

Actividad Anti VIH de *Artemisia glutinosa*

Martín, R; Bedoya, L.M.; Abad, M. J.; Bermejo, P.; Alcamí, J.
Departamento de Farmacología U.C.M.
(Plaza Ramón y Cajal s/n)

INTRODUCCIÓN

El SIDA se caracteriza por tener una alta prevalencia, para ello se han desarrollado numerosos fármacos, pero la dificultad para su control y para sacar al mercado productos que consigan neutralizar por completo al virus, sus capacidades intrínsecas (baja fidelidad de la transcriptasa inversa, alta capacidad replicativa, etc.) han dificultado el cumplimiento de los tratamientos y han dado lugar a que se desarrollen resistencias. Las plantas pueden ser una fuente válida para encontrar fármacos que complementen a los ya desarrollados

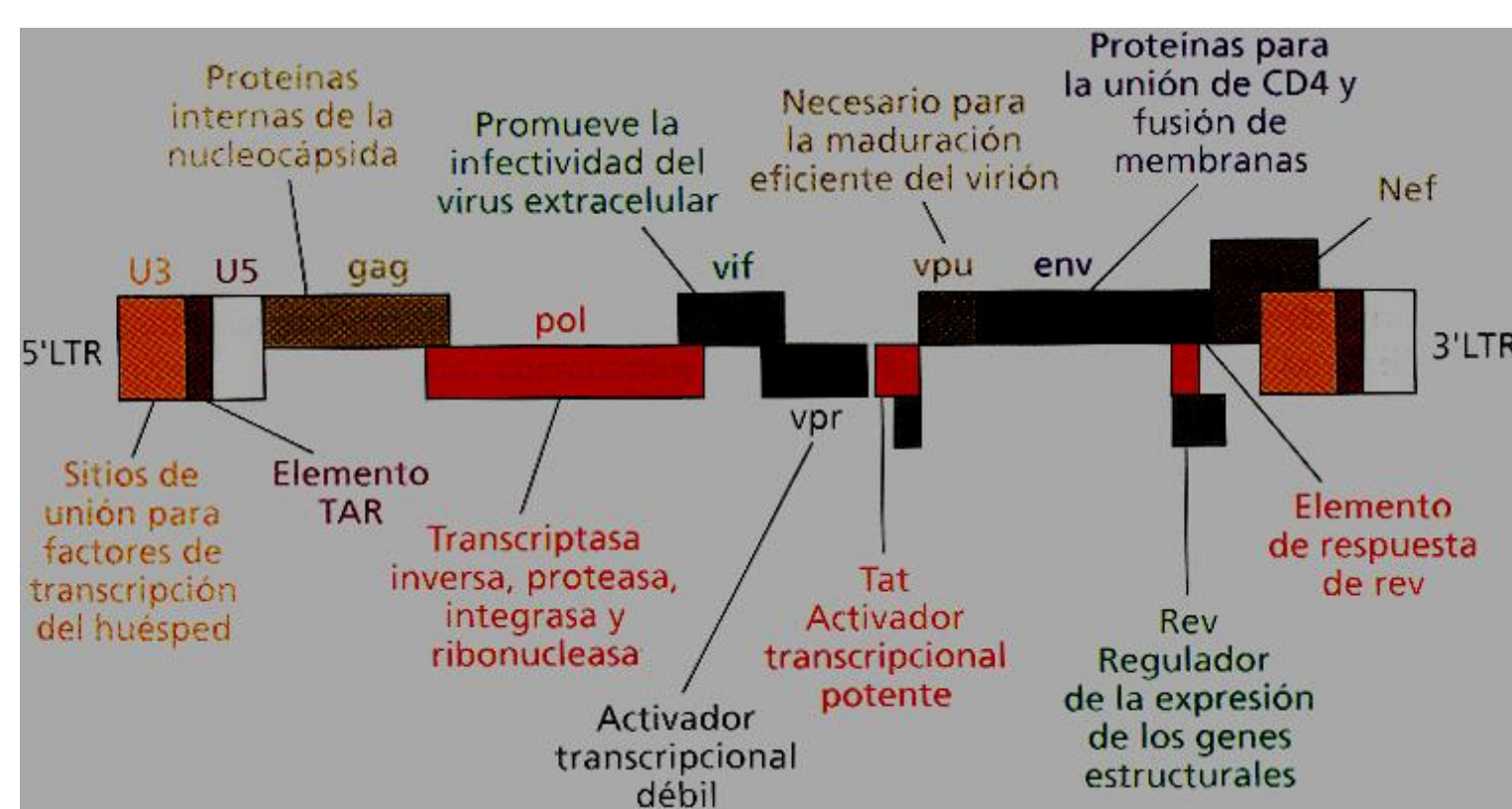
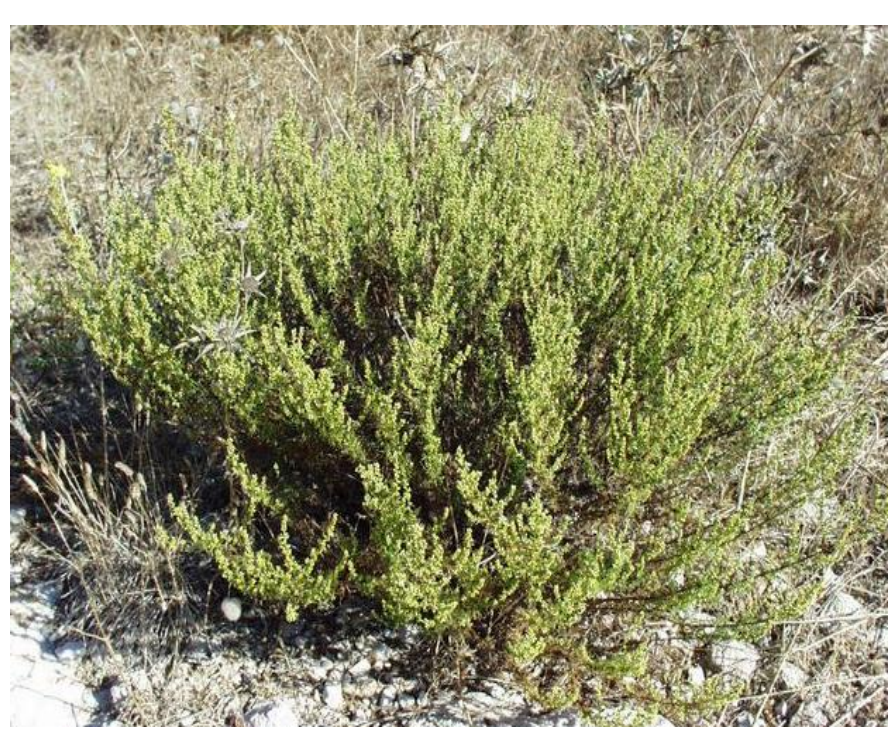


Fig. 1. *Artemisia glutinosa* J.Gay ex Besser, recolectada en Morata de Tajuña, Madrid, y estructura de VIH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvo el extracto inicial por maceración, tras separaciones sucesivas por columnas de intercambio, exclusión y afinidad y CCF se van descartando los productos menos activos por medio del ensayo MTT, obteniéndose las moléculas finales activas. Para la cuantificación de la actividad antiviral se empleó MTT y virus recombinantes (VR)

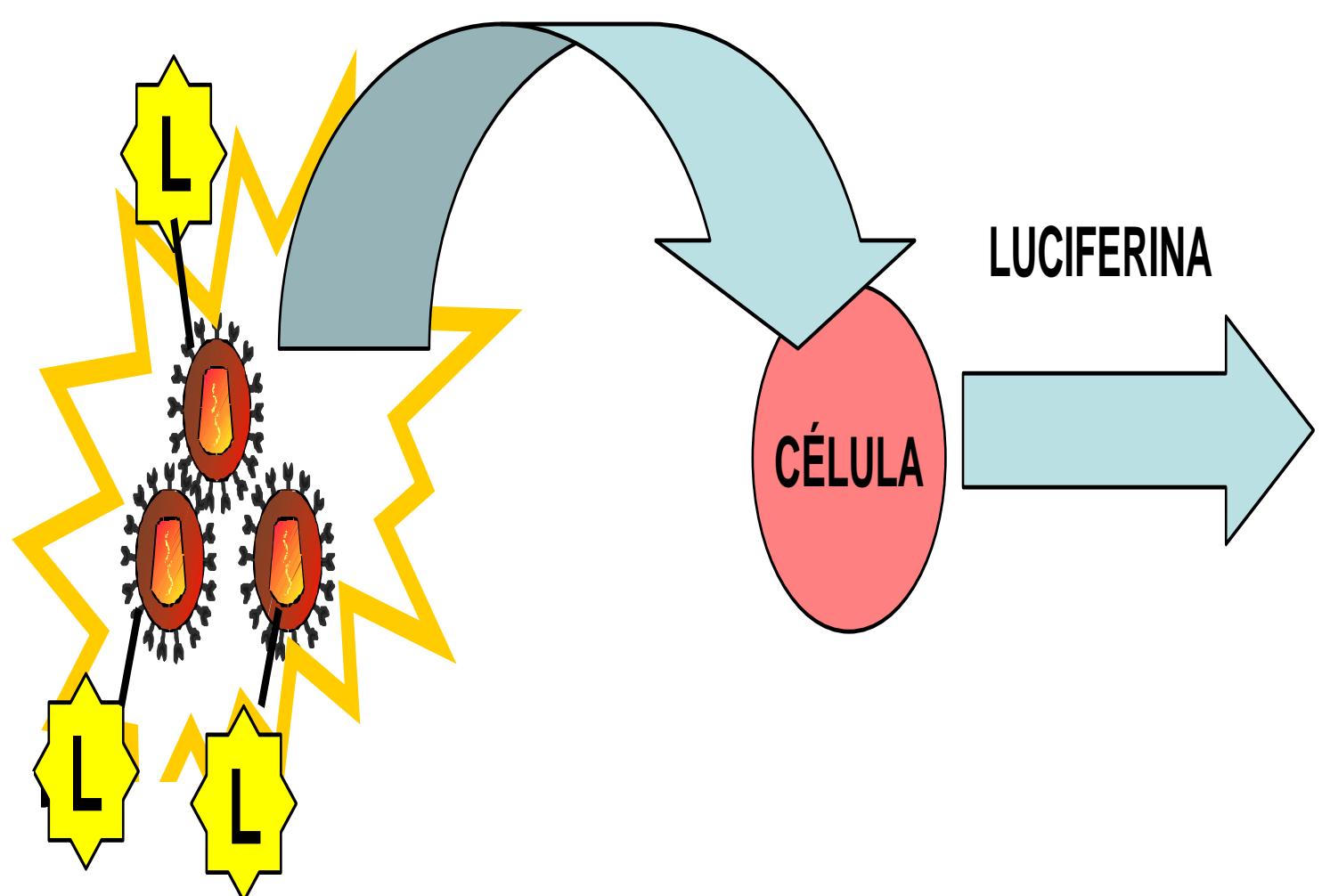


Fig. 2. Ensayo VR. El stock de virus recombinantes con luciferasa se pone en contacto con las células diana, las que hayan sido infectadas presentarán luciferasa, al añadir luciferina darán un producto que genera luz que se midió por luminometría. A más RLU, más infección y menos efecto antiviral del compuesto.

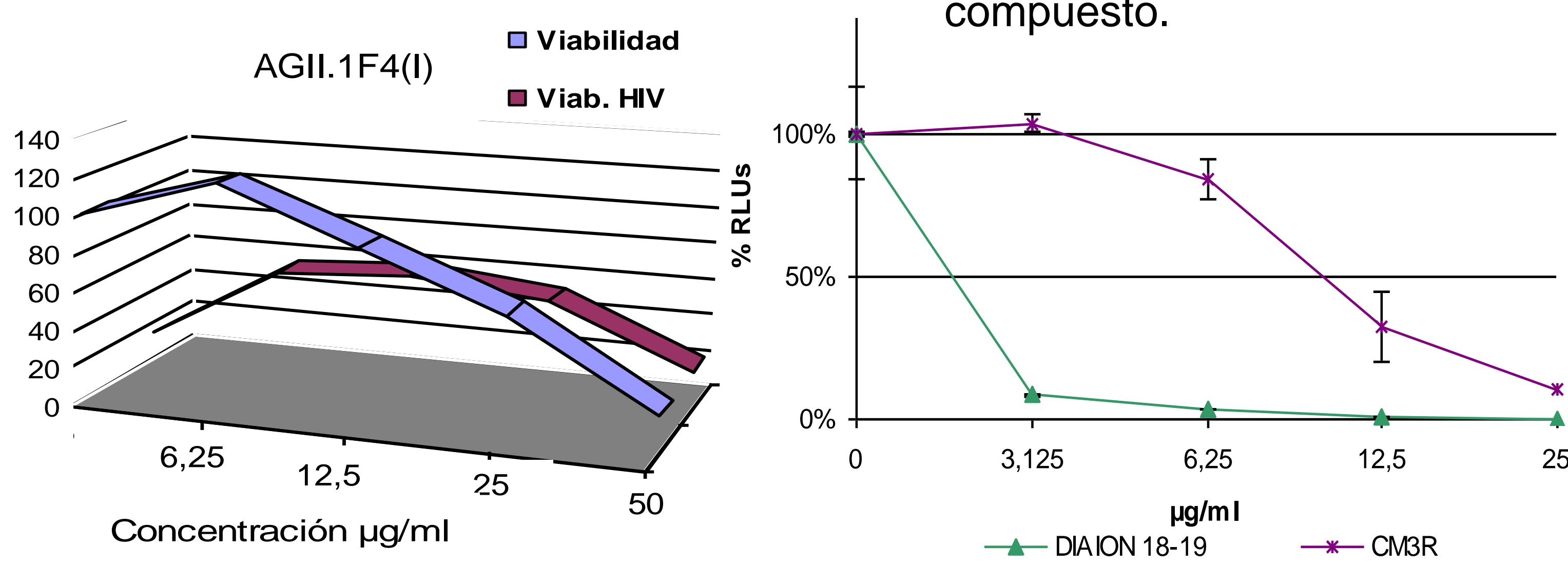


Fig. 3. Ensayo MTT del extracto a partir del que se obtienen CM3R y Diaion 1819 (izq.) y VR (dcha.).

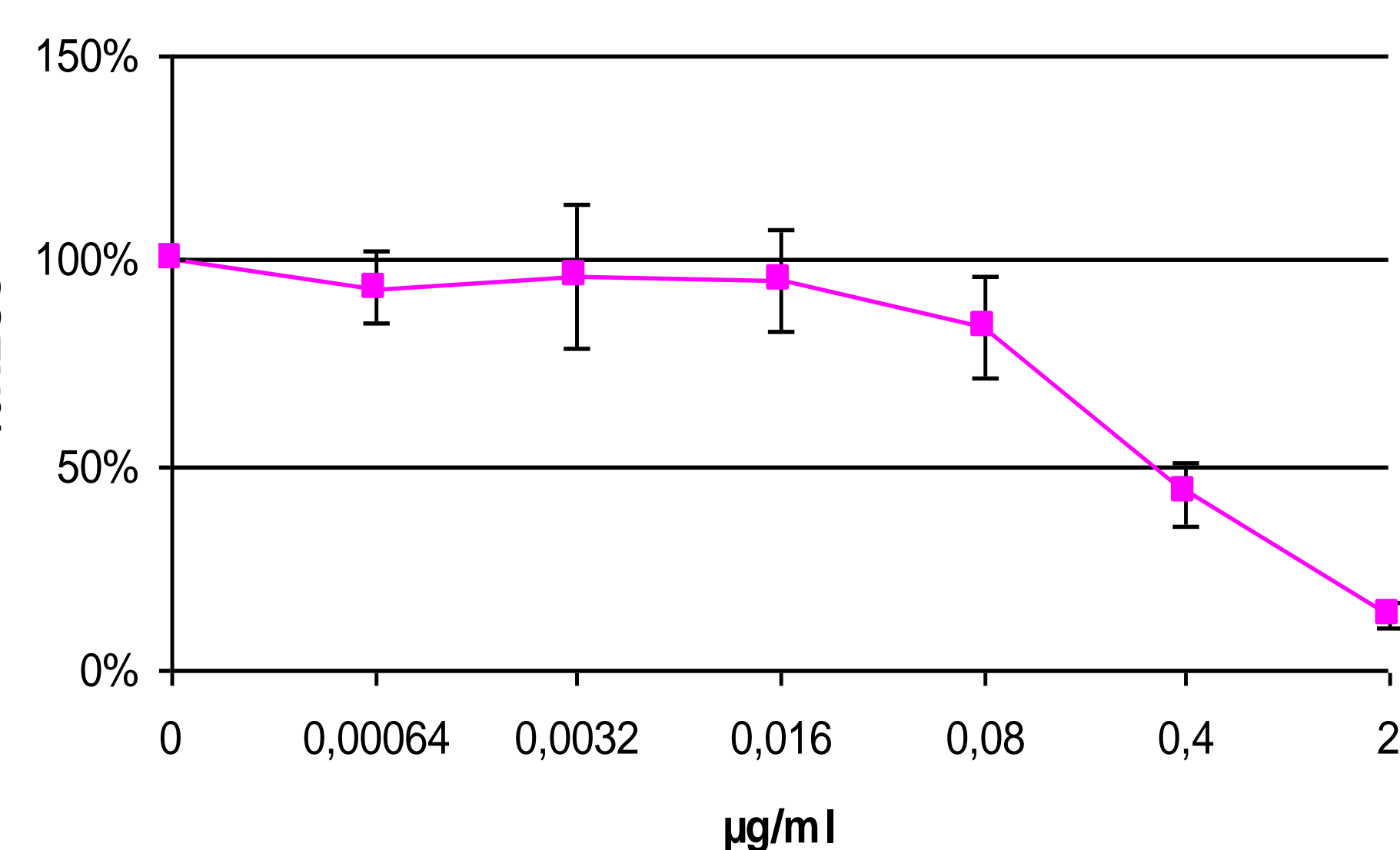
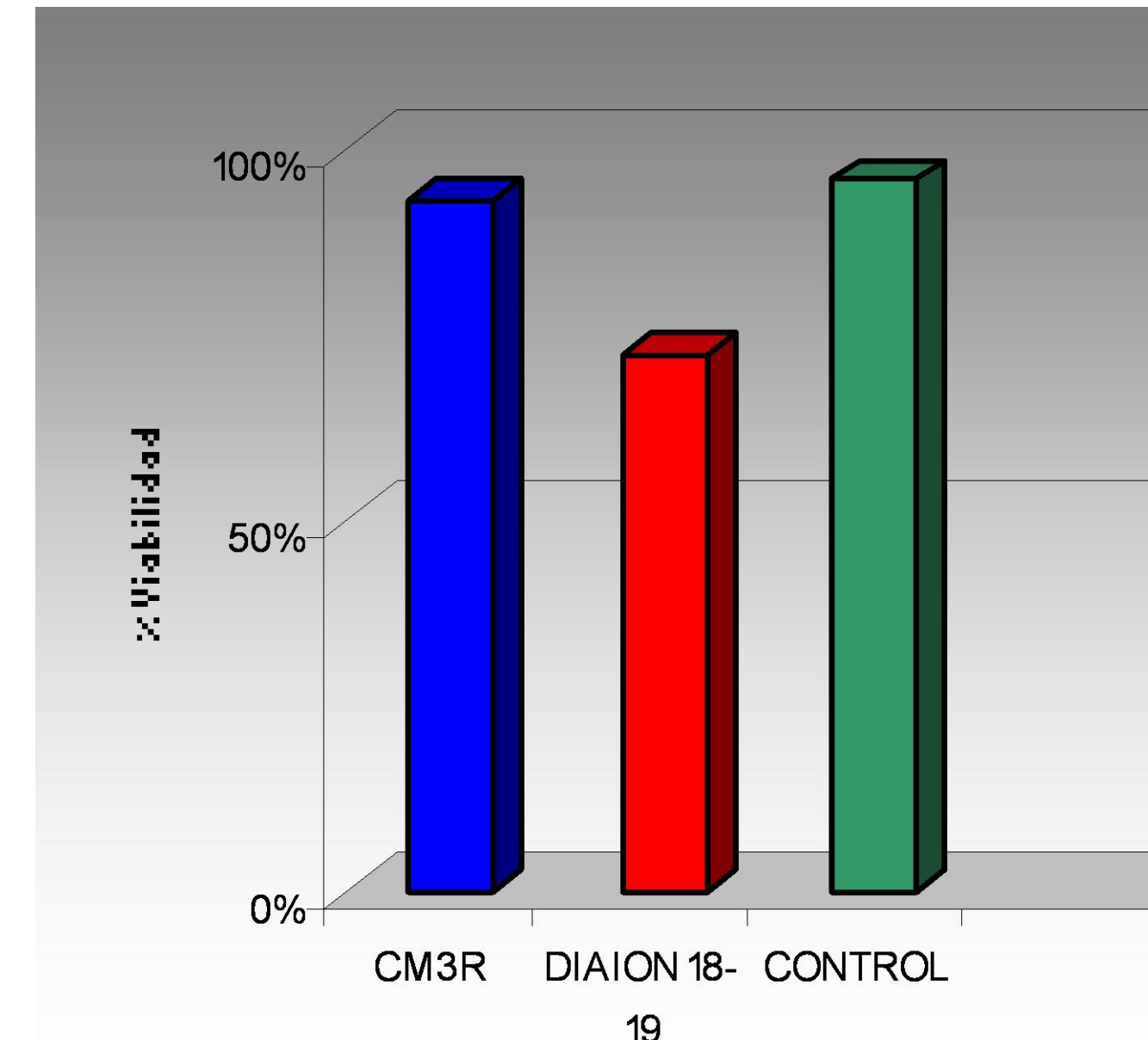


Fig. 4. Ensayo VR: Detalle de Diaion 1819, vemos que en realidad presenta actividad a concentraciones muy bajas (dcha.).

Fig. 5. Medimos la viabilidad de los compuestos activos por el método del yoduro de propidio, que solo penetra en las células muertas o apoptóticas a través de la membrana celular. Después de lavar, la presencia de este compuesto se mide por citometría de flujo



MECANISMO DE ACCIÓN

Interacción con la envuelta. Comparación de la actividad con virus que expresan la envuelta de VSV (no necesita reconocer receptores para penetrar en la célula) y los que expresan la de VIH.

Compuesto	NL4.3 Luc	CI50
CM3R	NL4.3 Luc	CI50=11,0 µg/ml
VSV Pseudotipado	VSV Pseudotipado	CI50=6,24 µg/ml
DIAION 1819	NL4.3 Luc	CI50=0,347 µg/ml
VSV Pseudotipado	VSV Pseudotipado	CI50=0,347 µg/ml

Fig. 6. La actividad para ambos tipos de virus no varía, descartamos este mecanismo de acción (izq)

Inhibición de la Transcriptasa Inversa. Nos basamos en la detección y cuantificación de ADN viral retrotranscrito usando una PCR, que deberá amplificar secuencias características LTR/gag y RU5

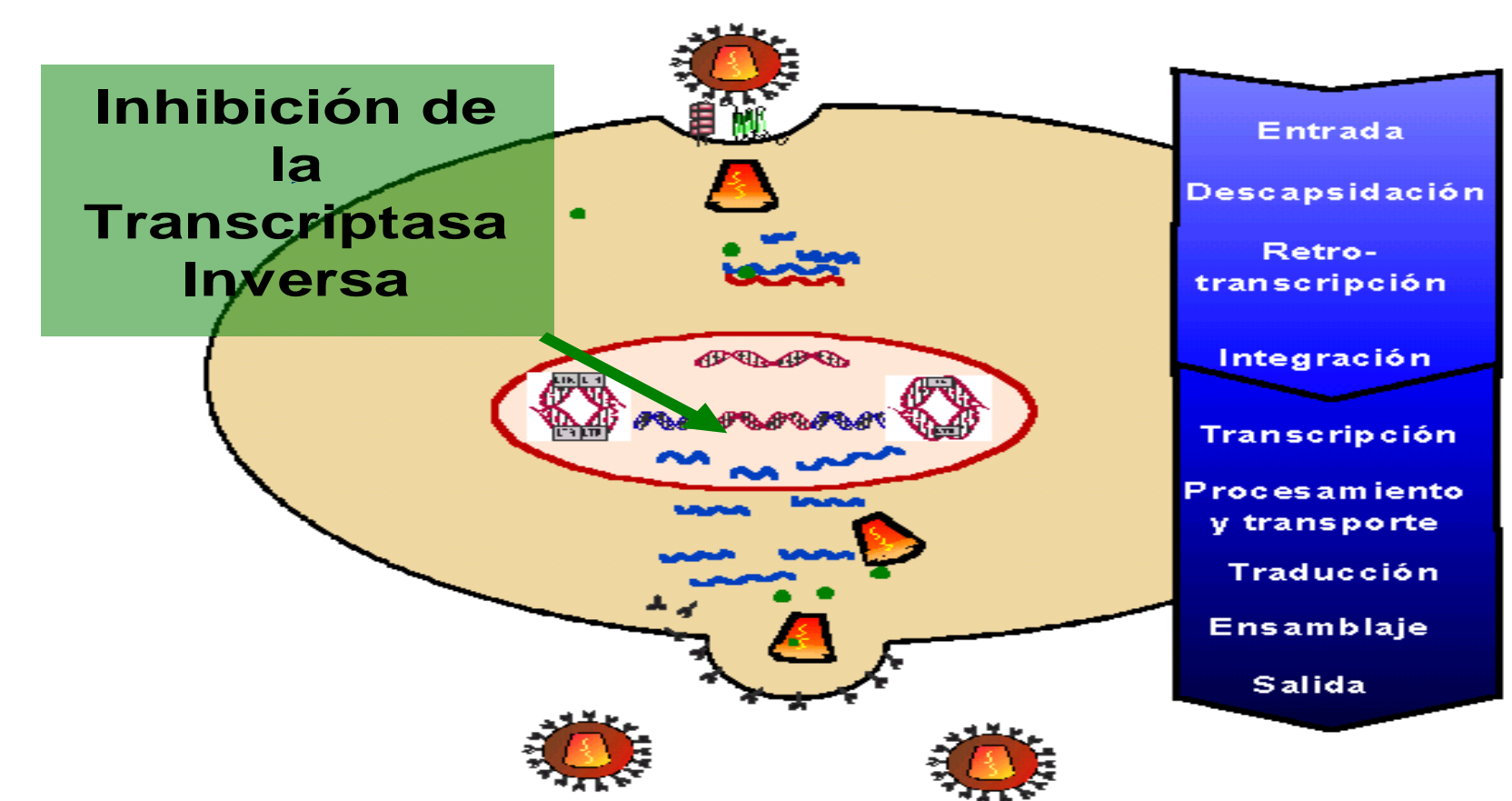


Fig. 7. Punto del ciclo vírico en que actúan nuestros compuestos (dcha.).

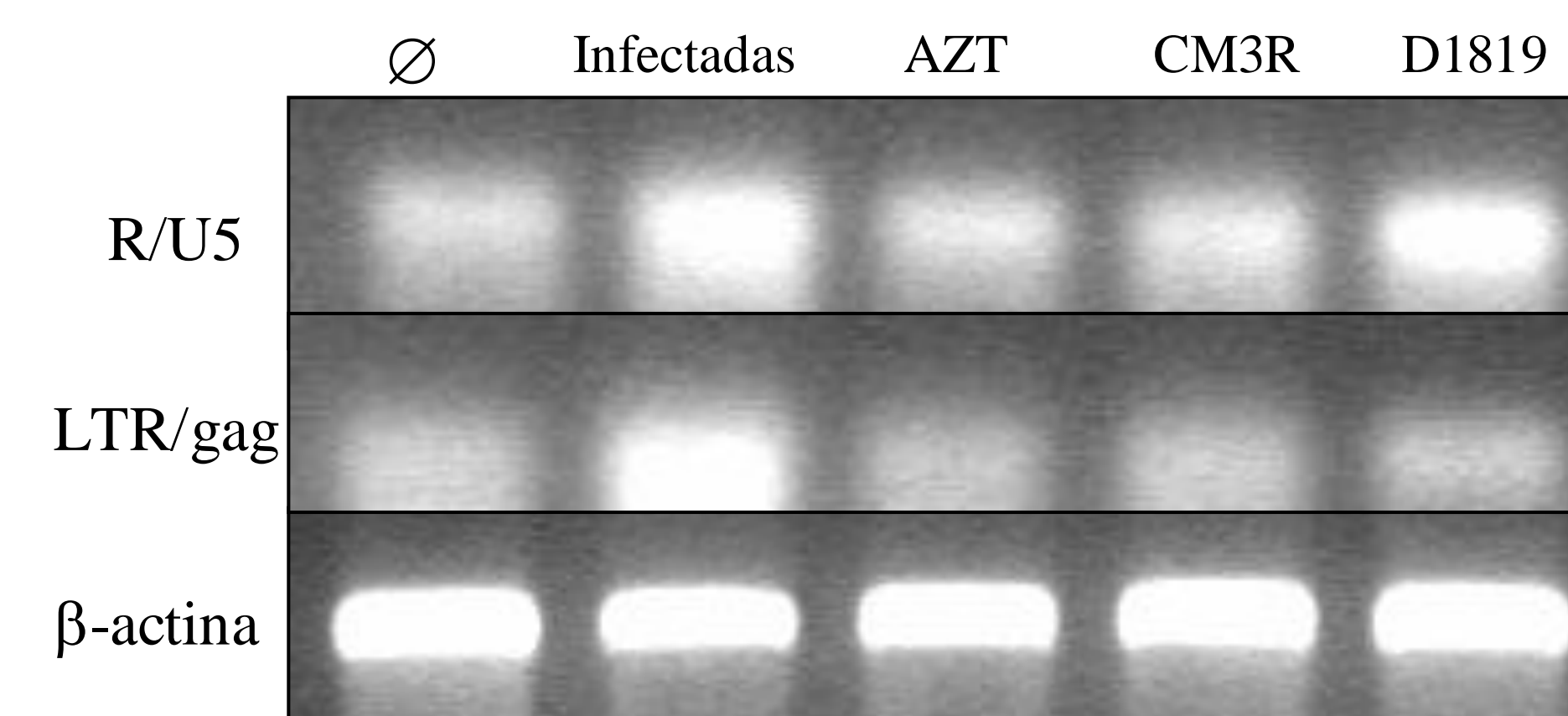


Fig. 8. Inhibición de T.I. Controles. Se observa la atenuación de las bandas comparable o más intensa que la de AZT

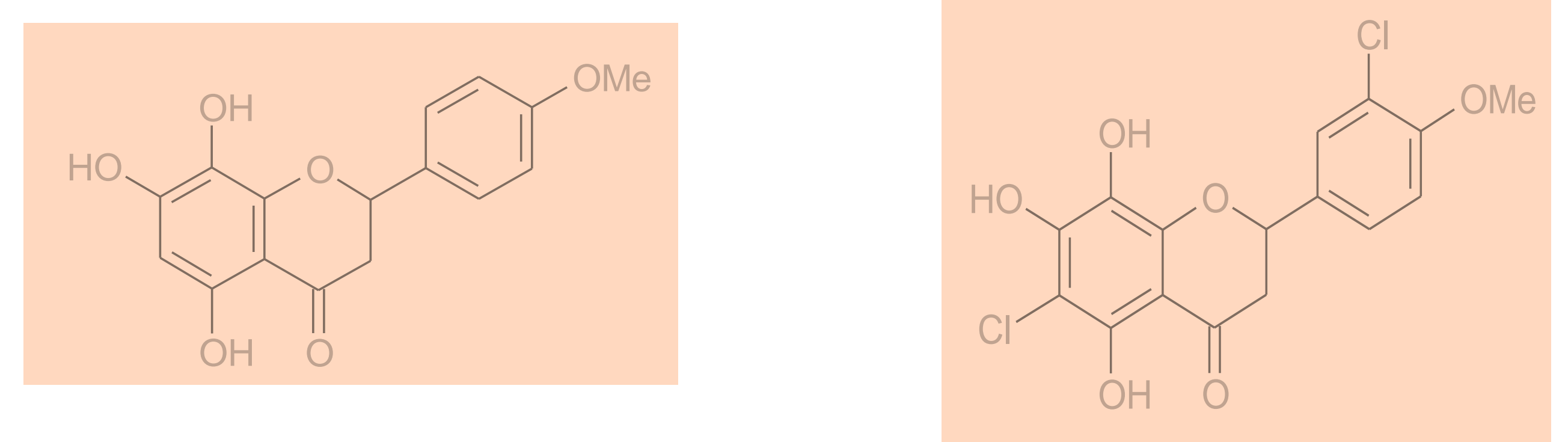


Fig. 9. Estructura de los compuestos activos tras análisis CCF, U.V, RMN y E.M.

CONCLUSIONES

Los compuestos aislados a partir de extractos etanólicos y diclorometánicos de *Artemisia glutinosa* demuestran tener actividad anti VIH in vitro, mejorando los resultados si eliminamos la fracción hexánica. Desarrolla como mecanismo de acción más probable la inhibición de la Transcriptasa Inversa, sin afectar a la entrada del virus. Ello permite establecer una relación estructura actividad con otros flavonoides activos.

Los compuestos mencionados carecen de citotoxicidad a las concentraciones ensayadas (CC50 > 25 µg/ml.).

AGRADECIMIENTOS

Luis Miguel Bedoya del Olmo, Paulina Bermejo, M. J. Abad y José Alcamí, sin cuya dirección, asesoramiento y paciencia no habría sido posible este trabajo.