

Estudio comparativo de los efectos antivirales de agentes antioxidantes: N-acetilcisteína y ácido ascórbico e inmunosupresores: Ciclosporina A y tacrolimus en células crónicamente infectadas con el virus de la inmunodeficiencia felina

Eduardo Mórtola^{*},^{**}
 Yasuyuki Endo^{**}
 Miguel Rizzo^{*},^{***}
 Eduardo Gimeno^{*}

Abstract

To examine the antiviral action of antioxidants and immunosuppressive drugs on feline immunodeficiency virus (FIV), the effects of noncytotoxic concentrations of two antioxidants, N-acetylcysteine (NAC) and ascorbic acid (AA) and two immunosuppressive agents, cyclosporin A (CsA) and Tacrolimus (also known as FK506) on the inhibition of the replication of the virus and of apoptosis in a feline fibroblastic cell line chronically infected with FIV were studied and compared. Long-term treatment of the infected cells with NAC and AA induced a significant inhibition of viral replication and apoptosis after addition of tumor necrosis factor alpha (TNF- α). Both CsA and FK506 significantly suppressed virus production and apoptosis activity by about the same magnitude as the equivalent dose of NAC and AA. The twenty two day experiment showed that continuous presence of the agents was necessary for FIV inhibition, because the removal of the drugs resulted in the resumption of virus replication. These *in vitro* results suggest that the antiviral effects of the antioxidants and immunosuppressive agents tested in this study have potential implications for the design of therapeutic strategies in FIV infection.

Key words: ANTIVIRAL EFFECTS, FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS, APOPTOSIS, ANTIOXIDANTS, IMMUNOSUPPRESSIVE AGENTS.

Resumen

En el presente trabajo, se examinan y comparan los efectos a largo plazo de dos antioxidantes: N-acetilcisteína (NAC) y ácido ascórbico (AA), con dos agentes inmunosupresores: Ciclosporina A (CsA) y tacrolimus (también conocido como FK506) sobre la replicación viral y la apoptosis en cultivos de una línea celular de fibroblastos felinos crónicamente infectada con el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV). En las células tratadas con NAC o AA se detectó una inhibición significativa de la replicación viral y la apoptosis, luego del agregado del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α). Cuando las células fueron tratadas con los agentes inmunosupresores CsA y FK506, la replicación viral y la apoptosis descendieron en forma similar a lo hallado con el uso de los antioxidantes. La inhibición del virus FIV en los cultivos tratados con cualquiera de los fármacos utilizados, persistió durante el tiempo que duró la suplementación de las mismas. Sobre la base de estos resultados *in vitro*, que muestran la eficacia de cada componente sobre la replicación viral y la apoptosis, podría sugerirse que el mejor camino para retrasar la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida es a través del uso inteligente de una combinación de terapias.

Palabras clave: EFECTOS ANTIVIRALES, VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA FELINA, APOPTOSIS, ANTIOXIDANTES, INMUNOSUPRESORES.

Recibido el 11 de enero de 2000 y aceptado el 27 de junio de 2000.

* Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118, 1900 La Plata, Argentina.

** Department of Veterinary Internal Medicine, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japón.

*** Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina 7 y 526, 1900 La Plata, Argentina.

Introducción

La infección con el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) en los gatos domésticos, se presenta con una fase aguda previa, de varias semanas o meses, en la que el animal presenta fiebre recurrente, neutropenia, linfadenopatías y, posteriormente, sobreviene un estado de portador asintomático durante varios meses o años.¹

² Algunos de los gatos infectados pueden desarrollar subsecuentemente el síndrome de inmunodeficiencia con una gran variedad de signos clínicos que incluyen pérdida de peso, infecciones oportunistas, neoplasias y trastornos neurológicos.^{3,4}

El virus de inmunodeficiencia felina constituye un lentivirus de los felinos que se asemeja al VIH de los humanos en su organización genómica, morfología, estructura proteínica y potencial patogénico.^{5, 6} Este virus infecta predominantemente linfocitos T y macrófagos, y lleva a una progresiva destrucción del sistema inmune, con una marcada pérdida por apoptosis de la población de linfocitos CD4+.⁷⁻¹⁰

Muchos de los efectos patológicos de los retrovirus, no directamente relacionados con la replicación viral, se deben a la respuesta del huésped a la infección; por ejemplo, la inflamación crónica y el estrés oxidativo.¹¹ Eck *et al.*¹² demostraron que en individuos infectados con VIH, los niveles de tiol en sangre disminuyen considerablemente, y establecen una posible asociación entre el estrés oxidativo y el proceso de apoptosis en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida).^{13,14} En este contexto, se podría especular que la regulación del estado redox de la célula por el uso de antioxidantes, representa un componente clave que evitaría la inducción de apoptosis en la célula.¹⁵

Con intención de hallar fármacos que interfirieran en la replicación viral y la apoptosis característica de la infección por VIF sin efectos citotóxicos colaterales, en el presente trabajo se utilizaron dos agentes antioxidantes: la N-acetilcisteína (NAC) y el ácido ascórbico (AA); el primero es un componente que, debido a su contenido en tiol, ha sido utilizado durante muchos años en el tratamiento de bronquitis crónica,^{16, 17} y su actividad mucolítica está relacionada con su propiedad antioxidante¹⁸ ejercida directamente por el incremento de los sistemas de defensa intracelulares contra el estrés oxidativo.¹² El AA ha demostrado inactivar e inhibir la replicación viral en células infectadas por un gran espectro de virus como poliovirus, herpesvirus, hepatitis virus e incluso el VIH.¹⁹⁻²¹

En la segunda etapa de este trabajo se examinó el uso de la CsA como inhibidor de la replicación viral y el efecto citopatogénico del VIF; además, se experimentó el uso de tacrolimus (también conocido como FK506), un fármaco inmunosupresor de reciente descubrimiento, que ha demostrado tener propiedades similares a la CsA en la prevención del rechazo en el trasplante de órganos y en la supresión de fenómenos de autoinmunidad.²² La CsA y el FK506 funcionan como profármacos y sólo se activan cuando se unen para formar un complejo con receptores intracelulares endógenos, o proteínas ligadoras llamadas inmunofilinas: Ciclofilina A (CyPA) para la CsA, y FKBP para el FK506.²³ Ambas proteínas ligadoras son isomerasas presentes en la mayoría de los tipos celulares y tejidos.^{23,24}

Con base en trabajos anteriores^{25, 26} sobre los efectos antivirales de los fármacos aquí mencionados, en este estudio se investigaron los efectos a largo plazo de NAC y AA, y se determinaron y compararon sus efectos con los de la CsA y el FK506, sobre la replicación viral y la apoptosis en cultivos de células felinas crónicamente infectadas con VIF. En este trabajo se resumen las más recientes observaciones y se presentan los últimos hallazgos.

Material y métodos

Línea celular

Se utilizó una línea celular de fibroblastos felinos (CRFK)²⁷ crónicamente infectada con la cepa Petaluma²⁸ de VIF (CRFK/VIF). Estas células se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino. Debido a que esta línea celular se mantiene infectada en forma permanente con VIF, la inducción de apoptosis se logró con el agregado del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) a una concentración de 100 U/ml.

Fármacos y protocolo experimental

Soluciones madres de 0.1 M de NAC* y 0.06 M de AA** fueron disueltas en medio RPMI 1640 y conservadas a -20°C. El pH de la solución de NAC se ajustó a siete con NaOH. Debido a que ambos antioxidantes son inestables en condiciones convencionales de cultivo,²⁹ se prepararon soluciones frescas de antioxidantes en el medio de crecimiento y se administraron diariamente a los cultivos. La CsA** y el FK506 se disolvieron en etanol y luego se diluyeron en el medio RPMI a las concentraciones de 1 a 10 g/ml.

Para examinar los efectos citotóxicos de los fármacos, las células CRFK/VIF fueron suspendidas en una densidad de 5×10^5 células/ml en el medio de crecimiento, y cultivadas durante dos semanas en presencia de varias concentraciones de cada uno de los compuestos: NAC (10 a 60 mM), AA (20 a 640 g/ml), CsA (0.5 a 20 g/ml) y FK506 (0.5 a 20 g/ml), manteniéndose cultivos testigos sin el agregado de los fármacos.

Posteriormente, se cultivaron células CRFK/VIF durante 22 días, en presencia de concentraciones no citotóxicas de NAC, AA, CsA y FK506, para determinar la viabilidad celular; se cuantificó la replicación viral con la medición de la enzima transcriptasa reversa (RT) en los sobrenadantes de los cultivos, y se determinó la apoptosis luego de su inducción con el TNF- α .

Determinación de la viabilidad celular

Con el propósito de examinar los efectos de los fármacos sobre la viabilidad celular, se suspendieron células CRFK/VIF en crecimiento exponencial, con y sin el agregado del TNF- α , a una concentración de 5×10^5 células/ml, y se incubaron en presencia de cada uno de los fármacos. Muestras de las células fueron recolectadas de los cultivos durante los 22 días del experimento, y su viabilidad fue examinada mediante tinción de las células con el azul de tripán (0.4%). Las células muertas incorporan el colorante, mientras que las vivas permanecen incoloras. Los efectos inhibitorios de los fármacos, se definieron por comparación con el número de células viables en cultivos celulares, sin el agregado de los compuestos.

Determinación de la enzima transcriptasa reversa (RT)

Luego de remover los detritus celulares por centrifugación a 8 000 g durante 10 min, los sobrenadantes se ultracentrifugaron a 100 000 g durante 10 min con el fin de obtener las partículas virales. Los precipitados resultantes se analizaron para establecer la actividad de la enzima RT mediante la técnica de ELISA con base en la incorporación de digoxigenina y biotina marcadas en el ADN celular.*

Detección de apoptosis

El análisis de apoptosis se llevó a cabo mediante la técnica de ELISA, para detectar el ADN celular fragmentado,** y fue confirmado por electroforesis en gel de agarosa (8). La técnica consiste en la detección de los fragmentos de ADN marcados con BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) en las células apoptóticas por un ELISA "sandwich" cuantitativo. La medición de la apoptosis se realizó mediante la lectura de absorciones a 470 nm en un lector de ELISA.

Análisis estadístico

Los datos de la viabilidad celular, replicación viral y apoptosis fueron sometidos a análisis de varianza, prueba de Fisher. Se eligió un nivel de significación del 5%. Se caracterizaron los siguientes grupos: 1: CRFK/VIF; 2: CRFK/VIF+TNF- α ; 3: CRFK/VIF+TNF- α +NAC; 4: CRFK/VIF+TNF- α +AA; 5: CRFK/VIF+TNF- α +CsA y 6: CRFK/VIF+TNF- α +FK506.

Resultados

* Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, Estados Unidos de América.

** Sigma Chemical, St. Luis, MO, Estados Unidos de América.

* Boehringer Mannheim, Alemania.

** Boehringer Mannheim, Alemania

Efectos de los fármacos sobre la viabilidad celular

Antes de evaluar los efectos antivirales de los antioxidantes e inmunosupresores, se valoró la citotoxicidad de los fármacos. No se observaron efectos citotóxicos en presencia de las siguientes concentraciones: NAC (10 a 30 mM), AA (20 a 80 g de por ml), CsA y FK506 (10 g/ml), durante las dos semanas de cultivo. No obstante, las concentraciones de 15 mM de NAC, 60 g por ml de AA y 10 g/ml de CsA y FK506 fueron elegidas como límite para el desarrollo del experimento. La concentración de etanol utilizada para disolver los agentes inmunosupresores no afectó la viabilidad celular.

En las células CRFK/VIF, 24 h después del agregado de TNF- α (100 U/ml), la viabilidad celular declinó a 51.1%, seguido de un descenso hasta el día siete y con una viabilidad muy baja hasta el final del experimento. A pesar del efecto del TNF- α , la viabilidad de las células CRFK/VIF se mantuvo alta cuando se cultivaron en presencia de los antioxidantes: NAC (15 mM) y AA (60 g por ml) con viabilidades promedio de 85.88% y 89.13%, respectivamente (Figura 1a); o en presencia de los agentes inmunosupresores: CsA y FK506 (10 g/ml), viabilidades promedio de 84.13% y 88.07%, respectivamente, hasta el final de la experiencia (Figura 1b). Con respecto al contraste de la Figura 1a y b, el grupo 1 fue significativamente mayor que los grupos 2, 3, 4, 5 y 6. Los grupos 3 y 4 y los 5 y 6 no difirieron entre sí y el grupo 2 fue significativamente menor que los grupos 3, 4, 5 y 6 (contrastes 1, 2, 3, y 4; $F = 35.2$; contrastes 1, 2, 5 y 6; $F = 34.3$; $gl = 3/32$; $P < 0.01$).

Efectos de los fármacos sobre la replicación viral

Como se muestra en la Figura 2a, el incremento en la actividad de la enzima RT en el sobrenadante de los cultivos de las células CRFK/VIF alcanzó un pico de producción 24 h después del agregado del TNF- α . En contraposición, el tratamiento de estas mismas células con NAC y AA mostró una marcada inhibición en la producción de la enzima RT. Un descenso notable en los valores de la enzima RT (44.3% de inhibición con el uso de NAC y 41% con el uso de AA) se halló 24 h después del agregado de TNF- α a los cultivos tratados con los agentes antioxidantes, seguido de una caída progresiva hasta al día cuatro de cultivo, y una estabilización posterior de los valores de RT mucho menores a los hallados en los testigos. El grupo 1 fue significativamente mayor que los grupos 2, 3 y 4, estos últimos no difirieron entre sí ($F = 8.35$; $gl = 3/32$; $P < 0.01$).

Las células CRFK/VIF liberan continuamente partículas virales al medio de cultivo, cuando estas células fueron cultivadas en presencia de CsA o FK506 (10 g/ml), la actividad de la enzima RT en los sobrenadantes de los cultivos tratados con estos agentes descendió 30% con el uso de CsA, y 38.6% con el uso de FK 506 a las 24 h después del agregado del TNF- α , luego el descenso fue paulatino, y se estabilizó al día 10 de cultivo (Figura 2b). El grupo 1 fue significativamente mayor que los grupos 2, 5 y 6. El grupo 2 fue significativamente menor que los grupos 5 y 6, y estos dos últimos no difirieron entre sí ($F = 8.02$; $gl = 3/32$; $P < 0.01$).

A lo largo del experimento, el tratamiento continuo de las células CRFK/VIF con el agregado diario de cualquiera de los fármacos antioxidantes o inmunosupresores, mantuvo los niveles de enzima RT en valores mucho menores a los hallados en los testigos no tratados. Para determinar si durante los 22 días del experimento, la presencia continua de los mencionados agentes es necesaria para la inhibición de la enzima RT, los fármacos fueron removidos de los cultivos al día 10 del experimento, las células se sembraron en medio sin agregado de fármacos, y se determinó la actividad de la enzima RT. Luego de la remoción de los fármacos, la producción de RT en los sobrenadantes de los cultivos ascendió notoriamente hacia los niveles de los testigos (Figura 2). Sin embargo, hubo una diferencia entre el comportamiento de los antioxidantes y los inmunosupresores, si bien en las células tratadas con los antioxidantes, los niveles de enzima RT ascendieron hasta el día 19 del experimento, no se registraron los valores de los testigos (Figura 2a); en cambio, en las células tratadas con los inmunosupresores, la recuperación requirió seis días, y alcanzó niveles similares a los testigos (Figura 2b).

Efectos de los fármacos sobre la apoptosis

La muerte de las células CRFK infectadas con VIF luego del agregado del TNF- α se debe a apoptosis (8). Los resultados obtenidos con la técnica de ELISA, que detecta apoptosis por fragmentación del ADN, fueron correlacionados con la observación microscópica de la morfología y la electroforesis del ADN en gel de agarosa (dato no mostrado). El tratamiento de las células CRFK/VIF con NAC (15 mM) o AA (60 g/ml), así como con el uso de CsA o FK506 en una dosis de 10 g/ml, inhibió la progresión de apoptosis en los cultivos celulares

expuestos al TNF- α . El porcentaje de inhibición de la apoptosis alcanzado fue de 85.3% y 87.45% para NAC y AA, respectivamente; y 87.53% y 88.37% para CsA y FK506, respectivamente (Figura 3). El testigo infectado (CRFK/VIF+TNF- α) difirió significativamente de todos los tratamientos. Los grupos 4 (tratado con AA), 5 (tratado con CsA) y 6 (tratado con FK506) no difirieron entre sí, pero difirieron del grupo 3 (tratado con NAC) ($F = 235.9$; $gl = 4/10$; $P < 0.01$).

Discusión

Con el uso a largo plazo de dos diferentes antioxidantes; NAC y AA, se logra la inhibición de la apoptosis y la replicación viral en las células CRFK crónicamente infectadas con VIF.

En trabajos anteriores²⁵ se ha demostrado que el nivel de GSH, un tripéptido muy importante en el sistema de defensa intracelular contra el estrés oxidativo,³⁰ desciende significativamente en las células CRFK infectadas con VIF.²⁵ Con el agregado de NAC y AA a los cultivos, dos precursores del GSH¹² que inhiben la actividad del TNF- α , se detuvo significativamente la oxidación celular que lleva a la apoptosis, y se inhibió la actividad de la enzima RT, y con ello la replicación viral. Estos hallazgos se correlacionan con los de Roederer *et al.*,³¹ en los cuales NAC inhibió la replicación del VIH en células estimuladas con ciertas citoquinas. Las células CRFK/VIF, sin la estimulación del TNF- α , producen una cantidad constante de partículas virales que le permiten mantenerse vivas a pesar de la infección. Al descender el nivel de GSH en las células infectadas con VIF, y ante el efecto del TNF- α , una fuente exógena de tiol como NAC o AA, pudo efectivamente bloquear la replicación viral. Poli *et al.*³² también demostraron que NAC inhibió la replicación del virus VIH, a pesar del uso de la interleuquina VI como estimulador viral. Estos resultados sugieren que NAC podría ser efectivo para mantener la latencia viral en las células CRFK/VIF, posiblemente inhibiendo ciertas citoquinas estimuladoras de la replicación viral en lentivirus.

Al igual que con el uso de antioxidantes, el uso de inmunosupresores como CsA y FK506 inhibió, en forma similar, la replicación viral y la apoptosis en las células CRFK infectadas con VIF. CsA demostró bloquear la replicación del VIH mediante la interrupción de la unión entre la proteína Gag del VIH y la CyPA,³³⁻³⁵ la cual es importante para la replicación viral.³⁶ Es muy posible que la CsA podría bloquear la replicación del VIF mediante la unión con la proteína Gag del virus, en una forma similar a su acción con el VIH. La especulación de esta hipótesis es sostenida por trabajos de Elder *et al.*,³⁷ quienes con un detallado análisis de las fracciones Gag y Gag-Pol del VIF, mostraron que este virus parece ser una excepción entre los lentivirus de los no primates, y que la matriz y la cápside del VIF son muy similares a aquellas del VIH-1, el cual se une a CyPA para su replicación.³⁶ Sin embargo, sería necesario realizar otros estudios para confirmar la asociación entre la proteína Gag de VIF con CyPA.

Por otro lado, FK506, que se une a una proteína diferente llamada FKBP, la cual no se combina con la proteína Gag del VIH,³⁸ podría suprimir la replicación viral debido a su habilidad para inhibir la proliferación celular, como se ha informado en trabajos previos.²⁶

En estos experimentos realizados con CsA y FK506, se observó que la cantidad de partículas virales en las células crónicamente infectadas con VIF descendió notablemente y se inhibió la apoptosis. Sin embargo, Bartz *et al.*³⁹ encontraron que análogos de la CsA inhibieron sólo en un bajo porcentaje la replicación viral en su línea celular crónicamente infectadas con VIH. Los resultados sobre los efectos antivirales de la CsA y FK506 obtenidos en estas experiencias son consistentes a los hallados por Karpas *et al.*,⁴⁰ quienes usaron el VIH con un protocolo experimental similar al del presente estudio. Sin embargo, los resultados de Steinkasserrer *et al.*⁴¹ difieren de los hallados en este trabajo; ellos registraron una actividad antiviral de la CsA y sus análogos, pero no con el uso de FK506. Sin embargo, la concentración de FK506 usada en sus experimentos fue mucho menor a la usada en este estudio (10 μ g/ml). De lo expuesto, se puede sugerir que los agentes que interfieren con la replicación del VIF podrían tener un papel importante en el control de la muerte celular por apoptosis. La infección por VIF en los gatos, tiene un efecto directo sobre la población de linfocitos T,⁷ con una pérdida selectiva de los linfocitos CD4+.⁴² El uso terapéutico de diferentes fármacos para preservar a los linfocitos T, podrían contribuir a subsanar la inmunodepresión en los gatos infectados.

Esta evaluación comparativa *in vitro*, sobre los efectos antivirales de los antioxidantes e inmunosupresores aquí citados, resultó ser interesante. NAC y AA inhibieron significativamente la replicación del VIF y la apoptosis en células crónicamente infectadas. Con el uso de CsA y FK506 durante los primeros días del experimento, se hallaron valores de la actividad de la enzima RT similares a los encontrados en el tratamiento con los antioxidantes; posteriormente, dichos valores se estabilizaron en niveles mayores que con el uso de NAC o AA.

Un importante hallazgo en esta investigación es que la supresión del VIF persistió durante el tiempo en que duró la suplementación diaria de los fármacos utilizados. La remoción de los fármacos de los cultivos incrementó los valores de RT virales, con el uso de NAC o AA, la recuperación llevó más tiempo que con el uso de los inmunosupresores, y no se alcanzaron los niveles de los testigos durante el desarrollo del experimento. Por lo tanto, la presencia continua de los fármacos es necesaria para mantener la supresión de la replicación viral. NAC y AA tienen ambos una larga historia en el uso humano y animal, y su seguridad y acción farmacológica son bien conocidas.

Los hallazgos en este trabajo muestran la eficacia de cada componente sobre la replicación viral y la apoptosis, lo que sugiere que el mejor camino para retrasar la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida es a través del uso inteligente de una amplia gama de terapias. Lo deseable sería la elección racional de una combinación de fármacos, donde debería considerarse la interacción de los fármacos entre sí en términos de eficacia y toxicidad farmacológica, y un análisis de patrones de resistencia. Los informes clínicos y experimentales más recientes aconsejan instaurar la terapia en los estadios tempranos de la infección, cuando el sistema inmune está relativamente intacto y puede actuar sinérgicamente con la quimioterapia en la lucha contra el virus.

El verdadero impacto de estos tratamientos en la prognosis del gato infectado con VIF será evaluado en un futuro cercano con el aporte de datos clínicos sobre el uso de los fármacos que se examinaron aquí.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Educación, Ciencia, Deporte y Cultura, y al Ministerio de Salud y Bienestar General de Japón, el financiamiento para el desarrollo de este trabajo; también reconocen la gentileza de Fujisawa Pharmaceutical, Osaka, Japón, por el suministro del fármaco FK506.

Referencias

1. Pedersen NC, Yamamoto JK, Ishida T, Hansen H. Feline immunodeficiency infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1989;21:111-129.
2. Yamamoto JK, Hansen H. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus (FIV) infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J Am Vet Med Assoc* 1989;194:213-220.
3. Dow SW, Poss ML, Hoover EA. Feline immunodeficiency virus: a neurotropic lentivirus. *J Acq Immun Def Synd* 1990;3:658-668.
4. Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods Arch Exp Pathol* 1988;13:18-25.
5. Hoffmann-Fezer G, Thum J, Ackley CD. Decline in CD4+ cell numbers in cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. *J Virol* 1992;66:1484-1488.
6. Pedersen NC, Ho EW, Brown ML, Yamamoto JK. Isolation of a T lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency like syndrome. *Science* 1987;235:790-793.
7. Bishop SA, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA, Stokes CR. Programmed cell death (apoptosis) as a mechanism of cell death in peripheral blood mononuclear cells from cats infected with feline immunodeficiency virus (FIV). *Clin Exp Immunol* 1993;93:65-71.
8. Ohno K, Nakano T, Matsumoto Y, Watari T, Goitsuka R, Nakayama H, *et al.* Apoptosis induced by tumor necrosis factor in cells chronically infected with feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1993;67:2429-2433.
9. Ohno K, Okamoto Y, Miyazawa T, Mikami T, Watari T, Goitsuka R, *et al.* Induction of apoptosis in a T-lymphoblastoid cell line infected with feline immunodeficiency virus. *Arch Virol* 1994;135:153-158.
10. Momoi Y, Takuya M, Nishimura Y, Endo Y, Ohno K, Watari T, *et al.* Detection of apoptosis induced in peripheral blood lymphocytes from cats infected with feline immunodeficiency virus. *Arch Virol* 1996;141:1651-1659.
11. Roederer M, Staal FJ, Raju PA, Ela SW, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Cytokine-stimulated VIH replication is inhibited by N-acetylcysteine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4884-4888.
12. Eck HP, Gmunder H, Hartmann M, Petzoldt D, Daniel V, Droge W. Low concentration of acid-soluble thiol (cysteine) in the blood plasma of VIH-1-infected patients. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1989;370:101-108.
13. Greenspan HC, Aruoma OI. Oxidative stress and apoptosis in VIH infection: a role for plant-derived metabolites with synergistic antioxidants activity (review). *Immunol Today* 1994;15:209-213.
14. McGowan AJ, Fernandes RS, Samali A, Cotter TG. Anti-oxidants and apoptosis (review). *Biochem Soc Trans* 1996;24:229-233.
15. Mathieu J, Chancerelle Y, Herodin F, Multon E, Drouet M, Mestries JC, *et al.* Oxidative stress and apoptosis (review). *Ann Pharm Fr* 1996;54:193-201.
16. Boman G, Backer U, Larsson S, Melander B, Wahlander L. Oral acetylcysteine reduces exacerbation rate in chronic bronchitis: report of a trial organized by the Swedish Society for Pulmonary Diseases. *Eur J Respir Dis* 1983;64:405-415.
17. British Thoracic Society Research Committee. Oral N-acetylcysteine and exacerbation rates in patients with chronic bronchitis and severe airways obstruction. *Thorax* 1985;40:832-835.
18. Moldeus P, Cotgreave IA, Bergren M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration* 1986;50:31-42.
19. Klenner FR. Observations on the dose and administration of ascorbic acid when employed beyond the range of a vitamin in human pathology. *J Appl Nutr* 1971;23:61-87.
20. Cathcart RF. Vitamin C: titrating to bowel tolerance, anascorbemia, and acute induced scurvy. *Med Hypotheses* 1981;5:54-58.
21. Harakeh S, Jariwalla RJ, Pauling L. Suppression of human immunodeficiency virus replication by ascorbate in chronically and acutely infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7245-7249.
22. Schreiber SL. Immunophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signaling pathways. *Cell* 1992;70:365-368.
23. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992;13:136-142.
24. Sigal NH, Dumont FJ. Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Ann Rev Immunol* 1992;10:519-560.
25. Mrtola E, Okuda M, Ohno K, Watari T, Tsujimoto H, Hasegawa A. Inhibition of apoptosis and virus replication in feline immunodeficiency virus-infected cells by N-acetylcysteine and ascorbic acid. *J Vet Med Sci* 1998;60:1181-1185.
26. Mrtola E, Endo Y, Ohno K, Watari T, Tsujimoto H, Hasegawa A. The use of two immunosuppressive drugs: CsA and FK 506 to inhibit viral replication and apoptosis in cells infected with feline immunodeficiency virus. *Vet Res Comm* 1998;22:553-563.
27. Crandell RA, Fabricant CG, Nelson-Rees WA. Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *In vitro* 1973;9:176-185.

28. Miyazawa T, Furuya T, Itagaki S, Tohya Y, Nakano K, Takahashi E, Mikami T. Preliminary comparisons of the biological properties of two strains of feline immunodeficiency virus (VIF) isolated in Japan with VIF Petaluma strain isolated in the United States. *Arch Virol* 1989;108:59-68.
29. Bissell MJ, Hatie C, Farson DA, Schwarz RI, Soo WJ. Ascorbic acid inhibits replication and infectivity of avian RNA tumor virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:2711-2715.
30. De-Vries N, De-Flora S. N-acetyl-L-cysteine. *J Cell Biochem Suppl* 1993;17F:270-277.
31. Roederer M, Ela SW, Frank JT, Staal FJ, Herzenberg L. N-acetylcysteine: a new approach to anti-VIH therapy. *AIDS Res Hum Retrovir* 1992;8:209-217.
32. Poli G, Bressler P, Kinter A, Duh E, Timmer WC, Rabson A, *et al.* Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor-alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Exp Med* 1990;172:151-158.
33. Luban J, Bossolt KL, Franke E, Kalpana GV, Goff SP. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilin A and B. *Cell* 1993;73:1067-1078.
34. Franke EK, Yuan HE, Luban J. Specific incorporation of cyclophilin A into VIH-1 virions. *Nature (London)* 1994;372:359-362.
35. Thali M, Bukovsky A, Kondo E. Functional association of a cyclophilin A with VIH-1 virions. *Nature* 1994;372:363-365.
36. Braaten D, Franke EK, Luban J. Cyclophilin A is required for the replication of group M human immunodeficiency virus type 1 (VIH-1) and simian immunodeficiency virus SIVcpz GAB but not group O VIH-1 or other primate immunodeficiency viruses. *J Virol* 1996;70:4220-4227.
37. Elder JH, Schnolzer M, Hasselkus-Light CS, Henson M, Lerner DA, Phillips TR, *et al.* Identification of proteolytic processing sites within the Gag and Pol polyproteins of feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1993;67:1869-1876.
38. Franke EK, Luban J. Inhibition of VIH-1 replication by cyclosporine A or related compounds correlates with the ability to disrupt the Gag-Cyclophilin A interaction. *Virology* 1996;222:279-282.
39. Bartz SR, Hohenwarter E, Hu M, Rich DH, Malkovsky M. Inhibition of human immunodeficiency virus replication by non-immunosuppressive analogs of cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5381-5385.
40. Karpas A, Lowdell M, Jacobson SK, Hill F. Inhibition of human immunodeficiency virus and growth of infected T cells by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8351-8355.
41. Steinkasserer A, Harrison H, Billich A, Hammerschmid F, Werner G, Wolff B, *et al.* Mode of action of SDZ NIM 811, a non-immunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus type 1 (VIH-1): interference with early and late events in VIH-1 replication. *J Virol* 1995;69:814-824.
42. Bishop SA, Williams NA, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA, Stokes CR. Impaired T-cell priming in cats infected with feline immunodeficiency virus (VIF). *AIDS* 1993;6:287-293.

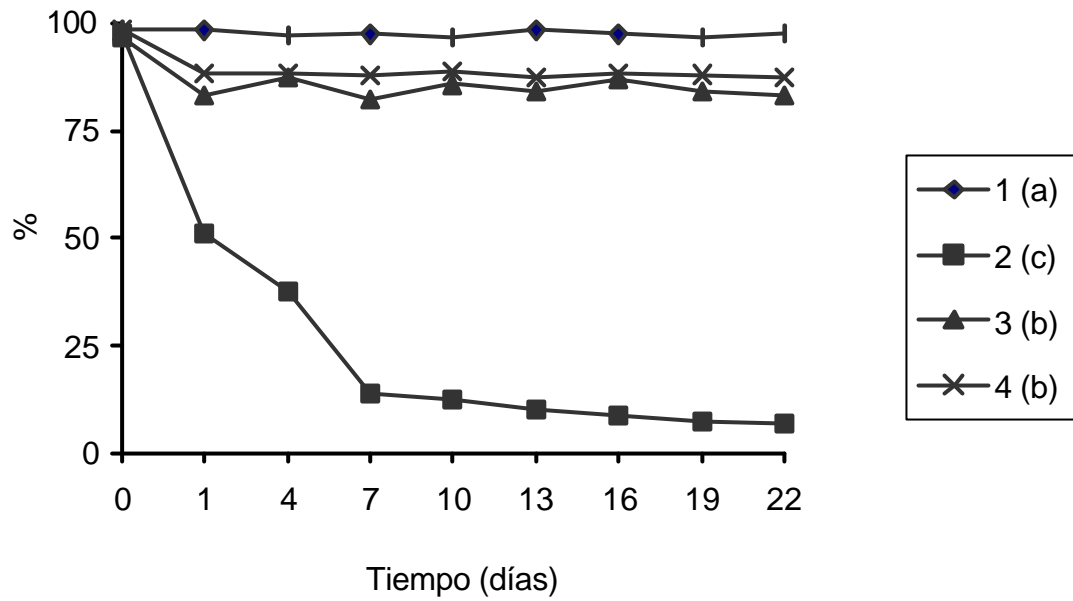


Figura 1a. Viabilidad celular: uso de NAC y AA.

Grupo 1: células CRFK/FIV; Grupo 2: células CRFK/FIV+TNF⁻; Grupo 3: células CRFK/FIV+TNF⁻+NAC; Grupo 4: células CRFK/FIV+TNF⁻+AA.

^{a, b, c} Grupos con diferente letra son significativamente diferentes (P < 0.05) Prueba de Fisher.

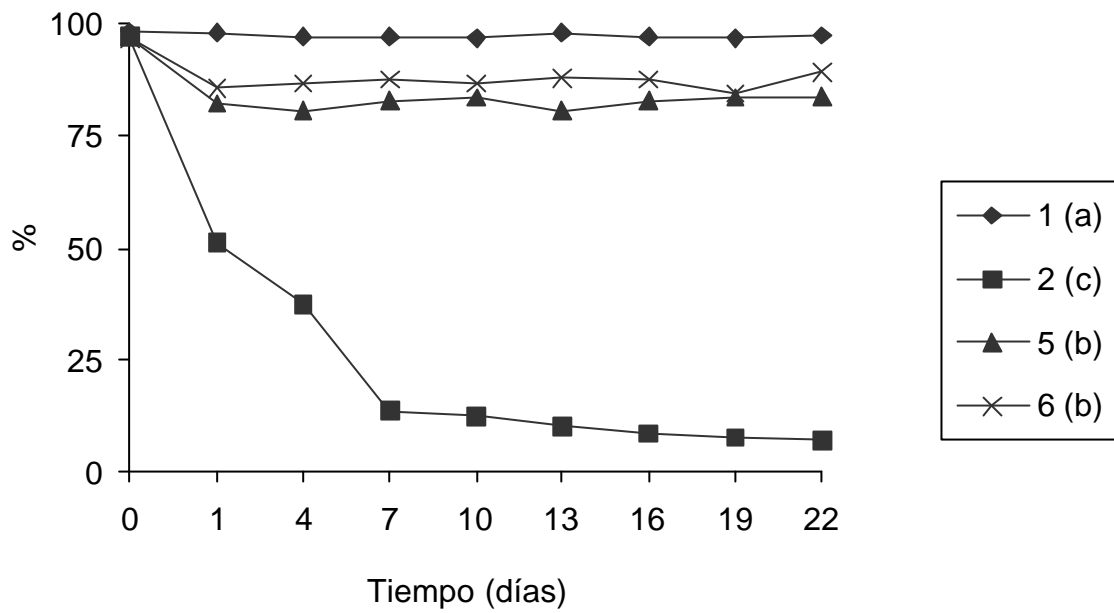


Figura 1b. Viabilidad celular: uso de CsA y FK506.

Grupo 1: células CRFK/FIV; Grupo 2: células CRFK/FIV+TNF⁻; Grupo 5: células CRFK/FIV+TNF⁻+CsA; Grupo 6: células CRFK/FIV+TNF⁻+FK506.

^{a, b, c} Grupos con diferente letra son significativamente diferentes (P < 0.05) Prueba de Fisher.

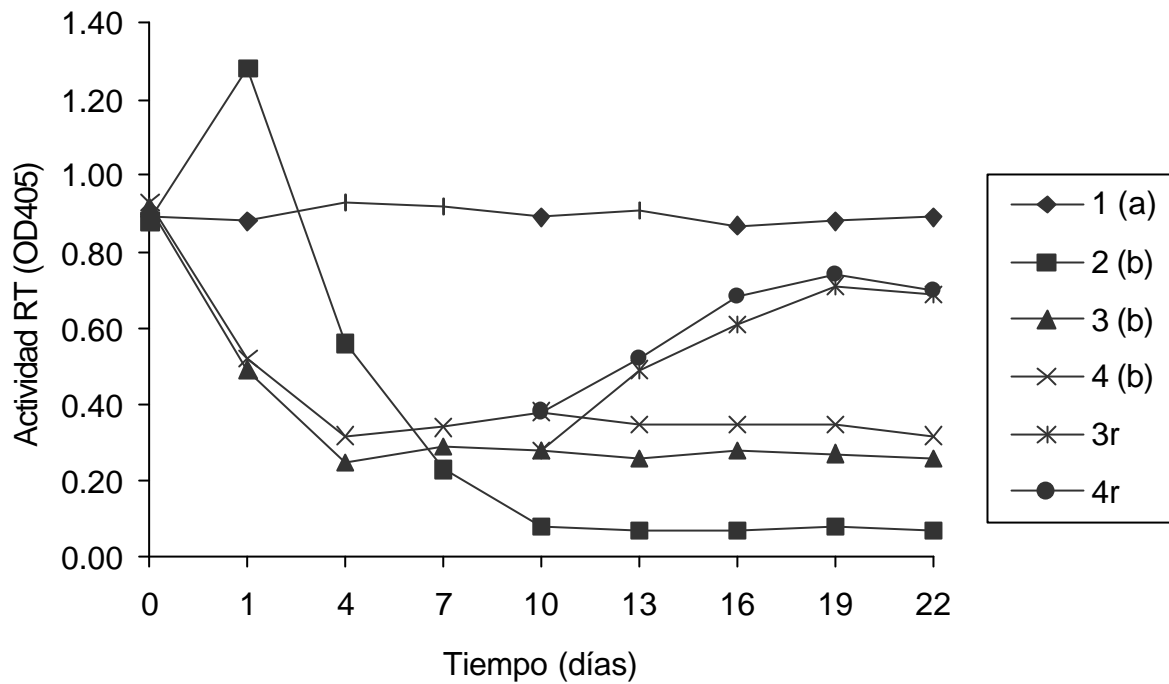


Figura 2a. Replicación viral: uso de NAC y AA.

Grupo 1: células CRFK/FIV; Grupo 2: células CRFK/FIV+TNF⁻; Grupo 3: células CRFK/FIV+TNF⁻+NAC; Grupo 4: células CRFK/FIV+TNF⁻+AA; Grupo 3r: células CRFK/FIV+TNF⁻+NAC luego de la remoción de NAC; Grupo 4r: células CRFK/FIV+TNF⁻+AA luego de la remoción de AA.

^{a, b} Grupos con diferente letra son significativamente diferentes (P < 0.05) Prueba de Fisher.

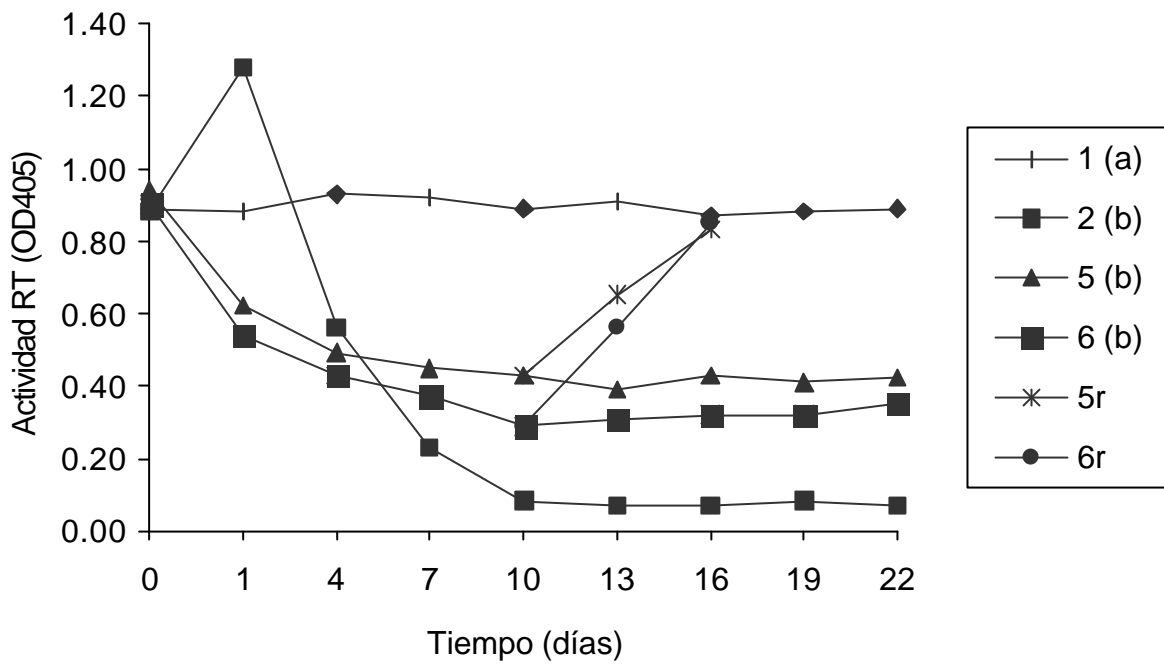


Figura 2b. Replicación viral: uso de csa y FK506.

Grupo 1: células CRFK/FIV; Grupo 2: células CRFK/FIV+TNF⁻; Grupo 5: células CRFK/FIV+TNF⁻ +CsA; Grupo 6: células CRFK/FIV+TNF⁻ +FK506; Grupo 5r: células CRFK/FIV+TNF⁻ +CsA luego de la remoción de CsA; Grupo 6r: células CRFK/FIV+TNF⁻ +FK506 luego de la remoción de FK506.

^{a, b} Grupos con diferente letra son significativamente diferentes

(P < 0.05) Prueba de Fisher.

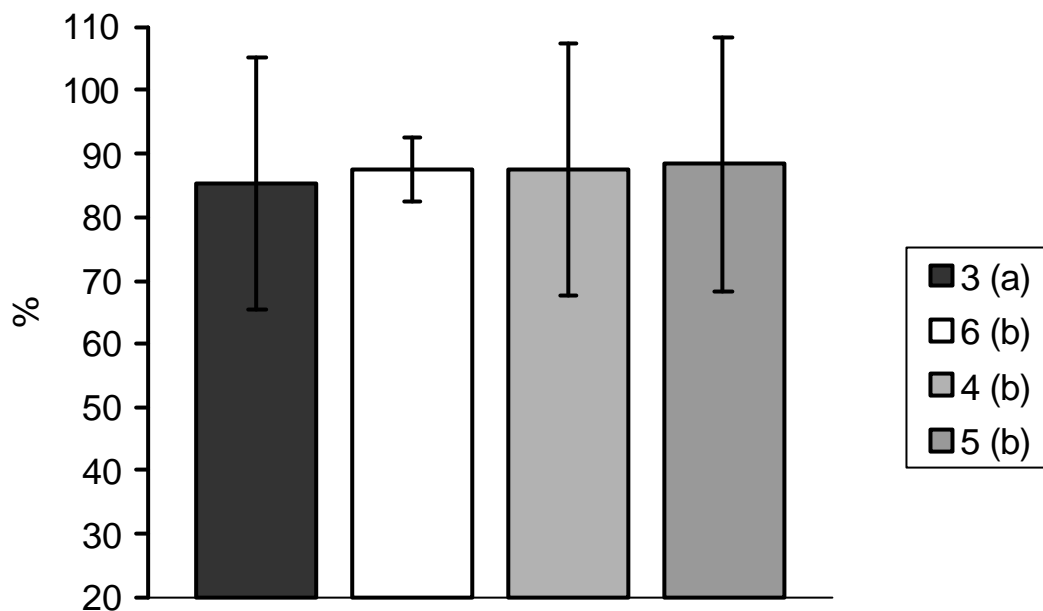


Figura 3 Porcentaje de la inhibición de la apoptosis con respecto al control celular infectado no tratado (CRFK/FIV+TNF⁻).

Grupo 3: células CRFK/FIV+TNF⁻ +NAC; Grupo 4: células CRFK/FIV+TNF⁻ +AA; Grupo 5: células CRFK/FIV+TNF⁻ +CsA; Grupo 6: células CRFK/FIV+TNF⁻ +FK506.

^{a,b} grupos con diferente letra son significativamente diferentes (P < 0.05) Prueba de Fisher.