

Un extracto de *Punica granatum* L. (BLBu) sobre la apoptosis inducida por virus influenza A y B

Isis Casadelvalle Pérez, Blanca Rosario Peña,* Suria Valdés García* y Omelio Caballero Pérez.*

Dpto. de Bioquímica, *Dpto. de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25, No. 455 entre Calles J e I, El Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Código Postal 10400, Cuba.

Recibido: 5 de noviembre de 2004. Aceptado: 17 de noviembre de 2005.

Palabras clave: apoptosis, virus influenza A y B, *Punica granatum* L., extracto natural, BLBu, fragmentación del ADN.
Key words: apoptosis, influenza virus A and B, *Punica granatum* L., natural extract, BLBu, DNA fragmentation.

RESUMEN. La apoptosis ha sido ampliamente reconocida como un mecanismo intrínseco de autodestrucción en las células animales. Este fenómeno puede ser inducido por múltiples factores, entre los que se pueden citar algunos virus, que lo utilizan como vía de diseminación en el hospedero. Para contrarrestar este mecanismo se han usado extractos obtenidos de plantas con propiedades antivirales, los cuales, intuitivamente, pudieran ejercer su efecto sobre la apoptosis inducida por los virus. En el presente trabajo se estudió el efecto de un extracto natural de *Punica granatum* L. sobre la apoptosis inducida por dos virus: influenza A e influenza B en dos líneas celulares: MDCK y células Vero. Se determinó la citotoxicidad del extracto y se estimó que el valor de CC_{50} para la línea celular MDCK resulta de $(400 \pm 59) \mu\text{g/mL}$ y en las células Vero de $(137,3 \pm 23) \mu\text{g/mL}$. A concentraciones no citotóxicas el extracto no indujo la fragmentación del ADN. El efecto del extracto sobre las células infectadas con los virus influenza A/Japan/10/99(H_3N_2), influenza B/Beijing/88 fue evaluado mediante la técnica del MTT y el análisis de la fragmentación del ADN, técnicas usadas para identificar el proceso de muerte apoptótica. El proceso de apoptosis fue inhibido por el extracto a todas las concentraciones y tiempos ensayados. A partir de los resultados, se infiere la existencia de mecanismos comunes de inducción de la apoptosis por estos virus que son interferidos por el extracto natural ensayado.

ABSTRACT. Apoptosis has been recognized as an intrinsic mechanism of self destruction in animal cells. It is known that it could be induced by different factors, including some viruses which use cellular destruction as a way to spread throughout the host. To deal with this fact, several plant extracts showing antiviral effect have been used, intuitively, to block virus induced apoptosis. In the current study the effect of a natural extract of *Punica granatum* L. (BLBu) on apoptosis induced by two viruses: influenza A and B in MDCK y Vero cell lines was assayed. Cytotoxic activity of the extract was evaluated by the MTT technique, and the CC_{50} indicated a value of $(400 \pm 59) \mu\text{g/mL}$ for MDCK cells and $(137 \pm 23) \mu\text{g/mL}$ for Vero cells. The inhibition of apoptosis was determined by both MTT and DNA fragmentation assays, and the experimental design included different exposition times and concentrations of the extract in cells infected by the viruses. The results showed that apoptosis was inhibited by the action of BLBu extract at all concentrations and times for all cell lines and virus, and suggested that it is likely to interfere virus dissemination *in vivo*.

INTRODUCCION

Desde tiempos muy antiguos, las plantas han sido la principal fuente de sustancias utilizadas por el hombre para mitigar dolencias, padecimientos e infecciones, ha utilizado las raíces, cortezas, tallos, hojas, flores y frutos. Actualmente, las plantas continúan siendo empleadas como recurso en la medicina tradicional popular para la prevención y cura de muchos padecimientos y enfermedades. De ahí que el conocimiento de cómo actúan y a qué nivel celular trabajan resulta de gran importancia.

Los extractos de plantas son productos naturales con amplias potencialidades de uso como antivirales y muchas sustancias con esta propiedad evidencian que pueden inhibir o disparar los mecanismos genéticos del programa apoptótico. En particular, el proveniente de *Punica granatum* L. (granada) (BLBu) ha sido evaluado en los últimos años por el grupo de virología de la Facultad de Biología, Universidad de la Habana¹⁻³ con resultados promisorios. Es posible que su actividad antiviral posea algún efecto sobre la apoptosis inducida por determinados virus, entre ellos, los virus influenza ampliamente reconocidos como inductores de la muerte celular programada en las células hospederas.^{4,5}

Correspondencia:

Dra. Isis Casadelvalle Pérez.

Estudios recientes de sustancias naturales procedentes de plantas han indicado que muchas de ellas intervienen (estimulando o inhibiendo) en el proceso de apoptosis. El frijol de soya, el ajo, jengibre, té de hierbas verdes, así como el ácido brionolítico procedente de *Trichosanthes kirilowii* var Japonica y la alicina proveniente de *Allium sativum* son potentes inductores de apoptosis contrariamente a los efectos inhibidores que muestra el extracto proveniente de *Panax ginseng* sobre las radiaciones que inducen muerte celular programada en los folículos del cabello.⁶ Se conoce también que la cafeína, presente en el té negro y el café, es un potente inductor de apoptosis en cultivos celulares y en modelos animales *in vivo*.⁷⁻⁹ Otras sustancias de origen sintético y de amplio uso en la cura de muchas enfermedades, como la aspirina (vasodilatador por excelencia), esteroides (actividad antiinflamatoria), amantadina, rimantadina, zanamivir (antigripales), también han mostrado un efecto de inducción de apoptosis tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.¹⁰⁻¹⁴

Con estos antecedentes, el objetivo de este estudio consistió en determinar si el BLBu inhibe la apoptosis inducida por los virus influenza A y B y para ello, se procedió al estudio de citotoxicidad del extracto sobre las líneas celulares MDCK y Vero, a la evaluación de la capacidad del extracto de inducir la fragmentación del ADN genómico en las líneas celulares MDCK y Vero, al estudio de la inducción de apoptosis en las dos líneas celulares por los virus influenza A y B y la evaluación de la capacidad del extracto de inhibir la fragmentación del ADN inducida por los virus influenza A y B.

MATERIALES Y METODOS

Extracto de *Punica granatum* L.

El extracto fue obtenido a partir de frutos maduros de la especie vegetal comúnmente llamada granada, familia Punicaceae, orden Myrtales. A partir de dicho material vegetal fue elaborado un extracto hidroalcohólico.² Y dicho producto, identificado como BLBu, fue liofilizado y conservado a 4 °C. Para el trabajo experimental se elaboró una disolución madre 10 mg/mL, que fue preparada en agua destilada estéril; se esterilizó a través de filtros Millipore de 0,2 µm y se distribuyó en tubos eppendorf. Se conservó en refrigeración hasta su utilización en la pre-

paración de las diferentes diluciones de trabajo 25, 50, 100, 200, 250, 500, 700 y 1 000 µg/mL respectivamente.

Líneas celulares

En el presente estudio fueron empleadas dos líneas celulares. La línea celular MDCK de riñón de perro (ATCC-L34) y la línea celular Vero (ATCC-CCL-81) de riñón de mono verde africano. Las células se trabajaron a $2 \cdot 10^5$ células/mL y para su mantenimiento, se trabajó a 37 °C, en un ambiente de humedad relativa al 95 % y una atmósfera al 5 % de CO₂. Para el cultivo de las células MDCK se utilizó el medio Dulbecco's, que contenía Hepes 25 mmol/L + glutamina 25 g/L + albúmina humana fracción V al 0,2 %, aminoácidos no esenciales (100X) 1 %, penicilina 1 000 UI/mL y estreptomina 1 000 UI/mL. Para las células Vero se empleó el medio 199 (Böehring, Alemania) a 0,35 g/L, al que se adicionó suero bovino fetal (SBF) 5 %.

Cepas virales

Las cepas virales utilizadas fueron: virus influenza A cepa A/Japan/10/99 (H₃N₂) y el virus influenza B, cepa, B/Beijing/88, procedentes del Instituto Nacional de Epidemiología de Leipzig, Alemania y gentilmente donadas a Cuba.

Ensayos de citotoxicidad

Ensayos de citotoxicidad

Las células en cultivo fueron tratadas durante 5 d con el BLBu a diferentes concentraciones (25 a 1 000 µg/mL) en pocillos separados y con ocho réplicas por cada tratamiento. Se emplearon como controles las células sin aplicación de los extractos. Los resultados fueron expresados como porcentaje de las absorbancias, relativas a los controles (células sin tratar), definidos como el 100 %. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado con un número de muestras n = 8. En todos los casos, los cultivos fueron observados diariamente bajo microscopio para la determinación del efecto citotóxico.

En estos ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular se utilizó el reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma).

Para determinar si el extracto poseía algún efecto citotóxico sobre las líneas celulares MDCK y Vero, se empleó la técnica del MTT, propuesta por Mossmann.¹⁵

Ensayos de fragmentación del ADN

Para el estudio de la fragmentación del ADN en las líneas celulares MDCK y Vero tratadas con el extracto, se utilizaron aquellas concentraciones que no resultaron citotóxicas, 25, 50 y 100 µg/mL. Para cada concentración de extracto, las células fueron expuestas durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48 y 72 h. En cada caso, se utilizaron tres réplicas por tratamiento. El control positivo para observar la fragmentación del ADN consistió en células tratadas con clorhidrato de amantadina (100 mg) procedente de los laboratorios MEDSOL (Cuba) aplicado durante 24 h sobre ambas líneas celulares.

Título viral

El título infectivo de los virus utilizados en este trabajo, fue determinado mediante la técnica de conteo de placas descrita por Tobita y colaboradores.¹⁶

Inducción de apoptosis

La inducción de apoptosis con los diferentes virus fue llevada a cabo en ambas líneas celulares, para los virus influenza A y B y se realizaron en células MDCK y en células Vero. Este ensayo fue realizado mediante electroforesis de ADN para analizar la integralidad del material nuclear siguiendo un patrón característico.

En el análisis del ADN se realizó la digestión de las células y la posterior extracción del ADN total. Se realizaron modificaciones a los métodos propuestos por otros autores.¹⁷⁻²⁰ Ellas consistieron en: (1) realizar la digestión en la propia placa de cultivo y (2) reducir el tiempo de digestión con la proteinasa K, lo que simplificó y abrevió el método tradicional. Para esto, se extrajo el medio de mantenimiento celular de cada unidad experimental (pozo) y seguidamente, se realizó un lavado con PBS 1X (KH₂PO₄ 3,6 g; Na₂PO₄ · 12 H₂O 14,3 g; NaCl 5 g; KCl 0,2 g) previamente esterilizado. Posteriormente, se le adicionó a cada pozo 200 µL de disolución reguladora de extracción (Tris HCl 10 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, SDS 0,1 %, DTT 50 mmol/L) que contenía proteinasa K (10 µg/mL) según el protocolo descrito por Kocher y colaboradores.²¹ La digestión se realizó durante 1 h temperatura de 37 °C en ambiente de CO₂ y humedad del 5 %. Posteriormente, la disolución fue colectada y transferida a tubos eppendorf de 1,5 mL. Las muestras fueron

guardadas en congelación (-70 °C) para su posterior análisis. El ADN total se extrajo empleando el protocolo propuesto por Kocher y col. y fue visualizado a través de electroforesis en geles de agarosa 1 % en disolución reguladora TBE 1X (Tris-base 0,89 mmol/L pH 8,0, ácido bórico 0,89 mmol/L, EDTA 20 nmol/L). Se aplicaron 8 µL de ADN mezclado con 2 µL de la disolución de corrida (bromofenol azul 0,01 %, EDTA 10 mmol/L). El tiempo de cada electroforesis fue de aproximadamente 45 min a 50 V.

Análisis estadístico

Para la determinación de la concentración citotóxica media (CC₅₀) se estimaron las ecuaciones de regresión entre los porcentajes de sobrevivencia y la concentración del extracto. A los datos muestrales se les determinó la homocidasticidad utilizando la prueba F máxima y la normalidad según la prueba de Kolmogorov-Smirnov de bondad de ajuste a la distribución.²² Todos los análisis se realizaron en una hoja de cálculo del programa Excel de Windows 2000 (estadística descriptiva, homocidasticidad, ANOVA y prueba t de Student) y con el empleo del programa TONYSTAT²³ (regresión lineal, normalidad y prueba de Dunnett).

RESULTADOS

El estudio de citotoxicidad del BLBu durante 5 d de exposición sobre la línea celular MDCK mediante el método colorimétrico MTT,¹⁵ evidenció que a medida que se incrementa la concentración del extracto, se afecta la viabilidad celular. La disminución progresiva de la viabilidad alcanza sus valores mínimos (12 %) a 1 000 µg/mL. Esta tendencia queda revelada en el valor significativo mostrado por la recta (p < 0,01) y el elevado coeficiente de ajuste a la regresión (r² = 0,807). En correspondencia con estos resultados, el análisis de la monocapa celular confluyente mostró que a concentraciones entre 500 y 1 000 µg/mL existe un desprendimiento total de la monocapa y la formación de gránulos tóxicos, así como una deformación de las células, lo que evidencia un efecto citotóxico (EC) marcado. La concentración citotóxica media (CC₅₀) estimada a partir de la ecuación de regresión fue de (400 ± 59) µg/mL.

Este mismo estudio en la línea celular Vero frente al BLBu mostró igualmente una disminución progresiva de la viabilidad inversamente proporcional a la concentración del

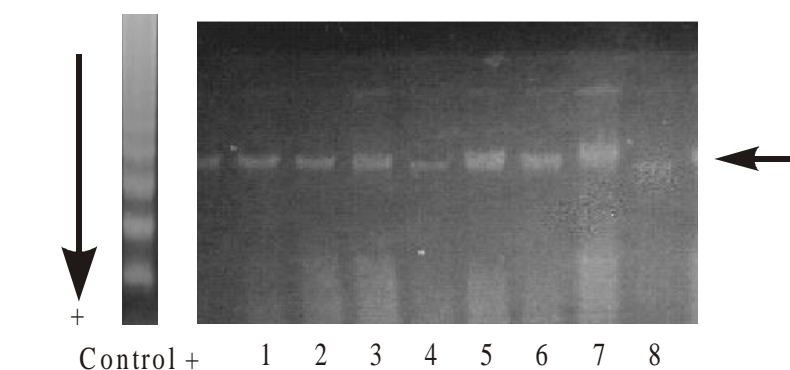


Fig. 1. Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1 % correspondiente a células MDCK y Vero tratadas a diferentes tiempos con 100 µg/mL del BLBu. Control +: tratamiento con amantadina. Carriles 1, 2, 3 y 4: tratamiento a 24, 48, 72 y 0 h en línea Vero. Carriles 5, 6, 7 y 8: tratamiento a 24, 48, 72 y 0 h en línea MDCK. La flecha indica la posición del ADN genómico intacto. La flecha izquierda indica el sentido de la corrida.

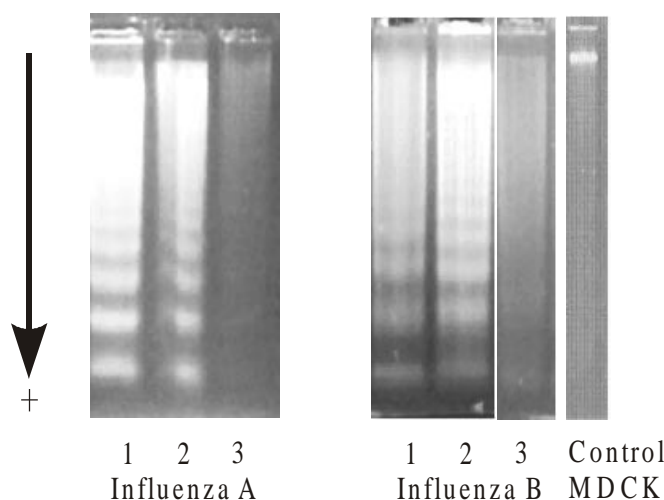


Fig. 2. Análisis de la fragmentación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en la línea MDCK con los virus influenza A y B. Carril 1: 24 h; carril 2: 48 h y carril 3: 72 h. Control MDCK: células no infectadas. En cada carril se aplicaron 8 µL de extracto de ADN.

extracto. La CC₅₀ en este ensayo resultó (137,3 ± 23 µg/mL) (Tabla 1).

Análisis del ADN en las líneas celulares tratadas con BLBu

Para comprobar el efecto del extracto BLBu sobre la integridad del ADN celular, se utilizaron concentraciones inferiores a la citotóxica media del BLBu (25, 50 y 100 µg/mL), según los resultados anteriores. El ADN se extrajo para cada tratamien-

to a las 0, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h, según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. El ADN se mantuvo íntegro en todos los casos indicando que el extracto no indujo fragmentación del ADN, lo cual se cumplió para las diferentes concentraciones ensayadas (Fig. 1). Como control positivo de inducción de fragmentación del ADN se utilizó el clorhidrato de amantadina a 100 µg/mL durante 24 h sobre ambas líneas celulares.

Análisis del ADN en las líneas celulares infectadas por los virus influenza A/Japan /10/99(H₃N₂) y B/Beijing/88

Para estudiar la apoptosis debida a la infección viral, se realizaron experimentos con las líneas celulares MDCK y Vero. En el caso de los virus influenza (A y B), dado su conocido tropismo por la línea celular MDCK, se analizó inicialmente si

Tabla 1. Actividad citotóxica *in vitro* del extracto de *Punica granatum* en las líneas celulares MDCK y Vero.

Línea celular	CC ₅₀ (µg/mL)
MDCK	400 ± 59
Vero	137,3 ± 23

n = 8. X ± DE.

ambas cepas eran capaces de inducir fragmentación del ADN en ella. El análisis del de las células infectadas después de 24 y 48 h de tratamiento evidenció la existencia de fragmentación en él, mientras que a las 72 h, mostró un grado de degradación prácticamente total (Fig. 2).

Aunque las diferentes cepas virales inducen fragmentación del ADN, el tiempo que media entre la inoculación del virus y la manifestación de este fenómeno varía entre una y otra cepa (Fig. 3). El virus influenza A es capaz de inducir fragmentación del ADN observable a las 24 h, mientras que a las 72 h, aunque evidente aún, muestra rasgos de degradación a lo largo de toda el área de migración (carriles 2 y 3). En el caso de influenza B, la fragmentación del ADN se manifiesta de manera más tardía. A las 72 h se observa la fragmentación (carriles 4 y 5) con rasgos ya de degradación.

Efecto del BLBu sobre la fragmentación del ADN inducida por los virus en las líneas celulares

Análisis de la fragmentación del ADN

En el caso de la línea celular MDCK infectada con el virus influenza A/Japan/10/99 y tratada con BLBu en ninguno de los tratamientos se presentaron evidencias de fragmentación o degradación del ADN, lo que sugiere protección del material genómico (Fig. 4).

En el caso de las células MDCK infectadas con el virus influenza B/Beijing/88y tratadas con BLBu se pudo observar que en todos los casos, el ADN genómico mantuvo su integridad (Fig. 5).

En el caso de las células Vero infectadas con el virus influenza A/Japan/10/99 y tratadas con BLBu a diferentes concentraciones y tiempos, se comprobó que el ADN se mantuvo íntegro en todos los tratamientos (Fig. 6).

DISCUSION

La utilización de los extractos naturales para combatir diferentes afecciones ha sido retomada por la farmacopea actual como una vía alternativa para aliviar y curar diversas enfermedades. Una de las propiedades más importantes a examinar ante el uso de estas sustancias es su capacidad de protección del ADN. Los virus son patógenos intracelulares y debido a su capacidad de disparar los mecanismos efectores de la inmunidad celular han sido ampliamente utilizados en investi-

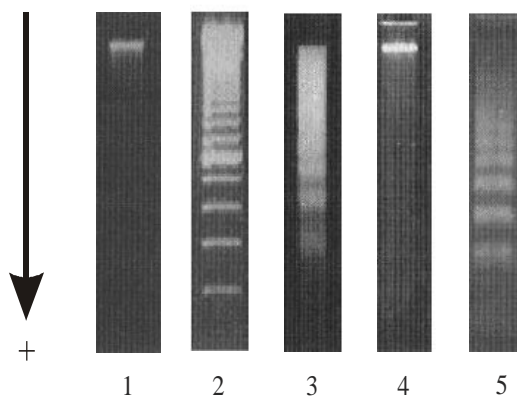


Fig. 3. Análisis de la fragmentación del ADN en la línea Vero mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Carril 1: control de la línea celular Vero (no infectada). Carril 2: influenza A/Japan/10/99 H₃N₂ (24 h). Carril 3: virus influenza A/Japan/10/99 H₃N₂ (72 h). Carril 4: influenza B/Beijing/88 (24 h). Carril 5: influenza B/Beijing/88 (72 h).

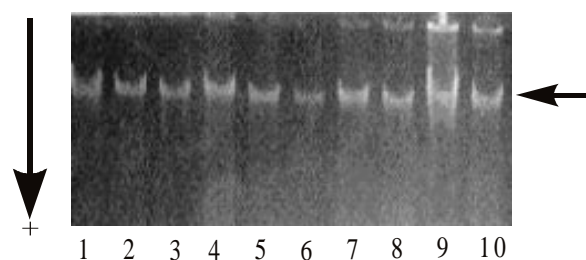


Fig. 4. Análisis de la integridad del ADN en la línea MDCK infectada con el virus influenza A/Japan/10/99 y tratada con BLBu. Carriles 1, 2 y 3: tiempo 24 h (25, 50 y 100 µg/mL). Carriles 4, 5 y 6: tiempo 48 h (25, 50 y 100 µg/mL). Carriles 6, 7 y 9: tiempo 72 h (25 y 100 µg/mL), carril 10: Control de células MDCK. La saeta indica la posición del ADN.

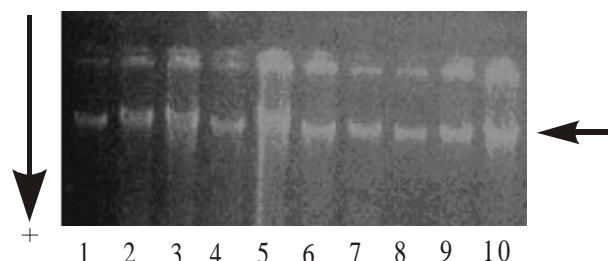


Fig. 5. Análisis de la integridad del ADN en la línea MDCK infectada con el virus influenza B/Beijing/88 y tratada con el extracto BLBu. Carriles 1, 2 y 3: tiempo 24 h (25, 50 y 100 µg/mL). Carriles 4, 5 y 6: tiempo 48 h (25, 50 y 100 µg/mL). Carriles: 7, 8, y 9: tiempo 72 h (25, 50 y 100 µg/mL). Carril 10: control de células MDCK.

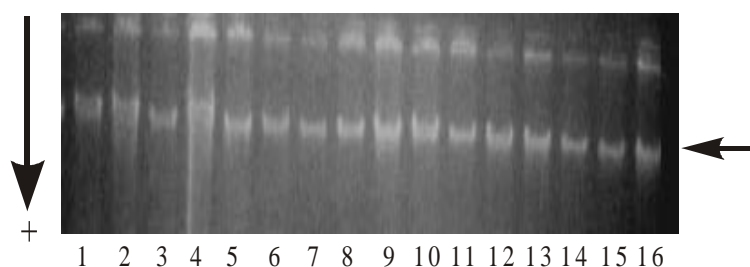


Fig. 6. Análisis de la integridad del ADN en la línea Vero. Tratamiento con A/Japan/10/99. Carriles 1, 2 y 3: concentración de BLBu a 25 µg/mL (24, 48 y 72 h de tratamiento). Carriles 4 y 5: concentración 50 µg/mL (24 y 72 h). Carriles 6 y 7 concentración 100 µg/mL (24 y 72 h). Carril 8: control de células Vero. Tratamiento con B/Beijing/88. Carriles 9,10,11: concentración de BLBu 25 µg/mL (24, 48 y 72 h de tratamiento). Carriles 12 y 13: concentración 50 µg/mL (24 y 72 h). Carriles 14, 15 y 16: concentración 100 µg/mL de BLBu (24, 48 y 72 h).

gaciones de inducción e inhibición de la apoptosis, tanto en sistemas celulares como en animales de experimentación. La fragmentación del ADN es uno de los eventos característicos de la muerte apoptótica que sigue un patrón característico^{1,19,24-26} de manera que los virus pueden ser empleados, además, como sistemas modelo para la evaluación del efecto anti-apoptosis de sustancias naturales o sintéticas.^{1,3,12,27,28}

El análisis de la citotoxicidad del extracto evidenció que el efecto sobre los cultivos celulares fue dependiente de dos factores: la concentración y el sistema celular empleado. Para ambas líneas celulares el aumento de la concentración, como se esperaba, produjo alteración en la viabilidad según evidenció el análisis de MTT. El extracto afectó a ambos tipos celulares a concentraciones bajas y se determinó que la concentración que garantiza el 50 % de sobrevivencia celular se encuentra por debajo de 250 µg/mL, lo que evidencia su carácter tóxico en las células.

El comportamiento y la concentración citotóxica media del BLBu coinciden en la línea celular MDCK, con los informados por Caballero.³ Se han realizado estudios de toxicidad *in vivo* a este extracto y se apreció que, al emplear concentraciones elevadas, resulta muy tóxico en los modelos empleados.²⁹ El paso siguiente fue investigar si el extracto inducía fragmentación del ADN en las células empleadas, para descartar alguna interferencia de este fenómeno en la evaluación de la capacidad protectora del extracto. El patrón de fragmentación observado en "escaleras" es característico y para ello se empleó en el trabajo el clorhidrato de amantadina, sustancia reconocida como inductora de apoptosis a elevadas concentraciones.³⁰ El contacto o entrada de diversas sustancias (tóxicas o dañinas) al organismo o cultivo de células desencadenan los mecanismos de muerte programada tanto extrínsecos como intrínsecos. Sin embargo, este proceso solo es llevado a cabo en función de la dosis y el tiempo de duración de exposición al inductor, así como del sistema empleado.³¹⁻³³ Para analizar si el extracto era capaz de inducir la fragmentación del ADN, se partió de las concentraciones que permitían más del 50 % de células activas en cada línea celular. Con relación al tiempo se consideró que la apoptosis puede manifestarse de manera temprana, tardía o como

aponecrosis.^{34,35} Los resultados evidenciaron que en ninguno de los casos se afectó el ADN, en cuanto a su fragmentación siguiendo un patrón característico, con los extractos ensayados (Figuras 5 y 6). Esto reafirma el hecho antes observado de la gran variabilidad en la sensibilidad de los diferentes células ante una misma sustancia y la importancia de que en los estudios futuros se tome en cuenta dicha variación.

La capacidad del extracto de inhibir el fenómeno de apoptosis inducido por los virus se evidenció al tratar las dos líneas celulares infectadas con dos cepas de virus de influenza A y B. En particular, estos virus fueron inoculados en la línea MDCK dado su conocido tropismo por ellas y teniendo en cuenta realizar la infección a baja multiplicidad para poder visualizar la fragmentación del ADN.³⁶⁻³⁸

El análisis del ADN de las células MDCK infectadas con los virus influenza A/Japan/10/99 y B/Beijing/88 evidenció que a las 24 h de infección los dos ya habían inducido la fragmentación del ADN y tenía lugar el proceso de apoptosis. Este evento se observó aún a las 48 y 72 h, en este último caso, más tardío de su desarrollo, con total degradación del material nuclear. Resultados similares han sido informados por otros grupos de investigación.³⁹⁻⁴² los que al realizar los ensayos de inducción de apoptosis con virus influenza, llegaron a la conclusión que 72 h es demasiado tarde para estudiar el fenómeno en cuestión sobre células MDCK y HeLa.

En la línea celular Vero se observó fragmentación de su ADN a las 24 h y degradación casi total a las 72 h de infectada con el virus influenza A. Sin embargo, el virus influenza B parece inducir la muerte celular de manera más tardía, dado que a las 72 h aún el patrón de fragmentación es evidente. Este resultado muestra que el patrón de fragmentación del ADN está en dependencia del sistema celular ensayado y de la virulencia de la cepa usada en los experimentos.³⁶

Los virus influenza inducen degeneración celular en los cultivos de células y el efecto citopático principalmente es registrado a través de la muerte celular programada.⁴³

En los últimos 7 años, se ha discutido que los virus influenza utilizan la apoptosis para garantizar la diseminación viral y lograr una espectacular producción de viriones

en un período de tiempo breve, burlando de esta forma el sistema inmune del organismo invadido.⁴⁴⁻⁴⁶ Las partículas virales que conducen la célula hacia la apoptosis viajan dentro de los cuerpos apoptóticos y cuando estos son fagocitados por los macrófagos transitan a través del organismo en el interior celular sin ser reconocidas por mediadores del sistema inmune, ni atacadas por las enzimas de degradación. De esta forma, colonizan otros órganos y tejidos para establecer la enfermedad infecciosa y garantizar una progenie viral en muy corto tiempo.^{47,48}

El tratamiento de las células MDCK con BLBu después de 1 h de infección con el virus influenza A/Japan/10/99 manifestó su mejor efecto protector a 50 y 100 µg/mL. Estos resultados se confirman a través de la evaluación de la integridad del ADN genómico, la cual revela que a todas las concentraciones y tiempos ensayados, incluso para aquellos que solo permitieron el 50 % de células vivas, el extracto fue capaz de inhibir el proceso de apoptosis.

El comportamiento del extracto frente al virus influenza B/Beijing/88 fue relativamente diferente con respecto a la viabilidad celular en la línea MDCK. Se debe resaltar que, a pesar de que la viabilidad en células infectadas resulte inferior al 60 %, el ADN se mantuvo en su forma nativa en todos los casos, lo cual indica que el extracto es capaz de proteger su material genómico, independientemente de la afectación provocada por los virus a otros niveles. Se sugiere que los virus afectan la viabilidad celular (actividad metabólica) y el extracto es capaz de interferir alguna(s) vía(s) de activación del fenómeno apoptótico, en particular, las caspasas, las cuales han sido reconocidas como sus principales ejecutoras.^{49,50}

Está demostrado que BLBu es un eficaz inhibidor *in ovo* frente a diferentes tipos y subtipos de influenza A y B y fue estimado que a 125 µg/mL, se necesita un tiempo mínimo para ejercer su acción sobre la hemaglutinina (HA) y de esta forma, no alcanzar los títulos de hemaglutinación.² También posee un marcado efecto antiviral *in vitro* en la línea celular MDCK cuando está en presencia del virus influenza A.³ Otros extractos del fruto de la granada obtenidos por diferentes protocolos manifiestan características anticancerígenas con potencialidades como adyuvante frente al cáncer de

mama.⁵² Los taninos presentes en este fruto actúan *in vitro* contra el virus del herpes genital⁵³ tipo 2 y ha sido informada también una potente actividad antibacteriana por esta sustancia natural.⁵⁴ Este estudio sugiere que el proceso de diseminación y replicación viral es interrumpido por el extracto a diferentes niveles, bien sea desde su adsorción y penetración al bloquear los posibles receptores y eventos que conducen a la muerte celular programada, o en eventos como los de replicación viral cuando la infección se ha establecido. Los eventos de inducción de apoptosis por las cepas de influenza A y B se atribuyen a las diferencias serológicas en las hemaglutininas.³⁸ Se conoce que la neuraminidasa también desempeña un papel relevante en la inducción de este evento, particularmente, en estos virus. Existen evidencias de que esta proteína unida a la hemaglutinina es un punto clave para disparar este proceso.^{12,55,56} Otra proteína no estructural, NS1, también tiene un papel fundamental en la apoptosis que desarrollan los virus influenza. A través de NS1 se ejecuta el proceso de muerte programada cuando se inicia la infección en células MDCK y HeLa, mecanismo que se establece mediante la inhibición de la activación del interferón celular. Es interesante destacar el papel de las proteínas no estructurales relacionadas con el interferón celular. Parece ser que esta es la clave del desencadenamiento de dicho proceso. Hasta el momento, los estudios de apoptosis relacionados con los virus influenza han estado dirigidos a establecer la relación entre la señal que da el virus para bloquear la función del interferón celular.^{40,47,57-59} Teniendo en cuenta los elementos anteriores, se hace necesario estudiar la relación del extracto con alguno de estos factores, en particular, los mecanismos moleculares por los cuales interactúan estas sustancias para inhibir el proceso apoptótico inducido por los virus.

De manera general, a partir de los resultados se puede sugerir que el efecto similar de inhibición de la fragmentación del ADN genómico producido por el BLBu ante diferentes entidades virales y tipos celulares, evidencia la posible existencia de mecanismos comunes de acción de los virus, al inducir apoptosis, que son interferidos por dicho extracto. Esto conduce a valorar a CD95-CD95L o FAS-FASL y TNF-TNFR como los principales candidatos en

los mecanismos de activación por señales externas. En este sentido, el estudio a nivel molecular de la expresión de las diferentes entidades moleculares involucradas en la cascada activadora a partir de dichas vías pudiera constituir un buen objetivo de inicio para investigar en los mecanismos de acción del extracto ensayado.

Finalmente, un análisis comparativo de los componentes presentes en el extracto pudiera ayudar a dilucidar cuál o cuáles de estos pudieran ser los implicados en la inhibición de la fragmentación del ADN genómico inducida por los virus.

CONCLUSIONES

Quedó demostrado en este estudio el efecto inhibitorio del extracto natural de *Punica granatum* L. sobre la apoptosis inducida por dos cepas virales de virus influenza en dos líneas celulares, MDCK y Vero. También se comprobó que este extracto no induce fragmentación del ADN genómico en los sistemas celulares ensayados a las concentraciones seleccionadas y que las cepas virales estudiadas inducen la fragmentación del ADN genómico siguiendo un patrón característico en las líneas celulares MDCK y Vero, aunque el tiempo de inducción parece variar entre una línea celular y otra.

AGRADECIMIENTOS

A Erik García-Machado por brindar desinteresadamente los reactivos y su laboratorio para la realización de los análisis del ADN, así como, por la revisión del manuscrito y sus oportunas críticas y recomendaciones al trabajo. Al personal del Laboratorio de control de la calidad del Centro de Inmunología Molecular.

BIBLIOGRAFIA

- Iglesias J. Fraccionamiento fitoquímico del BLBu con actividad antiviral. Trabajo de diploma. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, 1990.
- Peña B. Un extracto de frutos de *Punica granatum* L. con actividad contra el virus influenza. Tesis en opción de título de Maestro en Ciencias Biológicas, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, 1998.
- Caballero O. Actividad antiviral de un extracto acuoso de *Punica granatum* L. frente al virus de la influenza A. Tesis en opción de título de Maestro en Ciencias Biológicas, Facultad de Biología, Cuba, 2001.
- Hinshaw V.S., Olsen C.W., Dibdahl-Sissoko N. and Evans D. Apoptosis: a mechanism of killing by influenza A

- and B viruses. **J. Virol.**, **68**, 3667-3673, 1994.
- Bratton B., MacFarlane M., Cain K., Cohen G.M. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. **Exp. Cell Res.**, **256**, 27-33, 2001.
- Thatte U., Bagadey S. and Dahanukar S. Modulation of programmed cell death by medicinal plants. **Cell Mol. Biol.**, **46**, 199-214, 2000.
- Dubrez L., Coll J.L., Hurbin A., Solary E. and Favrot M.-C. Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53 mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of Bax protein. **J. Biol. Chem.**, **276**, 38980-38987, 2001.
- Jang M.H., Shin M.C., Kang I.S., Baik H., Cho Y.H. Caffeine induces in human neuroblastoma cell line SK-N-MC. **J. Korean Med. Sci.**, **17**, 674-678, 2002.
- Bhattacharyya A., Choudhuri T., Pal S., Chattopadhyaya G., and Das T. Apoptogenic effects of black tea on Ehrlich's ascites carcinoma cell. **Carcinogenesis**, **24**, 75-80, 2003.
- Qiao L., Hanif R., Shiff S.J. and Rigas B. Effects of aspirin on induction of apoptosis on HT-29 human colon adenocarcinoma cells. **Biochem. Pharm.**, **55**, 53-64, 1998.
- Freund B. Zanamivir. A review of clinical safety. **Drug**, **4**, 56-59, 1999.
- Hayden F.G. Use of the oral neuraminidase inhibitor Oseltamivir in experimental human influenza. **JAMA**, **282**, 1240-46, 1999.
- Sugaya N. and Miura M. Amantadine therapy for influenza type A-associated encephalopathy. **Pediatric Infectious Disease Journal**, **18**, 734, 1999.
- Marchetti C., Di marco B., Cifone G., Migliorati G and Riccardi C. Dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes: Role of glucocorticoid receptor associated Src kinase and caspase 8 activation. **Blood**, **101**, 585-593, 2003.
- Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **J. Immunol. Methods**, **65**, 55-63, 1983.
- Tobita K., Sugiura A., Enomoto C., Furuyama M. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in a established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. **Med. Microbiol. Immunol.**, **162**, 9-14, 1975.
- Darzynkiewicz Z., and Li X. Measurements of cell death by flow cytometry. (In) Techniques in Apoptosis (Cotter TG., Martin S.J. (ed.) London, Portland Press, 73, 1996.
- Collins J.A., Schandadl C.A., Young K.K., Vesely and Willingham M.C. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. **J. Histochem. Cytochem.**, **45**, 923-934, 1997.
- Walker R.P., Kokileva L., Le Blanc J. and Sikoprska M. Detection of the

- initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. **Biotechniques**, **15**, 1032-1036, 1998.
20. Alfaro E., García C., Dueñas A. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. **Rev. Inst. Nal. Cancerología (Méx.)**, **6**, 275-280, 2000.
 21. Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Paavo S., Villablanca F.X. and Wilson, A.C. Dynamic mitochondrial DNA evolution in animal: amplification and sequencing with conserved primers. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **86**, 196-200, 1989.
 22. Sigarroa A. *Biometría y Diseño experimental*. Ed. Pueblo y Educación, La Habana, 1985.
 23. Sigarroa A. Programa TONYSTAT. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, 1987.
 24. Columbié F and Galdeta P. Mecanismos involucrados en la apoptosis inducida por el VSV. **Botanic Rev.**, **2**, 162-169, 2002.
 25. McCarthy N.J. and Evan G.I. Methods of detecting and quantifying apoptosis. **Curr. Top. Dev. Biol.**, **36**, 259-278, 1998.
 26. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. **Exp. Cell Res.**, **256**, 12-18, 2000.
 27. Vaqueroa M. Apoptosis, To be or no to be, that is a question. **Med. Clin.**, **114**, 144-156, 2000.
 28. Aries S.P., Weirich B., Hansaen R., and Dennin R.H. Early T cell apoptosis and Fas expression during antiretroviral therapy in individuals infected with HIV. **J. Immunol.**, **48**, 86-91, 2001.
 29. Vidal A., Fallarero A., Peña B.R., Medina M.E., Gra B., Rivera F., Gutierrez Y., and Vuorela P.M. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Puniaceae) whole fruit extracts. **J. Ethnopharmacol.**, **89**, 295-300, 2003.
 30. Asai Y., Hashimoto K., Kujime Y., Gon K Mizumura K., Shimizu F and Oiré T. Amantadine inhibe RANTES production by influenza virus infected human bronquial epithelial cell. **Br. Farmacol.**, **132**, 918-924, 2001.
 31. Lorenzo H.K., Susin S.A., Penninger J. and Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. **Cell Death Differ.**, **6**, 516-524, 1999.
 32. Chang L., Chen C., Urlacher V. and Lee T.Z. Differential apoptosis effects primate lentiviral Vpr and VPX in mammalian cell. **Journal of Biomedical Science**, **7**, 322-333, 2000.
 33. Zhang J. and Xu M. (2002). Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. **Trend Cell Biol.**, **12**, 84-89, 2002.
 34. Hay S., and Kannourakis G. A time to Kill: viral manipulation of the cell death program. **JGV. Rev. Direc.**, **2**, 1-41, 2002.
 35. Formigli L., Papucci L., Tani A., Schiavone N., Tempestini A., Orlandini G.E., Capaccioli S., Orlandini S. Z. Aponecrosis: Morphological and biochemical exploration of a synaptic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. **J. Cell Physiol.**, **182**, 41-49, 2000.
 36. Price G.E., Smith H. and Sweet C. Differential induction of cytotoxicity and apoptosis by influenza virus strain of differing virulence. **J. Gen. Virol.**, **78**, 2821-2829, 1997.
 37. Fujimoto I., Pan T., Takizawa Y., Ohba Y., and Nakanishi Y. Virus clearance through apoptosis dependent phagocytosis of influenza A virus infected cell. **Cell Death Differ.**, **5**, 426-431, 2000.
 38. Ohyama K., Nishina M., Yoan B., Bessho T., and Yamakawa T. Apoptosis induced by influenza virus hemagglutinating stimulation may be related to fluctuation of cellular oxidative condition. **Biol. Farm. Bull.**, **26**, 141-147, 2003.
 39. Schultz-Cherry S., Dibdahl-Sissokpo N., Neumann N., Kawaoka Y., and Hinshaw S. Influenza virus NS1 protein induce apoptosis in culture cell. **J. Virol.**, **75**, 7875-7881, 2001.
 40. Schultz-Cherry S., Krug R.M., and Hinshaw V.S. Induction of apoptosis by influenza virus. **Seminars in Virology**, **8**, 491-495, 1998.
 41. Takizawa T., Matsukawa S., Higuchi S., Nakamura Y., Nakanishi, Y. and Fukuda, R.. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. **Journal of General Virology**, **74**, 1006-1017, 2002.
 42. Zhirnov O.P., Wolf T., Konakova T., and Klenk H.D. Host-dependent variation of apoptosis in cell infected with influenza A virus lacking NS1 gene. **Virology**, **82**, 10158-10163, 2003.
 43. Mahalingam S., Meanger J., Foster P.S., and Lidbury A. The viral manipulation of the cellular and immune environments to enhance propagation and survival: a focus on RNA virus. **J. Biol.**, **72**, 429-439, 2002.
 44. O'Brien V. Virus and apoptosis. **J. Gen. Virol.**, **79**, 1833-1845, 1998.
 45. Everett H., and McFadden G. Viruses and apoptosis: Meddling with mitochondria. **Virology**, **288**, 1-7, 2001.
 46. Mahalingam S., Foster P.S., and Lidbury A. The viral manipulation of the cellular and immune environments to enhance propagation on RNA virus. **J. Biol.**, **70**, 229-239, 2000.
 47. Geiss G.K., Salvatore M., Tumpey T.M., Carter V.S., Wuang X., Basler C.F., Taubenberger, J.K., Bumgarner, R.E., Pelese P., Katze MG and Garcia-Sastre A. Cellular trascripcional proflig in influenza A virus-infected lung epithelial cell: The role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **99**, 10736-10741, 2002.
 48. Uchide N. and Oyama K. Antiviral function of pyridoline dithiocarbamate against influenza virus: The inhibition of viral gene replication and transcription. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **52**, 1-10, 2003.
 49. Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Lou X., Wang X. Biochemical pathways of caspases activation during apoptosis. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.**, **15**, 269-290, 1999.
 50. Livne A., Shtrichman R., Kleingberger, T. Caspase activation by adenovirus E4orf4 protein is cell line specific and is mediated by death receptor pathway. **J. Virol.**, **75**, 789-798, 2001.
 51. Wurzer W.J., Planz O., Ehrhardt C., Giner M., Silberzahn T., Pleschka S., and Ludwig S. Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. **EMBO J.**, **22**, 2717-2728, 2003.
 52. Kim N.D., Mehta R, Yu W, Neeman I, Livney T, Amichay A., Poirier D., Nicholls P, Kirby A., Jiang W, Mansel R., Ramachandran C., Rabi T., Kaplan B., Lansky E. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, **71**, 203-17, 2002.
 53. Zhang J., Zhan B., Yao X., Gao Y. and Shong J. Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital Herpes virus *in vitro*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, **3**, 556-558, 1995.
 54. Prashanth D., Asha M.K. and Amit A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. **Fitoterapia**, **72**, 171-3, 2001.
 55. Morris S.J., Price G.E., Barnett J.M., Hiscox S.A., Smith H., and Sweet C. Role of the neuraminidase in influenza virus induced apoptosis. **J. Gen. Virol.**, **80**, 137-146, 1999.
 56. Lou C., Nobusawa E., and Nakajima K. The analysis of the role of neuraminidase in the receptor-binding activity of influenza B virus: the inhibitory effect of Zanamivir on haemoabsorption. **J. Gen. Virol.**, **80**, 2969-2976, 1999.
 57. Garcia-Sastre A., Egorov A., Matassov S., Brandt S., Levy E., Durbin J.E., and Muster. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon deficient systems. **Virology**, **252**, 324-330, 1998.
 58. Yuan W., and Krug M. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN) induced ubiquity-like ISG15 protein. **EMBO**, **20**, 362-371, 2001.
 59. Kohl M.H., Johnson L., Scorrano S.J., Korsmeyer and T.J. Ley Cell death induced by granzyme. **C. Blood**, **101**, 3093-3101, 2003.