

Actividad Antiviral asociada a una Fracción Polipeptídica obtenida de Extractos de *Melia azedarach* L.

MONICA B. WACHSMAN, GRACIELA M. ANDREI*,

MARCELO G. DAELLI*, CELIA E. COTTO**

*Cátedra de Virología, Departamento de Química Biológica,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires,
Pabellón II, Piso 4, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina*

y RAMON A. de TORRES**

*Orientación Microbiología, Depto. de Microbiología e Inmunología,
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires,
Junín 954, Buenos Aires 1113, Argentina*

RESUMEN. Extractos hidroalcohólicos de parte aérea seca de *Melia azedarach* L. (n.v. "paraíso") fueron ensayados *in vitro* frente a distintos virus animales. Tanto los extractos crudos como los semipurificados por distintos procedimientos demostraron un alto grado de actividad antiviral y baja citotoxicidad. Ensayos tendientes a caracterizar la naturaleza del principio activo sugieren que podría tratarse de una o más sustancias de naturaleza proteica.

SUMMARY: Aqueous-ethanolic extracts of aerial parts of *Melia azedarach* L. were tested against several viruses cultivated *in vitro*. Crude or partially purified plant extracts possess a potent antiviral activity as well as a low degree of cytotoxicity. Different procedures performed in order to characterize the chemical nature of the inhibitor suggest that the antiviral activity is associated with one or more polypeptides.

INTRODUCCION

Extractos hidroalcohólicos de raíz de la planta superior *Melia azedarach* (n.v.: "paraíso") oriundos del Paraguay, demostraron poseer actividad inhibitoria para un amplio espectro de virus animales cultivados *in vitro*¹.

La necesidad de encarar estudios de aislamiento y purificación del principio activo y extender el hallazgo a plantas de otras zonas nos llevó a recolectar la parte aérea de *Melia azedarach* de parques y calles de la ciudad de Buenos Ai-

res. Los resultados obtenidos con este material se describen en este trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal. Se colectaron las partes aéreas (hojas y ramas) de árboles de paraíso de la ciudad de Buenos Aires y sus alrededores (zonas de Palermo y San Isidro) durante el mes de noviembre de 1982.

Extracción del principio activo. Hojas, ramas y tallos fueron lavados exhaustivamente, secados a 37°C y

PALABRAS CLAVE: Actividad antiviral, planta superior, fracción polipeptídica, antiviral, *Melia azedarach*.

KEY WORDS: *Melia azedarach*, antiviral activity, antiviral plant polypeptide fraction, higher plant.

* Becario del CONICET

** Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET

pulverizados por medio de un molino de cuchillas rotativas. Sesenta gramos de este material vegetal seco se maceraron en etanol al 50 % durante 96 horas. El extracto alcohólico se filtró y el filtrado se centrifugó a 100.000 x g en un rotor SW 28 (Beckman) durante 2 horas. El sedimento se eliminó y el sobrenadante fue llevado a sequedad a 40 °C en un evaporador rotativo y disuelto en agua destilada a una concentración de 5 mg/ml constituyendo el denominado *extracto crudo*. La obtención del *extracto semipurificado* se efectuó a partir del sobrenadante (sin secar) el que se precipitó por el agregado gota a gota de dos volúmenes de alcohol absoluto y dejándolo una noche a -20 °C. El precipitado formado se separó por centrifugación a 10.000 rpm en un rotor JA 14 (Beckman) durante 1 h, posteriormente fue llevado a sequedad y se resuspendió en buffer fosfato 20 mM hasta llegar a una concentración de 100 mg/ml. La solución se llevó a pH 7, se centrifugó 50 minutos para clarificar, el sobrenadante obtenido se filtró por Millipore 0,22 micrones y se congeló a -20 °C hasta su uso. El extracto semipurificado denominado *MAsp* se utilizó en todos los experimentos.

Precipitación con sulfato de amonio. 3 ml de *MAsp* se precipitaron con sulfato de amonio sólido en forma fraccionada (de 0-30%, 30-60% y de 60 a 100%), en baño de hielo, siguiendo la técnica convencional.

Pasaje por columna de Sephadex G-25. Dos ml de *MAsp* se sembraron en una columna de Sephadex G-25 equilibrada con solución reguladora de fosfato 20 mM. La calibración de la columna se realizó con azul de dextrán y se determinó el volumen de exclusión. Como el extracto activo es coloreado

(verde-parduzco), se colectaron las fracciones coloreadas correspondientes al volumen de exclusión, las que fueron precipitadas con dos volúmenes de alcohol absoluto. El precipitado obtenido se llevó a sequedad y fue disuelto en medio de cultivo (Eagle) hasta obtener una concentración de 5 mg/ml.

Cultivos celulares. Se utilizaron células Vero (línea continua de riñón de Cercopithecus) y células BHK₂₁ clon 13 (riñón de hamster bebé). Las células se hicieron crecer en medio mínimo esencial (MEM) conteniendo 5% de suero de ternera inactivado por calor y 50 µg/ml de gentamicina. Para su mantenimiento se utilizó medio basal de Eagle conteniendo 3% de suero y antibióticos.

Virus. Se utilizaron los siguientes virus: Sindbis (cepa de origen NIH, USA) crecido en células de embrión de pollo; Herpes simple tipo 1 (HSV₁) replicado en células RK₁₃ (riñón de conejo), cepa de virus proveniente del Instituto Malbrán, Estomatitis vesicular (VSV), cepa Indiana propagada en células BHK₂₁, clon 13; Junín, cepa atenuada XJ-Cl₃; Tacaribe, cepa TRLV 11573 y Pichinde, cepa An 3739, todos propagados en cerebro de ratón lactante.

Ensayos de citotoxicidad. Se efectuaron según se describió en un trabajo anterior¹; la concentración no tóxica de *MAsp* resultó ser hasta 10 mg/ml.

Titulación de virus: Se efectuó siguiendo la técnica habitual de producción de placas bajo agar. La revelación de las placas varió según el virus; VSV y Sindbis se revelaron al 2º-3º día p.i. (post-infección), las producidas por los arnavirus Junín, Tacaribe y Pichinde al 7º día p.i. y las de HSV₁ al 6º día p.i.

Ensayo antiviral. La actividad antiviral de los distintos extractos ensayados

se probó de la siguiente manera: células Vero o BHK₂₁ se infectaron a una multiplicidad de infección de 1, independientemente del virus ensayado. Después de una hora de adsorción a 37 °C se retiró el inóculo, se lavaron las células y se incubaron con medio de Eagle conteniendo *MAsp* en una concentración de 10 mg/ml. Simultáneamente se realizaron controles sin *MAsp*. Al cabo de 24 horas (virus Sindbis, VSV o HSV₁) o de 48 horas p.i. (virus Junín, Tacaribe o Pichinde) se cosecharon los sobrenadantes, que se titularon; los títulos obtenidos se expresaron en unidades formadoras de placas por ml (UFP/ml).

RESULTADOS Y DISCUSION

Experimentos realizados con el extracto crudo de *Melia Azedarach* destinados a orientar sobre la naturaleza del principio activo antiviral indicaban que podría tratarse de una sustancia proteica, ya que su capacidad antiviral

era inhibida por tratamiento con tripsina 0,1% o por autoclavado a 120 °C por 20 min a 1 atm y era asimismo precipitable por el agregado de sulfato de amonio al 50% (datos no publicados). Por esta razón se procedió a precipitar con alcohol absoluto el sobrenadante del extracto hidroalcohólico crudo, filtrado y centrifugado, con el objeto de determinar si este procedimiento permitía concentrar el principio activo. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 1. Se puede observar que la capacidad del *MAsp* de inhibir la replicación viral resultó ser similar o mejor que la del extracto crudo descrita por nosotros anteriormente¹, resultando destacable que tanto el virus HSV como el Tacaribe fueron inhibidos en más de 4 logaritmos. La precipitación alcohólica no sólo permitió concentrar el principio activo sino que eliminó sustancias indeseables, ya que los sobrenadantes resultaron ser altamente citotóxicos.

VIRUS	CONTROL UFP/ml	TRATADO	INHIBICION %
Sindbis	4,7 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁷	92,4
Pichindé	1,5 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁵	86
Tacaribe	4,0 x 10 ⁴	< 5	> 99,99
Herpes	1,7 x 10 ⁵	< 5	> 99,99
Junín	2,3 x 10 ⁴	5,2 x 10 ³	77
VSV	1,3 x 10 ⁸	8,0 x 10 ⁶	94

Cuadro 1: Actividad antiviral del extracto de *MAsp*.

Fracción polipeptídica activa. Como la precipitación alcohólica no es selectiva para proteínas, se realizaron otros ensayos destinados a orientar sobre la naturaleza del principio activo. Con ese fin la solución de *MAsp* fue sometida a distintos tratamientos: a) precipitación fraccionada con sulfato de

amonio, b) diálisis y c) pasaje por columna de Sephadex G-25. Los resultados derivados de probar la actividad antiviral de *MAsp*, utilizando como indicador al virus Sindbis, después de sometida a los distintos tratamientos se presentan en el Cuadro 2.

TRATAMIENTO	INHIBICION * %
Ninguno	92,4
Diálisis (fracción no dializable)	96,4
Precipitación con Sulfato de amonio:	
0-30%	80,3
30-60%	93,7
60-100%	79,1
Sobrenadante	69
Pasaje por Sephadex G-25 (percolado)	91,8

* El % de Inhibición se expresa como la relación entre el número de placas producidas por el virus Sindbis (UFP/ml) en cultivos tratados con *MA_{sp}* y el título de virus producido en cultivos controles sin tratar, multiplicado por 100.

Cuadro 2. Efecto de distintos tratamientos sobre la actividad antiviral de *MA_{sp}*

Los resultados sugieren que el principio activo estaría constituido por una o varias proteínas, por tratarse de un producto no dializable, con un peso molecular mayor de 5000, ya que es excluido de la columna y que además es totalmente precipitable por el sulfato de amonio, dado que la actividad remanente del sobrenadante es despreciable. La concentración óptima para la precipitación resulta ser entre 30-60% sin embargo, no parece conveniente descartar los otros precipitados porque tienen actividad.

En la actualidad se conocen una gran variedad de sustancias antivirales derivadas de plantas. Ya en 1978 May y Willuhn² estudiaron la acción de extractos de 178 plantas diferentes contra los virus Herpes simplex, Influenza, Vaccinia y Polio. Los resultados de este estudio mostraron que por lo menos 75 de estos extractos tienen acción antiviral contra por lo menos uno de los virus ensayados. En el mismo año Van Den Berghe y col.³ hicieron un estudio

similar usando 100 extractos diferentes que fueron ensayados contra seis virus animales distintos. Ocho de estos extractos fueron activos contra por lo menos uno de estos virus. La naturaleza química de los principios activos no ha sido estudiada.

La primera especie de plantas que se demostró que tenía un inhibidor de carácter proteico (PAP) fue *Phytolacca americana*^{4,5}. Otras proteínas antivirales, similares a la de *Phytolacca* fueron descritas en *Chenopodium amaranticolor*^{6,7}, *Dianthus caryophyllus*^{9,10} y semillas de trigo¹¹.

A su vez, Babbar y col.¹² demostraron que la actividad antiviral y antitumoral de algunos de los extractos ensayados por ellos podrían estar relacionados con componentes proteicos de las fracciones solubles no dializables, sugiriendo que pudiera tratarse de proteínas de acción similar al interferón y que podrían ser designadas como interferón de plantas.

Por lo anterior, es evidente que el

conocimiento de proteínas de plantas con actividad antiviral ha aumentado considerablemente en estos últimos años. En nuestro laboratorio se está desarrollando un método de purificación a partir de material verde (húmedo) de *Melia azedarach* que permitiría confirmar o no la asociación de la actividad antiviral a un polipéptido. No sabemos aún si esta fracción polipeptídica está

relacionada con las proteínas antes mencionadas. Los primeros ensayos realizados con la misma tendientes a demostrar su mecanismo de acción (¹ y datos no publicados), indican que actuaría en forma diferente que la descrita para las proteínas PAP, ya que la fracción aislada de "paraíso" induce un estado antiviral en las células por pretratamiento que recuerda la acción del interferón.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Wachsmann, M., V. Martino, G. Gutkind, J. Coussio, C. Coto y R. A. de Torres (1982) *Fitoterapia*, 53: 167-70
2. May, V. G. y G. Willuhn (1978) *Drug Res.* 28: 1-7
3. Van Den Berghe, D. A., M., Ieven, F. Mertens y A. J. Vleitnick (1978) *Lloydia*, 41: 463-71
4. Duggar, B. M. y J. K. Armstrong (1925) *Ann. Missouri Bot. Garden* 12: 359-66
5. Wyatt, S. D. y R. J. Shepherd (1969) *Phytopathology* 59: 1787-94
6. Smookler, M. M. (1971) *Ann. Appl. Biol.* 69: 157-68
7. Grasso, S. y R. J. Shepherd (1978) *Phytopathology* 68: 199-205
8. Stirpe, F., D.G. Williams, L.J. Onyon, R.F. Legg y W.A. Stevens (1981) *Biochem. J.* 195: 399-405
9. Ragetli, H. W. J. y M. Weintraub (1962) *Virology*: 18: 232-40
10. Ragetli, H. W. J. y M. Weintraub (1962) *Virology* 18: 241-8
11. Roberts, W. K. y T. S. Stewart, (1979) *Biochemistry* 18: 2615-21
12. Babbar, O. P., S. K. Bajpai, B. L. Chowdhury y S. Khan (1979). *Indian J. Exp. Biol.* 17: 451-4