



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**TÍTULO DEL TRABAJO: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE
ACEITES ESENCIALES PRODUCIDOS EN EL PARAGUAY FRENTE AL
HERPES SIMPLEX TIPO 1**

MARCOS MARCELO FLORENTÍN PAVÍA

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Junio, 2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**TÍTULO DEL TRABAJO: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE
ACEITES ESENCIALES PRODUCIDOS EN EL PARAGUAY FRENTE AL
HERPES SIMPLEX TIPO 1**

MARCOS MARCELO FLORENTÍN PAVÍA

Tutor: PROF. DR PABLO HERNÁN SOTELO TORRES
Co-tutor: PROF. DRA PATRICIA ELENA LANGJAHR
PENAYO

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Junio, 2021

FICHA CATALOGRÁFICA (para el encuadernado final, para entregar en la defensa de tesis)

Florentín Pavía, Marcos Marcelo

Estudio de la actividad antiviral de aceites esenciales producidos en el Paraguay frente al herpes simplex tipo 1/Marcos Marcelo Florentín Pavía; Pablo Hernán Sotelo Torres; Patricia Elena Langjahr Penayo- - San Lorenzo: UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, 2021.

86 páginas; 11 gráficos;

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) – IICS, FCQ, 2021

1. HSV-1, Aceites Volátiles, Agente antiviral, Replicación viral, IL-6. I. Estudio de la actividad antiviral de aceites esenciales producidos en el Paraguay frente al herpes simplex tipo 1

CDD: consultar en biblioteca

M298e



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EL **PROF. DR. PABLO HERNÁN SOTELO TORRES**, DOCENTE INVESTIGADOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Estudio de la actividad antiviral de aceites esenciales producidos en el Paraguay frente al herpes simplex tipo 1”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el estudiante **Marcos Marcelo Florentín Pavía** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los ____ días del mes de Junio de 2021.

Tutor: Prof. Dr. Pablo Hernán Sotelo Torres



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA PROF. DRA. PATRICIA ELENA LANGJAHR PENAYO, DOCENTE INVESTIGADORA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Estudio de la actividad antiviral de aceites esenciales producidos en el Paraguay frente al herpes simplex tipo 1”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el estudiante **Marcos Marcelo Florentín Pavía** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los ____ días del mes de Junio de 2021.

Co-Tutora: Prof. Dra. Patricia Elena Langjahr Penayo



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA **B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc**,
COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA
UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Estudio de la actividad
antiviral de aceites esenciales producidos en el Paraguay frente al herpes simplex tipo
1”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el estudiante **Marcos
Marcelo Florentín Pavía** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas
bajo la dirección del docente investigador **PROF. DR. PABLO HERNÁN SOTELO
TORRES** considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato
necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste,
se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los ____ días del mes de Junio
de 2021.

B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**Estudio de la actividad antiviral de aceites esenciales producidos en el
Paraguay frente al herpes simplex tipo 1**

Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

Marcos Marcelo Florentín Pavía

Aprobado el 04 de Abril de 2021

Tribunal examinador:

Miguel Angel Campuzano Bublitz, Facultad de Ciencias Químicas, San Lorenzo,
Paraguay

Danilo Fernández Ríos, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, San Lorenzo,
Paraguay

Esteban Antonio Ferro Bertolotto, Facultad de Ciencias Químicas, San Lorenzo,
Paraguay

Iara Magaly Martínez Pereira, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
San Lorenzo, Paraguay

Prof. Dr. Pablo Hernán Sotelo Torres
Tutor

Prof. Dra. Patricia Elena Langjahr Penayo
Co-Tutora

Prof. Lic. Laura Joy, MSc.
Directora de Postgrado FCQ

DEDICATORIA

Para mamá, por su apoyo incondicional y por siempre creer en mí.

Para Toti, que se encargó del arduo trabajo de mi crianza.

Para mi hermana, por estar para mí siempre.

Para José Carlos, quien me apoyó en varias oportunidades.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Pablo Sotelo, por su guía, paciencia e inmensa capacidad de transmitir su valiosísimo conocimiento, no solamente limitado al aspecto de la tesis. Muchas gracias por haberme permitido trabajar una vez más bajo su tutelaje.

A mi co-tutora, la Dra. Patricia Langjahr, por su guía y excelente predisposición durante todo el proceso. Su ayuda y guía resultaron de inmensa ayuda durante todo el proceso.

A la MSc. Guadalupe Cantero, por su inmensa ayuda en la parte procedimental. La presente tesis es una de las ramificaciones de su trabajo, y espero haya muchas más en el futuro.

Al Lic. Samuel Gabaglio, con quien luchamos para ingresar, mantenernos y terminar la carrera, y las decisiones que tomamos al finalizar la misma.

A los miembros del laboratorio de Biotecnología, por estar siempre ahí.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE ACEITES ESENCIALES PRODUCIDOS EN EL PARAGUAY FRENTE AL HERPES SIMPLEX TIPO

1

Marcos Marcelo Florentín Pavía*, Patricia Langjahr**, Pablo Hernán Sotelo Torres**

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

RESUMEN

El virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) es uno de los principales patógenos humanos. Genera infecciones persistentes al ingresar a un estado de latencia permanente en aquellas personas infectadas. Si bien existen drogas para su tratamiento, las mismas presentan baja biodisponibilidad y en algunos casos alta toxicidad. Además, se ha observado el surgimiento de cepas resistentes, incluso a múltiples drogas. Los aceites esenciales constituyen una fuente potencial de antivirales, siendo Paraguay uno de los principales productores a nivel mundial de los mismos. En el presente trabajo se determinó la citotoxicidad y actividad antiviral contra el HSV-1 de los aceites de Palo Santo (*Gonopterodendron sarmientoi*) (concentración citotóxica 50-CC50- = 115,1 µg/mL y actividad antiviral 50-EC50- = 56,6 µg/mL), Cabreuva (*Myrocarpus frondosus*) (CC50 = 89 µg/mL y EC50 = 25,9 µg/mL) y Petitgrain (*Citrus aurantium* L. var. *amara*) (CC50 = 146 µg/mL y EC50 = 7,95 µg/mL), siendo los índices de selectividad 2,03, 3,44 y 18,36, respectivamente. El ensayo de tiempo de infección realizado sugiere que el aceite esencial de Palo Santo y de Petitgrain ejercen la actividad antiviral a nivel celular pre-infección y durante el periodo post-entrada del ciclo viral, mientras que el de Cabreuva solo a nivel pre-infección. Así mismo, se determinó los posibles mecanismos de acción del aceite esencial de Petitgrain frente al HSV-1, que incluyen la inhibición de la replicación del genoma viral, inhibición de la producción de la proteína estructural gD (44,6%) y el aumento de expresión de la citoquina IL-6 en el contexto de la infección.

Palabras claves: HSV-1, Aceite esencial, Agente antiviral, Inhibición en la replicación viral, IL-6.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE ACEITES ESENCIALES PRODUCIDOS EN EL PARAGUAY FRENTE AL HERPES SIMPLEX TIPO

1

Marcos Marcelo Florentín Pavía*, Patricia Langjahr**, Pablo Hernán Sotelo
Torres**

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

ABSTRACT

Herpes simplex type 1 (HSV-1) is one of the main human pathogens. It causes persistent infections due entering a permanent latency state in the infected people. Although there are drugs for its treatment, these usually show low bioavailability and high toxicity. Also, the emergence of resistant strains, sometimes to multiple drugs, has been observed. Essential oils constitute a new source of antiviral compounds, with Paraguay being one of the main producers at a worldwide scale. In the present work the cytotoxicity and antiviral activity against HSV-1 of the Palo Santo (*Gonopterodendron sarmientoi*) (cytotoxic concentration 50-CC50 = 115,1 µg/mL and antiviral concentration 50-EC50 = 56,6 µg/mL), Cabreuva (*Myrocarpus frondosus*) (CC50 = 89 µg/mL and EC50 = 25,9 µg/mL) and Petitgrain (*Citrus aurantium* L. var. *amara*) (CC50 = 146 µg/mL and EC50 = 7,95 µg/mL) essential oils could be determined, with the selectivity indexes being 2,03, 3,44 and 18,36 respectively. The time of infection assay performed suggests that Palo Santo and Petitgrain essential oils exhibit antiviral activity at a cellular level before the infection and then in a post-entry way in the viral cycle, while Cabreuva exhibits antiviral activity only before infection. Likewise, it was able to determine the possible mechanisms of action of Petitgrain essential oil against HSV-1, such as the inhibition in the viral genome replication, the decrease in structural protein gD production (44,6%) and the increase of the expression of the cytokine IL-6 in the context of the infection.

Keywords: HSV-1, Essential oil, Antiviral Agent, Inhibition of the viral replication, IL-6.

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	
1.1. Generalidades y epidemiología del HSV-1	19
1.2. Ciclo viral	20
1.3. Antivirales y limitaciones	21
1.4. Aceites esenciales como antivirales	23
1.5. Aceites esenciales de interés, usos y situación a nivel país	24
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo General	
2.2. Objetivos Específicos	
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	
3.1. Aceites esenciales	28
3.2. Cultivo celular	28
3.3. Virus utilizado	28
3.4. Ensayos de citotoxicidad	29
3.5. Ensayos de actividad antiviral	30
3.6. Ensayos de tiempo de infección	30
3.7. Ensayo virucídico	31
3.8. Extracción de genoma y ARN totales	32
3.9. Síntesis de ADNc	33
3.10. Reacciones en cadena de polimerasa en tiempo real	33
3.11. Obtención de proteínas y cuantificación por el método de ácido bicinonínico	35
3.12. Western blot	36
3.13. Software utilizado	36
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	
4.1. Ensayos de citotoxicidad para obtención del CC50	38

4.2. Ensayos de actividad antiviral para obtención del EC50 y determinación del SI	40
4.3. Ensayos de tiempo de infección	43
4.4. Ensayo virucídico	47
4.5. Cuantificación del genoma viral	49
4.6. Niveles de expresión de transcritos de genes virales	51
4.7. Niveles de expresión de proteínas virales	53
4.8. Niveles de expresión de transcritos de genes celulares	55
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN	59
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	66
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. ANEXOS	
8.1. Anexo 1	85

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Citotoxicidad de los AE en células Vero.	39
Figura 2: Actividad antiviral de los AE frente a HSV-1, en células Vero.	41
Figura 3: Estructura del ensayo de Tiempo de infección.	43
Figura 4: Ensayos de tiempos de infección de HSV-1 de los AE en células Vero.	45
Figura 5: Resultado del ensayo de actividad virucídica de PG frente a HSV-1.	48
Figura 6: Disminución en los niveles de producción de genoma de HSV-1 causada por PG, a dos diferentes MOI en células Vero.	50
Figura 7: Niveles de expresión de transcritos virales frente al tratamiento con PG.	52
Figura 8: Disminución en los niveles de la proteína viral gD por el tratamiento con PG, producidas durante la infección de células Vero con HSV-1.	54
Figura 9: Niveles de expresión de transcritos celulares frente al tratamiento con PG de células Vero.	56
Figura 10: Niveles de expresión de transcritos celulares frente al tratamiento con PG durante la infección de células Vero con HSV-1.	58
Figura 11: Mecanismos de actividad antiviral del PG frente a la infección por HSV-1.	65

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Primers utilizados.	34
Tabla 2: Parámetros de interés obtenidos de los AE en estudio.	42
Tabla 3: Inhibiciones de la infección por HSV-1 obtenidas en el ensayo de tiempo de infección.	46

ABREVIATURAS

Aceite esencial (AE)

Ácido bicinconínico (BCA)

Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA)

ARN mensajero (ARNm)

Concentración citotóxica 50% (CC50)

Concentración efectiva 50% (EC50)

Copias de genoma viral (VGC)

Gen inmediato-tempranos (genes IE)

Gen temprano (genes E)

Gen tardío (genes L), que puede subdividirse en laxo ($\gamma 1$) o astringente ($\gamma 2$)

Índice de selectividad (SI)

Interleuquina (IL)

Medio Dulbecco-Eagle modificado (DMEM)

Multiplicidad de infección (MOI)

Palo santo (PS), aceite esencial obtenido de *Gonopterodendron sarmientoi*

Petitgrain (PG), aceite esencial obtenido de *Citrus aurantium* L. var. *amara*

qPCR con transcriptasa reversa (RT-qPCR)

Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR)

Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

Respuesta de daño a ADN (DDR)

Suero fetal bovino (FBS)

Temperatura ambiente (RT)

TBS 1X-Tween 0.05% (TBST)

Unidades formadoras de placas (PFU)

Virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1)

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades y epidemiología del HSV-1

El virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1, nombre taxonómico *Human alphaherpesvirus 1*) es un virus de ADN de doble hebra, con un de genoma de 152 Kb. Pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, la cual se caracteriza por infectar un gran número de especies de vertebrados, así de como presentar un periodo de latencia permanente en el huésped. En promedio, el 67% de la población mundial se encuentra infectada con HSV-1, siendo el estimado de 40-50% para el continente americano. HSV-1 es así la especie de *Herpesvirus* más prevalente en humanos (1,2).

La transmisión ocurre por contacto entre mucosas o piel descubierta de una persona susceptible y una persona que excreta al virus. Luego de la infección local inicial oro-faríngea, ocurre el transporte y la infección del nervio trigémino, donde ocurre latencia (3–5).

La estructura del HSV-1 consiste en una membrana lipídica externa recubriendo el tegumento proteico no organizado y finalmente una nucleocápside conteniendo al genoma viral (3,6). La membrana contiene glicoproteínas que actúan como receptores de unión como son gB y gC, y fusión o entrada de la partícula viral como son gD y el dímero gH-gL (7–9). El tegumento proteico contiene distintos factores virales tales como VP16 que actúa como factor de trans-activación para la expresión de los genes virales inmediato-tempranos, la proteína de apagado del huésped del virión o VHS, que actúa como regulador de genes celulares y virales (10) y VP1-2, encargada en la liberación del genoma viral al poro nuclear (11). Finalmente, la nucleocápside contiene al genoma viral, está formada por proteínas tales como VP5, VP23, VP26, VP19c y la proteína portal. Está estructurada como icosaedro con simetría T = 16 constituido por pentámeros y hexámeros de VP5 y engloba el genoma viral, mayormente lineal, con un contenido de G+C de aproximadamente 68% y constituido por dos porciones unidas covalentemente: la sección larga y la corta, ambas flanqueadas por secuencias repetidas y en fracciones equimolares (3,6).

1.2. Ciclo viral

El ciclo viral puede diferenciarse entre productivo o latente, dependiendo de la síntesis activa o no de nuevos viriones por la célula infectada. Así mismo, se divide en las siguientes fases: contacto y unión del virus con la célula huésped, entrada del virus, liberación y transporte del tegumento y nucleocápside al núcleo celular, síntesis en cascada de los ARN mensajeros (ARNm) virales, síntesis de proteínas y replicación viral, ensamblaje del virión y egreso del virus (3).

La unión del HSV-1 se da por medio de la interacción entre gB y gC con glicosaminoglicanos celulares, luego la interacción entre gD y receptores de heparán sulfato para permitir la fusión de membranas y la liberación del contenido viral dentro del citoplasma celular (3,7–9). Así mismo, el virus también interactúa con otros receptores celulares como son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que induce una cascada de señalización para la reorganización del esqueleto de actina (12). La nucleocápside es transportada hasta el núcleo celular por medio de la red de microtúbulos de actina, mientras que VP16 es transportada por medio del factor celular hospedador C1 o HCFC1 (13,14). Se cree que la ausencia de este factor viral bloquea el avance del ciclo viral y genera latencia en células tales como neuronas (15). Una vez ambos componentes llegan al núcleo, la nucleocápside inyecta el genoma a través de los poros nucleares, luego ocurre la circularización del mismo y en presencia de VP16 ocurre la transcripción de genes inmediato-tempranos (IE o genes α) como ICP0 e ICP4, los cuales a su vez permiten la transcripción de los genes tempranos (E o genes β) como timidina quinasa (TK) e ICP8, los cuales están involucrados en la replicación del genoma viral (3).

La presencia de genes IE y E causa la expresión de genes tardíos (L o genes γ) que se dividen a su vez en laxos (genes γ_1) o astringentes (genes γ_2). Es así, que los genes γ_2 dependen de la replicación y la cantidad de genoma viral acumulado para su expresión, no así los genes γ_1 que se expresan a valores mínimos, aumentando su expresión una vez ocurre la replicación del genoma viral (3). El ensamblaje de la partícula viral ocurre durante la síntesis de proteínas estructurales pertenecientes al grupo de genes L, primeramente sobre un andamio proteico formado por VP21 y VP22a sobre el cual se organizan las demás proteínas formadoras de la nucleocápside (VP5, VP19c, VP23 y la proteína portal) (16). El ADN viral es luego insertado a través

de la proteína portal y la misma egresa del núcleo para seguir su maduración en el citoplasma celular (3).

Los mecanismos por los cuales la nucleocápside pasa al citoplasma no están aún bien establecidos, es durante este periodo donde ocurre la adquisición del tegumento proteico. Las cápsides recubiertas por tegumento pasan entonces al aparato de Golgi o al sistema trans-Golgi donde adquiere la membrana externa y glicoproteínas. El brote de viriones ocurre entonces por egreso de los mismos a través de las membranas celulares, pudiendo ocurrir el transporte directo por contacto célula-célula o su liberación al medio extracelular (3).

Para el caso de la reactivación a partir de la latencia, se cree que lo que sucede es una reactivación parcial en la infección en neuronas del nervio trigémino, generando un número reducido de partículas virales comparando con la infección activa, con el subsecuente transporte anterógrado de viriones por el axón hasta células del epitelio de la zona oro-facial para causar los rebrotes visibles (4,15,17). Así mismo, se cree tener identificadas ciertos factores que generan la reactivación, como son UV, stress, daño nervioso, uso de esteroides en modelos animales, presencia de metales pesados y trauma físico en el sitio de la infección inicial (17–25).

1.3. Antivirales y limitaciones

Las drogas utilizadas actualmente para el tratamiento de HSV-1 pueden dividirse en tres grupos: análogos de nucleósidos representados mayormente por aciclovir y sus derivados, foscarnet y docosanol (26–28). Aciclovir es la principal droga utilizada frente a infecciones (29). Aciclovir actúa mediante la interrupción de la síntesis de genoma viral al ser utilizado como sustrato análogo de guanósina durante la replicación, sufriendo una fosforilación inicial a monofosfato por TK y luego di- y tri-fosforilaciones por quinasas celulares (30,31). Entre las desventajas se encuentran su baja biodisponibilidad oral, alrededor del 10 a 20%, dosis dependiente (32,33). En situaciones en las que se necesita una mayor biodisponibilidad o su uso sistémico se utiliza la aplicación intravenosa, la cual trae consigo el riesgo de insuficiencia renal y nefrotoxicidad (34). Dentro del grupo aciclovir se tienen al valaciclovir o L-valil éster de aciclovir. Actúa como pro-droga, siendo metabolizado

a aciclovir en el hígado y compartiendo mismo mecanismo de acción frente al virus con una mejor biodisponibilidad (32,35,36).

Ganciclovir o DHPG es un segundo ejemplo de droga derivada de aciclovir que actúa de manera similar (27,37). Así, también interrumpe la síntesis del genoma viral, estando su uso mayormente destinado al tratamiento de infecciones por citomegalovirus, a excepción de la forma en gel al 0,15%, aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para queratitis herpética en 2008 (38,39). Los efectos adversos que posee son neutropenia y toxicidad del sistema nervioso central, por lo que su uso puede agravar el estado de pacientes inmunocomprometidos (40–42).

Trifluridina es otro compuesto análogo de nucleósido, teniendo una estructura de pirimidina, que además de poseer actividad frente al HSV-1 también actúa frente a HSV-2, citomegalovirus, vaccinia y algunos adenovirus (39,43). Aparentemente posee dos mecanismos de acción frente al HSV-1: por un lado actúa inhibiendo irreversiblemente la actividad timidilato sintasa luego de su monofosforilación, impidiendo el procesamiento de uracilos a timidinas e interfiriendo así con la síntesis de nuevo genoma viral (44); así mismo se integra durante la replicación del ADN viral y celular (43,45,46), pudiendo así ser utilizado como componente de una droga para tratar cáncer de estómago metastático, junto con un inhibidor de timidina fosforilasa (46). Su uso es mayormente tópico, y tiene como efectos secundarios incomodidad local, edema, reacciones alérgicas, irritación y erosiones epiteliales de la córnea (43).

Foscarnet o ácido fosfometanoico es un análogo de pirofosfato que actúa también a nivel de interrupción de la replicación viral, por inhibición del sitio de unión de pirofosfato en la polimerasa viral (47). Se utiliza no sólo para infecciones de HSV sino también para el virus de la varicela-zóster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus linfotrópico B humano y virus de la inmunodeficiencia humana (39,48). El uso de esta droga frente a HSV-1 se encuentra limitado exclusivamente al tratamiento de pacientes que poseen cepas resistentes a aciclovir y sus análogos (49,50), es decir, como último recurso o terapia de rescate (51), por los severos efectos secundarios que posee tales como su capacidad de causar anemia y nefrotoxicidad (42,52,53).

Se tiene a docosanol como una de las últimas drogas aprobadas para el tratamiento de infecciones herpéticas. Si bien se desconoce aún su mecanismo de

acción, existe evidencia de la actividad del compuesto sólo frente a virus envueltos, así como de la interacción entre las proteínas de membrana celulares y las proteínas virales de envoltura, por lo que se tiene como mecanismo propuesto de acción su interferencia durante la fusión entre la membrana viral y la celular (54,55). Es decir, el mismo no actúa directamente sobre la replicación viral impidiendo la formación de nuevas partículas virales, sino sobre aquellos viriones ya desprendidos del foco de la infección. Su aplicación es solo por vía tópica, no siendo posible su uso por vía sistémica y limitando su biodisponibilidad (28,56).

La existencia de cepas resistentes a aciclovir y sus derivados está ampliamente reportada y ocurre generalmente en pacientes inmunocomprometidos o bajo terapia inmunosupresora (49,57–60). Si bien existen casos de resistencia a aciclovir sensibles a ganciclovir, se considera que la resistencia al primero otorga resistencia cruzada a sus análogos (61,62). El uso de foscarnet se encuentra limitado al tratamiento de pacientes que poseen cepas resistentes a aciclovir y sus análogos (49,61,63,64), es decir, como último recurso o terapia de rescate (51). Cabe destacar que también se han reportado casos clínicos con cepas resistentes no solamente a foscarnet (64,65) sino también con resistencias múltiples a aciclovir y ganciclovir (62,66–68).

1.4. Aceites esenciales como antivirales

Los aceites esenciales (AE) son un grupo de concentrados líquidos hidrofóbicos volátiles provenientes de plantas. Los mismos son utilizados a nivel de cosméticos y también en medicina popular (69–71). El uso de AE está ampliamente extendido en la medicina popular, así como en la medicina alternativa y aromaterapia. Diversos estudios científicos han mostrado actividades antioxidantes (72–74) de estas sustancias, así como actividad frente a patógenos tales como hongos (75–78), bacterias (79–83) y virus (84–86). También se han descrito efectos antiinflamatorios (87,88), estimuladores (89) y supresores (90) de la respuesta inmune innata.

Si bien el número de reportes de AE con actividad antiviral es mucho mayor para aquellos virus con envoltura, algunos también presentan actividad ante virus desnudos (91,92). Existen antecedentes que describen actividad antiviral de AE frente a miembros de la familia *Herpesviridae*, principalmente HSV-1 (93–95). Entre las

plantas que son fuentes de estos AE pueden mencionarse el anís, orégano griego y mexicano, manzanilla, ajeno, menta, jengibre, tomillo y sándalo, entre muchas otras (84,85,92,96–102).

A pesar que la información sobre la actividad antiviral de los AE es vasta, no existen mayores antecedentes sobre los mecanismos de acción antiviral de los AE utilizados o de sus componentes purificados (103). Entre los mecanismos de actividad conocidos puede citarse que, la incubación de los AE provenientes de menta y anís estrella, así como farnesol, beta-cariofileno o triptofordina C-2 con HSV-1, provoca una desestabilización de la envoltura viral, notándose que en el caso de los últimos cuatro compuestos no disminuye la unión ni penetración del virus a las células (92,99,104). También se da el caso de compuestos de AE con más de un mecanismo de acción frente al virus como el isoborneol, proveniente de *Salvia fruticosa*, el cual actúa tanto como agente virucídico, causando la inactivación de la partícula viral, así como causando la inhibición específica de la glicosilación de proteínas de la envoltura viral, desconociéndose las causas exactas de este fenómeno. Se cree que puede darse por la interferencia sobre alguna proteína viral encargada de realizar la glicosilación, o bien la generación de un estado antiviral (100). Se pueden citar también al α -pineno, obtenido de *Melaleuca alternifolia*, *Eucalyptus globulus* y *Thymus Vulgaris*, que causa disminución de infectividad del virus mediante en el tratamiento previo y posterior a la infección de las células (96) o el eugenol, obtenido de *Eugenia caryophyllus*, *Cinnamomum* spp., *Ocimum basilicum* y *Myristica fragrans*, que posee actividad virucídica y además causa la disminución en la infectividad medida por reducción en el número de placas formadas en células tratadas luego de la infección (105,106).

1.5. Aceites esenciales de interés, usos y situación a nivel país

El uso de los AE puede dividirse en uso regulado o no. En el uso popular o no regulado se incluye como aromaterapia, en cosméticos, en agricultura y como agentes fitoterapéuticos (107–109). Luego está su uso regulado ya sea en la industria alimentaria como saborizantes o conservantes naturales y su potencial aplicación biomédica. Sobre esta última se destaca el uso de distintos sistemas de entrega

(nanopartículas y nanoemulsiones) o en investigación sobre las propiedades antimicrobianas previamente citadas (110,111).

El Paraguay es un importante productor a nivel mundial de AE. Existen unas 3576 fincas productoras de los mismos, con un volumen productivo de 661 toneladas para la exportación con valor de 9.236.000 USD en 2009 y 659 toneladas exportadas por un valor de 19.049.335 USD en el 2012 (112,113). El país es así también referente de producción para el AE Petitgrain (PG) y el de palo santo, teniendo el PG de origen paraguayo certificado de origen que garantiza su calidad.

PG se obtiene de *Citrus aurantium* L. var. *Amara*, conocido comúnmente como naranja agria o *aepéú*, pertenece a la familia Rutaceae, orden Sapindales. El AE es un líquido amarillo pálido, con un fuerte olor característico y agradable, constituido principalmente por linalool y acetato de linalilo, con trazas de otros componentes. Se obtiene a partir de la destilación por arrastre de vapor de hojas y ramas (114–116), y es utilizado mayormente para aquellas aplicaciones no reguladas como son: fijante de perfumes, elaboración de jabones, pomadas, medicina popular paraguaya, etc. La FDA le asigna la categoría de sustancia generalmente reconocida como segura para su uso establecido, bajo el código electrónico de regulación de 182.20 (117).

Gonopterodendron sarmientoi, especie previamente conocida como *Bulnesia sarmientoi*, pertenece a la familia Zygophyllaceae, orden Zygophyllales. Es llamado comúnmente como palo santo (PS) y es un árbol que crece en la región del Gran Chaco, entre Paraguay, Argentina y Bolivia (118,119). El AE de PS se obtiene de restos de madera y aserrín, también destiladas por arrastre de vapor (114,119). El mismo es un líquido viscoso amarillento oscuro, capaz de solidificar a temperatura ambiente a una masa amorfa color ámbar. Posee un olor suave, agradable y que recuerda a rosas. Está mayormente constituido por alcoholes sesquiterpenos como guaiol y bulnesol. También se usa en perfumería por sus propiedades fijativas (114). A diferencia de PG, su uso está orientado hacia el sector alimenticio: como aditivo de alimentos y saborizante de bebidas, si bien también se lo utiliza como fijativo en perfumes (114). Se encuentra aprobado como aditivo de alimentos permitidos para su adición directa para el consumo humano por la FDA bajo el código 172.510 (120). Al igual que en el caso de PG, Paraguay es uno de los principales productores a nivel mundial del AE de PS.

Finalmente se encuentra el AE de Cabreuva, obtenido del árbol *Myrocarpus frondosus*, familia Fabaceae, orden Fabales, el cual se encuentra distribuido entre Argentina, Brasil y Paraguay (121). Cabreuva se extrae de igual forma que el AE de PS (122), siendo un líquido amarillo claro, viscoso y con un olor suave que recuerda a madera y flores. Está constituido mayormente por nerolidol y menormente por farnesol. Se utiliza en la medicina popular como anti-inflamatorio y para sanar heridas (123). Se encuentra registrado bajo el código 294-497-3 en la base de datos de la Agencia Europea de Químicos o ECHA (124).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antiviral y los posibles mecanismos de acción de aceites esenciales de *Gonopterodendron sarmientoi*, *Citrus aurantium* L. var. *amara* y *Myrocarpus frondosus* producidos en el Paraguay contra el HSV-1 en células Vero.

2.2. Objetivos específicos

- Analizar la citotoxicidad de los aceites seleccionados y calcular la concentración citotóxica 50.
- Analizar la actividad antiviral de los aceites seleccionados, calcular la actividad antiviral 50 y el índice de selectividad.
- Evaluar el mecanismo de acción de al menos un aceite esencial con actividad antiviral demostrada.

3. METODOLOGÍA

3.1. Aceites esenciales

Los AE de PS (*Gonopterodendron sarmientoi*), Cabreuva (*Myrocarpus frondosus*) y PG (*Citrus aurantium* L. var. *amara*) fueron obtenidos comercialmente de Amigo & Arditi S.A. con sus respectivos certificados de análisis y tablas de composición química (Anexo 1). Se realizó un stock madre a 100 mg/uL en dimetil sulfóxido (Sigma, Saint Louis, MO) y se esterilizó por filtración en filtros de 0,22 µM Minisart® Syringe Filter (Sartorius).

3.2. Cultivo celular

Se utilizaron células Vero, que corresponden a células epiteliales de riñón de mono verde. Las mismas fueron cultivadas en medio Dulbecco-Eagle modificado (DMEM) (Gibco, USA) con 7,5 % de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Brasil), aminoácidos no esenciales (Gibco, Grand Island, NY) y penicilina y estreptomicina (Sigma, Saint Louis, MO), a 37 °C y una atmosfera con 5% CO₂.

3.3. Virus utilizado

El virus utilizado fue la cepa F del HSV-1, proporcionado por la Dra. María José Martínez de la Universidad de Chile. El mismo se produjo por medio de la infección de una botella con monocapa confluyente de células Vero, cosechando el sobrenadante conteniendo las partículas virales a los tres días. Se realizó una centrifugación a 2000 g a 4 °C por 5 minutos para la remoción de restos celulares y se alicuotó el sobrenadante conteniendo virus.

La titulación viral se realizó por el ensayo de formación de placas de lisis. Brevemente, se realizaron diluciones seriadas del virus en DMEM 2% FBS, incubando con las células por una hora para permitir la entrada del virus, luego se removió el medio y se agregó una mezcla de agarosa 1,2% con DMEM 2% FBS. Se incubaron las células por 5 a 6 días hasta la visualización de placas de lisis. Luego las células fueron fijadas con formol al 40% (Laboratorio Glorimar, Paraguay) y teñidas con cristal

violeta (Anedra). Se contó el número de placas de lisis a fin de determinar el título viral. Una vez titulado, el virus se conservó a -80 °C en el Laboratorio de Biotecnología, FCQ.

3.4. Ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de determinación de citotoxicidad consistieron en el tratamiento de células con los distintos AE en estudio. Para ello se prepararon 1E4 células Vero por pocillo en placas de 96 pocillos, se incubó con 100 µL soluciones seriadas de los AE en DMEM 2% FBS a distintas concentraciones. Como control (mock) se utilizaron células incubadas con un volumen de DMSO en DMEM 2% FBS. La lectura se realizó de acuerdo a las indicaciones del kit (alamarBlue® Assay, Invitrogen). Las placas se incubaron en estufa a 37 °C 5% CO₂ por 72 h, luego se agregó 20 µL de resazurina a 0,15 mg/mL (Alfa Aesar, Ucrania) en oscuridad a cada pocillo y se incubó en estufa por 3 h más. Finalmente se midió la absorbancia en el equipo MultiskanGO (ThermoFischer Scientific, Finlandia) a 570 y 600 nm, aplicándose la siguiente fórmula para la obtención de los valores de viabilidad celular y luego citotoxicidad de cada tratamiento:

$$\frac{(\varepsilon_{ox})\lambda_2 A \lambda_1 - (\varepsilon_{ox})\lambda_1 A \lambda_2 \text{ de la muestra en estudio}}{(\varepsilon_{ox})\lambda_2 A^o \lambda_1 - (\varepsilon_{ox})\lambda_1 A^o \lambda_2 \text{ del control}} \times 100$$

$$= \text{viabilidad celular (\%)} \quad (1)$$

$$100 - \text{viabilidad celular} = \text{citotoxicidad} \quad (2)$$

Donde ε_{ox} es el coeficiente de extinción molar de la forma oxidada de la resazurina (80,586 para 570 nm y 117,216 para 600 nm), A es la absorbancia de los pocillos tratados, A^o la absorbancia del control, $\lambda_1 = 570$ nm y $\lambda_2 = 600$ nm.

Una vez obtenidos los datos de citotoxicidad a las concentraciones estudiadas se realizaron curvas en Prism 5, mediante la transformación de las concentraciones a escala logarítmica y la aplicación de una regresión no lineal de inhibidor versus

respuesta, con pendiente variable, normalizándose los valores de los tratamientos al mock, obteniéndose así los valores de concentración citotóxica 50% (2) (CC50) y R^2 .

3.5. Ensayos de actividad antiviral

Los ensayos de determinación de la actividad antiviral fueron realizados como se ha descrito anteriormente (125). Brevemente, células Vero en placas de 96 pocillos se incubaron con 50 μ L de la solución de virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 1,5 y se incubaron a 37 °C 5% CO₂ por 1 h. Esto corresponde a 1,5 unidades formadoras de placas (PFU) de HSV-1 por cada célula en el pocillo. Las células fueron lavadas con 100 μ L PBS 1X para luego agregar 100 μ L de diluciones seriadas de los AE en DMEM 2% FBS, teniendo así mismo un grupo de células infectadas sin tratar como mock y un grupo de células sin infectar ni tratar como control negativo. Las células fueron incubadas por 72 h en estufa a 37 °C 5% CO₂. Una vez cumplido el tiempo se cuantificó la cantidad de genoma viral presente en el sobrenadante del cultivo por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR).

El análisis de datos se realizó mediante la obtención del número de copias de genoma viral (VGC) en cada condición por uso de una curva de cuantificación previamente establecida, normalizando los datos de infección obtenidos para cada condición con respecto al mock, el cual representa la totalidad de la infección. Se utilizó Prism 5 para obtener los valores de concentración efectiva 50% (como EC50) y el R^2 .

3.6. Ensayos de tiempo de infección

Se prepararon placas de 96 pocillos con células Vero y se realizaron las infecciones con HSV-1 como ya se ha descrito anteriormente variándose el momento en el cual se agregó el AE. De esta manera se obtuvieron tres grupos: el grupo con Pre-tratamiento previo a la entrada viral, infección y entrada simultáneas con el grupo “Durante-tratamiento”, y el grupo “Post-entrada”, teniendo así mismo un grupo de células sin tratar (mock) y otro sin tratar ni infectar como control negativo de placa.

Brevemente, para el grupo “Pre-tratamiento” se incubaron células con AE a 100 µg/mL en DMEM 2% FBS a 37 °C 5% CO₂ por 2 h. Posteriormente se removió el sobrenadante y se infectó con 50 µL de HSV-1 a MOI = 1,5. Para el grupo “Durante-tratamiento”, se preparó una solución conteniendo AE y HSV-1 a las concentraciones citadas y se infectó como se ha descrito previamente. Para el grupo “Post-entrada” primeramente se incubaron las células con el virus, luego se removió el inóculo viral y se agregó el AE en DMEM 2% FBS a la concentración ya citada. Así mismo, el mock se infectó como se ha descrito previamente. Finalmente, al control negativo de placa se realizó sólo el cambio de medio.

Luego de la incubación por 72 h en estufa se cuantificó la cantidad de genoma viral en el sobrenadante del cultivo por qPCR, realizando el análisis de datos como ya se ha descrito.

3.7. Ensayo virucídico

El ensayo virucídico se realizó mediante el enfrentamiento de una solución de HSV-1 con una de PG. Para ello, se preparó una solución de HSV-1 de 60.000 PFU/uL y se agregó PG para llegar a una concentración final de 794,5 µg/mL a un volumen final de 150 µL. Posteriormente se eliminó el genoma viral libre incubando con 2 UI de DNasa I RQ1 (Promega, Madison, WI), 2 µL de buffer RQ1 10X y 10 µL de muestra a volumen de reacción de 20 µL, se incubó por 30 min a 37 °C y se inactivó la enzima por 10 min a 65 °C.

Luego se cuantificó el número de VGC como ya se ha descrito previamente. Se halló la relación entre la digestión del grupo tratado con el AE frente a la digestión del grupo sin tratar, utilizándose la siguiente fórmula para la determinación del número de viriones íntegros y posteriormente la actividad virucídica (4):

$$\frac{\frac{DNasa\ PG}{sin\ DNasa\ PG}}{\frac{DNasa\ sin\ PG}{sin\ DNasa\ sin\ PG}} = Viriones\ íntegros\ (3)$$

$$1 - Viriones\ íntegros = Actividad\ virucídica\ (4)$$

Se utilizó Prism 5 para la elaboración del gráfico de barras del tratamiento con PG con respecto al mock, realizando pruebas estadísticas con el mismo software.

3.8. Extracción de genoma y ARN totales

Las extracciones de genoma y ARN se realizaron por medio del protocolo TRIzol® (Ambion, USA). Primeramente, se sembraron placas de 6 pocillos con 2E5 células Vero, luego se infectaron con HSV-1 a MOI 5 y 15, seguido de una incubación a 37 °C 5% CO₂ por 1 h, se removió el sobrenadante y se agregaron las soluciones de tratamiento con PG a 100 µg/mL en DMEM 2% FBS y se incubó en estufa por 4 u 8 h. Como control se infectaron células que fueron tratadas solo con DMSO.

La obtención del ARN y ADN viral se realizó mediante la extracción con TRIzol® según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se removió el sobrenadante del cultivo de cada pocillo y se agregó 500 µL de reactivo TRIzol® frío, luego se recolectó el lisado de la monocapa, posteriormente se realizó una incubación a temperatura ambiente (RT) por 5 min, con agitación con vortex y se agregó 100 µL de cloroformo (Cicarelli, Argentina). Se centrifugó a 12.000 g a 4 °C por 15 minutos, separando 220 µL de la fase acuosa superior de la interfase porción orgánica inferior a un tubo nuevo, sin perturbar la interfase, mientras que el remanente conteniendo genoma y proteínas se conservó a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

Se agregó 20 µL de acetato de sodio (Cicarelli, Argentina) 3 M y 200 µL de isopropanol (Anedra, Argentina) a la fase acuosa, homogeneizando y dejando en incubación a -20 °C hasta el día siguiente. Luego se centrifugó a 12.000 g a 4 °C por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y agregó 500 µL de etanol (J.T. Baker, USA) al 70% al pellet formado, vortex y se centrifugó a 7.500 g a 4 °C por 5 minutos, repitiendo una vez más el lavado con etanol y la centrifugación. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se secó a 65 °C. El pellet de ARN total se resuspendió en 20 µL de agua ultrapura (Invitrogen, USA). Finalmente se realizó un tratamiento de las muestras con DNasa I: se agregó 1 u de enzima DNasa I y 3 µL de buffer de digestión 10X a la totalidad del volumen de ARN, se incubó por 30 min a 37 °C y se inactivó la enzima por 10 min a 65 °C. El ARN digerido con DNasas se cuantificó por absorbancia y conservó a -80 °C hasta su posterior uso.

Para obtener el genoma total se utilizó la porción orgánica inferior mencionada, se realizó una centrifugación a 12.000 g a 4 °C por 5 min para descartar todo el remanente de la fase acuosa, se agregó 150 µL de etanol, homogeneizando e incubando por 2 min a RT. Luego se centrifugó a 2.000 g a 4 °C por 10 minutos, se separó la porción acuosa en un tubo nuevo y se agregó 500 µL de citrato de sodio (Cicarelli, Argentina) 0,1 M con 10% de etanol, pH = 8,5, se incubó por 30 min a RT, luego se centrifugó a 2.000 g a 4 °C por 5 minutos. Se repitió el lavado con citrato de sodio una vez más y se descartó el sobrenadante para agregar 1 mL de etanol al 75%, luego se incubó por 30 min a RT, se centrifugó a 2.000 g a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se secó a 65 °C. El pellet de genoma total se resuspendió en 100 µL de agua ultrapura, se cuantificó por absorbancia y conservó a -20 °C hasta su posterior uso.

3.9. Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó siguiendo el protocolo de síntesis de la enzima MMLV-RT (Promega, Madison, WI). Brevemente, se alicuotó volumen de ARN equivalente a 2 µg, se agregó 100 pm de oligoDT (Macrogen, Corea del Sur) 100 mM y agua ultrapura a volumen fijo de 17,25 µL y se incubó por 10 a 70 °C. Luego se agregó 5 µL del buffer MMLV 5X y 2 µL de dNTPs (Promega, Madison, WI) 10 mM e incubó por 5 min a 42 °C. Se agregó 0,75 µL de enzima MMLV-RT a cada muestra, teniendo así mismo un grupo de control sin agregado de enzima como control negativo de síntesis. Finalmente se incubó por 90 minutos a 42 °C seguido de la inactivación de la enzima por 10 min a 70 °C. Las muestras de ADNc se conservaron a -20 °C hasta su posterior uso.

3.10. Reacciones en cadena de polimerasa en tiempo real

Las reacciones en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR) se realizaron utilizando 1 µL de templado, 500 pM de cada cebador, 5 µL de buffer SYBR® Green Master Mix (Bio-Rad, USA) 2X y agua ultrapura a volumen final de 10 µL de reacción. Los programas de uso general consistieron en una desnaturalización inicial

de 5 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 s y lectura a 60 °C por 30 s, con una curva de melting de 60 °C por 1 min, lecturas a cada 0,3 °C/s hasta 95 °C manteniendo por 15 s con una lectura final. Para las reacciones utilizando templado de sobrenadante de infección se aumentó la desnaturalización inicial a 10 min. El ciclado para la amplificación de RAD51 consistió en 40 ciclos de 95 °C por 15s, 63 °C por 60s y lectura a 60 °C por 30 s. El ciclado para la amplificación de BRIP1 consistió en 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 58 °C por 90 s y lectura a 60 °C por 30 s. Las corridas se realizaron en un StepOnePlus™ (ThermoFischer Scientific). Los primers utilizados se encuentran en la Tabla 1.

Para el análisis de los datos obtenidos en las qPCR con transcriptasa reversa (RT-qPCR), se utilizó el método de $\Delta\Delta C_t$, utilizándose a GAPDH como normalizador para las otras condiciones.

Tabla 1. Primers utilizados.

Gen	Sentido	Secuencia 5' - 3'	Referencia
ICP0	Fw	GTCGCCTTACGTGAACAAGAC	(125)
	Rv	GTCGCCATGTTTCCCGTCTG	
GAPDH	Fw	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	(126)
	Rv	CATGGGTGGAATCATATTGGAA	
ICP4	Fw	GCGTCGTCGAGGTCGT	(127)
	Rv	CGCGGAGACGGAGGAG	
TK	Fw	CGAGACAATCGCGAACATCTAC	(128)
	Rv	CCCCGGCCGATATCTCA	
gB	Fw	TGTGTACATGTCCCCGTTTACG	(129)
	Rv	GCGTAGAAGCCGTCAACCT	
gC	Fw	GAGGAGGTCCTGACGAACATCACC	(130)
	Rv	CCGGTGACAGAATACAACGGAGG	
Us11	Fw	CTTCAGATGGCTTCGAGATCGTAG	(131)
	Rv	TGTTTACTTAAAAGGCGTGCCGT	
IL-6	Fw	TCTCCACAAGCGCCTTCG	(132)
	Rv	CTCAGGGCTGAGATGCCG	
EGFR_2	Fw	ATGCCCCGCATTAGCTCTTAG	(133)

	Rv	GCAACTTCCCAAATGTGCC	
IRAK2	Fw	GAGTGGGACTGGATGGAGTTTCG	
	Rv	GGTTTCCAGTTCAGGATGA	
RAD51	Fw	TCTCTGGCAGTGATGTCCTGGA	(134)
	Rv	TAAAGGGCGGTGGCACTGTCTA	
BRIP1	Fw	CAATGCCCGTGCTGTCA	(135)
	Rv	ATCTGCTGCCGTACCCATTTA	
BRCA2	Fw	GGCTTCAAAAAGCACTCCAGATG	(136)
	Rv	GGATTCTGTATCTCTTGACGTTCC	

3.11. Obtención de proteínas y cuantificación por el método de ácido bicinonínico

Para la obtención de proteínas se sembraron 2E5 células Vero en placas de 6 pocillos, se infectó con HSV-1 a MOI 5 y se incubó a 37 °C 5% CO₂ por 1 h. Luego se realizaron los tratamientos con soluciones de 100 µg/mL de PG en DMEM 2% FBS o cambio de medio para los grupos sin tratamiento, y se dejó en incubación por 16 h en estufa. Se removió el sobrenadante y se agregó 150 µL de buffer de lisis de proteínas (Triton X-100 [Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO] 1% con inhibidor de proteasas cOmplete™ EDTA-free 1X [Roche, Alemania] en PBS 1X autoclavado), se recolectó el lisado y centrifugó a 12.000 rpm a 4 °C por 5 min. Finalmente se tomó el sobrenadante conteniendo proteínas en tubos nuevos. Las proteínas se conservaron a -20 °C hasta su posterior uso.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método del ácido bicinonínico (BCA) (G-Biosciences, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se realizaron diluciones seriadas de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma, Saint Louis, MO) en buffer de lisis de proteínas para elaboración de una curva de calibración. Se cargó 12,5 µL de muestra, incluyendo los puntos de la curva y buffer de lisis de proteínas como blanco en placa de 96 pocillos. Luego se agregó 100 µL de la solución de trabajo (50 partes BCA por 1 parte solución de sulfato de cobre) a cada pocillo, se incubó en estufa por 30 min a 37 °C, se dejó enfriar por 5

min y se realizó la lectura de absorbancia en MultiskanGO a 562 nm. Se utilizó planillas Excel para el ordenamiento de los datos obtenidos.

3.12. Western blot

Se resolvieron 20 µg de proteína en geles de 10% de SDS page. La corrida se realizó a 80 V para el gel de apilamiento y a 100 V para el gel de separación, luego se ensambló el cassette de transferencia con papel, esponjas y membrana Mini-Protean (Bio-Rad), y se transfirió durante 90 min a 100 V. Se removió la membrana y realizó el bloqueo en TBS 1X-Tween 0.05% (TBST) Leche 2,5% durante toda la noche.

Posteriormente se incubó la membrana con 1:750 de α -gD (MABF1975) en agitación toda la noche a 4 °C, se lavó la membrana tres veces por cinco minutos con TBST en agitación y se incubó con 1:2500 α -ratón en agitación por 90 min a RT. Para el revelado se agregó 500 µL de solución potenciadora de Luminol y 500 µL de H₂O₂ (Promega, Madison, WI), se incubó por 3 minutos y se reveló en un C-DiGit® (LI-COR).

Luego del revelado se realizó el stripping de la membrana que consistió en una incubación con hidróxido de sodio (Biopack, Argentina) y se repitió el bloqueo como ya se había descrito. El segundo revelado consistió en la incubación de la membrana con 1:10.000 de α - γ -actina en rodamiento por 90 min a RT. Se realizó los lavados y continuó con la incubación con α -mouse y el revelado como ya se ha descrito.

Una vez obtenidas las imágenes de ambas membranas y los valores de intensidad de bandas se realizó el ordenamiento y análisis de datos con planillas Excel y Prism 5, normalizando los niveles de proteínas de gD con respecto a γ -actina, realizando pruebas estadísticas con el software mencionado.

3.13. Análisis estadístico

Se utilizó Microsoft Excel Professional Plus 2016 para el manejo de los datos obtenidos. Los datos de qPCR se obtuvieron mediante el uso del StepOne™ Software v2.3. Los análisis estadísticos se realizaron en Prism (GraphPad Prism v5.0.1

para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego, California, www.graphpad.com), utilizándose análisis de regresión no lineal del logaritmo de inhibición versus respuesta, logaritmo de inhibición versus respuesta normalizada, y prueba t de Student de una cola con valores de significancia de 95%.

4. RESULTADOS

4.1. Ensayos de citotoxicidad para obtención del CC50

En una primera instancia, se realizaron los ensayos de citotoxicidad para obtener los valores de CC50 de cada AE. Como control de viabilidad se utilizó un grupo sin tratamiento. Luego de la incubación se utilizó el reactivo resazurina para la determinación de los niveles de viabilidad celular, como se ve en la Figura 1. En la Tabla 2 se muestra la CC50 y el R^2 para cada uno de los AE ensayados.

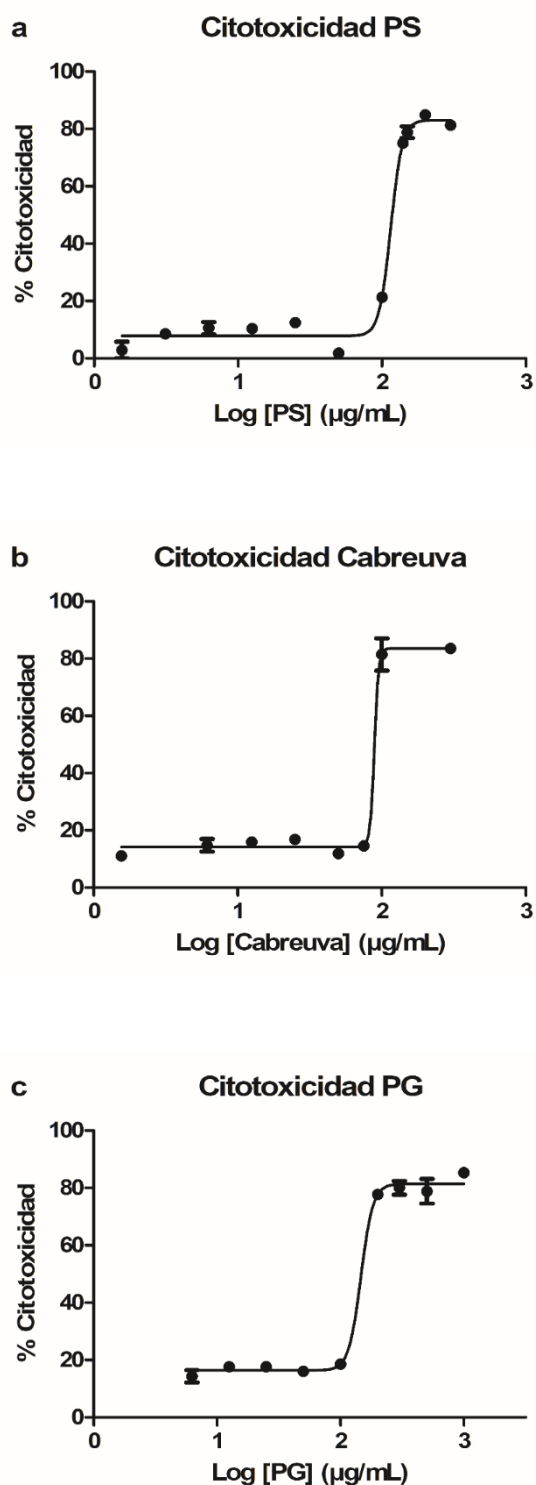


Figura 1. Citotoxicidad de los AE en células Vero. Porcentajes de citotoxicidad normalizados a células sin tratar con respecto a la concentración de cada AE utilizado. Cada punto corresponde a duplicados. Análisis no lineal de logaritmo de inhibidor versus respuesta.

4.2. Ensayos de actividad antiviral para obtención del EC50 y determinación del SI

Luego de los ensayos de citotoxicidad se procedió a estudiar la actividad antiviral de los AE. Para ello se infectaron células a una MOI de 1,5, se removió el inóculo y se agregaron los AE a concentraciones crecientes, teniendo también un grupo infectado sin tratar (mock) y un grupo de células sin tratar ni infectar como control. Luego de la incubación con los tratamientos se obtuvo el sobrenadante de cada grupo, y se cuantificó las VGC por qPCR en cada condición. En la Figura 2 se muestran las curvas de inhibición de infección.

Una vez obtenidos los parámetros de CC50 y EC50 se determinó el índice de selectividad (SI) (CC50/EC50). El SI es una medida que indica el intervalo aproximado de seguridad de la sustancia en estudio, y significa que a mayor SI, se tiene una seguridad teórica mayor pues es necesaria una menor cantidad de sustancia para tener los efectos deseados así como una mayor cantidad para que cause efectos tóxicos (137).

Los valores de citotoxicidad como CC50, actividad antiviral como EC50 e SI se encuentran en la Tabla 2. PG fue el AE con mayor valor de CC50, lo que indica una mayor concentración necesaria de la sustancia para causar un efecto citotóxico celular. Así mismo PG resultó con el mejor EC50 (7,95 µg/mL), lo que indica que es necesaria una cantidad menor de sustancia para obtener la misma actividad antiviral, con un SI de 18,36.

Por otro lado, las CC50 de PS y Cabreuva (115,1 y 89 µg/mL respectivamente) resultaron menores que la CC50 de PG (146 µg/mL). Esto sumado con sus valores de EC50 relativamente altos (56,6 y 25,9 µg/mL), se traducen en unos valores de SI reducidos (2,03 y 3,44, respectivamente) con respecto a PG (18,36).

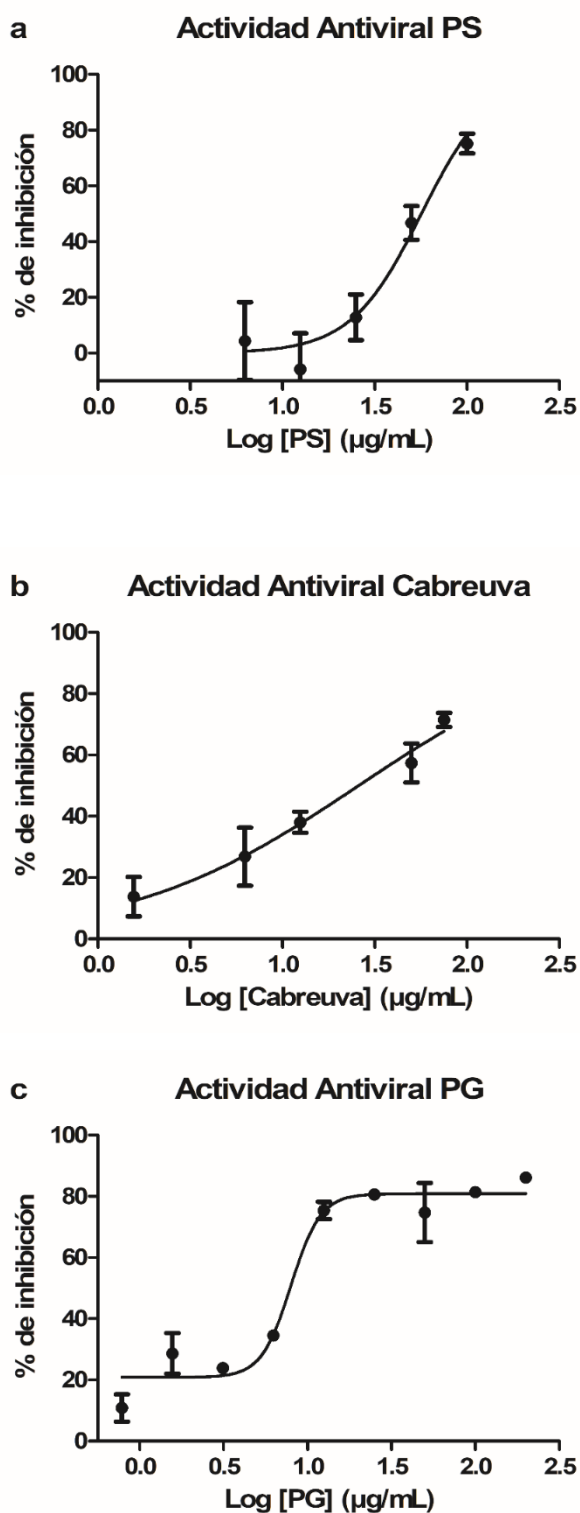


Figura 2. Actividad antiviral de los AE frente a HSV-1 en células Vero. Porcentaje de actividad antiviral, representado por la reducción en la producción de HSV-1 en sobrenadante de cultivo, normalizado a células sin tratar con respecto a la concentración de AE utilizado. Cada punto corresponde a duplicados para AE de PS y PG, y triplicados para Cabreuva.

Tabla 2. Parámetros de interés obtenidos de los AE en estudio.

AE	CC50 (µg/mL)	R² CC50	EC50 (µg/mL)	R² EC50	SI
PS	115,1	0,9900	56,6	0,8802	2,03
Cabreuva	89	0,9766	25,9	0,8454	3,44
PG	146	0,9922	7,95	0,9451	18,36

4.3. Ensayos de tiempo de infección

A fin de obtener datos sobre el mecanismo de acción antiviral de los AE sobre HSV-1, se realizó el ensayo de tiempo de infección. Este consistió en realizar la infección agregando el AE en diferentes etapas del ciclo viral: i) “Pre-tratamiento”, donde al AE fue agregado 2 h antes de la infección; ii) “Durante-tratamiento”, donde el AE fue agregado junto al virus durante la adsorción y entrada; iii) “Post-entrada”, se incubó la célula con el virus permitiendo la entrada viral y luego se trató con el AE. Se tuvo también un grupo de células infectadas sin tratar (mock).

El “Pre-tratamiento” permitió determinar si el AE activa genes celulares que afectan a la infección; el grupo “Durante-tratamiento” permite determinar si el tratamiento con el AE produce lisis de la partícula viral y se afecta la unión y entrada del virus. Finalmente, el grupo “Post-entrada” permite determinar si el efecto antiviral del AE es a nivel de eventos post-entrada del virus, tales como expresión, replicación y ensamblaje viral. El esquema del ensayo se ve en la Figura 3.

Se realizó el ensayo tiempo de infección y se cuantificó las VGC en el sobrenadante por qPCR. Los resultados se encuentran en la Figura 4 y los valores de inhibición de cada tiempo se encuentran en la Tabla 3.

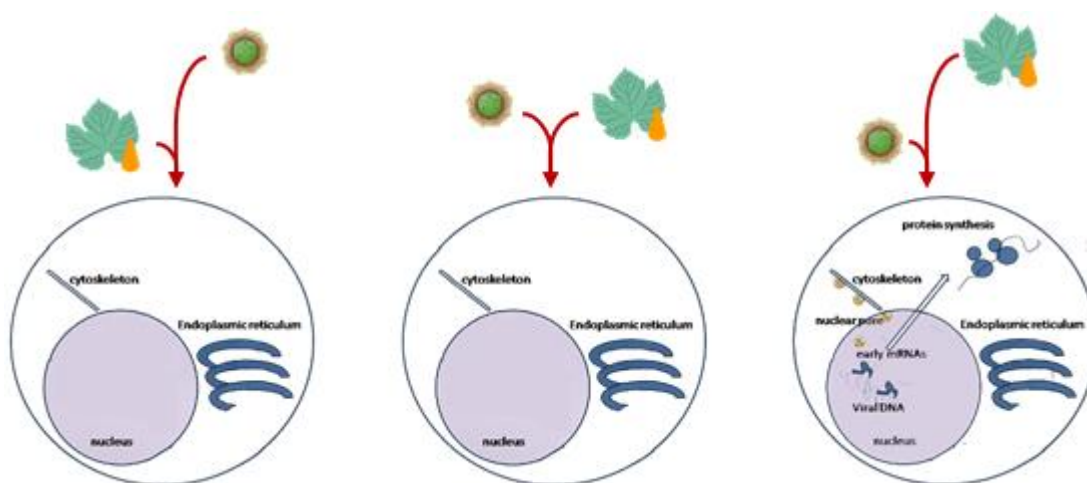


Figura 3. Estructura del ensayo de Tiempo de infección. Se muestran los tres tiempos diferentes: El “Pre-tratamiento” (izquierda) consiste en el tratamiento de las células con el AE, luego se agrega el virus. “Durante-tratamiento” (centro) es la adsorción de virus en presencia del AE, permitiendo así el contacto simultáneo entre el AE, el virus y la célula. “Post-entrada” (derecha) consiste en la adsorción del virus seguido por el agregado del AE al medio, así el

tratamiento es posterior al inicio del ciclo viral. Imagen de diseño propio. La célula posee licencia pública. La imagen del virus fue extraída del Swiss Institute of Bioinformatics.

Como puede observarse en la figura 4, PS y PG mostraron actividad antiviral en los tiempos de “Pre-tratamiento” y “Post-entrada”, con una inhibición mayor al 80%, lo que sugiere que la actividad antiviral está mayoritariamente mediada por efectos sobre la célula y en eventos posteriores a la entrada del virus. Cabreuva sólo mostró una inhibición del 76,7% en el tiempo de “Pre-tratamiento”, lo que indicaría que su actividad antiviral está mayormente orientada a efectos sobre la célula en vez de afectar a la entrada o al ciclo viral.

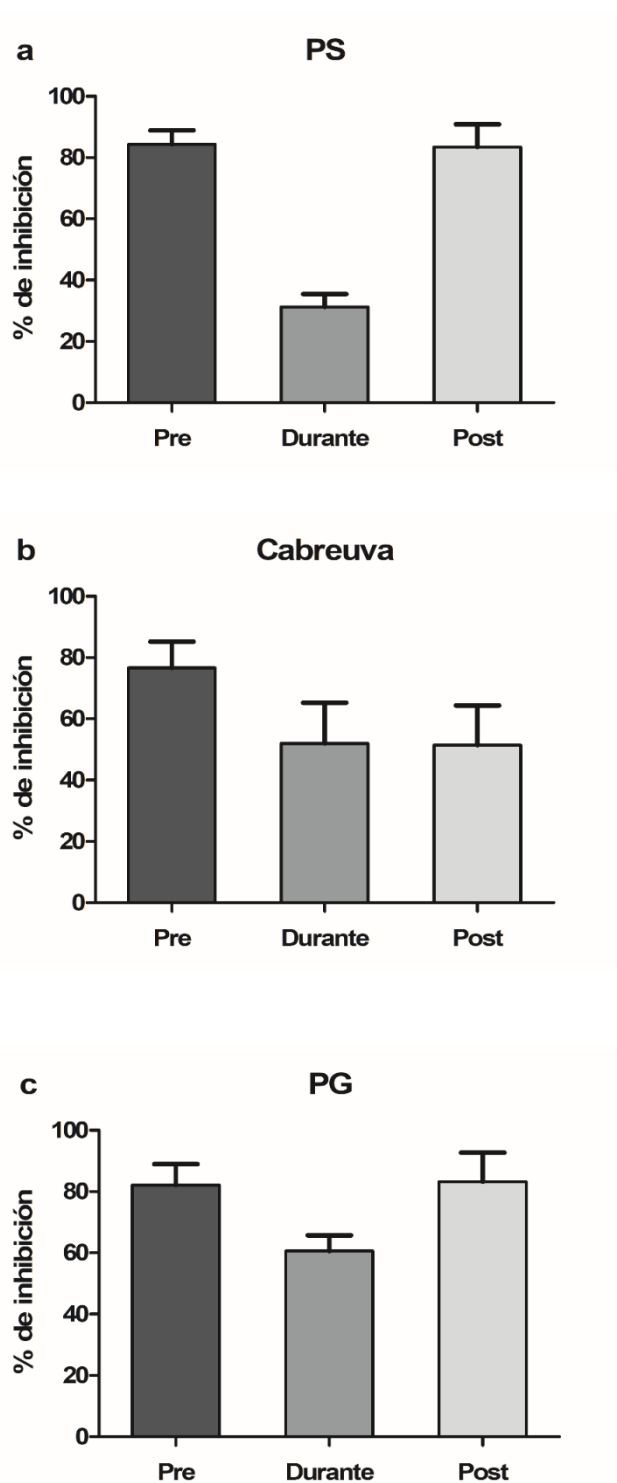


Figura 4. Ensayos de tiempos de infección de HSV-1 de los AE en células Vero. Porcentajes de inhibición en la producción de HSV-1 en sobrenadante, normalizados con respecto a células sin tratar, con respecto al tiempo de infección (“Pre-tratamiento”, “Durante-tratamiento” y “Post-entrada”) con los AE. Cada grupo representa triplicados.

Tabla 3. Inhibiciones de la infección por HSV-1 obtenidas en el ensayo de tiempo de infección.

AE	Inhibición en “Pre- tratamiento”	Inhibición en “Durante- tratamiento”	Inhibición en “Post- entrada”
PS	84,3 %	31,3 %	83,4 %
Cabreuva	76,7 %	52 %	51.5 %
PG	82,1 %	60,6 %	83,2 %

4.4. Ensayo virucídico

Considerando que el AE de PG presentó los mejores valores de EC50 y SI, se decidió profundizar en los posibles mecanismos de acción del mismo.

Como sólo se observó un 60,6 % de inhibición de la infección en el ensayo “Durante-tratamiento” (Tabla 3), se procedió a analizar el efecto del PG sobre la integridad de la partícula viral, realizando para ello el ensayo virucídico. El mismo consiste en el enfrentamiento directo de HSV-1 con el AE, así en caso de que el AE genere daños sobre la integridad de la partícula viral ocurriría la liberación del genoma viral. Seguidamente, se realiza una digestión del genoma con la enzima DNAsa I que permite eliminar al genoma libre o accesible por la enzima para posteriormente cuantificar el genoma no digerido por qPCR. De esta manera, es posible determinar el número de partículas que no fueron lisadas. En el ensayo se utiliza como normalizador un grupo de células sin tratar con AE (mock), de esta manera permite obtener la relación existente entre el genoma externalizado digerido y el presente en viriones sin digerir, lo cual indica la actividad virucídica del AE estudiado.

En la Figura 5 puede observarse que PG no posee actividad virucídica a nivel de la partícula viral ya que no ocurre liberación de genoma ($p = 0,3731$). Este resultado, junto con el porcentaje de inhibición de infección en “Durante-tratamiento”, indican que PG no actúa mayoritariamente afectando la integridad de la partícula viral.

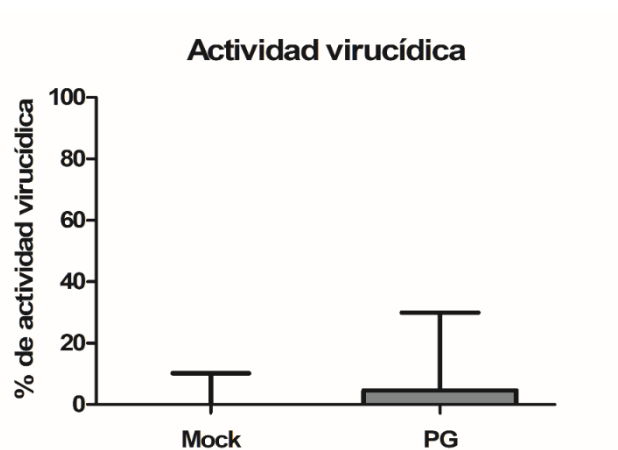


Figura 5. Resultado del ensayo de actividad virucídica de PG frente a HSV-1. Porcentaje de la actividad virucídica del AE de PG sobre HSV-1 normalizado frente al grupo de virus sin tratar. Cada grupo representa cuadruplicados. Se utilizó el test de t de Student.

4.5. Cuantificación del genoma viral

Considerando los resultados obtenidos en el ensayo de tiempo de infección que indican actividad antiviral en eventos posteriores a la entrada del virus a la célula, se decidió analizar el efecto de PG sobre la replicación viral.

Para ello se infectaron células Vero a dos MOI (5 y 15). Luego de la entrada del virus se trató con PG utilizando como control un grupo sin tratar con PG (mock). Las células fueron lisadas y se purificó el ADN, para luego cuantificar la cantidad de genoma viral intracelular por qPCR. Además, también se cuantificó la cantidad de genoma celular presente en la muestra mediante el gen GAPDH. De esta manera se determinó el genoma viral intracelular, normalizado con respecto al GAPDH celular, como se observa en las Figuras 6a y 6c, como indicativo del cambio relativo en la síntesis de genoma viral con respecto al número de células infectadas. También se cuantificó a los VGC totales intracelulares por separado, en las Figuras 6b y 6d, como indicativo del cambio absoluto en la síntesis de genoma viral.

Se pudo observar a MOI 5 una disminución del genoma viral producido ($p = 0,0406$), además pese a no ser significativo se observa una tendencia en la disminución de genoma viral cuando es tratado con PG cuando es normalizado con GAPDH. A MOI 15 se observó una disminución significativa ($p = 0,0102$) en el total de genoma viral y también cuando fue normalizado con GAPDH ($p = 0,0181$). Estos datos sugieren que el PG afecta la replicación viral.

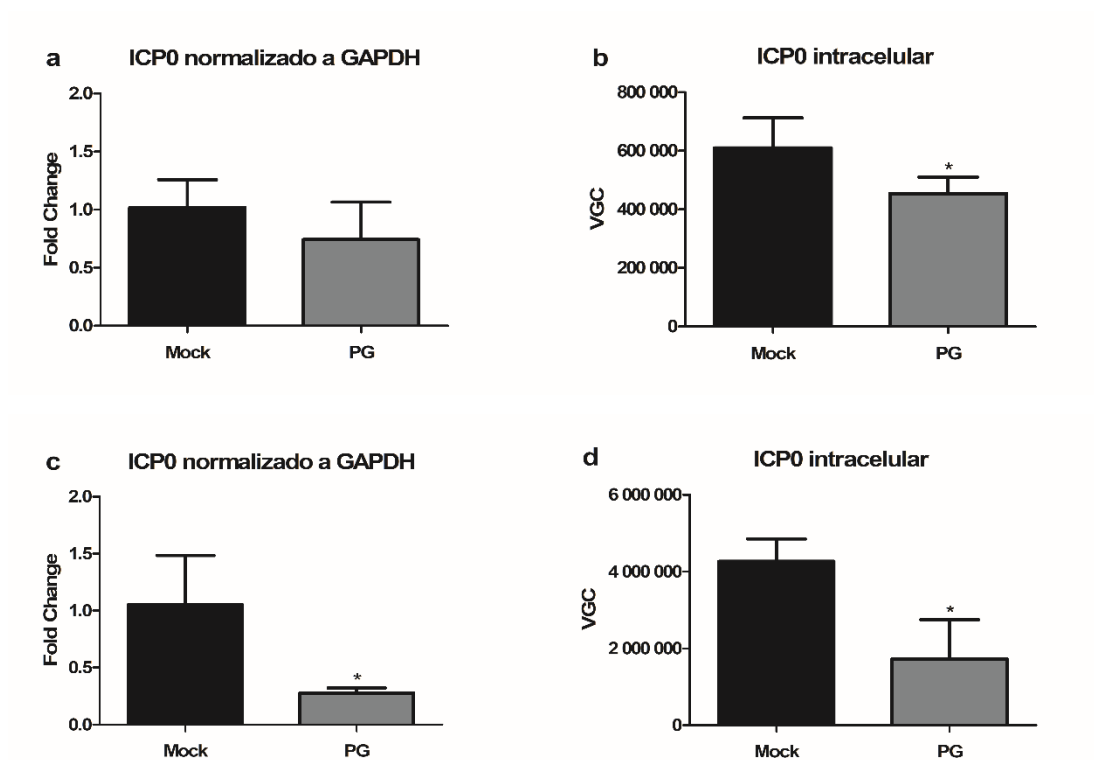


Figura 6. Disminución en los niveles de producción de genoma de HSV-1 causada por PG, a dos diferentes MOI en células Vero. (a) y (c) Niveles de reducción de genoma viral producido y (b) y (d) disminución en la cuantificación del virus producido, causado por el tratamiento con PG, normalizados al mock sin tratar, a MOI = 5 (a y b) y 15 (c y d). Cada grupo representa triplicados. Se utilizó el test de t de Student de una cola, * $p < 0,05$.

4.6. Niveles de expresión de transcriptos de genes virales

El efecto sobre la replicación viral del PG puede deberse a una inhibición directa sobre la replicación o la disminución de la expresión de genes virales necesarios para la misma. Por ello, se procedió a determinar el efecto PG sobre la expresión de los genes IE, E y L del virus.

Para ello, células se infectaron con HSV-1 y luego de la entrada del virus se trató con PG utilizando como control un grupo sin tratar con PG (mock). Posteriormente, se procedió a la extracción y purificación del ARN total y se analizó cada gen por RT-qPCR.

En la Figura 7 se observan los niveles de transcriptos de genes virales inmediato-tempranos ICP0 e ICP4, gen temprano Tk y los genes tardíos gB, gC y Us11. No se observó diferencias en ninguno de los genes estudiados, comparando entre células tratadas y no ($p = 0.2839$ para ICP0, $p = 0.1509$ para ICP4, $p = 0,4880$ para Tk, $p = 0,1160$ para gB, $p = 0,1393$ para gC, $p = 0,0993$ para Us11).

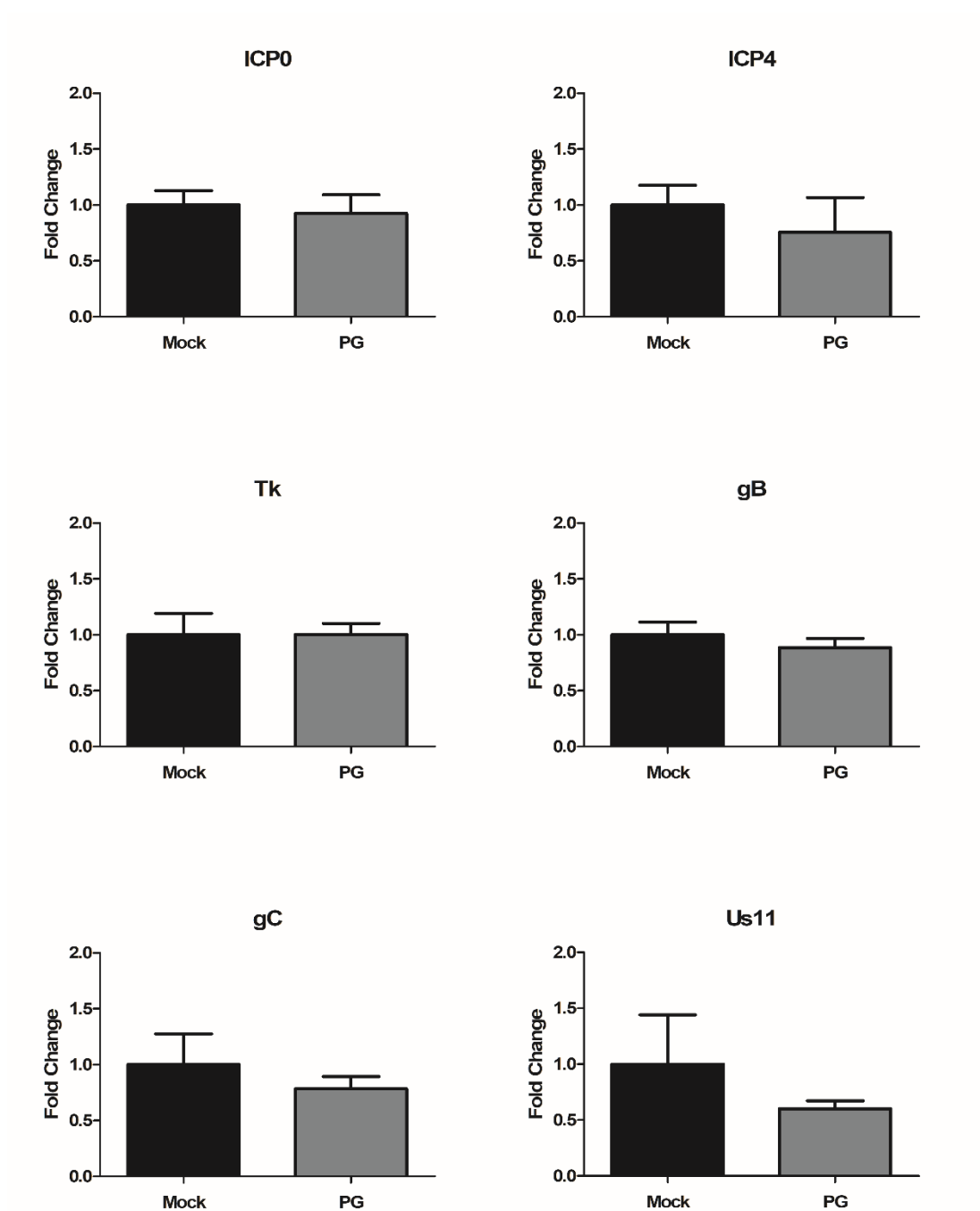


Figura 7. Niveles de expresión de transcritos virales frente al tratamiento con PG. Análisis de $\Delta\Delta C_t$ de genes inmediato-tempranos (ICP0, ICP4), temprano (Tk) y tardíos (gB, gC y Us11) de HSV-1 frente al tratamiento con PG. Cada grupo representa triplicados. Se utilizó el test de t de Student de una cola.

4.7. Niveles de expresión de proteínas virales

Posteriormente se procedió a evaluar la producción de proteínas virales. Para ello, células Vero que fueron infectadas y tratadas con PG, teniendo como control células sin tratamiento con el AE (mock). Luego de la incubación se procedió a realizar un ensayo de western blot.

En la Figura 8 puede notarse la disminución en los niveles de la proteína viral gD en presencia del tratamiento con PG, reduciéndose a 0,446 frente a 1 representando al mock ($p = 0,0067$), en unidades arbitrarias de intensidad. Esto indicaría que el AE no actúa a un nivel de transcripción, sino sobre la traducción o la regulación post-traducciona l de la proteína viral.

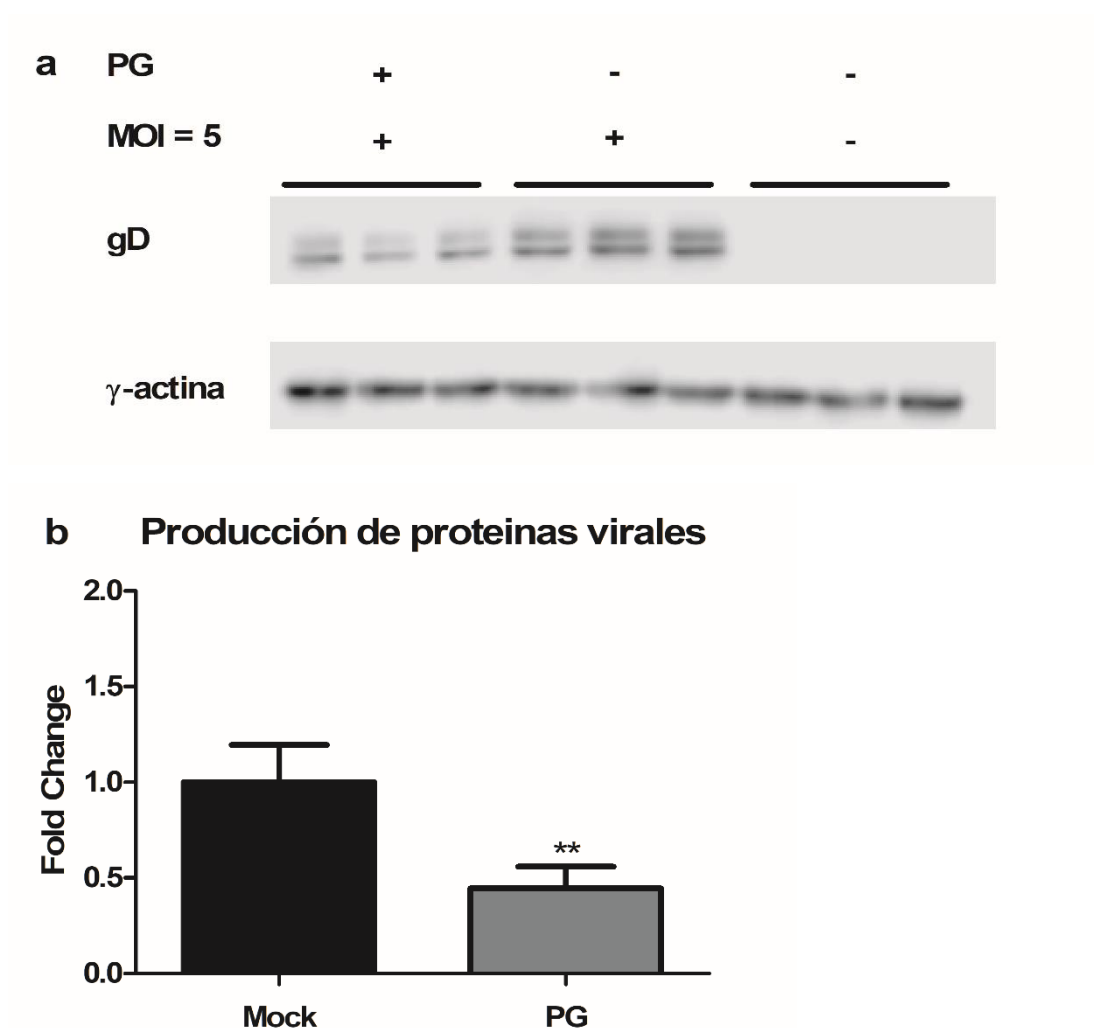


Figura 8. Disminución en los niveles de la proteína viral gD por el tratamiento con PG, producidas durante la infección de células Vero con HSV-1. (a) Ensayo de western blot representativo, utilizando células infectadas con MOI = 5, tratadas o no con PG y anticuerpos anti-gD y anti- γ -actina. (b) Semicuantificación de niveles de gD, normalizado a γ -actina. Cada grupo representa triplicados. Se utilizó el test de t de Student de una cola, ** $p < 0,005$.

4.8. Niveles de expresión de transcriptos de genes celulares

Como se observó actividad antiviral del PG en el ensayo de “Pre-tratamiento”, se analizó el efecto del PG sobre ciertos genes celulares de interés en ausencia de infección. Se dividió los genes a estudiar en dos grupos: el grupo correspondiente a citoquinas de la respuesta innata antiviral o responsables de señalización durante la infección como son interleuquina (IL)-6, IRAK2 y EGFR, y el grupo de genes de la respuesta de daño a ADN (DDR) relacionados a la replicación viral, como RAD51, BRCA2 y BRIP1. Diferencias en niveles de expresión en el primer grupo indicarían efectos de PG sobre interacciones virus-célula no relacionados al ciclo replicativo, como son la inmunidad celular innata o rutas de señalización, mientras que diferencias del segundo grupo indicarían un efecto sobre la regulación de los sistemas celulares encargados de la reparación de daño presente en el genoma, los cuales son explotados por HSV-1 para permitir su replicación.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9. No se pudieron observar diferencias en los genes celulares estudiados ($p = 0,0613$ para IL6, $p = 0,4778$ para IRAK2, $p = 0,3081$ para EGFR, $p = 0,3732$ para BRCA2, $p = 0,0894$ para RAD51, $p = 0,2541$ para BRIP1). Si bien se pudo observar tendencias en el aumento de los niveles de transcriptos para IL-6 y RAD51, los resultados indicarían que los efectos del tratamiento con PG no ocurrirían a nivel de expresión de genes celulares en ausencia de la infección. Debido a ello, se procedió a estudiar efectos del PG sobre la expresión de genes celulares en el contexto de la infección.

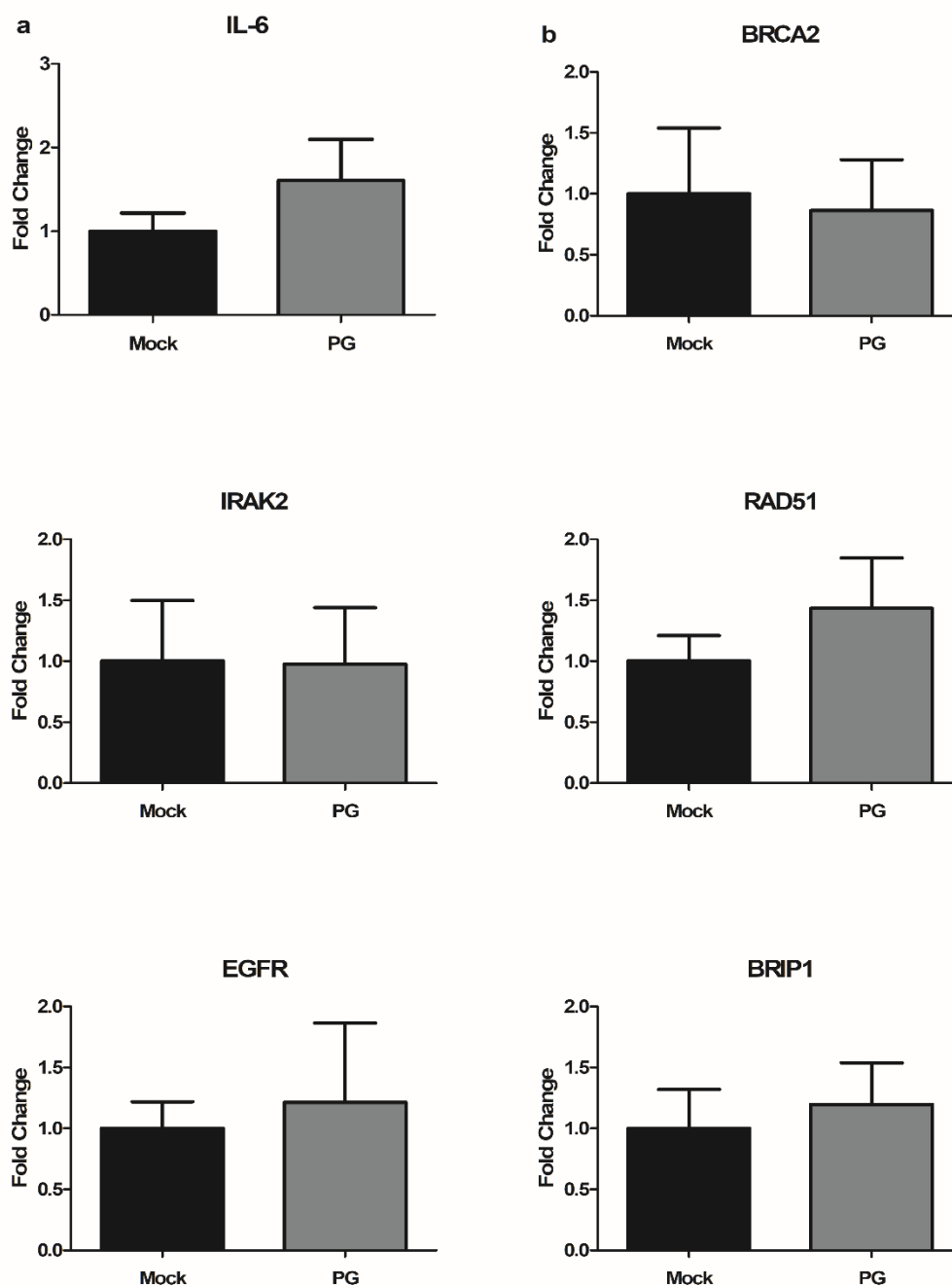


Figura 9. Niveles de expresión de transcritos celulares frente al tratamiento con PG de células Vero. Análisis de RT-qPCR de ARNm de genes celulares (a) como citoquinas y señalización celular y (b) relacionados a la DDR relacionados a la replicación viral, frente al tratamiento con PG. Cada grupo representa triplicados. Se utilizó el test de t de Student de una cola.

Para ello se infectaron células Vero en presencia o ausencia de PG. En la Figura 10a se observan niveles de transcritos del grupo de genes celulares

pertenecientes a citoquinas y señalización celular. Se pudo observar aumento en los niveles de IL-6 ($p = 0,0263$) en presencia de PG. Además, se observó una reducción en los niveles de IRAK2 ($p = 0,0344$), sin observarse diferencias significativas para EGFR ($p = 0,4054$). Así mismo, en la Figura 10b se observan los niveles de transcriptos del grupo de genes celulares pertenecientes a la DDR. No se observaron diferencias ($p = 0,3136$ para BRCA2, $p = 0,3470$ para RAD51, $p = 0,1641$ para BRIP1), lo cual indica que los efectos del tratamiento con PG no ocurren sobre los genes celulares estudiados relacionados a la replicación viral.

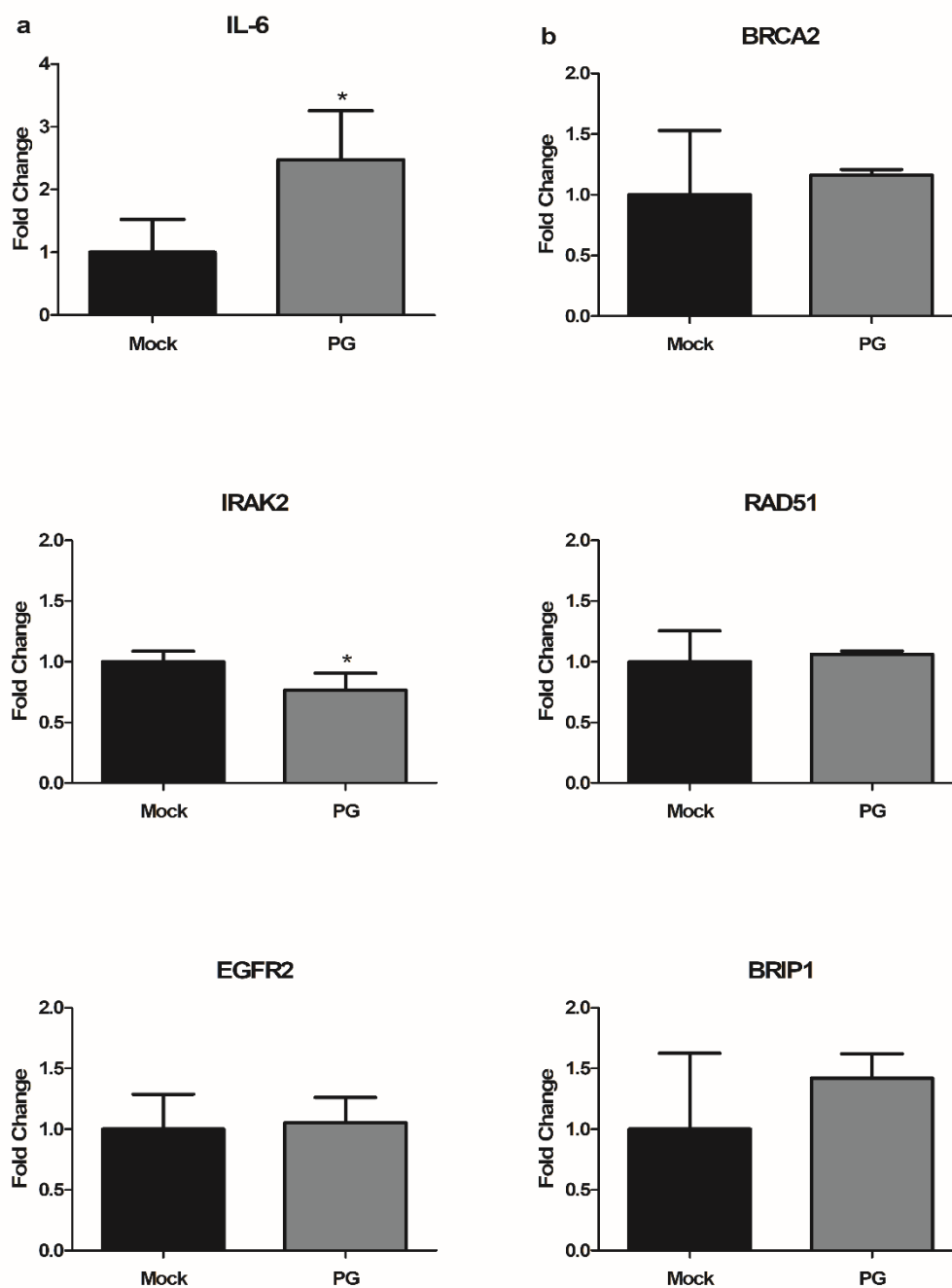


Figura 10. Niveles de expresión de transcriptos celulares frente al tratamiento con PG durante la infección de células Vero con HSV-1. Análisis de RT-qPCR de ARNm de genes celulares (a) como citoquinas y señalización celular y (b) relacionados a la DDR, en infección por HSV-1 frente al tratamiento con PG. Cada grupo representa triplicados. Se utilizó el test de t de Student de una cola, * $p < 0,05$.

5. DISCUSIÓN

El estudio de la actividad antiviral y la citotoxicidad de los AE producidos en Paraguay es un área previamente no abordada. Los datos obtenidos en el presente estudio resultan importantes desde el punto de vista de otorgar un valor agregado a productos intrínsecamente nacionales, con relevancia económica a nivel país. Además, el trabajo aporta información sobre su uso, lo cual es un fuerte incentivo para su continuo estudio (112). Así también, la búsqueda de posibles mecanismos de la actividad antiviral es un paso posterior en el estudio de compuestos naturales, que además de facilitar la búsqueda de los componentes involucrados al efecto, es importante en lo que respecta a la determinación de dianas de susceptibilidad viral.

Con respecto al AE de PS pudimos observar una CC50 de 115,1 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1 y Tabla 2). Si bien no existen datos previos de la citotoxicidad del AE, se ha reportado que el extracto obtenido por fluido supercrítico, posee una CC50 de 18,1 a 61,1 $\mu\text{g/mL}$ (138). Similar a lo encontrado en el presente estudio para PS, se ha reportado la citotoxicidad de sus componentes, como 110,8 $\mu\text{g/mL}$ para (-)-guaiol (siendo 29,31% de PS) y 142,6 $\mu\text{g/mL}$ para α -guaieno (1,33%) (138,139). No se encontró reportes correspondientes al bulnesol (44,13%).

No existen datos publicados previamente con respecto a la actividad antiviral del AE de PS o de alguno de sus componentes frente al HSV-1. En nuestro trabajo se determinó actividad antiviral, EC50 de 56,6 $\mu\text{g/mL}$, (Figura 2 y Tabla 2) con un SI de 2,03. Este fue el menor SI obtenido entre los tres aceites estudiados (3,44 para Cabreuva y 18,36 para PG). Con respecto a los resultados del tiempo de infección, se observó que PS presentó una mayor actividad antiviral en los tiempos “Pre-tratamiento” y “Post-entrada” (Tabla 3). Esto sugiere que podría actuar a un nivel celular, mediante la inducción de un estado antiviral, así como también sobre el ciclo infectivo del HSV-1.

Está reportado que el guaicol, componente del 29,31% del AE de PS, presenta actividad antitumoral para tres distintas líneas celulares *in vitro* (CC50 de 121,7 μM para A549, 211,5 μM para H1299 y 297,1 μM para BEAS-2B) y actividad citotóxica sobre xenoinjertos en modelos murinos(139). Además, el guaicol induce la expresión de ciertos genes tales como IRAK2, EGFR e IL-6 y disminuye los niveles de varios otros, entre los que destacan CDK1, BRIP1, FANCD2, PARP1, P53, y RAD51, este

último de crítica importancia pues regula la autofagia celular en las líneas citadas (139).

Con respecto al AE de Cabreuva, se ha reportado que sus compuestos presentan una actividad antitumoral *in vitro* para líneas celulares, como es el caso de nerolidol (69,09% del AE de Cabreuva), el cual posee una CC50 <10 μ M y 3,02 μ g/mL frente a HeLa (140,141), 41 μ g/mL para MDA-MB-231 y 35 μ g/mL para MCF7 (142). En todos los casos, los valores de CC50 son menores a los observados en el presente estudio (89 μ g/mL). Cabe resaltar que la presencia de nerolidol podría explicar la relativamente alta citotoxicidad observada para Cabreuva con respecto a los otros dos AE estudiados (Figura 1 y Tabla 2).

Con respecto a la actividad antiviral de Cabreuva, sólo se reportó actividad en uno de sus compuestos, el farnesol, con una EC50 de 3,5 μ g/mL y una SI de 11,4 frente al HSV-1 en células RC-37 (92). En nuestro estudio observamos una EC50 de 25,9 μ g/mL para el AE, mostrado en la Figura 2 y Tabla 2, con un SI de 3,44. Es de notar que el farnesol es un componente minoritario del AE (presencia de sólo 0,86%), además posee valores de CC50 que van entre <10 μ M y 17,6 μ g/mL frente a HeLa (140,143), entre 39 a <80 μ M para MIA PaCa-2 (144,145) y 40 μ g/mL para RC-37 (92).

El AE de PG presentó una CC50 de 146 μ g/mL (Figura 1 y Tabla 2). Datos previamente publicados sobre PG indicaron valores de CC50 superiores a los 100 μ g/mL en células MCF-7 y MDA-MB-231 (146), similar a lo encontrado en este trabajo. Se ha reportado citotoxicidad para diferentes componentes del AE tales como nerol (1,15% del AE) y geraniol (2,83% del AE), con CC50 de 1,6 μ g/mL o 3,2 μ g/mL respectivamente, hasta 400 μ g/mL para α -terpineol, no observándose citotoxicidad a la misma concentración para el acetato de linalilo (49,12% del AE) (96,147,148). Al igual que para el caso de Cabreuva, algunos componentes de PG son considerados como antitumorales *in vitro* debido a la alta citotoxicidad que presentan, como es el caso de linalool (24,92% del AE), β -cariofileno (0,87% del AE) y geraniol (2,83% del AE), con CC50 de 24,86 μ g/mL, 3,92 μ g/mL y 22,09 μ g/mL, respectivamente (141), también habiéndose reportado una CC50 de 35 μ g/mL en RC-37 para el caso de β -cariofileno (92). Cabe resaltar que linalool se ha reportado como no citotóxico (CC50 de 177,1 μ g/mL) en células BCC-1/KMC (149).

De esta forma, el SI encontrado para PG fue de 18,36, como se puede ver en la Figura 2 y Tabla 2. Como referencia se tienen reportados los valores de SI para aciclovir, fármaco actualmente utilizado, que van desde 61,9 (CC50 de 130 $\mu\text{g/mL}$ y EC50 de 2,1 $\mu\text{g/mL}$) (150) a 880 (CC50 de 960 $\mu\text{g/mL}$ y EC50 de 1,09 $\mu\text{g/mL}$) (151). Así también, los resultados del ensayo de tiempo de infección mostraron una reducción significativa de producción de virus en los tiempos de “Pre-tratamiento” y “Post-entrada”, con una menor reducción en “Durante-tratamiento” (Tabla 3).

En relación a la actividad antiviral, no existen reportes previos para el AE de PG. Con respecto a sus componentes, se ha reportado que el acetato de linalilo y linalool, principales componentes del AE, no poseen actividad antiviral frente a HSV (152). Además, otros componentes tales como el acetato de terpinilo (5,53% del AE), geraniol o mirceno (2,22% del AE) tampoco presentaron actividad antiviral (149,152). Entre aquellos componentes minoritarios con actividad antiviral contra HSV-1 pueden citarse al terpinoleno (0,46% del AE), con una EC50 mayor a 12 $\mu\text{g/mL}$ (153), el β -pineno (1,2% del AE), limoneno (0,84% del AE), α -pineno (0,14%) y α -terpineol + con valores de EC50 de 3,5 $\mu\text{g/mL}$, 5,9 $\mu\text{g/mL}$, 4,5 $\mu\text{g/mL}$ y 22 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (96,154). Así también, se ha observado actividad antiviral del β -cariofileno con una EC50 entre 0,25 y 5,38 $\mu\text{g/mL}$ en células RC-37 y Vero, siendo el último dato para HSV-2 (92,152).

Se observó una inhibición del 60,6% cuando el virus fue incubado con el AE de PG durante la adsorción en el ensayo de infección (Figura 4), pero notablemente no fue posible determinar la actividad virucídica del AE (Figura 5). Esto podría deberse a que en el ensayo “Durante-tratamiento”, hay un contacto simultáneamente entre las células, PG y el virus, lo cual puede tener efectos no sólo sobre la partícula viral, sino también sobre receptores celulares, pudiendo afectar la unión y entrada del virus.

Cabe resaltar que el ensayo virucídico realizado consistió en el enfrentamiento directo del virus con AE, seguido de una incubación por 30 min a 37°C (para permitir la actividad DNAsa). Se cuantificó los virus a través de la medición de los VGC totales por qPCR. De esta forma, se cuantificó solamente la actividad virucídica. En ensayos virucídicos reportados previamente, el enfrentamiento del AE o compuesto de interés con el virus se realizó por un tiempo de 0 a 6 h a 37 °C, se midió la infectividad del virus por PFU (85,92,98–100,104,155,156). De esta forma,

estos ensayos determinaron no solamente la destrucción de la partícula viral, sino también otros efectos que pueden relacionarse con la unión y entrada del virus a la célula. Esto constituye una diferencia con el ensayo utilizado en este estudio.

Se observó una gran actividad del AE a nivel de “Post-entrada” del virus, con una inhibición de producción de virus del 83,2% con respecto al control sin tratar. Esto indica que uno de los principales mecanismos por los cuales PG actuaría es directamente sobre el ciclo infectivo de HSV-1 en eventos post-entrada. Debido a la secuencialidad del ciclo replicativo viral, una interferencia río arriba del mismo terminará produciendo efectos observables río abajo, como la disminución en el número total de partículas virales producidas.

A fin de determinar el punto donde ocurriría dicho evento se decidió estudiar primeramente la replicación viral. Se observó una tendencia en la disminución del genoma normalizado con GAPDH celular, a 72,8% ($p = 0,1486$) con respecto a células sin tratar. Mientras que el genoma total cuantificado por VGC intracelular total se redujo a un 74,7% ($p = 0,0406$) cuando se utilizó un MOI = 5, en las Figuras 6a y 6b. Esta diferencia se vio incrementada con una MOI = 15, donde ocurrió una disminución de producción de genoma viral normalizado a GAPDH celular, a 26,2% ($p = 0,0181$) o 40,3% ($p = 0,0102$) una vez se realizó la normalización con células sin tratar. Estos resultados indican que PG posee actividad antiviral durante la replicación viral o en eventos que ocurren previo a esta etapa.

Por ello, se estudió la expresión de ARNm virales pertenecientes a cada uno de los tres grupos correspondientes a la secuencialidad de expresión, es decir los genes IE, E y L. Sin embargo, no se pudo encontrar diferencias en ninguno de los genes estudiados (Figura 7), lo cual indicaría que los efectos observados ocurren a nivel de replicación viral. Es de notar que no hubo diferencias en la expresión de los genes virales estudiados relacionados al ciclo viral. Por otro lado, no podemos descartar que el efecto de la reducción de replicación viral observado ocurra por una inhibición de la expresión a nivel post-transcripcional.

Se pudo determinar que PG induce la caída de expresión de la proteína viral gD a un 44,6% de los niveles observados en ausencia de tratamiento (Figura 8), lo cual coincide con lo observado en el tiempo “Post-entrada”. Esto sugiere un segundo posible mecanismo de actividad antiviral del AE. Es importante notar que la

producción del ARNm para genes tardíos no se vio afectada por el AE de PG. Esto implicaría que la disminución en los niveles de gD puede deberse a fenómenos post-transcripcionales, como la traducción del mensajero o la degradación de proteínas. Teniendo en cuenta que gD es un gen L laxo, se consideró que la expresión basal del mismo no es dependiente de la replicación viral (3).

Se observó también efectos de PG durante el “Pre-tratamiento”, por lo que se procedió a estudiar los niveles de transcriptos celulares en ausencia de infección. No se observaron efectos de PG sobre los niveles de la expresión de estos genes en ausencia de la infección viral (Figura 9). Cabe señalar que en el ensayo “Pre-tratamiento”, la incubación con PG fue seguida de una infección por 24 h, lo que permite al menos un ciclo replicativo viral, mientras que el estudio de los ARNm se realizó a las 4 h del tratamiento con PG, en ausencia de infección. No se puede descartar el efecto de PG sobre otros ARNm no estudiados o efectos del AE a nivel post-traducciona.

Dentro de los transcriptos estudiados se encuentra BRCA2, también conocida como FANCD o XRCC11, involucrada en la vía de anemia de Fanconi y es explotada por HSV-1 para permitir la replicación del genoma viral (157,158). Además, se analizó RAD51, que es utilizado junto con RAD52, para permitir la recombinación homóloga del virus, proceso crítico para la replicación viral (159). BRIP1, o proteína C-terminal helicasa 1 de interacción con BRCA1, también conocida como BACH1 o FANJ, interactúa de forma directa con BRCA1 para mediar funciones de reparación de daño genómico (160,161).

El otro grupo de genes celulares estudiados corresponde a aquellos relacionados a la producción de citoquinas y señalización celular, ya que intervienen en la defensa anti-viral. Se analizó los niveles de estos transcriptos celulares en presencia de PG e infección. Un aumento de expresión de IL-6 fue detectado, así como una reducción en los niveles de IRAK2 (Figura 10). Estos datos, sumados con los obtenidos previamente en ausencia de la infección, indican una sinergia en la producción de ARNm de IL-6 por parte de PG en presencia de HSV-1, lo cual también aplicaría para la reducción de IRAK2.

Con respecto a IL-6, se ha reportado que los niveles de esta citoquina se elevan durante la infección por HSV-1 (162), reportándose que la UL24 causa su

disminución por el bloqueo selectivo de NF κ B (163). Además, ratones *knock-out* para IL-6 poseen una mayor susceptibilidad a la infección frente al virus (164) y se ha visto que la utilización de anticuerpos bloqueantes para la citoquina induce la reactivación del virus a partir de su latencia *in vivo* (165). Se ha reportado el aumento de expresión de ARNm y proteínas de IL-6 como dependiente de la síntesis de proteínas virales (162,166). Por lo anteriormente expuesto, un aumento en los niveles de IL-6 mediado por PG podría afectar el ciclo viral.

En este estudio se observó disminución del ARNm de IRAK2 en presencia de PG. IRAK2, corresponde a una quinasa que participa en la vía de la activación de NF κ B (167,168), posterior al reconocimiento por TLR2 y TLR9 de glicoproteínas virales o genoma viral, respectivamente (169–171). Sin embargo, cabe señalar que lo evaluado fueron niveles de ARNm, no así niveles de proteína de IRAK2, ni otros puntos en las vías de señalización tales como la producción de proteínas, migración NF κ B al núcleo, entre otros. Se ha visto que la transcripción de IRAK2 es regulado en células humanas por unión del factor de transcripción CTCF, o factor de unión a CCCTF al promotor (172). Esto podría indicar algún efecto de PG sobre dicho factor, causando la disminución en los niveles de transcripción observados.

Como perspectivas de este trabajo se encuentra la determinación de los compuestos o la combinación de los mismos, encargados de generar los efectos observados y la determinación de las etapas del ciclo infectivo que se correlacionan con la actividad antiviral. Así mismo, se plantea la realización de los ensayos en otros tipos celulares, como aquellos que derivan del linaje inmune para el estudio a profundidad de los aspectos relacionados a la respuesta inmune innata celular y a la interacción con PG. Es de notar, que el modelo utilizado se encuentra limitado en ese aspecto por carecer de genes del clúster de interferón tipo I (IFN), una familia de citoquinas altamente relevante para la respuesta antiviral. Otra proyección corresponde a la evaluación de la actividad antiviral en modelos animales, lo cual permitiría el estudio de diferentes escenarios de infección como son las infecciones oculares, cutáneas y sistémicas, permitiendo así diferentes enfoques para el tratamiento con PG o sus compuestos.

En conjunto los resultados de este estudio muestran que PG presenta el mejor SI entre los AE estudiados. Los resultados obtenidos sobre los mecanismos de acción

antiviral se resumen en la Figura 11, mostrando tres diferentes puntos identificados: la disminución en la replicación del genoma viral, la disminución de la expresión de la proteína gD, y finalmente a nivel de regulación en la señalización celular y defensa antiviral el aumento de IL-6.

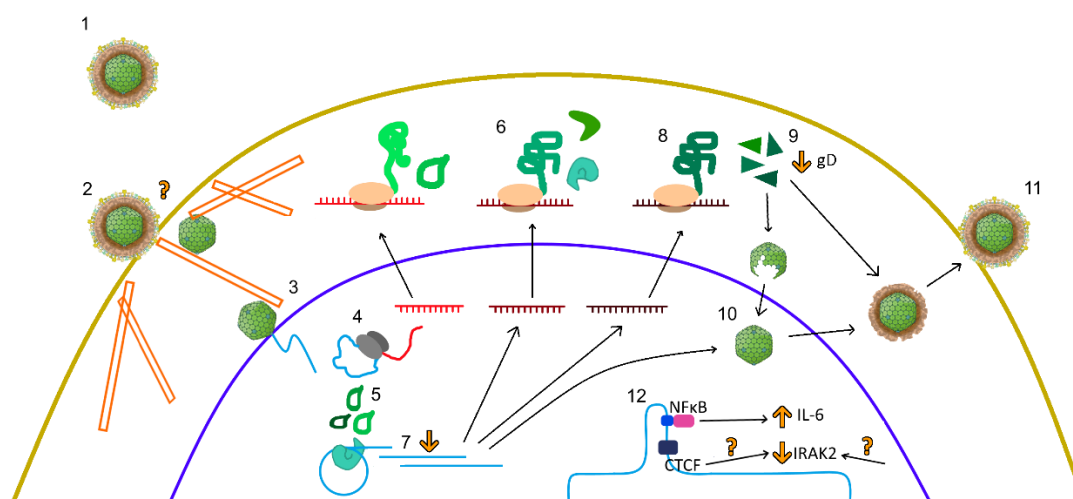


Figura 11. Mecanismos de actividad antiviral del PG frente a la infección por HSV-1. La figura muestra el ciclo viral y los puntos posibles de acción del AE de PG. (1) Virión libre, no hay actividad virucídica por el AE. (2) Unión y entrada del virión. (3) Entrada? del genoma viral al núcleo celular. (4) Circularización del genoma viral y transcripción de los genes IE. (5) y (6) Proteínas IE inducen la transcripción de ARNm de genes E. (7) Genes E inducen la replicación del genoma viral, uno de los puntos por los que actuaría PG. (8) La replicación viral y la presencia de genes E induce primero la transcripción y luego la traducción de genes L. (9) Entre la traducción de proteínas L se encuentra gD, siendo la traducción de ésta el segundo punto de acción de PG. (10) Maduración de las cápsides a través del núcleo, hasta el ensamblaje de los nuevos viriones en el citoplasma. (11) Egreso de las nuevas partículas virales. (12) Durante la infección, receptores de la inmunidad innata de la célula reconocen elementos virales y activan la cascada de señalización con activación del factor de transcripción NFκB. Este es el tercer punto donde actuaría PG, sobre la regulación de la vía de señalización, medida como aumento de expresión de IL-6, y la regulación por el factor CTCF, medido como disminución en la expresión IRAK2. Imagen de diseño propio. La imagen del virus fue extraída del Swiss Institute of Bioinformatics.

6. CONCLUSIÓN

Se identificó la citotoxicidad de AE producidos en el Paraguay, provenientes de las especies nativas *Gonopterodendron sarmientoi* (CC50 de 115,1 µg/mL), *Myrocarpus frondosus* (CC50 de 89 µg/mL) y *Citrus aurantium* L. var. *amara* (CC50 de 146 µg/mL).

Se identificó la actividad antiviral de AE producidos en el Paraguay, provenientes de las especies nativas *Gonopterodendron sarmientoi* (EC50 de 56,6 µg/mL y un SI de 2,03), *Myrocarpus frondosus* (EC50 de 25,9 µg/mL y un SI de 3,44) y *Citrus aurantium* L. var. *amara* (EC50 de 7,95 µg/mL y un SI de 18,36).

Mediante el ensayo de tiempo de infección se identificaron dos posibles mecanismos por los cuales *Gonopterodendron sarmientoi* y *Citrus aurantium* L. var. *amara* ejercen su actividad antiviral, afectando a nivel celular previo a la infección y a nivel post-entrada del virus.

En el caso de *Citrus aurantium* L. var. *amara* se determinó al menos tres posibles mecanismos de actividad antiviral: inhibición de la replicación del genoma viral, disminución de la expresión de proteína gD y aumento de la expresión de la citoquina IL-6 en presencia de la infección.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Looker KJ, Magaret AS, May MT, Turner KME, Vickerman P, Gottlieb SL, et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. DeLuca NA, editor. PLoS One. 2015;10(10):e0140765.
2. International Committee on Taxonomy of Viruses. Herpesviridae [Internet]. 2019 [citado 5 de abril de 2021]. Disponible en: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae
3. Roizman B, Knipe D, Whitley R. Herpes simplex viruses. En: Fields' virology. 6.^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1823-97.
4. Baringer JR, Swoveland P. Recovery of herpes-simplex virus from human trigeminal ganglions. Plast Reconstr Surg. 1973;52(3):321-2.
5. Cook ML, Stevens JG. Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence for intra-axonal transport of infection. Infect Immun. 1973;7(2):272-88.
6. Racaniello VR, Skalka AM, Flint J, Rall GF. Herpesviruses. En: Principles of Virology. 4.^a ed. Washington: American Society of Microbiology; 2015. p. 514-5.
7. Herold BC, Visalli RJ, Susmarski N, Brandt CR, Spear PG. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. J Gen Virol. 1994;75(6):1211-22.
8. Ligas MW, Johnson DC. A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by beta-galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. J Virol. 1988;62(5):1486-94.
9. Fuller AO, Spear PG. Anti-glycoprotein D antibodies that permit adsorption but block infection by herpes simplex virus 1 prevent virion-cell fusion at the cell surface. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(15):5454-8.

10. Page HG, Read GS. The virion host shutoff endonuclease (UL41) of herpes simplex virus interacts with the cellular cap-binding complex eIF4F. *J Virol.* 2010;84(13):6886-90.
11. Jovasevic V, Liang L, Roizman B. Proteolytic cleavage of VP1-2 Is required for release of Herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. *J Virol.* 2008;82(7):3311-9.
12. Zheng K, Xiang Y, Wang X, Wang Q, Zhong M, Wang S, et al. Epidermal growth factor receptor-PI3K signaling controls cofilin activity to facilitate herpes simplex virus 1 entry into neuronal cells. *Coyne C, Nemerow G, editores. MBio.* 2014;5(1):1-15.
13. Johnson KM, Mahajan SS, Wilson AC. Herpes simplex virus transactivator VP16 discriminates between HCF-1 and a novel family member, HCF-2. *J Virol.* 1999;73(5):3930-40.
14. Shen Y, Ye Z, Zhao X, Feng Z, Chen J, Yang L, et al. HCFC1R1 deficiency blocks herpes simplex virus-1 infection by inhibiting nuclear translocation of HCFC1 and VP16. *bioRxiv.* 2020;(0086):1-26.
15. Wilson AC, Mohr I. A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. *Trends Microbiol.* 2012;20(12):604-11.
16. Baines JD. Herpes simplex virus capsid assembly and DNA packaging: A present and future antiviral drug target. *Trends Microbiol.* 2011;19(12):606-13.
17. Shimizu F, Monma Y, Sekizawa T, Kamiyama K. Establishment of latent ganglionic infection with herpes simplex virus via maxillary gingiva and viral re-activation in vivo after trauma. *J Dent Res.* 1989;68(3):472-5.
18. Perna JJ, Mannix ML, Rooney JF, Notkins AL, Straus SE. Reactivation of latent herpes simplex virus infection by ultraviolet light: A human model. *J Am Acad Dermatol.* 1987;17(3):473-8.
19. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Speicher CE, Holliday JE. Stress, loneliness, and changes in herpesvirus latency. *J Behav Med.* 1985;8(3):249-60.
20. Padgett DA, Sheridan JF, Dorne J, Berntson GG, Candelora J, Glaser R.

- Social stress and the reactivation of latent herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95(12):7231-5.
21. Beyer CF, Hill JM, Reidy JJ, Beuerman RW. Corneal nerve disruption reactivates virus in rabbits latently infected with HSV-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31(5):925-32.
 22. Price RW, Schmitz J. Reactivation of latent herpes simplex virus infection of the autonomic nervous system by postganglionic neurectomy. *Infect Immun.* 1978;19(2):523-32.
 23. Beyer CF, Arens MQ, Hill JM, Rose BT, Hill GA, Lin DTC. Penetrating keratoplasty in rabbits induces latent HSV-1 reactivation when corticosteroids are used. *Curr Eye Res.* 1989;8(12):1323-9.
 24. Fawl RL, Roizman B. Induction of reactivation of herpes simplex virus in murine sensory ganglia in vivo by cadmium. *J Virol.* 1993;67(12):7025-31.
 25. Kameyama T, Futami M, Nakayoshi N, Sujaku C, Yamamoto S. Shedding of herpes simplex virus type 1 into saliva in patients with orofacial fracture. *J Med Virol.* 1989;28(2):78-80.
 26. Birkmann A, Zimmermann H. HSV antivirals – current and future treatment options. *Curr Opin Virol.* 2016;18:9-13.
 27. Coen D, Richman D. Antiviral agents. En: *Fields' virology*. 6.^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 338-73.
 28. Food and Drug Administration. Drug approval package [Internet]. 2000 [citado 28 de marzo de 2019]. Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2000/20-941_Abreva.cfm
 29. O'Brien JJ, Campoli-Richards DM. Acyclovir. *Drugs.* 1989;37(3):233-309.
 30. Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, Miranda P d., Beauchamp L, Schaeffer HJ. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proc Natl Acad Sci.* 1977;74(12):5716-20.
 31. Elion GB. Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am J Med.* 1982;73(1):7-13.

32. Weller S, Blum MR, Doucette M, Burnette T, Cederberg DM, de Miranda P, et al. Pharmacokinetics of the acyclovir pro-drug valaciclovir after escalating single-and multiple-dose administration to normal volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 1993;54(6):595-605.
33. Soul-Lawton J, Seaber E, On N, Wootton R, Rolan P, Posner J. Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(12):2759-64.
34. Sawyer MH, Webb DE, Balow JE, Straus SE. Acyclovir-induced renal failure. *Am J Med.* 1988;84(6):1067-71.
35. Burnette TC, Harrington JA, Reardon JE, Merrill BM, de Miranda P. Purification and characterization of a rat liver enzyme that hydrolyzes valaciclovir, the L-valyl ester prodrug of acyclovir. *J Biol Chem.* 1995;270(26):15827-31.
36. Perry CM, Faulds D. Valaciclovir. *Drugs.* 1996;52(5):754-72.
37. Cheng YC, Grill SP, Dutschman GE, Nakayama K, Bastow KF. Metabolism of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine, a new anti-herpes virus compound, in herpes simplex virus-infected cells. *J Biol Chem.* 1983;258(20):12460-4.
38. Food and Drug Administration. Drug approval package [Internet]. 2009 [citado 20 de marzo de 2021]. Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2009/022211_zirgan_toc.cfm
39. De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol.* 2004;30(2):115-33.
40. Holland GN, Sidikaro Y, Kreiger AE, Hardy D, Sakamoto MJ, Frenkel LM, et al. Treatment of cytomegalovirus retinopathy with ganciclovir. *Ophthalmology.* 1987;94(7):815-23.
41. Bracken M, Shephard MJ, Collins W, Holford T. Central nervous system side effects of ganciclovir. *N Engl J Med.* 1990;322(13):933-4.

42. Walmsley SL, Chew E, Read SE, Vellend H, Salit I, Rachlis A, et al. Treatment of cytomegalovirus retinitis with trisodium phosphonoformate hexahydrate (Foscarnet). *J Infect Dis.* 1988;157(3):569-72.
43. Aoki FY. Antivirals against herpes viruses. En: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Eighth Edi. Elsevier; 2015. p. 546-562.e7.
44. Eckstein JW, Foster PG, Finer-Moore J, Wataya Y, Santi D V. Mechanism-based inhibition of thymidylate synthase by 5-(trifluoromethyl)-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate. *Biochemistry.* 1994;33(50):15086-94.
45. Matsuoka K, Iimori M, Niimi S, Tsukihara H, Watanabe S, Kiyonari S, et al. Trifluridine induces p53-dependent sustained G 2 phase arrest with its massive misincorporation into DNA and few DNA strand breaks. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(4):1004-13.
46. Burness CB, Duggan ST. Trifluridine/Tipiracil: A review in metastatic colorectal cancer. *Drugs.* 2016;76(14):1393-402.
47. Crumpacker CS. Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *Am J Med.* 1992;92(2):S3-7.
48. Salvaggio MR, Gnann JW. Drugs for Herpesvirus infections. En: Infectious Diseases. Fourth Edi. Elsevier; 2017. p. 1309-1317.e1.
49. Engel JP. Treatment of resistant herpes simplex virus with continuous-infusion acyclovir. *JAMA J Am Med Assoc.* 1990;263(12):1662.
50. De Clercq E, Li G. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):695-747.
51. Canestri A, Ghosn J, Wirden M, Marguet F, Ktorza N, Boubezari I, et al. Foscarnet salvage therapy for patients with late-stage HIV disease and multiple drug resistance. *Antivir Ther.* 2006;11(5):561-6.
52. Lehoang P, Girard B, Robinet M, Marcel P, Zazoun L, Matheron S, et al. Foscarnet in the treatment of cytomegalovirus retinitis in acquired immune deficiency syndrome. *Ophthalmology.* 1989;96(6):865-74.
53. Gérard L, Salmon-Céron D. Pharmacology and clinical use of foscarnet. *Int J*

- Antimicrob Agents. 1995;5(4):209-17.
54. Katz DH, Marcelletti JF, Khalil MH, Pope LE, Katz LR. Antiviral activity of 1-docosanol, an inhibitor of lipid-enveloped viruses including herpes simplex. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88(23):10825-9.
 55. Pope LE, Marcelletti JF, Katz LR, Lin JY, Katz DH, Parish ML, et al. The anti-herpes simplex virus activity of n-docosanol includes inhibition of the viral entry process. *Antiviral Res.* 1998;40(1-2):85-94.
 56. Sacks SL, Thisted RA, Jones TM, Barbarash RA, Mikolich DJ, Ruoff GE, et al. Clinical efficacy of topical docosanol 10% cream for herpes simplex labialis: A multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45(2):222-30.
 57. Sibrack CD, Gutman LT, Wilfert CM, McLaren C, St. Clair MH, Keller PM, et al. Pathogenicity of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 from an immunodeficient child. *J Infect Dis.* 1982;146(5):673-82.
 58. Burns WH, Santos GW, Saral R, Laskin OL, Lietman PS, McLaren C, et al. Isolation and characterisation of resistant Herpes simplex virus after acyclovir therapy. *Lancet.* 1982;319(8269):421-3.
 59. Frobert E, Burrel S, Ducastelle-Lepretre S, Billaud G, Ader F, Casalegno J-S, et al. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: An update from a ten-year survey in France. *Antiviral Res.* 2014;111:36-41.
 60. Erlich KS, Mills J, Chatiss P, Mertz GJ, Busch DF, Follansbee SE, et al. Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 1989;320(5):293-6.
 61. Cheng YC, Huang ES, Lin JC, Mar EC, Pagano JS, Dutschman GE, et al. Unique spectrum of activity of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]-guanine against herpesviruses in vitro and its mode of action against herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci.* 1983;80(9):2767-70.
 62. Ljungman P, Ellis MN, Hackman RC, Shepp DH, Meyers JD. Acyclovir-resistant herpes simplex virus causing pneumonia after marrow transplantation. *J Infect Dis.* 1990;162(1):244-8.

63. De Clercq E, Li G. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):695-747.
64. Chatis PA, Miller CH, Schrager LE, Crumacker CS. Successful treatment with foscarnet of an acyclovir-resistant mucocutaneous infection with herpes simplex virus in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 1989;320(5):297-300.
65. Safrin S, Kemmerly S, Plotkin B, Smith T, Weissbach N, De Veranez D, et al. Foscarnet-resistant herpes simplex virus infection in patients with AIDS. *J Infect Dis.* 1994;169(1):193-6.
66. Venard V, Dauendorffer J., Carret A., Corsaro D, Edert D, Bordigoni P, et al. Infection due to aciclovir resistant herpes simplex virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pathol Biol.* 2001;49(7):553-8.
67. Sauerbrei A, Deinhardt S, Zell R, Wutzler P. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus. *Antiviral Res.* 2010;86(3):246-52.
68. Tatarowicz WA, Lurain NS, Thompson KD. A ganciclovir-resistant clinical isolate of human cytomegalovirus exhibiting cross-resistance to other DNA polymerase inhibitors. *J Infect Dis.* 1992;166(4):904-7.
69. Graven EH, Dean SG, Svoboda KP, Mavi S, Gundidza MG. Antimicrobial and antioxidative properties of the volatile (essential) oil of *Artemisia afra* Jacq. *Flavour Fragr J.* 1992;7(3):121-3.
70. Al-Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J Ethnopharmacol.* 2008;116(3):403-6.
71. Carvalho JCT, Vignoli VV, de Souza GHB, Ujikawa K, Neto JJ. Antimicrobial activity of essential oils from plants used in Brazilian popular medicine. *Acta Hort.* 1999;(501):77-82.
72. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phyther Res.* 2000;14(5):323-8.

73. Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem.* 2005;90(3):333-40.
74. Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem.* 2006;54(5):1822-8.
75. Pessini GL, Dias Filho BP, Nakamura CV, Cortez DAG. Antifungal activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. *J Braz Chem Soc.* 2005;16(6a):1130-3.
76. Daouk RK, Dagher SM, Sattout EJ. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *J Food Prot.* 1995;58(10):1147-9.
77. Tzortzakis NG, Economakis CD. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2007;8(2):253-8.
78. Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol.* 2009;58(11):1454-62.
79. Pessini GL, Dias Filho BP, Nakamura CV, Cortez DAG. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(8):1115-20.
80. Kim J, Marshall MR, Wei C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J Agric Food Chem.* 1995;43(11):2839-45.
81. Chang S-T, Chen P-F, Chang S-C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J Ethnopharmacol.* 2001;77(1):123-7.
82. Juteau F, Masotti V, Bessière JM, Dherbomez M, Viano J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia.* 2002;73(6):532-5.

83. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot.* 2002;65(10):1545-60.
84. Pilau MR, Alves SH, Weiblen R, Arenhart S, Cueto AP, Lovato LT. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Brazilian J Microbiol.* 2011;42(4):1616-24.
85. Sivropoulou A, Nikolaou C, Papanikolaou E, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J Agric Food Chem.* 1997;45(8):3197-201.
86. Bishop CD. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden amp; Betcher) Cheele (Tea Tree) against tobacco mosaic virus. *J Essent Oil Res.* 1995;7(6):641-4.
87. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res.* 2000;49(11):619-26.
88. Souza MC, Siani AC, Ramos MFSS, Menezes-de-Lima OJ, Henriques MGMOMO. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. *Pharmazie.* 2003;58(8):582-6.
89. Serafino A, Vallebona P, Andreola F, Zonfrillo M, Mercuri L, Federici M, et al. Stimulatory effect of Eucalyptus essential oil on innate cell-mediated immune response. *BMC Immunol.* 2008;9(1):17.
90. Yousofi A, Daneshmandi S, Soleimani N, Bagheri K, Karimi MH. Immunomodulatory effect of Parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil on immune cells: Mitogen-activated splenocytes and peritoneal macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2012;34(2):303-8.
91. Gilling DH, Kitajima M, Torrey JR, Bright KR. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component

- carvacrol against murine norovirus. *J Appl Microbiol.* 2014;116(5):1149-63.
92. Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2011;2011:1-8.
 93. Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod.* 2014;62:250-64.
 94. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phyther Res.* 2007;21(4):308-23.
 95. Kristmundsdóttir T, Skúlason S. Lipids as active ingredients in pharmaceuticals, cosmetics and health foods. En: *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2010. p. 151-77.
 96. Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phyther Res.* 2010;24(5):673-9.
 97. Koch C, Reichling J, Kehm R, Sharaf MM, Zentgraf H, Schnee J, et al. Efficacy of anise oil, dwarf-pine oil and chamomile oil against thymidine-kinase-positive and thymidine-kinase-negative herpesviruses. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(11):1545-50.
 98. Duschatzky CB, Possetto ML, Talarico LB, García CC, Michis F, Almeida N V., et al. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antivir Chem Chemother.* 2005;16(4):247-51.
 99. Schuhmacher A, Reichling J, Schnitzler P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine.* 2003;10(6-7):504-10.
 100. Armaka M, Papanikolaou E, Sivropoulou A, Arsenakis M. Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res.* 1999;43(2):79-92.
 101. Schnitzler P, Koch C, Reichling J. Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop,

- and sandalwood. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(5):1859-62.
102. Bertol JW, Santos PR, Rodrigues J, Cortez DAG, D. Filho BP, Nakamura C V., et al. Antiviral activity of fractions from leaves of *Piper regnelli* var. *pallescens*. *Rev Bras Farmacogn.* 2012;22(6):1276-81.
 103. Saad NY, Muller CD, Lobstein A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Fragr J.* 2013;28(5):269-79.
 104. Hayashi K, Hayashi T, Ujita K, Takaishi Y. Characterization of antiviral activity of a sesquiterpene, triptofordin C-2. *J Antimicrob Chemother.* 1996;37(4):759-68.
 105. Tragoolpua Y, Jatisatienr A. Anti-herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison and essential oil, eugenol. *Phyther Res.* 2007;21(12):1153-8.
 106. Benencia F, Courrèges MC. In vitro and in vivo activity of eugenol on human herpesvirus. *Phyther Res.* 2000;14(7):495-500.
 107. Alikhani-Koupaei M. Liposome-entrapped essential oils on in vitro and in vivo antioxidant activity in leafy vegetables. *Qual Assur Saf Crop Foods.* 2015;7(3):369-73.
 108. Frabboni L, Tarantino A, Petruzzi F, Disciglio G. Bio-herbicidal effects of oregano and rosemary essential oils on chamomile (*matricaria chamomilla* l.) crop in organic farming system. *Agronomy.* 2019;9(9).
 109. Harris B. Phytotherapeutic uses of essential oils. En: Baser KHC, Buchbauer G, editores. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, Second Edition. CRC Press; 2015. p. 319-20.
 110. Saporito F, Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Boselli C, Cornaglia AI, et al. Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:175-86.
 111. AlMotwaa SM, Alkhatib MH, Alkreathy HM. Nanoemulsion-based camphor oil carrying ifosfamide: Preparation, characterization, and in-vitro evaluation in cancer cells. *Int J Pharm Sci Res.* 2019;10(4):2018-26.

112. Fretes F, Martínez M, USAID. Aceites esenciales, análisis de la cadena de valor. Agencia del Gobierno de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID/Paraguay). 2011.
113. Huella aromática. ABC Color. 2015;
114. Surburg H, Panten J. Natural raw materials in the flavor and fragrance industry. En: Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. 5.^a ed. Weinheim, FRG: Wiley; 2006. p. 177-238.
115. Guenther E. The production of essential oils. En: The Essential Oils. Lancaster, PA; 1949. p. 175-6.
116. Reactivan producción de petit grain en Cordillera. ABC Color. 2019;
117. Office of the Federal Register. Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates) [Internet]. Electronic Code of Federal Regulations. 2021 [citado 14 de marzo de 2021]. Disponible en: https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=c30bebf00513bec69d09e3b37b9fc17f&mc=true&node=se21.3.182_120&rgn=div8
118. Godoy-Bürki AC, Acosta JM, Aagesen L. Phylogenetic relationships within the New World subfamily Larreoideae (Zygophyllaceae) confirm polyphyly of the disjunct genus *Bulnesia*. Syst Biodivers. 2018;16(5):453-68.
119. Barstow M. *Bulnesia sarmientoi* [Internet]. The IUCN Red List of Threatened Species 2018. 2018 [citado 16 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.iucnredlist.org/species/32028/68085692#taxonomy>
120. Office of the Federal Register. Natural flavoring substances and natural substances used in conjunction with flavors [Internet]. Electronic Code of Federal Regulations. 2021 [citado 14 de marzo de 2021]. Disponible en: https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=a6449b528e0544c85cfce2dd0119234b&mc=true&node=se21.3.172_1510&rgn=div8
121. Prado D. *Myrocarpus frondosus* [Internet]. The IUCN Red List of Threatened Species 1998. 1998 [citado 16 de marzo de 2021]. Disponible en:

<https://www.iucnredlist.org/species/34631/9880082>

122. Arctander S. Monographs on crude and processed raw materials of natural origin. En: Perfume and Flavor Materials of Natural Origin. 1960. p. 84.
123. Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz-Junior M, Tien OS, Kakinami SH, et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*. 2002;73(1):69-91.
124. European Chemicals Agency. *Myrocarpus frondosus*, ext. [Internet]. Registration Dossier. [citado 16 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/27681/11/?documentUUID=d1eee35d-68c5-4a70-bba6-c372d24d6c9c>
125. Gabaglio S, Alvarenga N, Cantero-González G, Degen R, Ferro EA, Langjahr P, et al. A quantitative PCR assay for antiviral activity screening of medicinal plants against Herpes simplex 1. *Nat Prod Res*. 2019;0(0):1-5.
126. Scacco S, Petruzzella V, Budde S, Vergari R, Tamborra R, Panelli D, et al. Pathological mutations of the human NDUFS4 gene of the 18-kDa (AQDQ) subunit of complex I affect the expression of the protein and the assembly and function of the complex. *J Biol Chem*. 2003;278(45):44161-7.
127. Mott KR, Underhill D, Wechsler SL, Town T, Ghiasi H. A role for the JAK-STAT1 pathway in blocking replication of HSV-1 in dendritic cells and macrophages. *Virol J*. 2009;6(1):56.
128. Cook WJ, Kramer MF, Walker RM, Burwell TJ, Holman HA, Coen DM, et al. Persistent expression of chemokine and chemokine receptor RNAs at primary and latent sites of herpes simplex virus 1 infection. *Virol J*. 2004;1:5.
129. Trigg B, Lauer K, Fernandes dos Santos P, Coleman H, Balmus G, Mansur D, et al. The non-homologous end joining protein PAXX acts to restrict HSV-1 infection. *Viruses*. 2017;9(11):342.
130. Garvey CE, McGowin CL, Foster TP. Development and evaluation of SYBR Green-I based quantitative PCR assays for herpes simplex virus type 1 whole transcriptome analysis. *J Virol Methods*. 2014;201:101-11.
131. McNally BA, Trgovcich J, Maul GG, Liu Y, Zheng P. A role for cytoplasmic

- PML in cellular resistance to viral infection. You M, editor. PLoS One. 2008;3(5):e2277.
132. Wolf K, Schulz C, Riegger GAJ, Pfeifer M. Tumour necrosis factor- α induced CD70 and interleukin-7R mRNA expression in BEAS-2B cells. *Eur Respir J*. 2002;20(2):369-75.
 133. Zhu J, Zou Z, Nie P, Kou X, Wu B, Wang S, et al. Downregulation of microRNA-27b-3p enhances tamoxifen resistance in breast cancer by increasing NR5A2 and CREB1 expression. *Cell Death Dis*. 2016;7(11):e2454-e2454.
 134. Johnson BA, Aloor HL, Moody CA. The Rb binding domain of HPV31 E7 is required to maintain high levels of DNA repair factors in infected cells. *Virology*. 2017;500(1):22-34.
 135. Zou W, Ma X, Hua W, Chen B, Huang Y, Wang D, et al. BRIP1 inhibits the tumorigenic properties of cervical cancer by regulating RhoA GTPase activity. *Oncol Lett*. 2016;11(1):551-8.
 136. Hu Q, Xie Y, Ge Y, Nie X, Tao J, Zhao Y. Resting T cells are hypersensitive to DNA damage due to defective DNA repair pathway. *Cell Death Dis*. 2018;9(6):662.
 137. Trevor A, Katzung B, Kruidering-Hall M. Pharmacodynamics. En: *Pharmacology Examination & Board Review*. 11.^a ed. McGraw Hill Education; 2015. p. 16-25.
 138. Wang H-L, Chang J-C, Fang L-W, Hsu H-F, Lee L-C, Yang J-F, et al. *Bulnesia sarmientoi* supercritical fluid extract exhibits necroptotic effects and anti-metastatic activity on lung cancer cells. *Molecules*. 2018;23(12):3304.
 139. Yang Q, Wu J, Luo Y, Huang N, Zhen N, Zhou Y, et al. (-)-Guaicol regulates RAD51 stability via autophagy to induce cell apoptosis in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(38):62585-97.
 140. Ryabchenko B, Tulupova E, Schmidt E, Wlcek K, Buchbauer G, Jirovetz L. Investigation of anticancer and antiviral properties of selected aroma samples. *Nat Prod Commun*. 2008;3(7):1934578X0800300.

141. Kubo I, Morimitsu Y. Cytotoxicity of green tea flavor compounds against two solid tumor cells. *J Agric Food Chem*. 1995;43(6):1626-8.
142. Hanušová V, Caltová K, Svobodová H, Ambrož M, Skarka A, Murínová N, et al. The effects of β -caryophyllene oxide and trans-nerolidol on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice. *Biomed Pharmacother*. 2017;95(September):828-36.
143. Wang Y-L, Liu H-F, Shi X-J, Wang Y. Antiproliferative activity of farnesol in HeLa cervical cancer cells is mediated via apoptosis induction, loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and PI3K/Akt signalling pathway. *J BUON*. 2018;23(3):752-7.
144. Wiseman DA, Werner SR, Crowell PL. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol Is mediated by p21 Cip1 and p27 Kip1 in human pancreatic adenocarcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320(3):1163-70.
145. Burke YD, Stark MJ, Roach SL, Sen SE, Crowell PL. Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids*. 1997;32(2):151-6.
146. Powers CN, Osier JL, McFeeters RL, Brazell CB, Olsen EL, Moriarity DM, et al. Antifungal and cytotoxic activities of sixty commercially-available essential oils. *Molecules*. 2018;23(7).
147. Erdoğan Orhan I, Özçelik B, Kartal M, Kan Y. Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. *Turkish J Biol*. 2012;36(3):239-46.
148. Moon PD, Han NR, Lee JS, Kim HM, Jeong HJ. Effects of linalyl acetate on thymic stromal lymphopoietin production in mast cells. *Molecules*. 2018;23(7):1-12.
149. Chiang L-C, Ng L-T, Cheng P-W, Chiang W, Lin C-C. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(10):811-6.
150. Bag P, Chattopadhyay D, Mukherjee H, Ojha D, Mandal N, Sarkar M, et al.

Anti-herpes virus activities of bioactive fraction and isolated pure constituent of *Mallotus peltatus*: an ethnomedicine from Andaman Islands. *Virol J.* 2012;9(1):98.

151. Lucero BDA, Gomes CRB, Frugulhetti ICDPP, Faro L V., Alvarenga L, de Souza MCBV, et al. Synthesis and anti-HSV-1 activity of quinolonic acyclovir analogues. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006;16(4):1010-3.
152. Cagno V, Sgorbini B, Sanna C, Cagliero C, Ballero M, Civra A, et al. In vitro anti-herpes simplex virus-2 activity of *Salvia desoleana* Atzei & V. Picci essential oil. Schang LM, editor. *PLoS One.* 2017;12(2):e0172322.
153. Garozzo A, Timpanaro R, Bisignano B, Furneri PM, Bisignano G, Castro A. In vitro antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Lett Appl Microbiol.* 2009;49(6):806-8.
154. Astani A, Schnitzler P. Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro. *Iran J Microbiol.* 2014;6(3):149-55.
155. Hafidh RR, Abdulamir AS, Abu Bakar F, Sekawi Z, Jahansheri F, Jalilian FA. Novel antiviral activity of mung bean sprouts against respiratory syncytial virus and herpes simplex virus –1: an in vitro study on virally infected Vero and MRC-5 cell lines. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15(1):179.
156. García CC, Talarico L, Almeida N, Colombres S, Duschatzky C, Damonte EB. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phyther Res.* 2003;17(9):1073-5.
157. Karttunen H, Savas JN, McKinney C, Chen Y-H, Yates JR, Hukkanen V, et al. Co-opting the Fanconi anemia genomic stability pathway enables Herpesvirus DNA synthesis and productive growth. *Mol Cell.* 2014;55(1):111-22.
158. Hussain S. Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Hum Mol Genet.* 2004;13(12):1241-8.
159. Tang K-W, Norberg P, Holmudden M, Elias P, Liljeqvist J-Å. Rad51 and Rad52 are involved in homologous recombination of replicating herpes

- simplex virus DNA. BenMohamed L, editor. PLoS One. 2014;9(11):e111584.
160. Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell*. 2001;105(1):149-60.
 161. Peng M, Litman R, Jin Z, Fong G, Cantor SB. BACH1 is a DNA repair protein supporting BRCA1 damage response. *Oncogene*. 2006;25(15):2245-53.
 162. Paludan SR. Requirements for the induction of interleukin-6 by herpes simplex virus-infected leukocytes. *J Virol*. 2001;75(17):8008-15.
 163. Xu H, Su C, Pearson A, Mody CH, Zheng C. Herpes simplex virus 1 UL24 abrogates the DNA sensing signal pathway by inhibiting NF- κ B activation. Sandri-Goldin RM, editor. *J Virol*. 2017;91(7):1-10.
 164. LeBlanc RA, Pesnicak L, Cabral ES, Godleski M, Straus SE. Lack of interleukin-6 (IL-6) enhances susceptibility to infection but does not alter latency or reactivation of herpes simplex virus type 1 in IL-6 knockout mice. *J Virol*. 1999;73(10):8145-51.
 165. Kriesel JD, Gebhardt BM, Hill JM, Maulden SA, Hwang IP, Clinch TE, et al. Anti-interleukin-6 antibodies inhibit herpes simplex virus reactivation. *J Infect Dis*. 1997;175(4):821-7.
 166. Mogensen TH, Melchjorsen J, Malmgaard L, Casola A, Paludan SR. Suppression of proinflammatory cytokine expression by herpes simplex virus Type 1. *J Virol*. 2004;78(11):5883-90.
 167. Lin S-C, Lo Y-C, Wu H. Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. 2010;465(7300):885-90.
 168. Keating SE, Maloney GM, Moran EM, Bowie AG. IRAK-2 participates in multiple toll-like receptor signaling pathways to NF κ B via activation of TRAF6 ubiquitination. *J Biol Chem*. 2007;282(46):33435-43.
 169. Sauter MM, Gauger JJL, Brandt CR. Oligonucleotides designed to inhibit TLR9 block Herpes simplex virus type 1 infection at multiple steps. *Antiviral Res*. 2014;109(608):83-96.

170. Lima GK, Zolini GP, Mansur DS, Freire Lima BH, Wischhoff U, Astigarraga RG, et al. Toll-Like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection. *Am J Pathol.* 2010;177(5):2433-45.
171. Leoni V, Gianni T, Salvioli S, Campadelli-Fiume G. Herpes simplex virus glycoproteins gH/gL and gB bind Toll-like receptor 2, and soluble gH/gL is sufficient to activate NF-kB. *J Virol.* 2012;86(12):6555-62.
172. Kuzmin I, Geil L, Gibson L, Cavinato T, Loukinov D, Lobanenko V, et al. Transcriptional regulator CTCF controls human interleukin 1 receptor-associated kinase 2 promoter. *J Mol Biol.* 2005;346(2):411-22.

8. ANEXOS

Anexo 1. Composición de los aceites esenciales utilizados.

Aceite esencial	Componente	Porcentaje (%)
BS	α -guaieno	1,33
	Guaiol	29,31
	Bulnesol	44,13
Cabreuva	t-nerolidol	69,06
	t,t-farnesol	0,86
PG	α -pineno	0,14
	β -pineno	1,2
	Sabineno	0,26
	Mirceno	2,22
	Limoneno	0,84
	(Z) β -ocimeno	0,85
	(E) β -ocimeno	2,55
	Terpinoleno	0,46
	Linalool	24,92
	Acetato de linalilo	49,12
	β -cariofileno	0,87
	α -terpineol +	
	Acetato de terpinilo	5,53
	Acetato de nerilo	2,19
	Acetato de geranilo	3,72
	Nerol	1,15
	Geraniol	2,83