

# rdf

## Revista de Fitoterapia



## Actividad de un extracto de equinácea purpúrea frente a los virus de la influenza H1N1, H5N1 y H7N7

Stephan Pleschka  
Michael Stein  
Roland Schoop  
James B Hudson

ÓRGANO OFICIAL

 **SEFIT**  
SOCIEDAD ESPAÑOLA  
DE FITOTERAPIA

 **Amefit**  
Asociación Mexicana de Fitoterapia

 **SOCHIFITO**  
Sociedad Chilena de Fitoterapia

 **SPFito**  
Sociedade Portuguesa de  
Fitotermia e Fitoterapia

 **ABRAFITO**  
Associação Brasileira  
de Fitoterapia (desde 1990)

IMPRESIÓN  
ESPECIAL PARA

**Bioforce España**

 **A.Vogel**

Enero 2010



FIGURA 1. Equinácea purpúrea. Foto: Salvador Cañigueral.

## Actividad de un extracto de equinácea purpúrea frente a los virus de la influenza H1N1, H5N1 y H7N7

Stephan Pleschka <sup>a,\*</sup>

Michael Stein <sup>a</sup>

Roland Schoop <sup>b</sup>

James B Hudson <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute for Medical Virology  
Justus-Liebig-University Giessen  
Frankfurterstrasse 107  
D-35392 Giessen, Germany  
stephan.pleschka@mikro.bio.uni-giessen.de

<sup>b</sup> Bioforce AG  
Grünaustrasse 4  
CH-9325 Roggwil, Switzerland

<sup>c</sup> Department of Pathology  
Laboratory Medicine  
University of British Columbia  
2733 Heather Street  
Vancouver V5Z 3J5, Canada

\* Autor para la correspondencia

### Resumen

Las infecciones producidas por los virus de la influenza (VI) representan un problema de grandes dimensiones epidemiológicas en todo el mundo. La terapia antiviral incluye vacunas y algunos medicamentos antivirales. Sin embargo no siempre se dispone de las vacunas adecuadas y los virus desarrollan resistencia a los inhibidores de la neuraminidasa como Tamiflu® (oseltamivir).

Se estudió la actividad antiviral de un extracto comercial estandarizado de *Echinacea purpurea* (Echinaforce®, EF), comprobándose su capacidad para inactivar, en cultivos celulares, los virus de la influenza tipo H1N1, H5N1 y H7N7, inhibiendo la capacidad de unión del virus al receptor y su entrada en la célula. A diferencia del Tamiflu®, no sólo las incubaciones sucesivas con EF no desarrollaron resistencias virales, sino que EF fue activo frente a los virus resistentes al oseltamivir. En conclusión, este preparado de equinácea puede constituir un complemento útil para el control de la replicación y difusión de los virus de la influenza.

### Palabras clave

Equinácea purpúrea, *Echinacea purpurea*, gripe, virus de la influenza tipo H1N1, H5N1 y H7N7.

## Actividade de um extracto de equinácea purpurea contra os vírus da gripe H1N1, H5N1 e H7N7

### Resumo

As Infecções causadas por vírus influenza (VI) representam um grande problema epidemiológico a nível mundial. A terapia utilizada inclui vacinas e alguns medicamentos antivirais. No entanto, nem sempre se dispõe de vacinas adequadas e os vírus desenvolvem resistências aos inibidores da neuraminidase, como o Tamiflu® (oseltamivir). Estudou-se a actividade antiviral do extracto comercial padronizado de *Echinacea purpurea* (Echinaforce®, EF), comprovando-se a sua capacidade de inactivar, em culturas de células, os vírus influenza H1N1, H5N1 e H7N7, inibindo a capacidade de união do vírus ao receptor e a sua entrada na célula. Ao contrário do Tamiflu®, não só as incubações sucessivas com EF não desenvolveram resistências virais, como também EF foi activo contra vírus resistentes ao oseltamivir. Em conclusão, esta preparação de equinácea pode ser um complemento útil para controlar a replicação e difusão do vírus da gripe.

### Palavras-chave

Equinácea purpurea, *Echinacea purpurea*, gripe, vírus da gripe dos tipos H1N1, H5N1 e H7N7.

### Introducción

Los virus de la influenza (VI) afectan a la población mundial y a su ganado, particularmente a las aves de corral y a los cerdos, como consecuencia de la evolución y desplazamiento antigénico que deriva con frecuencia y de manera impredecible en mutantes nuevos y cepas recombinantes, algunas de las cuales adquieren la habilidad de cruzar las barreras entre las especies y volverse patógenas en su nuevo huésped<sup>(1)</sup>.

Las perspectivas de aparición de cepas pandémicas de origen porcino y aviar se ha discutido en varias publicaciones recientes<sup>(2,3)</sup>. Una de las cepas aviares altamente patógenas (HPAIV), la H5N1, ha infectado ocasionalmente a los humanos representando una importante amenaza debido a su alta patogenicidad, con tasas de mortalidad que llegan a superar el 60% de los infectados<sup>(4,5)</sup>.

Se ha cuestionado la viabilidad y la eficacia de la vacunación oportuna<sup>(1,6,7)</sup> y el control potencial con antivirales de síntesis se ha frustrado generalmente por la aparición de cepas resistentes, situación que se ha documentado en el

## Activity of an extract of purple cornflower against the influenza virus H1N1, H5N1 and H7N7

### Abstract

Infections caused by influenza viruses represent a large epidemiological problem worldwide. Antiviral therapy includes vaccines and few antiviral drugs. However vaccines are not always available in time and viruses develop resistance to neuraminidase inhibitors such as Tamiflu® (oseltamivir).

We studied the antiviral activity of a commercial standardized extract of *Echinacea purpurea* (Echinaforce®, EF), that demonstrated its ability to inactivate, in cell culture, the influenza viruses H1N1, H5N1 and H7N7, inhibiting the virus binding capacity to the cell receptor and its entry into the cell. Unlike Tamiflu®, not only successive incubations with EF did not develop viral resistance, but EF was active against oseltamivir-resistant viruses. In conclusion, this preparation of echinacea could be a useful addition for the control of replication and spread of influenza virus.

### Key words

Purple cornflower, *Echinacea purpurea*, flu, influenza virus type H1N1, H5N1 and H7N7.

caso de los inhibidores del canal iónico M2, como los derivados de la amantadina, y los inhibidores de la neuraminidasa, como el oseltamivir y zanamivir<sup>(8,9)</sup>. La especificidad de las cepas virales es otra limitación del uso de estos inhibidores. Por ello se requieren urgentemente enfoques alternativos a la terapia que superen estos obstáculos. Estos incluyen la manipulación de determinadas vías de señalización que se sabe que intervienen en la replicación del virus.<sup>(10,11)</sup>

Tanto la cascada de transducción de la señal raf/MEK/ERK como la activación del factor de transcripción NF-κB han demostrado ser esenciales para la exportación nuclear eficiente de los complejos de la ribonucleoproteína (RNP) viral. Estos han demostrado ser objetivos interesantes, ya que su inhibición reduce significativamente la replicación viral sin la aparición de variantes resistentes *in vitro* e *in vivo*<sup>(12,15)</sup>.

Otra opción es el uso de extractos vegetales estandarizados con un amplio espectro de actividad anti VI *in vitro*<sup>(16,19)</sup>. Es concebible que estos puedan dar lugar a una

inhibición más generalizada de todas las cepas virales, inactivando directamente el virus o interfiriendo en una o más etapas esenciales de su replicación y diseminación. Además, los extractos vegetales presentan frecuentemente actividades múltiples <sup>(20)</sup> y esto permitiría su uso a dosis relativamente bajas de los compuestos activos, actuando posiblemente en sinergia, proporcionando al mismo tiempo un medicamento relativamente seguro con pocos efectos colaterales. Huelga decir que la aparición de resistencia a los preparados fitoterápicos es también un problema potencial que necesitaría ser evaluado, aunque si varios compuestos bioactivos se ven involucrados en la actividad, el riesgo de la aparición de virus resistentes quedaría sustancialmente reducido.

Diferentes drogas vegetales procedentes de diversas especies de *Echinacea* (las raíces de equinácea pálida, angustifolia y purpúrea, así como la sumidad florida de equinácea purpúrea se han utilizado tradicionalmente para la profilaxis y como tratamiento complementario de las afecciones recurrentes de las vías respiratorias superiores (resfriado común), habiendo sido aprobada esta indicación por ESCOP (TABLA 1).

Recientemente se ha descrito la actividad antiviral de un preparado estandarizado de equinácea purpúrea (Echinaforce®, EF) frente a diferentes tipos de virus (rinovirus 1A y 14, virus de la gripe, virus sincitial respiratorio, adenovirus tipo 3 y 11, y el virus herpes simplex tipo 1), concluyendo los autores que el preparado puede ser útil para aliviar los síntomas de la gripe y resfriados, y posiblemente otras afecciones respiratorias al inhibir el crecimiento viral y la secreción de citoquinas proinflamatorias. Además, ejerce una potente actividad virucida contra varios virus con membrana, incluyendo los virus de la influenza del tipo H3N2, a la dosis recomendada para su uso oral. El preparado revierte efectivamente la respuesta proinflamatoria inducida por el virus en cultivos de células epiteliales <sup>(21)</sup>.

Algunos preparados de equinácea también poseen actividades antibacteriana e inmunomoduladora, que podrían contribuir a sus propiedades beneficiosas <sup>(23, 24)</sup>. Sin embargo nuestros estudios demuestran que las propiedades antiviral e inhibidora de las citoquinas varían ampliamente entre los diferentes constituyentes y especies de equináceas <sup>(25-27)</sup>, por lo que es importante llevar a cabo investigaciones con preparados de equinácea estandarizados y caracterizados químicamente.

### Abreviaturas

CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CPE	Efecto Citopático.
EF	Echinaforce®, preparado estandarizado de equinácea purpúrea.
HA	Hemaglutinina
HPAIV	Virus de la influenza aviar altamente patógeno ( <i>Highly Pathogenic Avian Influenza Virus</i> ).
MOI	Multiplicidad de infección (número de partículas víricas por célula).
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
RNP	Ribonucleoproteína.
UFF	Unidades Formadoras de Focos
UFP	Unidades Formadoras de Placa
VI	Virus de la influenza.

El objetivo del presente estudio fue investigar la actividad de EF frente al virus de la influenza y elucidar los posibles mecanismos de acción sobre varias cepas de VI (humanas y aviarias), haciendo hincapié en la cepa humana tipo H5N1 de HPAIV, y evaluar el potencial de aparición de cepas resistentes en comparación con oseltamivir (Tamiflú®).

### Material y métodos

Los materiales y métodos están descritos con detalle en el artículo original (véase la Nota editorial al final del escrito), por lo que el lector interesado en ampliar la información de esta sección deberá remitirse al mismo.

El producto ensayado fue Echinaforce® (A. Vogel - Bioforce AG, Roggwil, Suiza), un extracto alcohólico estandarizado de equinácea purpúrea. Un mL del preparado contiene un 95% (860 mg) de extracto etanólico (1:12) de sumidad florida y un 5% (45 mg) de extracto etanólico (1:11) de raíz. La composición de sustancias marcadoras de este extracto ha sido descrita previamente por Sharma *et al.* <sup>(21)</sup>. La concentración de etanol en el producto es del 65% V/V, sin embargo su concentración en los ensayos experimentales y en los cultivos fue suficientemente baja para no causar efectos adversos en las células o los virus. Además, el preparado estaba libre de endotoxinas y de la dosis eficaz en

	<b>Parte aérea de equinácea purpúrea</b> <i>Echinaceae purpureae herba</i>	<b>Raíz de equinácea purpúrea</b> <i>Echinaceae purpureae radix</i>
<b>Definición Farmacopea Europea</b>	Consiste en las partes aéreas floridas, enteras o cortadas y desecadas de <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench. Contiene no menos del 0,1% de ácido caf-tárico, calculado respecto a la droga seca.  Puede emplearse material fresco, siempre que una vez desecado cumpla las especificaciones citadas.	Consiste en los órganos subterráneos, enteros o cortados y desecados de <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench. Contiene no menos del 0,5% de ácido caf-tárico, calculado respecto a la droga seca
<b>Principales constituyentes</b>	- Alquilamidas, especialmente las isobutilamidas del ácido dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetranóico. - Derivados del ácido caféico, principalmente el ácido chicórico (0,5-4,9%). - Polisacáridos, como el PS I (un 4-O-metil-glucoarabinoxilano) y el PS II (un arabinoramnogalactano ácido).	- Derivados del ácido caféico (0,6-2,8%), principalmente el ácido chicórico y caf-tárico. - Alquilamidas (0,5-0,7%), especialmente isobutilamidas del ácido dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetranóico. - Polisacáridos y glicoproteínas.
<b>Indicaciones terapéuticas (vía interna)</b>	Tratamiento complementario y preventivo de las afecciones recurrentes de las vías respiratorias superiores (resfriado común) y del tracto urogenital.	Tratamiento complementario y preventivo de las afecciones recurrentes de las vías respiratorias superiores (resfriado común).
<b>Posología</b>	Adultos: 6-9 mL/día de jugo o preparaciones equivalentes. El primer día puede ser recomendable administrar dicha dosis 2-3 veces.  Niños: dosis proporcional a la edad o peso corporal.	Adultos: 3 x 60 gotas de tintura (1:5, etanol 55%), 3 x 300 mg de droga seca o preparaciones equivalentes.  Niños: dosis proporcional a la edad o peso corporal.
<b>Duración del tratamiento</b>	No administrar durante más de 8 semanas seguidas. No se han descrito efectos secundarios en tratamientos prolongados.	
<b>Contra-indicaciones</b>	Hipersensibilidad a plantas de la familia de las Compuestas.  Como todos los inmunoestimulantes no está recomendada su administración en caso de enfermedades sistémicas progresivas y autoinmunes como tuberculosis, leucosis, colagenosis, esclerosis múltiple, SIDA o infecciones por VIH.	
<b>Precauciones especiales</b>	No se han descrito.	
<b>Interacciones</b>	No se han descrito.	
<b>Embarazo y lactancia</b>	A pesar de que no se han descrito efectos adversos en estas circunstancias, de acuerdo con la práctica médica habitual no se recomienda su uso sin control médico.	
<b>Efectos indeseables</b>	En raros casos, reacciones de hipersensibilidad cutánea.	

TABLA 1. Resumen de las monografías ESCOP de parte aérea y raíz de equinácea purpúrea. (22)

nuestros experimentos hasta la dosis oral recomendada (1,6 mg/mL), no produjeron citotoxicidad.

Para el cultivo se utilizaron células renales caninas Madin-Darby (MDCK) y las siguientes cepas de virus de la Influenza: A/Victoria/3/75 humano (Victoria, H3N2); HPAIV humano A/Thailand/KAN-1/2004 (KAN-1, H5N1); HPAIV A/FPV/Bratislava/79 (FPV, H7N7); cepa humana A/Puerto Rico/8/34 (PR8, H1N1), y el aislado humano de la pandemia del 2009 del VI A /Hamburg/1/09 (S-OIV, H1N1) de origen porcino.

La actividad antiviral se evaluó mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria al 100% (CMI<sub>100</sub>) de Echinaforce en el ensayo de punto final del Efecto Citopático (CPE), que mide la capacidad infectiva de los virus. La CMI<sub>100</sub> es la concentración mínima de extracto a la cual el CPE (y, por tanto, la capacidad infectiva) es completamente inhibido por el extracto.

Para la valoración de la concentración de virus, la cepa Victoria (H3N2) fue titulada mediante técnicas estándar de ensayo en placa en células MDCK, mientras que las demás cepas fueron tituladas por la formación de focos de infección en células MDCK.

En algunos ensayos se preincubaron, antes de la infección, alícuotas de virus (H3N2 o H5N1) o las células con EF (50 µL/mL). Las células infectadas y los controles se incubaron a continuación en un medio con EF (50 µL/mL) durante 24 h y posteriormente se utilizó el sobrenadante para realizar los ensayos de formación de focos de infección.

Para el estudio de la producción y la localización intracelular de RNP viral, las células fueron incubadas e infectadas utilizando virus preincubados con extracto. Las células fueron fijadas a distintos tiempos postinfección, y la medida y localización de RNP se efectuó mediante microscopia de barrido láser confocal, empleando anticuerpos específicos.

La interacción directa entre EF y la hemaglutinina (HA) viral se estudió mediante la realización de ensayos de actividad hemaglutinante frente a eritrocitos de pollo de diferentes preparados: sin virus (control negativo), de virus sin tratar con EF (controles positivos) o previamente tratados con diversas concentraciones de EF.

Finalmente, se realizaron ensayos de resistencia viral. Para ello, células MDCK preincubadas con o sin EF fueron infectadas e incubadas con preparados de virus H5N1 tratados o no con EF. Tras la incubación y la retirada del inóculo, las células fueron incubadas en un medio con Echinaforce® (50

µg/mL), Tamiflu® (2 µM) o sin estas sustancias durante 24 horas. Se recolectaron muestras de los sobrenadantes, en los que se valoraron los virus mediante el ensayo de formación de focos. Los sobrenadantes fueron utilizados para infectar otro conjunto de cultivos bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Este proceso de infecciones secuenciales con sobrenadantes fue repetido una vez más para completar tres rondas de infección y replicación. Los experimentos se detuvieron cuando las muestras de Tamiflu® alcanzaron títulos iguales a los controles no tratados.

## Resultados

### Echinaforce® (EF) y concentración viral

Previamente se ha descrito que el extracto EF a concentraciones de hasta 1,6 mg/mL (masa seca/volumen, la dosis oral recomendada) no provoca efectos citotóxicos aparentes en los ensayos mediante la tinción con azul tripano y MTT, o examen microscópico<sup>(21)</sup>. Sin embargo a concentraciones mayores a 1,6 µg/mL, se alcanzó una inactivación igual o superior al 99% del VI tipo H3N2 (TABLA 2). Como era de esperar, el grado de inactivación depende de la concentración de virus (FIGURA 2). Los valores CMI<sub>100</sub> estuvieron entre 0,32 µg/mL para 10<sup>2</sup> UFP/mL del virus hasta 7,5 µg/mL para 10<sup>5</sup> UFP/mL.

Con el fin de excluir la posibilidad de que el efecto viricida pudiera ser específico del subtipo de virus o sólo se refiriera a VI humanos, se analizó el efecto de EF a concentraciones no tóxicas en aislado humano del HPAIV tipo H5N1 (KAN-1). Los ensayos de reducción de la concentración del virus se llevaron a cabo con KAN-1 preincubado con varias concentraciones de EF, de 0,1 a 50 µg/mL (FIGURA 3). A

Dilución EF (µg/mL)	Titulación viral (% UFP/mL respecto al control)
1:30 (53,3)	< 0,1
1:10 <sup>2</sup> (16)	< 0,1
1:10 <sup>3</sup> (1,6)	< 0,1
1:10 <sup>4</sup> (0,16)	1,0 ± 0
1:10 <sup>5</sup> (0,016)	110 ± 7,8

TABLA 2. Efecto antiviral de Echinaforce (EF) sobre el virus de la influenza H3N2. Se incubaron alícuotas del virus H3N2 con un contenido de 10<sup>5</sup> UFP/mL a 22°C durante 60 minutos con las concentraciones indicadas de EF y se determinaron las UFP/mL remanentes.

la concentración más alta de EF, la concentración viral se redujo en más de 3 log<sub>10</sub>. Además, se ensayó el efecto inhibitorio de EF sobre los HPAIV humanos tipos H1N1 (PR8) y H7 (FPV) y se obtuvieron resultados comparables (datos no mostrados), indicando que EF afecta no solamente a los VI humanos (H3N2, H1N1), sino que también a los dos tipos (H5, H7) de HPAIV.

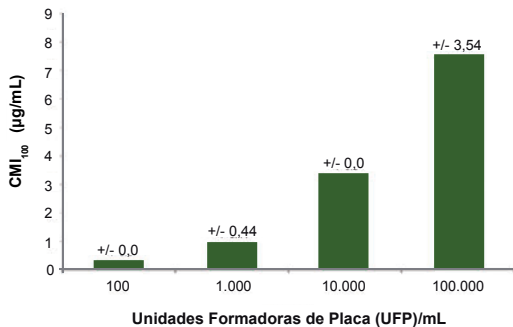


FIGURA 2. La CMI depende de la concentración viral. Se utilizaron cantidades crecientes de virus de Influenza (Victoria, H3N2) para determinar la CMI<sub>100</sub> de EF. Se incubaron diluciones seriadas de EF por cuadruplicado con las concentraciones de virus de Influenza indicadas (10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> UFP/mL) y se transfirieron a las células para hacer la determinación del punto final del CPE, tal como se describe en la sección de materiales y métodos.

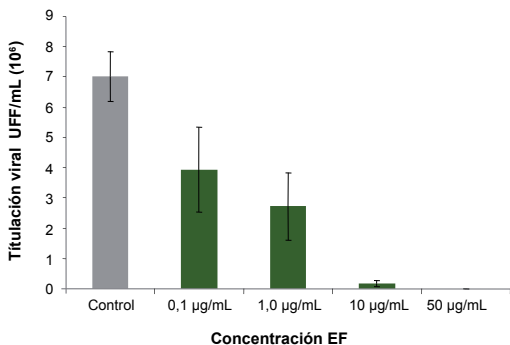
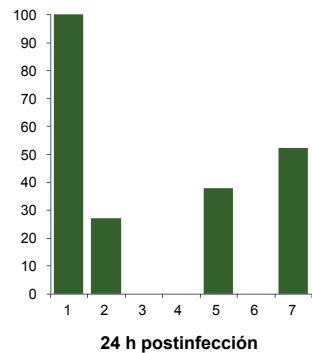


FIGURA 3. EF actúa de manera dosis dependiente. El HPAIV H5N1 (MOI = 0,001) y las células MDCK se preincubaron 1 h antes de la infección con EF a las concentraciones indicadas. Una vez infectadas las células fueron incubadas en un medio con EF, a la concentración apropiada, durante 24 horas, y se determinó el título de la infección (UFF/mL). El experimento se llevó a cabo por triplicado y las titulaciones por duplicado.

### Tiempos de adición de Echinaforce®

Todas las cepas VI ensayadas, la patogénica humana Victoria (H3N2), PR8 (H1N1), S-OIV (H1N1) y las cepas aviares KAN-1 (H5N1) y FPV (H7N7) fueron susceptibles a EF, pero sólo como resultado del contacto directo. La preincubación de las células con el extracto EF, seguidas de la infección viral o post-exposición de las células infectadas a EF inhibió la replicación del virus en menor medida. Para investigar esto con más detalle, se realizaron varios experimentos con KAN-1 para determinar el efecto de EF al ser añadido a diferentes tiempos en relación con la infección viral de las células. Se alcanzó una inhibición total incubando KAN-1 y EF conjuntamente, antes de añadirlo a las células (FIGURA 4, barras 3, 4 y 6). Sin embargo, otras combinaciones de pre o post-exposición a EF (barras 2, 5 y 7) resultaron en una reducción parcial en la producción del virus, comparado con los no tratados (barra 1). Estos resultados sugieren que EF actúa directamente contra el virus o en etapas muy tempranas del ciclo de replicación. Vale la pena mencionar que la eliminación de EF del medio 6,5 horas después de la infección seguido de incubación en medios normales



Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7
Preincubación del virus con EF	-	-	+	+	-	+	-
Preincubación de las células con EF	-	-	+	-	+	-	+
Incubación de las células postinfección con EF	-	+	+	+	+	-	-

FIGURA 4. El pretratamiento del VI con EF es más efectivo. Se trataron H5N1 (MOI = 0,001) y células MDCK con EF (50 µg/mL). Las células infectadas fueron tratadas con un medio con o sin EF durante 24 horas y se determinó el título infeccioso (UFF/mL). El experimento se llevó a cabo por triplicado y las titulaciones por duplicado.

durante 1,5 h, para prevenir una exposición de los nuevos viriones a EF antes de la titulación, no dio lugar a cambios en los resultados.

### Localización intracelular de las ribonucleoproteínas (RNP)

A continuación se determinó por inmunofluorescencia la producción y localización intracelular de las RNP virales en células MDCK infectadas con KAN-1 con y sin tratamiento con EF (FIGURA 5). En células infectadas normales sin tratamiento con EF (– EF), la proteína de la nucleocápside (verde), principal componente de las RNPs, apareció inicialmente en el núcleo (6 horas), y después migró al citoplasma (8 horas). Se observó el mismo comportamiento en las células tratadas con EF e infectadas con virus no tratados (Células + EF) y en células expuestas a EF después de la infección (EF p.i.). Sin embargo, cuando las células fueron infectadas con virus tratados con EF (virus + EF), el número total de células positivas se redujo significativamente. Sin embargo, la cantidad y la localización de RNPs detectadas en las células infectadas con un VI pretratado fue el mismo que las células infectadas no tratadas con virus no tratados. Cabe señalar que el tratamiento de las células

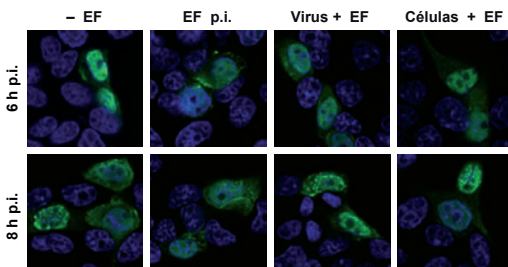


FIGURA 5. La producción de RNP intracelular y su localización no se ve afectada por EF. El virus H5N1 (MOI = 0,001) y las células MDCK o bien se dejaron sin tratamiento o se trataron con EF como sigue: – EF, infección normal sin tratamiento con EF; EF p.i., células infectadas tratadas con EF (50 µg/mL) después de la infección; virus + EF, células infectadas con virus pretratado con EF (50 µg/mL); células + EF, células pretratadas con EF (50 µg/mL) e infectadas con virus no pretratado. Las células infectadas fueron incubadas en un medio con o sin EF durante 6 y 8 horas y se detectó por inmunofluorescencia la cantidad y localización de RNP virales intracelulares (verde) así como el núcleo (azul).

infectadas a diferentes intervalos de tiempo postinfección no afectó el número de células positivas a la tinción de la nucleocápside (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que EF actúa en etapas muy tempranas, antes de la replicación, pero una vez el virus ha penetrado en la célula, su replicación y difusión no se ven afectados.

### Interacción de Echinaforce® con la hemaglutinina (HA) viral

El primer paso en la entrada de los VI en las células depende de la interacción entre la HA viral y un receptor celular específico que contiene ácido siálico. Si EF puede inhibir esta interacción, uniéndose a la HA, se previene la entrada del virus a la célula. La capacidad de unión al receptor específico de la célula por parte de la HA funcional viral se puede determinar por su capacidad de aglutinar eritrocitos de pollo, lo cual se puede constatar fácilmente de una manera visual. Se pudo estudiar la interacción directa entre el virus y EF mediante la inspección de la actividad de hemaglutinante causada por el virus en presencia y ausencia de EF. En la TABLA 3 se pueden observar los resultados de la hemaglutinación para el S-OIV pandémico (H1N1) y dos HPAIV (H5, H7). EF inhibe la actividad de HA en las 3 cepas dependiendo de la concentración y el tiempo. La misma concentración de EF sin el virus no demuestra hemaglutinación, tal y como se esperaba (datos no mostrados). Adicionalmente no se observó lisis de los eritrocitos en ninguna de las reacciones. Por tanto la inhibición de la actividad de HA se debió a la interferencia con EF. Como éste es eficaz contra diferentes cepas humanas y aviares, EF puede ejercer un efecto inespecífico sobre la replicación del VI, al interferir en la unión al receptor celular y la entrada del virus a la célula.

### Ausencia de resistencia a Echinaforce®

El tratamiento de la gripe con los medicamentos antivirales actualmente disponibles tiene el inconveniente de la frecuente aparición de cepas resistentes, debido a la alta tasa de mutación de los VI. Esto se ha observado con inhibidores de la neuraminidasa como Tamiflú® con respecto al VI estacional, el HPAIV H5N1 y en informes recientes sobre la pandemia por S-OIV [2, 3, 9, 28, 29]. Por lo tanto, cualquier alternativa competitiva debería tener la ventaja de prevenir la aparición de variantes resistentes [11]. Esto podría ser así para sustancias que bloqueen la actividad del virus de forma inespecífica. La posibilidad de aparición de virus resistentes a EF se evaluó comparando la concentración relativa del virus H5N1 ante la presencia o ausencia



Cepa virus influenza	Control positivo	Control negativo	EF (µg/mL) 1 hora					EF (µg/mL) 4 horas				
			50	100	200	400	800	50	100	200	400	800
H1N1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5N1	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
H7N7	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 3: Interacción de EF con la HA viral. Se ensayaron dos tiempos de incubación de las suspensiones virales tratadas con diferentes diluciones de EF con los eritrocitos de pollo (1 h y 4 h).

+: actividad hemaglutinante (aglutinación de eritrocitos). -: sin actividad hemaglutinante.

de EF o Tamiflú®, a lo largo de varias secuencias de tratamientos consecutivos de cultivos celulares. Los resultados aparecen en la FIGURA 6. Después de la primera secuencia de replicación, la concentración de virus fue reducida sustancialmente con EF (50 µg/mL) y con Tamiflú® (2 µM). Sin embargo en las secuencias 2ª y 3ª la concentración viral en presencia de Tamiflú® fue similar a la de los controles no tratados, indicando la aparición de variantes de virus resistentes, mientras que ante la presencia de EF la concentración de virus continuó permaneciendo baja, indicando la ausencia de resistencia del virus.

Para determinar si los virus resistentes a Tamiflú® continuaban siendo sensibles a EF, se ensayó el crecimiento de los virus resistentes a Tamiflú® en presencia y ausencia de EF. Echinaforce (50 µg/mL) redujo la concentración de los virus resistentes a Tamiflú® en más de 3 log<sub>10</sub> UFF virales, mostrando una actividad similar a la que tiene sobre el virus normal (datos no mostrados).

## Discusión

Los resultados demuestran que Echinaforce®, tiene una potente actividad antiviral contra todas las cepas VI ensayadas, las llamadas humanas Victoria (H3N2) y PR8 (H1N1), cepas aviares KAN-1 (H5N1) y FPV (H7N7) y la pandémica S-OIV (H1N1). Concentraciones de EF que oscilan desde 1,6 mg/mL (la dosis recomendada para consumo oral) hasta concentraciones tan pequeñas como 1,6 µg/mL (dilución 1:1000), pueden inactivar en más de un 99% la capacidad infectiva del virus y la infección con virus tratados dio lugar a concentraciones virales muy reducidas en cultivos celulares. Sin embargo, se requiere del contacto directo entre el virus y EF para conseguir este efecto inhibitorio, ya que el pretratamiento de las células antes de la infección viral, o la exposición de las células a EF postinfección, conducen a una inhibición sustancialmente menor, indicando que el

efecto antiviral se manifestó en una etapa muy temprana del proceso infeccioso. Esto se pudo confirmar utilizando ensayos de hemaglutinación los cuales muestran de una manera clara que EF inhibe la actividad de la hemaglutinina y consecuentemente bloquean la entrada del virus tratado en la célula. Sin embargo se debe estudiar con más detalle el mecanismo de inhibición.

La inhibición general producida por EF sobre diferentes cepas de virus constituye una ventaja significativa frente a otros antivirales que actúan de forma específica sobre determinadas cepas víricas, como los adamantanos (amantadina)<sup>(8, 9)</sup>. Es más, la no aparición de virus resistentes a EF durante los tratamientos secuenciales es una ventaja significativa sobre Tamiflú®, el cual bajo condiciones de cultivo similares dio lugar a un rápido desarrollo de cepas resistentes. Adicionalmente, los virus resistentes a Tamiflú® fueron muy sensibles a EF. Estos resultados indican que EF puede ser de gran ayuda en el control del virus de la influenza y se complementa con la capacidad de EF de contrarrestar la inducción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias originadas por el virus de la gripe y otras virosis, así como con la actividad anti bacteriana selectiva de los extractos de equinácea<sup>(24)</sup>. Así, EF puede jugar un papel multifuncional durante una infección por VI.

Echinaforce® contiene concentraciones conocidas de compuestos potencialmente bioactivos<sup>(21, 23)</sup> y esto incluye los llamados marcadores de calidad, tales como compuestos fenólicos derivados del ácido caféico, alquilamidas y polisacáridos, todos los cuales han sido propuestos como responsables de los beneficios médicos atribuidos a los extractos de varias especies de equinácea<sup>(30)</sup>. Sin embargo, nuestros estudios recientes sobre diferentes tipos de extractos de equinácea sugieren que las bioactividades específicas no se pueden atribuir a un solo componente.

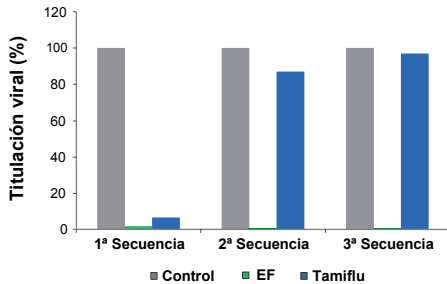


FIGURA 6. El tratamiento con Echinaforce no da lugar a variantes resistentes del virus. Se infectaron células MDCK con H5N1 (MOI= 0,001) y se incubaron durante 24 h o bien con un medio sin tratamiento (barras grises), o con EF (50 µg/mL, barras verdes) o con Tamiflú® (2 µM, barras azules). La concentración viral del sobrenadante fue valorada por el ensayo de UFF y dicho sobrenadante fue utilizado para una segunda secuencia de infección de células MDCK frescas. Se realizaron tres secuencias y después de cada una de ellas se determinó el título viral mediante el ensayo UFF (UFF/mL). La valoración de las UFF de las muestras tratadas con EF o Tamiflú® se calcularon como porcentajes de las muestras control, a las que se asignó el 100%. Se muestra la media de experimentos realizados por duplicado con valoraciones realizadas también por duplicado.

Además EF, como otros extractos de equinácea, contiene otros compuestos bioactivos como flavonoides y alcaloides<sup>(30)</sup> y es concebible que la clave de la relativamente alta potencia de EF esté en la particular combinación y equilibrio entre sus constituyentes individuales.

Estudios recientes sobre la planta mediterránea *Cistus creticus* (= *Cistus incanus*) proporcionan algunas comparaciones interesantes. Un extracto de *Cistus* rico en polifenoles mostró actividades anti VI parecidas a las que se describen en este trabajo, sugiriendo un modo de acción similar<sup>(18)</sup>. El mecanismo de actividad antiviral del *Cistus* no se ha elucidado aún, de forma que un estudio comparativo de estos dos extractos, podría ser útil y proporcionar interesantes ideas para el diseño de compuestos efectivos anti VI.

Por el contrario el estudio de Palamara *et al.*<sup>(16)</sup> mostró que un polifenol individual, el resveratrol, un constituyente común de la uva negra y otras plantas, podría inhibir la replicación de VI interfiriendo en las vías de señalización implicadas en la translocación de RNP virales. Así, una adecuada combinación de los polifenoles vegetales podría ofrecer un enfoque multifuncional en el control de la replicación del virus de la influenza y sus síntomas asociados.

## 5. Conclusión

Los datos presentados en este trabajo han demostrado que un preparado estandarizado de equinácea, Echinaforce®, tiene el potencial de impedir la propagación del virus de la influenza, incluyendo las cepas estacionales, las cepas altamente patogénicas de la influenza aviar, así como la nueva cepa pandémica de origen porcino, a las concentraciones recomendadas para uso oral e inferiores. Además el preparado no induce la aparición de variantes víricas resistentes y es activo incluso contra cepas que se han vuelto resistentes al tratamiento con inhibidores de la neuraminidasa. Esta potencialidad, la disponibilidad y la falta de toxicidad hacen de este preparado una opción interesante en el control y tratamiento de las infecciones por virus de la influenza.

## Nota de la editorial

El presente artículo es una traducción adaptada del trabajo: Pleschka S, Stein M, Schoop R, Hudson JB. Anti-viral properties and mode of action of standardized Echinacea purpurea extract against highly pathogenic avian Influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV). *Virology Journal* 2009, 6:197- 206. DOI: 10.1186/1743-422X-6-197. Disponible en <http://www.virologyj.com/content/6/1/197> (con Licencia Creative Commons).

## Referencias bibliográficas

1. Cannell JJ, Zaslloff M, Garland CF, Scragg R, Giovannucci E. On the epidemiology of influenza. *Virology J* 2008; 5: 29.
2. Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J. Novel swine-origin influenza A virus in humans: another pandemic knocking at the door. *Med Microbiol Immunol* 2009; 198: 175-183.
3. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 2009; 459: 931-939.
4. Bahlky H. Avian influenza: The tip of the iceberg. *Ann Thorac Med* 2009; 3:154-157.
5. Suzuki Y. The Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1-Initial Molecular Signals for the Next Influenza Pandemic. *Chang Gung Med J* 2009; 32: 258-263.
6. Hayden F. Developing New Antiviral Agents for Influenza Treatment: What does the Future Hold? *Clin Infect Dis* 2009; 48: S3-S13.
7. Jefferson T, Di Pietrantonj C, Debalini MG, Rivetti A, Demicheli V. Inactivated influenza vaccines: methods, policies, and politics. *J Clin Epidemiol* 2009; 62: 677-686.

8. Lackenby A, Thompson CI, Democratis J. The potential impact of neuraminidase inhibitor resistant influenza. *Curr Op Infec Dis* 2008; 21: 626-638.
9. Cheng PKC, Leung TWC, Ho ECM, Leung PKC, Ng AYY, Lai MYY et al. Oseltamivir and Amantadine-Resistant Influenza viruses A (H1N1). *Emerg Infec Dis* 2009; 15: 966-968.
10. Ludwig S, Planz O, Pleschka S, Wolff T. Influenza-virus-induced signaling cascades: targets for antiviral therapy? *Trends Mol Med* 2003; 9: 46-52.
11. Ludwig S. Targeting cell signaling pathways to fight the flu: towards a paradigm change in anti-influenza therapy. *J Antimicrob Ther* 2009; 64: 1-4.
12. Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, Hobom G, Planz O, Rapp UR, et al. Influenza virus propagation is impaired upon specific inhibition of the Raf/MEK/ERK signaling cascade. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 301-305.
13. Ludwig S, Wolff T, Ehrhardt C, Wurzer WJ, Reinhardt J, Planz O, et al. MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants. *FEBS Lett* 2004; 561: 37-43.
14. Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Berberich-Seibelt F, Wolff T, Walczak H, et al. NF-kappaB-dependent of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J Biol Chem* 2004; 279: 30931-30937.
15. Mazur I, Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Puthavathana P, Silberzahn T, et al. Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity. *Cell Microbiol* 2007; 9: 1683-94.
16. Palamara AT, Nencioni L, Aquilano K, De Chiara G, Hernandez L, Cozzolino F, et al. Inhibition of Influenza Virus Replication by Resveratrol. *J Infec Dis* 2005; 191: 1719-1729.
17. Wang X, Jia W, Zhao A, Wang X. Anti-influenza Agents from Plants and Traditional Chinese Medicine. *Phytother Res* 2006; 20: 335-341.
18. Ehrhardt C, Hrinčius ER, Korte V, Mazur I, Droebner K, Poetter A, et al. A Polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antivir Res* 2007; 76: 38-47.
19. Droebner K, Ehrhardt C, Poetter A, Ludwig S, Planz O. CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antivir Res* 2007; 76: 1-10.
20. Hudson JB, Towers GHN. Phytomedicines as antivirals. *Drugs of the Future* 1999; 24: 295-320.
21. Sharma M, Anderson SA, Schoop R, Hudson JB. Induction of proinflammatory cytokines by respiratory viruses and reversal by standardized Echinacea, a potent antiviral herbal extract. *Antiviral Res* 2009; 83: 165-170.
22. ESCOP. ESCOP Monographs, the scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. 2<sup>nd</sup> edition, Suppl 2009. Stuttgart-New York: ESCOP-Thieme; 2009.
23. Sharma M, Vohra S, Arnason JT, Hudson JB. Echinacea Extracts contain significant and selective activities against human pathogenic bacteria. *Pharmac Biol* 2008; 46: 111-116.
24. Vohra S, Adams D, Hudson JB, Moore JA, Vimalanathan S, Sharma M, et al. Selection of natural health products for clinical trials: a preclinical template. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87:371-378.
25. Hudson J, Vimalanathan S, Kang L, Treyvaud Amiguet V, Livesey J, Arnason JT. Characterization of antiviral activities in Echinacea root preparations. *Pharmac Biol* 2005; 43: 790-796.
26. Vimalanathan S, Kang L, Treyvaud Amiguet V, Livesey J, Arnason JT, Hudson J. Echinacea purpurea aerial parts contain multiple antiviral compounds. *Pharmac Biol* 2005; 43: 740-745.
27. Vimalanathan S, Arnason JT, Hudson JB. Anti-inflammatory activities of Echinacea extracts do not correlate with traditional marker components. *Pharmac Biol* 2009; 47: 430-435.
28. Hurt AC, Ernest J, Deng YM, Iannello P, Besselaar TG, Birch C, et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antivir Res* 2009; 83: 90-93.
29. Morbidity Mortality Weekly Report. Oseltamivir-Resistant Novel Influenza A (H1N1) Virus Infection in Two Immunosuppressed Patients-Seattle Washington. *MMWR* 2009; 58 (32): 893-896.
30. Barnes J, Anderson LA, Gibbons S, Phillipson JD. Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell. *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench: a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57: 929-954.

**A.Vogel**



Mejora  
tus defensas



**Echinaforce**®

La fuerza de la equinácea  
obtenida de la planta fresca

Lo mejor para su Salud  
desde 1923

*A. Vogel*