

EL PARAÍSO (*Melia azedarach* L.): FUENTE DE PRODUCTOS BIOACTIVOS

Celia E. Coto*¹ y Ramón A. de Torres**¹

* Autor a quien dirigir la correspondencia

Cátedra de Virología. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA Pabellón 2 Piso 4. Ciudad Universitaria. (1428) Buenos Aires, República Argentina, Tel.: 4576-3334. Fax: 4576-3342. e-mail: cmaitocoto@qb.fcen.uba.ar

** Cátedra de Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.

Resumen

En este trabajo se consignan las actividades bioactivas, antivirales e inmunomoduladoras encontradas en los extractos de las hojas verdes de árboles de la familia Meliaceae. Los estudios más extensos se realizaron con *Melia azedarach* L., especie cuyo nombre vulgar es "paraíso". Se encontró que los extractos de las hojas de *M. azedarach* inhiben la replicación en cultivos celulares de virus patógenos para el hombre y los animales. La actividad terapéutica potencial de los extractos se probó en ratones de exo y endocria infectados con virus Tacaribe, o con virus Herpes simplex tipo I (HSV-1) respectivamente. Mientras que en el modelo Tacaribe se observó un efecto protector de los extractos, en el modelo HSV-1 se produjo una exacerbación de la sintomatología. La interpretación de estos resultados reveló la actividad inmunomoduladora de los extractos sobre distintos parámetros de la respuesta inmune, demostrada en experimentos *in vitro* e *in vivo*, en ratones de endocria. A partir de los extractos de *M. azedarach* se aisló y purificó un glicopéptido cíclico denominado meliacina que conserva el mismo espectro de actividad antiviral que *M. azedarach*.

Los extractos de hojas de meliáceas nativas como *Cedrela tubiflora*, *Cedrela lilloi*, *Trichilia glabra* y *Trichilia elegans* también modifican la respuesta inmune T-dependiente.

INDIAN LILAC (*Melia azedarach* L.): SOURCE OF BIOACTIVE PRODUCTS

Summary

Immunomodulating and antiviral activities present in crude leaf extracts of members of the Meliaceae family are described. Intensive studies were performed with *Melia azedarach* L., a species ordinary known as "Indian lilac". Crude extracts of *M. azedarach* inhibited the replication in cell cultures of several viruses pathogenic for humans and animals. Potential therapeutic effects of *M. azedarach* extracts were tested in mouse models. Administration of *M. azedarach* to Tacaribe infected mice produced a significant protection of treated animals whereas *M. azedarach* -treatment of inbred mice infected with HSV-1 virus produced a deleterious effect.

The interpretation of these results led to conclude that *Melia azedarach* extracts display immunomodulating activities, a fact that was later proved by experiments performed *in vitro* and *in vivo* using inbred mice. By purification of *M. azedarach* extracts, a cyclic glycopeptide, meliacine, which retained the broad spectrum of the antiviral activity was isolated.

Crude leaf extracts from native *Meliaceae* species: *Cedrela tubiflora*, *Cedrela lilloi*, *Trichilia glabra* and *Trichilia elegans* showed immunomodulating activities and inhibited T-cell response.

¹ Miembros de la Carrera de Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de la República Argentina.

Palabras claves: meliáceas - antiviral - inmunomodulador - *Melia azedarach* L. - meliacina.

Key words: antiviral - inmunomodulator - *Meliaceae* - *Melia azedarach* L. - meliacine.

Introducción

Las meliáceas son una familia de plantas utilizadas desde hace siglos en la medicina natural de la India. Su representante más notable es la *Azadiracta indica* (neem tree) utilizada en la medicina Ayúveda y de la que, además, se han aislado compuestos insecticidas. El árbol del paraíso, oriundo de Asia, es una especie muy difundida en nuestro país por su valor forestal y ornamental. Su nombre científico es *Melia azedarach* L. (*Persian lilac*) y pertenece al género *Melia* de la familia *Meliaceae*. Los extractos de diferentes partes de la planta poseen actividades benéficas, excepto los frutos que son tóxicos. Entre las meliáceas indígenas se encuentran: *Cedrela tubiflora*, conocida en Misiones como "cedro colorado"; *Cedrela lilloi*, *Trichilia glabra* y *Trichilia elegans*.

Este trabajo constituye un compendio de los resultados obtenidos con las hojas de estas plantas en lo que concierne a sus propiedades antivirales e inmunomoduladoras. Los estudios más detallados se han realizado con *Melia azedarach*, *Cedrela lilloi*, *Trichilia glabra* y *Trichilia elegans*.

Materiales

Plantas

- *Melia azedarach* L.: se colectaron hojas verdes de *M. azedarach* en parques de Buenos Aires y en la localidad de Bella Vista en la provincia de Buenos Aires. Las hojas fueron cosechadas desde diciembre hasta marzo. Fueron identificadas en la Cátedra de Botánica, del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN) de la Universidad de Buenos Aires donde se dejó una muestra que fue denominada Argentina BAFC 1432.
- *Trichilia glabra* L.: las hojas verdes se colectaron en noviembre y fueron identificadas en el Departamento de Botánica de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (Argentina BAA 2722).
- *Cedrela tubiflora* Bert: las hojas verdes se colectaron en la primavera tardía y fueron identificadas en el Departamento de Biología de la FCEN de la UBA.
- *Cedrela lilloi* C.D.C. y *Trichilia elegans* A. Juss: las hojas verdes se obtuvieron del Jardín Botánico de la ciudad de Buenos Aires.

Virus

Se emplearon los arenavirus Junín (agente de la fiebre hemorrágica argentina) y Tacaribe; los picornavirus polio y fiebre aftosa; los Herpes virus: simplex tipo

1 (HSV-1) y tipo 2 (HSV-2), cepas tk⁺ y tk⁻ de colección y cepas de aislamientos clínicos; virus herpes suis (pseudorrabia) y virus herpes bovino y equino; el togavirus Sindbis; el rhabdovirus estomatitis vesicular (VSV); el virus influenza tipo A y el paramixovirus NDV (enfermedad de Newcastle).

Cultivos celulares

Se utilizaron células de riñón de mono verde africano (Vero), de riñón de hamster bebé (BHK), de ratón (L), células humanas (HeLa), de embrión de pollo, y de perro (MDCK). A partir de ratones, se establecieron cultivos de macrófagos y linfocitos.

Drogas utilizadas

- Aciclovir (ACV) (Burroughs Wellcome Company, Research Triangle Park NC).
- Foscarnet (Sigma Chemical Co. USA).
- Valaciclovir (obtenida por gentileza de Glaxo Wellcome, Argentina).
- MTT (3-(4,5 dimetil tiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromuro) (Sigma Chemical Co. USA).

Animales

Los ensayos *in vivo* se realizaron en ratones blancos y en ratones de endocría BALB/C. Para multiplicar el virus NDV se usaron huevos embrionados.

Métodos

Detección de virus y parámetros inmunológicos

Fueron utilizadas técnicas virológicas de rutina, como la preparación de *stocks* y la titulación de virus por plaqueo directo o por rendimiento. En algunos casos que se observó el efecto citopático, se realizó la titulación para determinar la dosis infectiva del 50 %.

El efecto antiviral se investigó de dos maneras: a) las células fueron tratadas durante 2 horas antes de la infección (pretratamiento), b) 1 hora después se agregó el antiviral de la infección (postratamiento) y permaneció hasta la cosecha del virus (rendimiento viral) o hasta el momento del revelado de las placas o de la lectura del efecto citopático.

También se emplearon técnicas para el estudio de la determinación de centros infecciosos, ensayos diseñados al investigar la adsorción y penetración viral a la célula huésped. Para la detección de antígenos virales se emplearon técnicas de ELISA y de inmunofluorescencia, y el análisis de las proteínas

virales fue realizado por electroforesis en geles de poliacrilamida y tinciones citoquímicas. El análisis de síntesis de ácido nucleico viral fue estudiado por la incorporación de radioisótopos. En cuanto a la acción antiviral se determinó calculando la concentración inhibitoria 50 %, mientras que en los estudios de combinación de meliacina con otros antivirales se aplicaron métodos propios de uso en este tipo de experimentos.

Las respuestas inmunes se analizaron por determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes ensayados en sistemas celulares contra distintos virus según el modelo viral en estudio. La detección de interferón, las técnicas para obtener macrófagos y para estimular la proliferación de los linfocitos como los inductores de interferón utilizados fueron las de rutina.

Preparación de los extractos

Los extractos vegetales se prepararon con hojas verdes obtenidas de las plantas, seleccionadas cuidadosamente por su aspecto sano, lavadas con agua destilada y procesadas con una solución buffer-salina-fosfato ⁽¹⁾. La purificación de meliacina a partir de los extractos crudos fue realizada mediante técnicas de cromatografía en columnas y placas de sílica y la separación posterior en cromatografía líquida de alta presión ⁽²⁾.

Citotoxicidad

En todos los casos se trabajó con concentraciones no tóxicas para las células, tanto de *extractos de M. azedarach* como de las otras meliáceas. Previamente al ensayo se determinó la viabilidad celular por los métodos de exclusión del colorante azul tripán, o por medio de la incorporación del MTT de acuerdo con el método descrito por Mosmann ⁽³⁾.

Resultados

Efecto como antiviral

En la tabla 1 se muestra el rango de virus susceptibles estudiados y la mayor o menor sensibilidad de cada uno según el tipo de tratamiento aplicado a las células. Se consigna, además, el tipo de ácido nucleico y la polaridad de cada familia. Con excepción de los picornavirus el resto de los virus poseen envoltura. Los datos consignados muestran el amplio espectro de susceptibilidad viral al extracto de *M. azedarach*; en todos los casos la inhibición de la multiplicación ocurre cuando el virus ha ingresado a la célula huésped. Los resultados obtenidos al poner en contacto directo las partículas de virus con *M. azedarach* sugieren que el extracto no tiene efecto virucida sobre ninguno de los virus ensayados. Al purificarse la meliacina se encontró un patrón idéntico de susceptibilidad viral ⁽²⁾.

Virus	Tipo de ácido nucleico	Tratamiento	
		Pre	Post
Junín	RNA monocatenario segmentado, ambos sentidos	AS	AS
Tacaribe	RNA monocatenario segmentado, ambos sentidos	S	S
Aftosa (BHK) A24 01 Campos A87 01 Caseros C3 Rosende	RNA monocatenario positivo	R R	S R
Polio I II III	RNA monocatenario positivo	R R	S R
VSV	RNA monocatenario negativo	AS	S
HSV-1	DNA cadena doble	S	AS
PrV	DNA cadena doble	S	AS
HEV (MDCK)* (herpes equino)	DNA cadena doble	S	S
HBV (MDCK)* (herpes bovino)	DNA cadena doble	S	S
Sindbis (BHK21)	RNA monocatenario positivo	AS	AS
Influenza (MDCK)**	RNA monocatenario segmentado negativo	AS	Sin datos

AS= altamente sensible (inhibición > 90 %) S=sensible (inhibición 55 a 90 %) R= resistente (inhibición 0 a 50 %). A continuación del nombre del virus se especifica el cultivo celular en el que se hizo el ensayo. *(Cavaliere, H. y Coto, C.E., datos no publicados) **(Joseovich, A., Savy, V. y Coto, C.E. datos no publicados).

Tabla 1.- Susceptibilidad de virus animales al tipo de tratamiento con *Melia azedarach* L.

Inducción de un estado refractario a la infección

Debido a sus implicancias, la observación que el extracto de *M. azedarach* induce en las células un estado antiviral, en forma similar al que provoca el interferón (IFN), fue el motivo de un estudio más profundo de este fenómeno. Así se pudo establecer que *M. azedarach* induce en las células un estado refractario al desarrollo viral solo a temperatura fisiológica, alcanza su máximo

desarrollo al cabo de 2 horas y permanece activo por lo menos durante las 12 horas subsiguientes ⁽⁴⁾.

Su nivel máximo se restablece por un nuevo pulso del antiviral. Los factores responsables de este estado se desconocen aún, pero no interviene el sistema IFN *per se*. Es decir, la primera hipótesis fue que *M. azedarach* era un inductor de IFN y que esta proteína era la responsable de la acción antiviral observada. Por el contrario, los experimentos mostraron que el tratamiento de células L con *M. azedarach* en forma previa a la inducción de IFN por ribonucleótidos sintéticos de doble cadena, produce una inhibición tanto de la síntesis de IFN como de una de las enzimas involucradas en el sistema antiviral de IFN, la proteína quinasa dependiente de RNA doble cadena ⁽⁵⁾.

Al descartarse la hipótesis de que el IFN participaba en el efecto antiviral observado se buscó determinar si la meliacina, por sí misma, podía provocar una modificación en las células que involucrara cambios en los niveles de fosforilación en tirosina de las proteínas celulares como lo hace el IFN ⁽⁶⁾. En ese caso, se suponía que meliacina interactúa con un receptor celular y que, como consecuencia de esa interacción, se dispara el estado antiviral. En principio no fue posible demostrar la presencia de un receptor para meliacina en las células. Ese receptor debería ser de naturaleza ubicua ya que un espectro amplio de células responden a la acción del extracto de *M. azedarach* [mono (Vero), hamster (BHK), ratón (L), perro (MDCK), carcinoma humano (HeLa), conejo (RK13)].

A pesar de no encontrar evidencias de la participación de un receptor, tampoco se puede descartar que no lo haya. Por otra parte, se ha comprobado que al poner en contacto la meliacina con las células, se producen alteraciones en los niveles de fosforilación en la tirosina de las proteínas celulares; por lo tanto, se podría inferir que la meliacina afecta el camino de transducción de señales. (Barquero, A. y Coto, C. E., datos no publicados).

Acción de meliacina sobre cepas de virus HSV-1 y aislamientos clínicos

Debido a la importancia clínica del virus herpes simplex, se realizaron estudios para determinar la susceptibilidad de cepas denominadas tk⁻, mutantes resistentes al aciclovir, el antiviral de elección en el uso clínico. Los resultados mostraron que estas mutantes no solo son susceptibles a la meliacina sino que esta puede combinarse en forma sinérgica con algunas concentraciones de aciclovir ⁽⁷⁾. Un resultado similar se obtuvo cuando se ensayaron combinaciones de meliacina con la droga foscarnet (fosfonoformato de sodio) (PFA) ⁽⁸⁾. Se utilizaron cepas patrones de HSV-1 y, así, se analizó también la susceptibilidad de los aislamientos clínicos. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en forma comparativa con el efecto de otras drogas antiherpéticas de uso clínico. Se observa que meliacina puede competir

exitosamente, *in vitro*, con el aciclovir, el PFA y el valaciclovir con la ventaja de que actúa sobre las cepas tk⁻ no susceptibles a los análogos de nucleósidos.

Aislamiento clínico HSV-1	Localización	ACV (CE50) µg/ml	PFA (CE50) µg/ml	VCV (CE50) µg/ml	Heparina 4 µg/ml inhibición %	Meliacina* 50 µg/ml inhibición %
A1	fauces	0,03	16	0,1	75	100
B1	glande	0,06	32	0,2	95	100
E1	labial	0,03	16	0,1	95	100
F1	nc (HIV ⁺)	0,03	16	0,2	90	100
G ₁	nc	0,03	16	0,2	75	100
H1	nc	0,06	16	0,1	85	100
cepa F (tk ⁺)	—	0,03	16	0,2	80	100
cepa KOS (tk ⁺)	—	0,06	32	0,1	95	100
cepa Field (tk ⁻)	—	>10	32	>20	85	100
cepa B2006 (tk ⁻)	—	>10	64	>20	100	100

Los ensayos se realizaron por plaqueo directo en presencia de distintas concentraciones de los compuestos, que permitió calcular las CE50 = concentración del compuesto capaz de inhibir en un 50 % el número de placas virales en relación a un control sin droga.

*Se usó una sola concentración de meliacina. La heparina que impide la entrada de HSV-1 se utilizó para establecer el fenotipo formador de sincicios. ACV= aciclovir; VCV= valaciclovir; PFA= foscarnet. nc = no se conoce la localización, pero en ambos casos se aisló de individuos transplantados de hígado con terapia inmunodepresora. (Casos G1 y H1). F1 persona infectada con VIH.

Tabla 2.- Susceptibilidad a la meliacina de cepas de virus herpes simplex tipo 1 de aislamientos clínicos y cepas patrones de laboratorio.

En relación con el mecanismo de acción antiviral sobre la replicación del virus herpes *in vitro* se estableció que en las células infectadas tratadas con meliacina, se produce una inhibición de los polipéptidos virales denominados β - γ , estos polipéptidos participan en la síntesis de los genomas progenie, y en el ensamble de las nucleocápsides virales ⁽⁹⁾. Estudios posteriores, por medio

de la técnica de detección de antígenos por inmunohistoquímica y microscopía electrónica de células infectadas, demostraron que la producción de partículas intracelulares se encuentra inhibida, como también la síntesis de DNA viral progenie. La microscopía electrónica muestra que se produce una acumulación de nucleocápsides virales carentes de envoltura en el citoplasma celular y solo se encuentra una mínima cantidad de partículas completas incluidas dentro de vesículas citoplasmáticas (Alché, L.A.; Villamil, S.; San Juan, N.; Coto, C.E.; datos no publicados). Se detectó que la replicación de Herpes virus suis, de la familia Herpesviridae –patógeno del cerdo– es afectada sensiblemente por el extracto de *M. azedarach* ⁽¹⁰⁾.

Mecanismo de acción sobre el virus Junín

La multiplicación del virus Junín se encuentra inhibida por meliacina tanto en el pre como en el postratamiento (Tabla 1) ⁽¹¹⁾. En el pretratamiento, el compuesto interfiere con el desnudamiento de las partículas virales y, en el postratamiento hay un bloqueo de la liberación de las partículas al medio extracelular, aun cuando el transporte de las glicoproteínas virales a la membrana celular ocurra normalmente.

Como en presencia de meliacina, la capacidad que tiene el virus Junín para fusionar las células a pH bajo se encuentra inhibida, se puede inferir que el blanco de acción de meliacina es la fusión de membranas, paso necesario tanto para la entrada como para la salida del virus de la célula ⁽¹¹⁾.

Acción sobre Picornavirus

De todos los virus ensayados los Picornavirus fueron los menos susceptibles a la meliacina (Tabla 1) ⁽¹²⁾. Solo se pudo demostrar un efecto inhibitorio de la replicación en multiplicidades de infección muy bajas ⁽¹³⁾. Estudios posteriores realizados con la cepa Campos del virus aftoso y células BHK21 ⁽¹⁴⁾ mostraron que la inhibición de la replicación viral ocurre porque el virus, a pesar de ser endocitado por las células, no puede ingresar al citoplasma, índice de que la meliacina afecta la etapa de desnudamiento. En ese sentido, la meliacina se comporta como otras drogas lisosomotrópicas como la L-amantadina y el cloruro de amonio.

De la misma forma que esas drogas, el agregado de la meliacina produjo una basificación de los endosomas ⁽¹⁴⁾. Pero a diferencia de los otros compuestos la basificación solo ocurre a temperatura fisiológica y requiere de un período de contacto de más de 10 minutos. La alteración del pH endosomal sería uno de los mecanismos por los cuales la meliacina se comporta como un antiviral para todos los virus que ingresan a la célula a causa de endocitosis mediada por receptores como los virus Junín, Sindbis ⁽¹⁵⁾, VSV y picornavirus.

Ensayos de acción antiviral de *Melia azedarach* en modelos de infección *in vivo*

Se trabajó con dos modelos: la infección de ratones neonatos con el arenavirus Tacaribe y por vía intraperitoneal y el modelo de encefalitis herpética por el virus HSV-1 en el ratón adulto de endocría.

Virus Tacaribe

Los resultados obtenidos con ratones neonatos infectados con virus Tacaribe y tratados con *M. azedarach* fueron muy promisorios ^(16,17). En primer lugar, se observó una protección del 66 al 100 % en el desarrollo de una encefalitis mortal entre ratones infectados con virus Tacaribe a los 4 días de edad y tratados con *M. azedarach* administrada a los -1, 0, +1, +2, +3, +4, +5 y +6 días postinfección. También se obtuvieron resultados similares al administrar *M. azedarach* en el agua de bebida, a las ratonas que amamantaban a sus crías recién nacidas inoculados con virus Tacaribe ⁽¹⁶⁾.

Posteriormente, se investigó el porqué de la protección observada ⁽¹⁷⁾; se encontró que la administración de los extractos a los animales inoculados con 1.000 Unidad Formadora de Plazas (UFP) de virus Tacaribe reducía la distribución viral a los órganos periféricos como el riñón y el hígado.

En el cerebro de los animales tratados el título de virus se redujo en 3 logaritmos (99,9 %) respecto de los controles; los animales sobrevivientes por el tratamiento mostraron una respuesta inmune humoral similar a la de los controles no tratados, pero presentaban niveles de interferón más bajos. A pesar de la actividad antiviral manifiesta, y debido a que la encefalitis producida por virus Tacaribe es de naturaleza inmunopatológica, no se descartó que los extractos de *M. azedarach* pudieran haber modificado la respuesta T y, en consecuencia, favorecido la supervivencia de los animales infectados.

Virus herpes

En primer lugar, se realizó un estudio de toxicidad de los extractos para ratones adultos de endocría tratados por vía intraperitoneal (ip) durante un mes, con una dosis diaria. Los ratones soportaron el tratamiento sin que se produjera pérdida de peso, muertes o alteraciones manifiestas, como cambios en el comportamiento, u otros signos. Luego se probó la acción del extracto sobre grupos de 8 ratones infectados con 100 UFP de virus HSV-1 por vía intracerebral. A uno de los grupos de ratones se les administró extracto de *M. azedarach* por ip los días -1; -2; 0; +1; +2; +3; +4 y +5 p.i. Se emplearon animales adultos de exocría de la cepa OF1 (Tabla 3).

Grupos	Número de muertos/ número de tratados
No infectados tratados	0/8
Infectados sin tratar	8/8
Infectados tratados	3/8

Tabla 3.- Ratones adultos de exocría infectados con HSV-1 y tratados con *Melia azedarach* L.

Los resultados obtenidos fueron alentadores, pero si se tiene en cuenta que la inoculación directa en el cerebro de un virus que produce encefalitis favorece al virus y, en consecuencia, no permite evaluar la verdadera potencia del antiviral, se cambió el modelo y se administró el virus por vía ip. Dado que no todos los ratones son susceptibles al virus herpes por esta vía, se seleccionaron los ratones Balb/c que presentan una susceptibilidad intermedia a la infección.

La actividad de extractos de *M. azedarach* sobre la infección ip de ratones adultos Balb/C con virus HSV-1, mostró que el comportamiento del extracto *in vivo* no responde a las expectativas de los resultados obtenidos *in vitro* y tampoco con los ratones OF1. En animales endocriados el tratamiento con *M. azedarach* provocó una respuesta inversa. No solamente no se observó protección, sino que tanto el período de incubación como la muerte de los ratones, se aceleraron. Este efecto confirma que *M. azedarach* modifica el factor inicial de la relación del virus con los macrófagos que en condiciones de pretratamiento con los extractos de *M. azedarach* replican eficientemente al virus herpes en lugar de eliminarlo ⁽¹⁸⁾.

En el modelo de queratitis herpética murina se observó una respuesta inflamatoria que puede llegar hasta la opacidad de la córnea. En un estudio posterior se demostró que la administración diaria de meliacina a 20 ratones, infectados con virus HSV-1, solo en 2 desarrollaron enfermedad, mientras que entre los controles enfermaron 18 sobre 20. Además los títulos de virus en el cerebro de los animales tratados alcanzaron 2 logaritmos menos que los controles ⁽¹⁹⁾. Otros resultados ponen de manifiesto que lo que parecía una desventaja en el modelo de infección intraperitoneal resultó lo contrario en el ocular.

Efecto de *Melia azedarach* como inmunomodulador

Los resultados obtenidos en el modelo ratón infectado con HSV-1 por vía ip dio lugar a la planificación de un estudio para investigar si los extractos de *M. azedarach* pueden modificar parámetros de la respuesta inmune tanto *in vitro* como *in vivo*. En la tabla 4 se presentan en forma resumida los resultados encontrados.

Actividad	Referencia
Inhibe la producción de Interferón alfa en cultivos celulares (células L929) o fibroblastos primarios de ratón inducidos con virus de Newcastle o con poli I: poli C. Agregada antes, junto con o inmediatamente después de la inducción. (<i>in vitro</i>).	Andrei, G.M.; Coulombié, F.C.; Courrèges, M.C.; de Torres, R.A. y Coto, C.E. (1990). "Meliacine an antiviral compound from <i>Melia azedarach</i> L. inhibits interferon production". <i>Journal of Interferon Research</i> 10: 469-475.
La cantidad de IFN circulante ácido resistente disminuye sensiblemente en ratones inoculados con <i>M. azedarach</i> por vía intraperitoneal.	Andrei, G.M.; Coulombié, F.C.; Courrèges, M.C.; de Torres, R.A. y Coto, C.E. (1990). "Meliacine an antiviral compound from <i>Melia azedarach</i> L. inhibits interferon production". <i>Journal of Interferon Research</i> 10: 469-475.
El extracto de <i>M. azedarach</i> inhibe la fagocitosis de monocitos humanos y también el estallido respiratorio inducido por un éster de forbol.	Benencia, F.; Courrèges, M.C.; Coto, C.E. y Coulombié, F.C. (1997). "Immunomodulatory activities of <i>Melia azedarach</i> L. leaf extracts on human monocytes". <i>Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants</i> 5:7-13.
El extracto de <i>M. azedarach</i> no inhibe el estallido respiratorio de los leucocitos de ratón, ni la actividad fagocítica de los polimorfonucleares. En cambio, muestra una fuerte actividad anticomplementaria, afectando más la vía clásica.	Benencia, F.; Courrèges, M.C.; Massouh, E.J. y Coulombié, F.C. (1994). "Effect of <i>Melia azedarach</i> L. leaf extracts on human complement and polymorphonuclear leukocytes". <i>Journal of Ethnopharmacology</i> 41: 53-57.
La administración intraperitoneal de <i>M. azedarach</i> a ratones, produce un aumento transiente del volumen de glóbulos rojos y la concentración de hemoglobina en sangre y un aumento del número de neutrófilos.	Benencia, F.; Courrèges, M.C.; Coulombié, F.C. y Massouh, E. (1992). "Effect of <i>Melia azedarach</i> L. fresh leaf aqueous extract on mice hematological parameters". <i>Fitoterapia</i> LXIII: 411-414.
Los extractos de <i>M. azedarach</i> inhiben la actividad fagocítica y el metabolismo oxidativo de exudados peritoneales de células de ratón.	Courrèges, M.C.; Benencia, F.; Coto, C.E.; Massouh, E. y Coulombié, F.C. (1994). "In vitro antiphagocytic effect of <i>Melia azedarach</i> L. leaf extracts on mouse peritoneal exudate cells". <i>Journal of Ethnopharmacology</i> 43: 135-140.
<i>M. azedarach</i> puede inhibir la proliferación de linfocitos estimulados <i>in vitro</i> por mitógenos como la concanavalina A y el lipopolisacárido. Ocurre con linfocitos T aislados de bazo o ganglios de ratones de endocría. El tratamiento de ratones con los extractos inhiben ligeramente la producción de anticuerpos contra glóbulos rojos pero afectan en forma total, y depende de la dosis, la reacción de rechazo de transplante del huésped por los linfocitos trasplantados y la reacción de hipersensibilidad retardada.	Courrèges, M.C.; Benencia, F.; Coulombié, F.C. y Coto, C.E. (1998). "In vitro and in vivo activities of <i>Melia azedarach</i> L. aqueous extracts on murine lymphocytes". <i>Phytomedicine</i> 5 (1) 63-69.

Tabla 4.- Propiedades inmunomoduladoras de los extractos de *Melia azedarach* L.

En todos los casos los extractos de *M. azedarach* debieron administrarse antes o simultáneamente con el disparador de la reacción en ensayo. Entre las características más notables se pueden mencionar la capacidad de *M. azedarach* para inhibir la inducción y la síntesis de interferón en cultivos celulares y en ratones infectados con virus Tacaribe.

Los extractos de *M. azedarach* tienen un efecto ligero sobre la respuesta B-dependiente pero interfieren en forma notoria los parámetros de la respuesta T-dependiente, como la inhibición de la proliferación de linfocitos, la reacción de rechazo de transplante y la reacción de hipersensibilidad retardada.

Actividades detectadas en otras Meliáceas nativas

Se han buscado indicios de actividades antiviral e inmunomoduladora en extractos y purificados de otras meliáceas nativas. Los resultados más relevantes se ilustran en la tabla 4 y muestran el potencial de estas plantas como fuente de productos antiinflamatorios.

Se han estudiado, además, otros extractos de meliáceas como *M. azedarach* var *gigantea*, *M. azedarach* var. *variegada*, *M. toona*, *M. toosedans* y *M. caoba* para determinar la presencia de actividad antiviral o antifagocítica. No se han encontrado aún actividades importantes en esos extractos y, algunos de ellos, como los de *M. toona* y *M. toosedans* son muy tóxicos para las células.

Discusión

De los estudios realizados se concluye que el paraíso es una reserva de productos de posible aplicación farmacológica. Algunas partes del árbol, como los frutos, son tóxicos para los animales domésticos y el hombre porque producen diferentes grados de envenenamiento. La mayoría de los trabajos que se encuentran en la bibliografía, realizados por otros investigadores sobre *M. azedarach*, tratan precisamente sobre la presencia de compuestos del tipo de los limonoides que muestran poderes tóxico e insecticida. Solo se mencionan tres de ellos ⁽²⁰⁻²²⁾.

El poder de los extractos de *M. azedarach* para inhibir la replicación del RNA y DNA viral, así como su evidente acción sobre parámetros del sistema inmune, señalan la necesidad de continuar los estudios de purificación para su identificación molecular de sus principios activos.

Se desconoce la función que la meliacina cumple en la planta; una posibilidad sería que se tratara de un metabolismo secundario de la planta, en forma similar a las que producen numerosas plantas superiores ⁽²³⁾.

Por ejemplo, las sustancias que actúan en la defensa son péptidos de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas propias de vertebrados anfibios y bacterias, y considerados como un sistema de defensa primitivo anterior al sistema inmune dependiente de la respuesta B o T ^(24,25).

Estos péptidos tienen la habilidad de atravesar las membranas celulares formando poros por medio de un mecanismo diferente al de endocitosis ⁽²⁶⁾. Aun no hay pruebas concretas; se podría sostener que la meliacina es una sustancia de defensa del paraíso que además, se comporta como una molécula capaz de modificar los procesos moleculares que ocurren en la células al ser infectadas, protegiéndolas de la agresión viral (Tabla 5).

Especie	Actividad	Referencia
<i>Cedrela tubiflora</i> (Extractos de hojas)	- Interfiere con funciones del complemento humano: a) actividad hemolítica; b) proliferación de los linfocitos T; c) capacidad fagocítica y metabolismo de los monocitos y leucocitos polimorfonucleares en ratones.	Benencia, F.; Courrèges, M.C.; Nores, M.M. y Coulombié, F.C. (1995). "Immunomodulatory activities of <i>Cedrela tubiflora</i> leaf aqueous extracts". <i>Journal of Ethnopharmacology</i> 41: 53-57.
<i>Cedrela tubiflora</i> (Extractos de hojas)	- Actividad virucida contra HSV, PrV y VSV.	Córdoba, M.; Coto, C.E. y Damonte, E.B. (1991). "Virucidal activity in aqueous extracts from <i>Cedrela tubiflora</i> leaves". <i>Phytotherapy Research</i> 5: 250-253.
<i>Cedrela tubiflora</i> (Extractos de hojas)	- Inhibe la actividad del complemento murino y la fagocitosis por exudados peritoneales de ratón.	Benencia, F.; Courrèges, M.C. y Coulombié, F.C. (1996). "In vitro activities of <i>Cedrela tubiflora</i> aqueous leaf extracts on murine macrophages polymorphonuclear leukocytes and complement". <i>Phytotherapy Research</i> 10, 37-41.
<i>Trichilia glabra</i>	- Actividad antiviral: fracción de un polisacárido aislado de hojas contra HSV y VSV.	Benencia, F.; Courrèges, M.C. y Coulombié, F.C. (1997). "Antiviral activity of crude of polysaccharides from <i>Trichilia glabra</i> leaves". <i>Fitoterapia</i> 58: 173-176.
<i>Cedrela lilloi</i>	- Actividad anticomplementaria. - Inhibición de la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales y la activación de su metabolismo oxidativo por zimosán opsonizado.	Nores, M.M.; Courrèges, M.C.; Benencia, F. y Coulombié, F.C. (1997). <i>Journal of Ethnopharmacology</i> 55: 99-106.
<i>Trichilia elegans</i>	- Actividad anticomplementaria. - Inhibición de la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales y la activación de su metabolismo oxidativo por zimosán opsonizado.	Nores, M.M.; Courrèges, M.C.; Benencia, F. y Coulombié, F.C. (1997). <i>Journal of Ethnopharmacology</i> 55: 99-106.

Tabla 5.- Bioactividades detectadas en extractos de hojas de meliáceas nativas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Miguel A. De Cristófano del Hospital Italiano por la provisión de los aislamientos clínicos, y a la Lic. Gabriela Castro por su valiosa colaboración en este trabajo.

Esta investigación se llevó a cabo con subsidios otorgados por el CONICET y la UBA.

Referencias bibliográficas

1. Andrei, G.M.; Coto C.E. y de Torres, R.A. (1985). "Ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral de extractos crudos y semipurificados de hojas verdes de *Melia azedarach* L." *Revista Argentina de Microbiología* 17: 187-194.
2. Andrei, G.M.; Couto, A.S.; Lederkremer, R., Coto, C.E. (1995). "Inhibition of herpes simplex virus type-1 multiplication by meliacine, a peptide of plant origin". *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 6: 239-244.
3. Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
4. Andrei, G.M.; Damonte, E.B.; de Torres, R.A. y Coto, C.E. (1988). "Induction of a refractory state to viral infection in mammalian cells by a plant inhibitor isolated from leaves of *Melia azedarach* L". *Antiviral Research* 9: 221-231.
5. Andrei, G.M.; Coulombié, F.C.; Courrèges, M.C.; de Torres, R.A. y Coto, C.E. (1990). «Meliacine, an antiviral compound from *M.azedarach* L, inhibits Interferon production". *Journal of Interferon Research*. 10: 469-475.
6. Larner, A.; Reich, Nancy C. (1996). "Interferon signal transduction". *Biotherapy* 8: 175-181.
7. Barquero, A.; Alche, L.E. y Coto, C.E. (1997). "Antiviral activity of meliacine on the replication of a thymidine kinase-deficient (TK) mutant of herpes simplex virus type 1 alone and in combination with aciclovir". *International Journal of Antimicrobial Agents* 9: 49-55.
8. Barquero, A. y Villamil, S.M. (1997). "Estudio de la acción combinada de meliacina y foscarnet contra distintas cepas del virus herpes simplex tipo 1 empleando un modelo tridimensional". *Revista Argentina de Microbiología* 28: 32-37.
9. Villamil, S.M.; Alché, L.E. y Coto, C.E. (1995). "Inhibition of herpes simplex virus type 1 multiplication by meliacine, a peptide of plant origin". *Antiviral Chemiatry and Chemotherapy* 6, 239-244, 95.
10. Descalzo, A.M. y Coto, C.E. (1989). "Inhibición del virus de pseudorrabia (Suid herpesvirus 1) por acción de un antiviral aislado de las hojas de *Melia azedarach* L.". *Revista Argentina de Microbiología* 21: 133-140.
11. Castilla, V.; Barquero, A.; Mersich, S. y Coto, C.E. (1998). "In-vitro anti-Junin virus activity of a peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves". *International Journal of Antimicrobial Agents* 10:67-75.
12. Wachsman, M.B.; Martino, V.; Gutkind, G.; Coussio, J.; Coto, C.E. y de Torres, R.A. (1982). "Antiviral activity of *Melia azedarach* L. plant extract". *Fitoterapia* 53: 167-170.
13. Wachsman, M.B. y Coto, C.E. (1995). "Susceptibilidad de Picornavirus a un antiviral de origen vegetal (Meliacina)". *Revista Argentina de Microbiología* 27:33-37.

14. Wachsman, M.B.; Castilla, V. y Coto, C.E. (1998). "Inhibition of foot and mouth virus (FMDV) uncoating by a plant-derived peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves". *Archives of Virology* 143: 1-10.
15. Wachsman, M.B.; Damonte, E.B.; Coto, C.E. y de Torres, R.A. (1987). "Antiviral effects of *Melia azedarach* L., leaves extracts on Sindbis virus-infected cells". *Antiviral Research* 8: 1-12.
16. Andrei, G.M.; Lampuri, J.S.; Coto, C.E. y de Torres, R.A. (1986). "An antiviral factor from *Melia azedarach* L. prevents Tacaribe virus encephalitis in mice". *Experientia* 42: 843-845.
17. Coulombié, F.C.; Andrei, G.M.; Laguens, R.P.; de Torres, R.A. y Coto, C.E. (1992). "Partially purified leaf extracts of *Melia azedarach* L. inhibit Tacaribe virus growth in neonatal mice". *Phytotherapy Research* Vol. 6, 15-19.
18. Claus, J.; Coto, C.E. y de Torres, R.A. (1998). "Natural resistance of BALB/c mice to Herpes simplex virus type 1 intraperitoneal infection is abrogated by a plant extract with in vitro antiherpes activity". *Phytotherapy Research* 12:1-5.
19. Berra, A.; Alché, L.; Veloso, M.J. y Coto, C.E. (1998). *Medicina (Bs As)* 58: 673.
20. Takeya, K. *et al.* (1996). "Cytotoxic azadirachtin-type limonoids from *Melia azedarach* L.". *Phytochemistry* 42: 709-712.
21. Cabral, M.M., *et al.* (1995). "Lignanes from the Brazilian *Melia azedarach* L. and their activity in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae)". *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 90: 759- 763.
22. Itokawa, *et al.* (1995). "Cytotoxic limonoids and tetranortriterpenoids from *Melia azedarach* L.". *Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* 43: 1171-1175.
23. Polya, G.M. y Wang, B.H. (1997). "Inhibition of eukaryote protein kinases by plant defensive metabolites". *Recent Research Developmental in Phytochemistry*: 77-94.
24. Broekaert, W.F.; Terras, F.R.G.; Cammue, B.P.A. y Osborn, R.W. (1995). "Plant defensins: Nobel antimicrobial peptides as components of the host defense system". *Plant Physiology* 108:1353-1358.
25. Nissen-Meyer, J. Nes (1997). "Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action". *Archives of Microbiology* 167: 67-77.
26. Derossi, D.; Chassaing, G. y Prochiant, A. (1998). "Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery". *Trends in Cell Biology* 8: 84-87.