57,7	3,18
850	0,263	0,346	0,504	23,29	30,64	44,64	32,8	10,84
1000	0,143	0,147	0,159	12,66	13,02	14,08	13,2	0,73

*: Densidad óptica.

Se observa que a concentraciones de 300 y 400 $\mu\text{g/ml}$ de EAC, la mayor parte de las células del cultivo permanecieron viables.

Por otro lado, los resultados de los tratamientos celulares con EAC mostraron un aumento de toxicidad a medida que se incrementó la concentración del extracto, es decir hubo una correlación dosis-respuesta.

5.4.2.1. Cálculo de la Concentración Citotóxica 50% (CC_{50})

Los resultados expuestos en la **Tabla 6** fueron sometidos a un análisis estadístico y permitieron construir la gráfica de viabilidad celular porcentual en función de las diferentes concentraciones ensayadas para el extracto vegetal (**Gráfica 1**). A partir de la misma, se determinó la concentración citotóxica 50% (CC_{50}) cuyo valor fue de 718 $\mu\text{g/ml}$ que por definición, es la concentración de EAC de *Baccharis articulata* que ejerce un efecto nocivo en el 50% de todas las células tratadas.

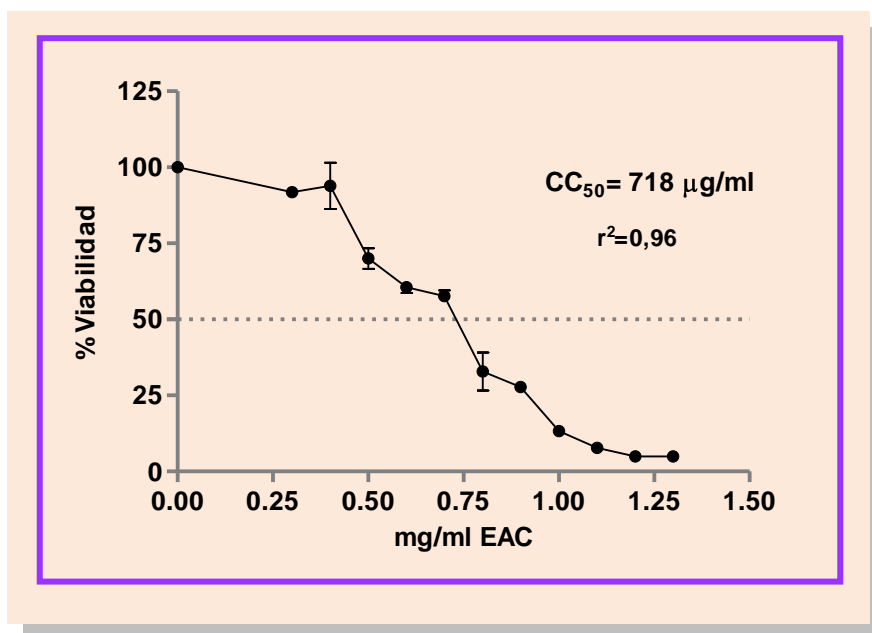


Gráfico 1: Citotoxicidad % de EAC de *B. articulata* por RN.

En estudios de citotoxicidad realizados por el método de captación de rojo neutro, *Boris y colaboradores* (2.009) demostraron una CC_{50} de 354 $\mu\text{g/ml}$ para el EAC de *Baccharis crisper* en células Vero.

Por otro lado, *Schnitzler y colaboradores* (2.008), mediante el mismo método, evaluaron la citotoxicidad de extractos acuosos de *Salvia officinalis* (Lamiaceae) proveniente de dos zonas montañosas del sur de Alemania, Garden y Swabian, e informaron valores de CC_{50} de 499 $\mu\text{g/ml}$ y 630,5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Betancur Galvis y colaboradores (1.999) determinaron un valor de CC_{50} de 7,1 $\mu\text{g/ml}$ para el extracto acuoso de *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae).

El análisis comparativo de los resultados de CC_{50} anteriormente expuestos con el aquí informado, manifiesta que el EAC de *B. articulata* analizado en este trabajo final resultó menos tóxico que los extractos acuosos de las demás especies vegetales evaluadas por otros investigadores.

En la evaluación de la citotoxicidad ejercida por el EAC de *B. articulata* se establece que para la MCNC de 600 $\mu\text{g/ml}$ se corresponde a un 60% de viabilidad celular determinada por el método de captación de rojo neutro. Esto demuestra que la observación microscópica de la morfología normal de los cultivos tratados con el EAC se debe a que no hubo alteración de la membrana celular, pero que a esa

concentración sí se afectó la actividad en el lisosoma. Por lo tanto, se puede interpretar que el EAC de *B. articulata* afectaría en principio el metabolismo celular antes que la estructura de la membrana.

5.5. Evaluación de la actividad antiviral del EAC durante la etapa de adsorción y/o penetración viral

5.5.1. Determinación por reducción del número de placas de lisis

Para cumplir este objetivo monocapas de células Vero fueron infectadas con virus *Herpes suis tipo 1* en presencia de distintas concentraciones de EAC tal como se detalla en el apartado 4.5.1. Transcurrido el período de incubación, se determinó la actividad antiviral mediante la reducción del número de placas de lisis de los cultivos tratados respecto al número de placas de los cultivos controles.

En la **Figura 11** se muestran las placas de lisis obtenidas en los controles virales y las correspondientes a los cultivos tratados con la muestra vegetal.

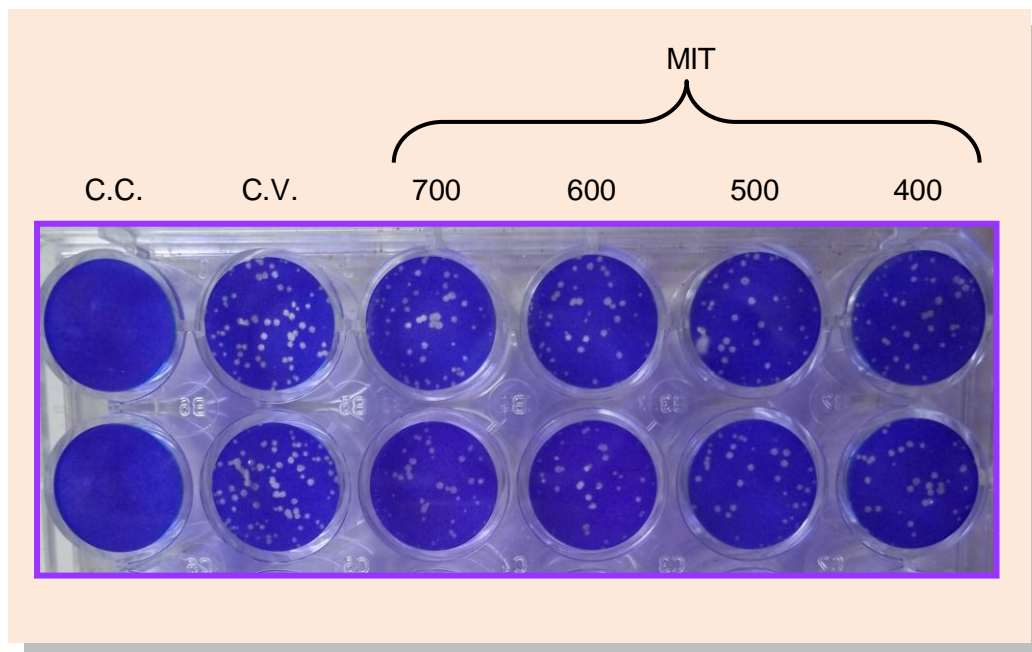


Figura 11: Actividad antiviral de EAC de *Baccharis articulata* frente al virus *Herpes suis tipo 1*, determinada por reducción del número de placas de lisis en células Vero. CC: Controles celulares, CV: Controles virales, MIT: Monocapas infectadas y tratadas con concentraciones de extracto (700- 400 µg/l).



En la **Tabla 7** se presentan los resultados porcentuales de actividad antiviral (según apartado 4.5.3) obtenidos en cada uno de los tratamientos descriptos anteriormente.

Tabla 7: Porcentajes de inhibición del virus *Herpes suis* tipo 1 a diferentes concentraciones del EAC de *B. articulata*, durante la adsorción y /o penetración.

EAC (µg/ml)	Inhibición viral (%)		Promedio	± DS
400	44,19	44,85	44,52	0,47
500	51,94	57,14	54,54	3,68
600	46,32	57,14	51,73	7,65
700	54,16	52,54	53,57	1,14

Como puede observarse, concentraciones superiores o igual a 500 µg/ml del extracto acuoso caliente inhiben al menos un 50% la replicación del virus *Herpes suis* cuando dicho extracto es incorporado junto con el virus en el cultivo celular.

Es posible cotejar este resultado con el obtenido por *Torres C.* (2.013), quien a partir de la misma especie vegetal con igual procedencia y período estacional de recolección, estudió la capacidad inhibitoria del extracto acuoso frío en el mismo sistema célula - virus e informó sólo un 25% de inhibición viral del extracto a una concentración de 1000 µg/ml, empleando la misma metodología. El análisis comparativo indica que el EAC demostró ejercer mayor poder antiviral que el EAF de *B. articulata* en las condiciones ensayadas.

Resultados similares al determinado en este trabajo final han sido publicados por *Abad y col.* (1.999), quienes demostraron que el extracto acuoso de otra especie de *Baccharis* (*B. genistelloides*) redujo un 50% la multiplicación de un virus *Herpes* (*H. simplex* tipo 1) cuando el mismo fue adicionado al cultivo ya infectado.

Zanon y col. (1.999) informaron que extractos etanólicos de 9 de 13 especies vegetales estudiadas, inhibieron en más de un 99% la replicación del virus *Herpes suis* tipo 1 incluyendo la especie *B. articulata*. Este porcentaje que es mayor al determinado



en este trabajo podría atribuirse al método extractivo empleado para la preparación de la muestra vegetal, a la concentración de extracto empleado (2200 vs. 600 µg/ml) y a que las células fueron tratadas luego de haber sufrido la infección con el virus.

Es importante destacar que en las investigaciones realizadas por *Abad y col.*, y *Zanon y col.*, las muestras vegetales fueron incorporadas al sistema celular luego de la infección viral deduciendo que las mismas podrían llegar a inhibir alguna/s etapas del ciclo replicativo viral que acontecen intracelularmente. Por el contrario, en este trabajo final, el extracto estuvo en contacto con la célula solamente durante la adsorción y penetración viral lo que lleva a pensar que la acción inhibitoria se ejercería en dicha etapa, hipótesis avalada por la escasa actividad inhibitoria (6,8%) que manifestó este extracto sobre etapas posteriores a la adsorción y penetración viral, [Torres C., 2.013].

La literatura cita varias especies vegetales de diferentes grupos taxonómicos cuyos extractos inhiben la replicación de otros herpesvirus. Como ejemplo se puede mencionar a *Zambrana Santander S.*, (2.007) quien demostró que el extracto acuoso de *Opuntia soehrensii* (Cactaceae) disminuye en un 35% la replicación del virus *Herpes simplex tipo 2* en la línea celular BHK-21 (fibroblastos provenientes de riñón de hámster) cuando la muestra vegetal es incorporada durante la adsorción viral. Este grado de actividad antiviral fue determinado a una concentración de 21 mg/ml, valor muy superior a los empleados en este trabajo final.

Si bien estudios previos [Torres C., 2.013] demostraron que el EAC de la especie ensayada ejerce una acción inhibitoria del 6,8% sobre etapas posteriores a la adsorción y penetración viral, los resultados obtenidos en este trabajo final indicaron que dicho extracto (obtenido de plantas recolectadas en igual época estacional y en el mismo lugar) ejerce una mayor actividad inhibitoria (50%) sobre el virus *Herpes suis tipo 1* cuando el mismo es incorporado de manera simultánea con el agente viral.

5.5.2. Determinación por reducción de la producción viral

Otra metodología empleada para evaluar la acción inhibitoria del extracto sobre el virus *Herpes suis* consistió en la cuantificación de la reducción en el rendimiento viral. Para ello cultivos confluentes de células Vero fueron infectados con virus en presencia de extracto. Transcurridas 48 horas de incubación en MM sin extracto, se realizó la cosecha viral y el sobrenadante obtenido (producción viral) se cuantificó por recuento de placas de lisis, según lo indicado en el apartado 4.5.2. Tal como se menciona en la



sección métodos, los estudios se realizaron empleando diferentes concentraciones de extracto y de virus.

A partir de los títulos virales obtenidos, de acuerdo al apartado 5.2.2., se calcularon los valores porcentuales de inhibición del rendimiento viral, los cuales se presentan en la **Tabla 8**. Estos resultados permitieron construir el **Gráfico 2**.

Tabla 8: Porcentajes de inhibición del rendimiento de *Herpes suis* tipo 1 a diferentes moi por el EAC de *B. articulata*.

MOI	EAC (µg/ml)	Inhibición del rendimiento viral (%)		Promedio	± DS
0,1	550	84,07	53,06	68,56	21,92
	700	57,52	63,26	60,39	4,05
0,01	550	96,11	97	96,55	0,62
	700	99,68	98,38	99,03	0,91

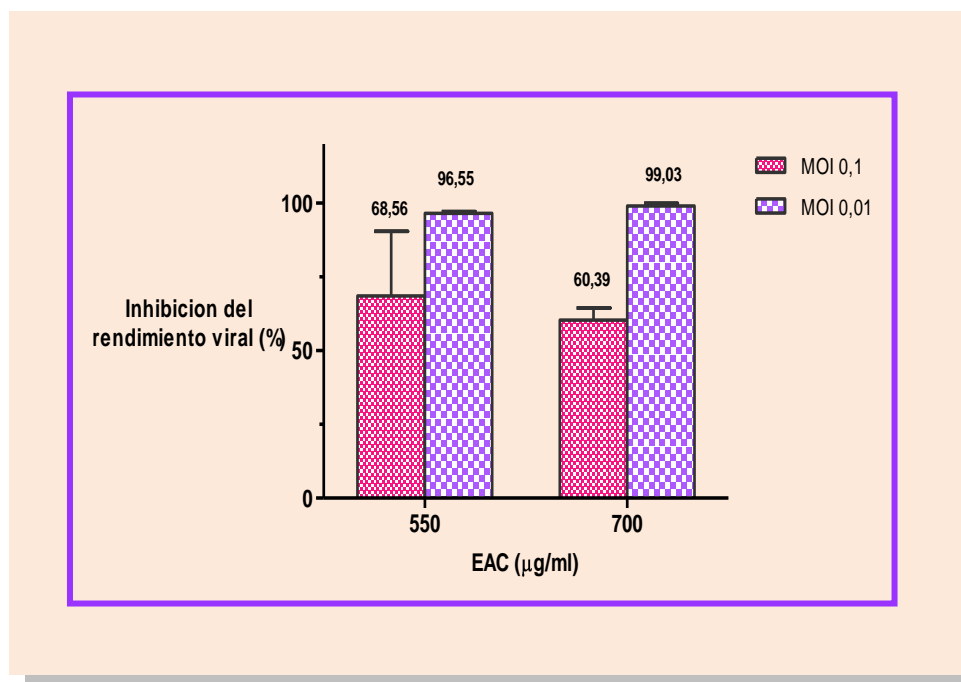


Gráfico 2: Porcentaje de inhibición del rendimiento del virus *Herpes suis* tipo 1 tratado con el EAC de *B. articulata*.



Tal como se observa en la **Tabla 8** y en el **Gráfico 2** y como era de esperar, el extracto a una misma concentración redujo en mayor grado la producción viral cuando la dosis de virus empleada fue menor. También se mostró una mayor inhibición cuando la concentración de extracto fue mayor para una misma dosis de virus. Esta situación fue también informada por *Pujol y colaboradores*, (1.995), quienes comprobaron que cuando se inoculaba el sistema celular con mayores dosis virales y en presencia del compuesto antiviral, se requería mayor concentración del compuesto para inhibir la replicación del virus.

Si bien una concentración de 700 µg/ml del EAC inhibió un 99,03% la producción viral cuando la *moi* fue de 0,01, dicha dosis no podría llegar a utilizarse para reducir la multiplicación del virus ya que es superior a la MCNC (600 µg/ml) que soporta el sistema celular Vero y a su proximidad con la CC_{50} (718 µg/ml), valores determinados a las 72 h de exposición. Como consecuencia, el tratamiento del cultivo celular por 72 h con esta concentración de extracto modificaría su morfología y más aún comprometería la fisiología normal en un 50% de la monocapa por lo que la reducción en el título viral no reflejaría la acción directa del extracto sobre la multiplicación viral sino que se debería a la disminución en la viabilidad celular de la monocapa, lo que se traduce como menor disponibilidad de sustrato celular. Dicho de otra manera, para un tratamiento prolongado, es decir de 72 horas, una concentración de 550 µg/ml de EAC de *B. articulata* inhibiría la producción viral alrededor del 95% para una *moi* de 0,01 y la ausencia de toxicidad sobre el cultivo celular justificaría su empleo. La **Figura 12** exhibe la reducción en la producción viral (titulada por recuento de placas de lisis) por el EAC a 550 µg/ml.

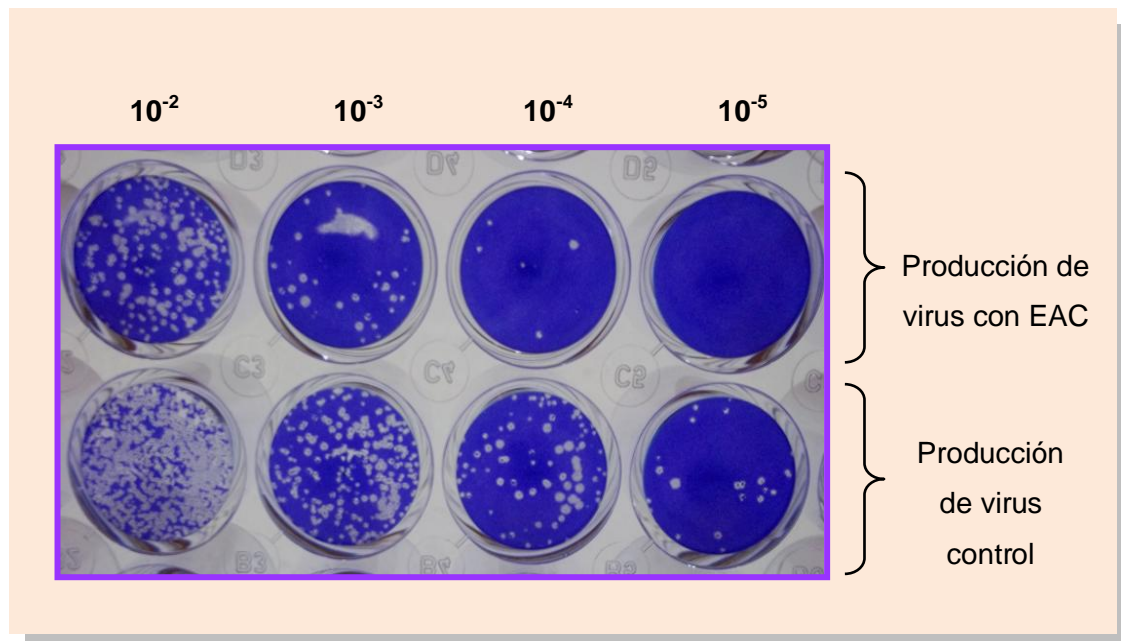


Figura 12: Actividad antiviral de EAC de *Baccharis articulata* (550 µg/ml) frente al virus *Herpes suis* tipo 1 (moi de 0,01), determinada por reducción de la producción viral.

En esta instancia es importante realizar un análisis comparativo entre las dos metodologías empleadas para la determinación de la actividad antiviral del EAC. A tal efecto, la **Tabla 9** presenta los resultados logrados por el extracto a 700 µg/ml, cuando el mismo fue utilizado conjuntamente con el virus a diferentes multiplicidades de infección.

Tabla 9: Acción inhibitoria del EAC (700 µg/ml) de *B.articulata* sobre el virus *H. suis* (distintas moi) determinada por diferentes metodologías.

Método de cuantificación	Multiplicidad de infección	Inhibición porcentual
Recuento de placa de lisis	0,0006	53,57
Producción viral	0,01	99,03
	0,1	60,39



Por reducción del número de placa de lisis para una moi de 0,0006 y una concentración de 700 $\mu\text{g/ml}$ del material vegetal, la multiplicación viral se redujo en un 53%; en cambio la misma concentración de extracto, por ensayo de reducción de la producción viral, para una moi de 0,01 y 0,1 ejerció una inhibición del rendimiento viral superior a este valor aún cuando la dosis de virus fue 150 veces mayor.

El ensayo de reducción en la producción viral es una medida más rigurosa que el ensayo de reducción del número de placas, ya que la capacidad del compuesto de interferir con la replicación viral durante un período prolongado de infección, que comprende varios ciclos de multiplicación viral se correlacionaría mejor con la probable eficacia del compuesto en un tratamiento *in vivo*, [Pujol y col., 1.995]. No obstante, para determinar la Concentración Efectiva 50% se empleó el ensayo de reducción de placas de lisis debido a que es una técnica utilizada de rutina por ser menos laboriosa de llevar a cabo y demandar menos tiempo que la otra metodología.

5.5.3. Determinación de la Concentración Efectiva 50% (CE_{50})

Los diferentes porcentajes de inhibición viral obtenidos como se indicó en el apartado 5.5.1, permitieron realizar el **Gráfico 3**, a partir del cual se calculó por intrapolación la CE_{50} del EAC de *B. articulata*.

La CE_{50} es un parámetro que define la concentración del material en estudio (extracto acuoso) que reduce la multiplicación viral (número de UFP) a un 50% con respecto al control viral.

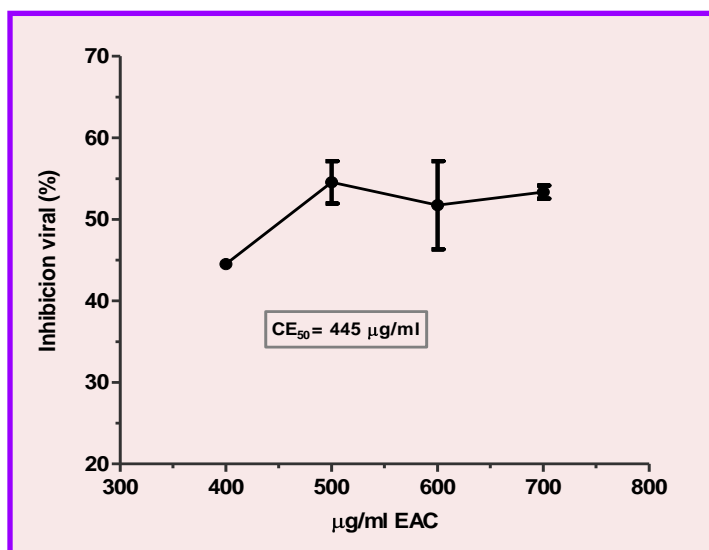


Gráfico 3: Concentración Efectiva 50% de EAC de *B. articulata* frente al virus *H. suis* tipo 1.



A partir del **Gráfico 3** obtenido anteriormente, se obtuvo el valor de CE_{50} el cual fue de 445 $\mu\text{g/ml}$ para el EAC de *B. articulata*. El análisis estadístico de los datos utilizados para la construcción de la curva reveló un valor de $R^2=0,97$ validando el ensayo, indicando correlación entre valores de abscisas y ordenadas y certificando el valor de CE_{50} determinado. Puede notarse también en la curva y de forma llamativa que después de una determinada concentración (500 $\mu\text{g/ml}$) un aumento en la cantidad de EAC utilizado no modificó la infectividad viral, revelando que a partir de dicha concentración hubo ausencia de relación dosis-respuesta. Se desconocen la identidad química del compuesto o los compuestos del EAC que estarían impidiendo la adsorción y/o penetración del virus a la célula y también su mecanismo de acción. No obstante, se podría especular que tal vez el fenómeno de inhibición de la adsorción viral podría estar aconteciendo por ocupación estérica de los receptores celulares para el virus, y que a una determinada concentración de extracto serían totalmente bloqueados por lo que un incremento de la cantidad de la muestra vegetal ya no influiría en el proceso de inhibición viral.

Resultados semejantes a la CE_{50} obtenida en este trabajo fueron reportados por *Betancur Galvis y colaboradores* (1.999), quienes hallaron un valor de 480 $\mu\text{g/ml}$ para el extracto acuoso de *Beta vulgaris* (Amaranthaceae), frente al virus *HSV-2*. En relación a valores obtenidos con extractos acuosos procedentes de especies vegetales de la familia Asteraceae y del género *Baccharis*, *Montanha y col.*, (2.003), determinaron para el extracto acuoso de *B. erioclada* una CE_{50} de 1250 $\mu\text{g/ml}$ frente al virus *HSV-1*. Por otro lado *Visintini y col.*, (2.009), demostraron que el extracto acuoso de *B. gaudichaudiana* resultó ser activo contra los virus *HSV-1* y *HSV-2* con valores de CE_{50} de 17,1 y 18 mg/ml respectivamente. El análisis comparativo de la CE_{50} (445 $\mu\text{g/ml}$) hallada para *B. articulata* con los valores determinados para otras especies vegetales frente a herpesvirus refleja que para ejercer el mismo grado de acción antiherpética se requiere una concentración mucho más baja que para los otros extractos.



5.5.4. Cálculo del Índice de Selectividad

El cociente CC_{50} / CE_{50} indica la relación que existe entre la acción tóxica que ejerce un determinado compuesto sobre un sistema celular y la capacidad del mismo para inhibir al virus en estudio. Este valor es imprescindible para establecer la toxicidad selectiva de un nuevo agente antiviral.

El valor de citotoxicidad (CC_{50}) para este extracto mediante la captación de Rojo Neutro fue de 718 $\mu\text{g/ml}$. Dicho valor fue superior a la concentración efectiva 50% del EAC (445 $\mu\text{g/ml}$) frente al virus *Herpes suis*, determinando un IS de 1,61. Aunque este IS es escasamente superior a 1, es relevante ya que indica selectividad de acción antiviral.

El resultado en sí mismo es sumamente importante ya que constituye el primero reportado en estudios antiherpéticos de esta especie que le atribuyen potencial antiviral. La bibliografía consultada señala que diferentes especies del género *Baccharis* (*B. erioclada*, *B. megapotamica* y *B. uncinella*) poseen actividad inhibitoria frente al virus *HSV-1* cepa Kos sin embargo esta capacidad no fue demostrada para *B. articulata*, [Montanha y col., 2.004].

Los estudios realizados por Arboleda y colaboradores (2.007), demostraron que los extractos acuosos de las especies *Caryodendron orinocense* y *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) presentan un IS de 1 contra el virus *Herpes Bovino tipo 1*. El valor del IS de *B. articulata* hallado en esta tesina es superior e indica que el EAC de la especie estudiada sería terapéuticamente más eficaz.

De acuerdo a los datos obtenidos en este Trabajo Final el EAC de *B. articulata* es efectivo para inhibir la replicación del virus *Herpes suis tipo 1* en la primera etapa de la replicación viral y en concentraciones no citotóxicas.



6. CONCLUSIONES

- Las condiciones experimentales ensayadas resultaron ser las adecuadas para obtener una monocapa confluyente de la línea celular Vero y mantener los cultivos celulares con su morfología característica por un período prolongado de tiempo.
- La amplificación del virus *Herpes suis tipo 1* cepa RC/79 en células Vero fue exitosa ya que se observó el efecto citopático típico sobre el cultivo celular y se logró un título viral adecuado, según lo establecido, para los ensayos de actividad antiviral.
- La MCNC del EAC, determinada por observación microscópica de los cultivos tratados, demostró la escasa toxicidad del extracto en el sistema celular Vero.
- El valor de CC_{50} determinado por la técnica de captación de Rojo Neutro demostró nuevamente la escasa toxicidad del EAC de *B. articulata* en la línea celular.
- Los valores de MCNC y CC_{50} revelaron una mayor sensibilidad del lisosoma que de la membrana citoplasmática de las células tratadas con EAC de *B. articulata*.
- Los estudios de citotoxicidad permitieron establecer la concentración adecuada del EAC de *B. articulata* a utilizar en los ensayos de actividad antiviral en la etapa de adsorción y penetración viral.
- El EAC de *B. articulata* empleado a concentraciones no citotóxicas presentó mayor grado de acción inhibitoria durante la etapa de adsorción y penetración viral que otros extractos de su especie.
- La inhibición de la producción viral ejercida por el EAC de *B. articulata*, a concentraciones no citotóxicas y durante la etapa de adsorción y penetración viral, es dependiente de la multiplicidad de infección.
- Los resultados alcanzados en este Trabajo Final avalan la potencial actividad fitoterápica antiherpética del EAC de *Baccharis articulata*.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abad, M. J.; Bermejo, P.; Gonzáles, E.; Iglesias, I.; Irurzun, A.; Carrasco, L. 1.999. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology*. **32** (4): 499-503.
2. Aguilar, M.; Michelli, P. 2.008. Revisión sobre el estado actual de Drogas Antivirales. *Revista de la Sociedad Médico-Quirúrgico del Hospital de Emergencia Pérez de León*. **39** (1): 1-10.
3. Alonso, J.; Desmachelier, C. 2.006. Carqueja. Cap. 22.:127-135. En Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en la atención primaria de la salud. Editorial Fitociencia. Buenos Aires. Argentina.
4. Alonso, J. 2.002. Plantas medicinales empleadas por los indígenas del NOA (Noroeste Argentino). Sitio en internet: www.plantasmedicinales.org
5. Ambrogi, A.; Giraud, J.; Busso, J.; Bianco, O.; Bagnat, E.; Segura de Aramburu, M.; Ramos, B.; Ceriatti, F. 1.981. Primer diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky en cerdos en la República Argentina. *Gaceta Veterinaria*. Buenos Aires. **43** (357): 58-64.
6. Andrei, G.; Coto C. E.; De Torres, R. 1.985. Ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral de extractos crudos y semipurificados de hojas verdes de *Melia azedarach*. *Revista Argentina de Microbiología*. **17**: 187-194.
7. Arboleda, D.; Cañas, A.; Lopez, A.; Forero, J. 2.007. Evaluación de la actividad antiviral *in vitro* de cuatro extractos de las especies *Caryodendron orinocense* y *Phyllanthus niruri* de la familia Euphorbiaceae contra los virus *Herpes bobino tipo 1* y *Herpes simplex tipo 2*. *Revista Vitae*. Colombia. **14** (1): 55-60.
8. Barreto Penié, J.; Gundián González Piñera, J.; Rodríguez Rodríguez, M. A.; Pino Alfonso, P. 1.998. Medicamentos antivirales. *Acta Médica*. **8** (1): 86-100.
9. Basualdo, J. A.; Coto, C. E.; De Torres, R. 1.996. En Microbiología Biomédica. Cap. 58: 511-521. Editorial Atlante. Buenos Aires.
10. Ben Porat, T.; Kaplan, A. S. 1.973. In the *Herpesviruses*. Ed. A. S. Kaplan. *Academic Press*. New York. Page: 163-220.
11. Betancur Galvis, L. A.; Saez, J.; Granados, H.; Salazar, A.; Ossa, J. E. 1.999. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Río de Janeiro. **94** (4): 531-535.
12. Bhanuprakash, V.; Hosamani, M.; Balamurugan, V.; Gandhale, P.; Ram Naresh; Swarup, D.; Singh, R. K. 2.008. In vitro antiviral activity of plant extracts on goatpox virus replication. *Indian Journal. Experiment Biology*. **46**: 120-127
13. Borenfreund, G.; Puernen, A. 1.985. Toxicity determined in vitro by morphological alteration and RN absorption. *Toxicology Letters*. **24**: 119-124.
14. Boris, A.; Rivarola, M.; Konigheim, B.; Aguilar, J.; Contigiani, M. 2.009. Evaluación de la actividad antiviral de extractos acuosos de *Baccharis crispa sreng*. X Jornadas de investigación



- científica, Secretaría de Ciencia y Tecnología. II Jornadas científicas en modalidad seminario. Instituto de Virología Dr. N. M. Vanella. Córdoba.
15. Cañigual, S.; Vila, R. 2001. Principios de la Fitoterapia. **Vol. 1**:173-193. En *Plantas medicinales y Fitoterapia*. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid.
 16. Cañigual, S.; Vila, R. 1998. Fitoterapia: conceptos y límites. Fuentes de información. Pág.: 23-30. En *Fitoterapia: Vademecum de prescripción*. 3^o ed. Editorial Masson. Barcelona.
 17. Carballal, G.; Oubiña, J. 1998. Familia Herpesviridae. Cap. 19: 327-338. En *Virología Médica*. 3^o ed. Editorial El Ateneo. Buenos Aires. Argentina.
 18. Cazes Camarero, P. L. 2003. Asteraceae biodinámicas del herbario del Museo Juan A. Domínguez. *Dominguezia*. **19**. Nº 1.
 19. Cedeño, I.; Rolo, M.; Palencia, L.; López, N. 1998. Susceptibilidad de cinco líneas celulares estables al virus de la pseudorrabia. *Revista Científica FCV-LUZ*. **8** (1): 77-84.
 20. Chiba, K.; Kawakami, K.; Tohyama, K. 1998. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in vitro*. **12**: 251-258.
 21. Coelho, M. G. P.; Reis, P. A.; Gava, V. B.; Marques, P. R.; Gayer, C. R.; Laranja, G. A. T.; Felzenswalb, I.; Sabino, K. C. C. 2004. Anti-arthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. *Toxicology Letters*. **154**: 69-80.
 22. Cowan, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiological Reviews*. **12** (4): 564-582.
 23. Debenedetti, S; Miño, J; Rojo, A.; Acevedo, C. 2000. Ensayo del efecto diurético de los extractos acuosos de *Amaranthus muricatus* (Moquin) Gill. Ex Hicken, *Bauhinia candicans* Benth. y *Smilax campestris* Griseb. *Acta Farmacológica Bonaerense*. **19** (1): 17-20.
 24. Del Barrio Alonso, G.; Álvarez Rodríguez, A.; Valdés García, S. M.; Parra Fernández, F. 2008. Metodología de pesquisa preclínica de actividad antiherpesvirus a partir de productos naturales. *Revista Cubana Farm*. **Vol. 42**.
 25. De Oliveira, S. Q.; Dal Pizzol, F.; Gosmann, G.; Guillaume, D.; Moreira, J. C.; Schenkel, E. 2003. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of new compound with antioxidant activity. *Free Radical Research*. **37** (5): 555-9.
 26. Dulbecco, R. 1962. Production of plaques in monolayer tissue culture by single particles of an animal virus. *Proceeding National Academic Science. USA*. **38**: 747-752.
 27. Echeverría, M. G.; Nosetto, E. O. 2000. Actualización en enfermedad de Aujeszky. *Analecta Veterinaria*. **20** (2): 22-30.
 28. Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.
 29. Field, H. J.; Whitley, R. J. 2005. Antiviral chemotherapy. In: Mahy, B.W.J., Ter Meulen, V. (Eds.), *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Vol. 2, 10th Editorial Hodder & Arnold. **69**: 1.605-1.645.
 30. Freire, S. E.; Urtubey, E.; Giuliano, D. A. 2007. Epidermal characters of *Baccharis* (Asteraceae) species used in traditional medicine. *Caldasia*. **29** (1): 23-38.



31. García, G.; Campos, R.; De Torres, R.; Broussalis, A.; Ferraro, G.; Martino, V.; Coussio, J. 1.990. Antiherpetic Activity of some Argentine Medicinal Plants. *Fitoterapia*. **61** (6): 541-546.
32. Giménez Arnau, A.M. 1.992. Agentes antivirales. Conceptos actuales y prácticas aplicables a la dermatología. *Molecular Biother*. **4**: 87-94.
33. Gong, Y.; Raj, K.; Luscombe, C.; Gadawski, Y.; Tam, T.; Chu, J.; Gibson, D.; Carlson, R.; Sacks, S. 2.004. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*. **64**: 127-130.
34. González González, R. L.; Quintero, A. R.; Díaz L. M.; Rodríguez, Lay L. 2.006. Evaluación de la actividad antiviral de plantas medicinales frente al virus de la hepatitis B (VHB) en células PLC/PRF/5. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. **58** (2).
35. Hayashi, K.; Hayashi, M.; Arisawa, M.; Morita, N. 1.993. Antiviral agents of plant origin. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. **4** (1): 49-53.
36. Hsiung, G.; Fong, K. Herpesviridae. 1.982. Part 3. Recognition and characterization of viruses by virus morphology and virus-induced cellular changes. RNA viruses. Chapter 12: 89-108. In *Diagnostic Virology*. 3º ed. Yale University Press New Haven and London.
37. Hudson, J. 1.990. Antiviral compounds from plants. CRC Press, Florida, pp 43-51.
38. Jagadeeswaran, R.; Thirunavukkarasu, C.; Gunasekaran, P.; Ramamurty, N.; Sakthisekaran, D. 2.000. In vitro studies on the selective cytotoxic effect of crocetin and quercetin. *Fitoterapia*. **71** (4): 395-399.
39. Jassim, S.; Najji, M. 2.003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal Applied Microbiology*. **95** (3): 412-427.
40. Koh, G; Chou, G; Liu, Z. 2.009. Purification of a water extract of Chinese sweet tea plant (*Rubus suavissimus* S. Lee) by alcohol precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57** (11): 5.000–5.006.
41. Laboratorio de Productos Naturales pertenecientes a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador. Sitio en internet: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/1226/1/T-ESPE-025146.pdf>
42. Lennette, E.; Schmit, N. 1.979. Diagnostic procedures for Viral, *Rickettsial* and *Chlamydial* infections. 5th ed. American Public Health Association, Inc. Washington D.C.
43. Li, Y.; Ma, S.; Yang, Y.; Ye, S.; But, P. 2.002. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. *Journal of Ethnopharmacology*. **79**: 365-368.
44. Mangiaterra, P. A. 2.005. Evaluación de parámetros botánicos y fitoquímicos para el control de calidad de “carqueja”. Tesina. Universidad de Belgrano. Buenos Aires. Argentina.
45. Marín Ocampo, A. M.; López Zuluaga, C. A.; Pérez Cardenas, J. E.; Isaza Mejia, G. 2.006. Actividad antifúngica de los extractos acuosos de *Baccharis trinervis*, *Baccharis latifolia* y *Solanum dolichosepalum*. *Biosalud*. **5**: 51-59.
46. Matulewicz, M. C.; Damonte, E. B. Perspectivas de los polisacáridos sulfatados de algas marinas como agentes antivirales. Sitio en internet: www.aqa.org.ar/iyq354.html



47. Microbiología e Inmunología on line, herpesvirus, Richard Hunt.
48. Mongelli, E.; Desmarchelier, C.; Rodríguez Talou, J.; Coussio, J.; Ciccía, G. 1.997. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis cardiofolia* DC. *Journal of Ethnopharmacology*. **58**: 157-163.
49. Montanha, J; Moellerke, P; Bordignon, S; Schenkel, E; Roehe, P. 2.004. Antiviral activity of Brazilian plant extracts. *Acta Farmacologica Bonaerense*. **23** (2): 183-6.
50. Monteiro, M; Gomes Carneiro, M; Felzenszwalb, I; Chahoud, I; Paumgartten, F. 2.001. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensate*. *J. Ethnopharmacology*. **74**: 149–157.
51. Morales Segura, M.; Morales Montecinos, J. 2.009. Plantas medicinales, fitofármacos y fitomedicamentos. Sitio en internet: <http://es.scribd.com/doc/159892130/Plantas-Medicinales-Fitofarmacos-y-Fitomedicamentos>
52. Núñez, C.; Cantero, J. 2.000. Las plantas medicinales del sur de la provincia de Córdoba. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto.
53. Ooi, L.; Wang, H.; Luk, C.; Ooi, V.; 2.004. Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L) DC (Asteraceae, Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*. **94**: 117-122.
54. Palacios, P. S.; Wilson, E. G.; Debenedetti, S. L. 1.999. Análisis por HPLC de ácidos cafeilquínicos presentes en tres especies de *Baccharis*. *Dominguezia*. **15**. Nº 1.
55. Pujol, C. A.; Coto, C. E.; Damonte, E. B. 1.995. Determinación de la actividad de un xilomanano sulfatado de origen natural en distintas condiciones experimentales. *Revista Argentina de Microbiología*. **27**: 91-98.
56. Rajbhandari, M. Wegner, U.; Jülich, M.; Schöpke, T; Mentel, R. 2.001. Screening of Nepalese medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **74**: 251-255.
57. Rangel, D.; García, I.; Velasco, J.; Buitrago, D.; Velasco, E. 2.001. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nítida*. *Revista de la Facultad de Farmacia*. **Vol. 42**.
58. Ratera, E. L.; Ratera, M. O. 1.980. Su empleo en la antigüedad. Cap. 1:12-20. En *Plantas de la Flora Argentina empleadas en la medicina popular*. 1^{ra} edición. Editorial. Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina.
59. Ruíz, J.; Jaime, J.; Vera, V. 2.008. Latencia del Herpesvirus Bovino tipo 1: El papel de los transcritos relacionados con latencia. *Acta biológica Colombiana*. **Vol 13**. Nº 1.
60. Sabini, L. I. 1.996. Caracterización del virus de la enfermedad de *Aujeszky cepa RC/79*: estudios dirigidos al control y erradicación de la enfermedad. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Río Cuarto.
61. Sabini, L.; Zanon, S. 2.005. Manual de prácticas básicas para el manejo adecuado de muestras virales en el laboratorio. Editorial Fundación Univ. Nac. de Río Cuarto.
62. Sagrera Ferrandiz, J. 1.993. Plantas medicinales. Historia de las plantas medicinales. Editorial Iatro.



63. Sánchez Palomino, S.; Abad, M. J.; Bedoya, L. M.; García, J.; Gonzáles, E.; Chiriboga, X.; Bermejo, P.; Alcamí, J. 2002. Screening of South American Plants against Human Immunodeficiency Virus: Preliminary Fractionation of Aqueous Extract from *Baccharis trinervis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **25 (9)**: 1.147-1.150.
64. Schnitzler, P.; Nolkemper, S.; Stintzing, F. C.; Reichling, J. 2008. Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. *Phytomedicine*. **15**: 62-70.
65. Seth, R.; Yang, S.; Choi, S.; Sabeen, M.; Roberts, E. 2004. In vitro assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, Hep G2. *Toxicology in Vitro*. **18**: 501-509.
66. Shtukmaster, S; Ljubuncic, P; Bomzon, A. 2010. The effect of an aqueous extract of *Teucrium polium* on glutathione homeostasis *in vitro*: A possible mechanism of its hepatoprotectant action. *Advances in Pharmacological Sciences*. Article ID 938324, 7 pages doi:10.1155/2010/938324.
67. Solbay Agudelo Gómez, L.; Gómez Ríos G. A.; Durán García D. C.; Stashenko E.; Betancur Galvis L. 2010. Composición química y evaluación de la actividad antiherpética *in vitro* de aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown y sus componentes mayoritarios. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*. **Vol. 42**. Nº3.
68. Taborda, N. A.; Acevedo, I.Y.; Patiño, C. P.; Forero, J. E.; López Herrera, A. 2007. Actividad antiviral *in vitro* de extractos de *Hura crepitans* y *Codiaeum variegatum* en la replicación de herpes virus bovino tipo-1 y virus de estomatitis vesicular. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. **20**: 241-249.
69. Tapia, A.; Rodríguez, J.; Theoduloz, C.; López, S.; Egly Feresin, G.; Schmeda-Hirschmann, G. 2004. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology*. **95**: 155-161.
70. Torres, C. V. 2013. Propiedades citogenotóxicas y antiviral de extractos de especies del Género *Baccharis*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto.
71. Tuset, M.; Martín Conde, T.; Miró, J.; Del Cacho, E.; Alberdi, A.; Codina, C.; Ribas, J. 2003. Características de los fármacos antivirales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **21 (8)**: 433-458.
72. Vanella, J. M. 1964. Procedimientos y técnicas del laboratorio de virus. Universidad Nacional de Córdoba, Instituto de Virología.
73. Valdés García, S. M.; Álvarez Rodríguez, A.; Del Barrio Alonso, G. 2009. Los modelos animales en la evaluación preclínica de antivirales contra los virus del Herpes simple. *Revista Salud Animal*. Vol. **31(2)**: 86-92.
74. Vicent Martínez, C. 2004. Historia de las plantas medicinales. Importancia de las plantas medicinales. Principios activos. Sitio en Internet: www.botanical-online.com.



75. Visintini J.M.F.; Retta D.; Sülsen V; Muschietti L; Martino V; Campos R; Cavallaro L. 2.009. Screening de actividad antiviral en cinco especies argentinas del género *Baccharis*. XXIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología. Córdoba. Argentina.
76. Vivot Lupi, E. P.; Sánchez Brisuela, C. I.; Casik Jeifetz, F.; Sequin Acosta, C. J. 2.009. Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. *Revista Cubana de Farmacia*. **Vol. 434**. Nº 4.
77. www.homeopatia.com.mx/congreso26
78. Zambrana Santander, S. T. 2.007. Caracterización de la actividad biológica de *Opuntia soehrensii* empleado como modelo de la infección *in vitro* del virus Herpes simplex. Tesis para optar al grado de Magister *Scientiarum*. Universidad Mayor de San Andrés.
79. Zanon, S. M. 2.005. Acción antiviral de *Minthostachys verticillata*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto.
80. Zanon, S. M.; Ceriatti, F.; Rovera, M.; Sabini, L.; Ramos, B. 1.999. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **41 (2)**: 59-62.