



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MEXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES  
ANTIVIRALES DE EXTRACTOS DE ALGA  
MARINA CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE 2**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**MOISÉS MONZÓN GUALITO**

**ASESOR: M. EN C. SOCORRO SANDRA MARTÍNEZ ROBLES**

**CO-ASESORES: DRA. MARIA ESTHER RAMIREZ MORENO**

**DR. JUAN SANTIAGO SALAS BENITO**

**CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Evaluación de las propiedades antivirales de extractos de alga marina contra el virus del Dengue 2**

Que presenta el pasante: Moisés Monzón Gualito

Con número de cuenta: 304092129 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de abril de 2014.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
<b>VOCAL</b>	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Dr. Salvador Fonseca Coronado	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

*A mis padres, Juanita y Moisés, porque gracias a su amor incondicional, confianza, comprensión y apoyo, he culminado esta etapa de mi vida académica, que es para mí la mejor de las herencias. Este trabajo simboliza mis esfuerzos y logros que también son suyos.*

*Con todo mi amor.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Esther Ramírez y al Dr. Juan Salas, que bajo su dirección me brindaron de sus conocimientos, de su confianza, apoyo y sobretodo paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

A la Bióloga Mariana Salas por su valiosa colaboración y paciencia en el entrenamiento de cultivo celular y a todos los compañeros que laboran en el Laboratorio de Biomedicina Molecular 2 y 3, que también estuvieron presentes durante mi estancia en la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional.

Al Dr. Iván Murillo Álvarez, que proporcionó el material orgánico sin el cual no hubiese sido posible la realización de este trabajo y a sus alumnos Alejandro Marín Álvarez y Stephanie Castro Silva, además del Dr. Gustavo Hernández por proporcionar el material bibliográfico que fue de valiosa ayuda, quienes todos ellos forman parte del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas – IPN.

Al investigador Alejandro M.S. Mayer, por facilitarme parte de su investigación para que pudiera complementar algunos aspectos de este trabajo.

A mis hermanos, Rafael y Gabriela, porque gracias a sus consejos y experiencias, me ayudaron a superar algunas crisis existenciales y momentos de pesadumbre. Gracias por su amor incondicional y cuidar siempre de su hermano pequeño.

A mis amigas Oscar, Guillermo, Martin, David y Gabriel, por toda la fiestota pero también por sus consejos, y también a mi amigas Anel, Mónica, Xiomara y Elena por aguantarme en mis peores momentos. Por ahí dicen que los amigos son la familia que uno escoge, gracias por todo queridos hermanos y hermanas.

A Anel García Laguna, por ayudarme a equilibrar una parte de mí que me hacía falta, por reescribir la historia de un Gato Mallado, por tu cariño y por tus palabras de aliento en algunos días funestos.

A Elena Serrano Zaragoza, por soportarme durante tanto tiempo y no haber huido en el intento. Las palabras no son suficientes para expresarte el afecto que te tengo. En verdad, gracias por todo.

A Tigre, Bruno, Beto, Jimmy, Ixtapaluco, Toño, Checador, Mariana, Rulo, Maricela, Carito Hutch y a harta banda de la (de)Generación 35 de Q.F.B. que me hace falta mencionar, pero que también fueron personas importantes en esta etapa de mi vida.

También a algunos profesores de la carrera, gracias por su entrega y paciencia.

Y por último, pero no menos importantes, a mis sinodales que se tomaron tiempo de hacer las observaciones necesarias para mejorar este trabajo.

## APOYOS RECIBIDOS

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Biomedicina Molecular 2 y 3 de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía –IPN, bajo la dirección de la Dra. María Esther Ramírez Moreno y del Dr. Juan Salas Benito

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de proyecto 130710 y de la Secretaría de Investigación y Posgrado - IPN con el proyecto número 20130688, y a través de la Secretaría de Investigación y Posgrado, de Instituto Politécnico Nacional, con el proyecto número 20130754.

*"Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes".  
-Isaac Newton*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>i</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>iv</b>
<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
1.1 Dengue.....	1
1.2 Vector.....	1
1.3 Transmisión.....	3
1.4 Patogénesis .....	4
1.5 Manifestaciones clínicas .....	8
1.6 Virus.....	11
1.7 Proteínas virales .....	12
1.8 Ciclo viral.....	14
1.9 Tratamiento .....	16
1.10 Vacunación .....	19
1.11 Acciones de control.....	20
1.12 Epidemiología .....	21
1.13 El alga marina de género <i>Codium</i> .....	22
1.14 Actividad antiviral de algas del género <i>Codium</i> .....	23
1.15 El alga marina de género <i>Macrocystis</i> .....	24
1.16 Actividad antiviral de algas del género <i>Macrocystis</i> .....	25
<b>2. JUSTIFICACION .....</b>	<b>26</b>
<b>3. HIPOTESIS .....</b>	<b>27</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>27</b>
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
<b>5. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>28</b>
<b>6. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>29</b>
6.1 <i>Codium amplivesiculatum</i> .....	29
6.1.1 Recolección del material biológico.....	29
6.1.2 Obtención de extractos orgánicos .....	29
6.1.3 Fraccionamiento y aislamiento de compuestos .....	29
6.2 <i>Macrocystis pyrifera</i> .....	31
6.2.1 Recolección del material biológico.....	31
6.2.2 Obtención de extractos, fraccionamiento y caracterización .....	32
6.3 Línea celular HuH-7 .....	33

6.4 Propagación de la línea celular .....	33
6.5 Virus.....	34
6.6 Preparación de extractos .....	34
6.6.1 Compuestos del alga parda <i>Codium amplivesiculatum</i> .....	35
6.6.2 Compuestos del alga parda <i>Macrocystis pyrifera</i> .....	35
6.7 Ensayos de citotoxicidad.....	35
6.8 Determinación del número de células para sembrado en placa.....	36
6.9 Ensayos .....	36
6.9.1 <i>Codium amplivesiculatum</i> .....	36
6.9.2 <i>Macrocystis pyrifera</i> .....	38
6.10 Infección de la línea celular HuH-7 con DENV-2.....	38
6.11 Determinación semicuantitativa de la infección por la técnica de Platelía .....	39
6.12 Evaluación del efecto antiviral de extractos de <i>Codium amplivesiculatum</i> .....	39
6.13 Evaluación del efecto antiviral de extractos de <i>Macrocystis pyrifera</i> .....	40
6.14 Análisis estadístico .....	40
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
7.1 Determinación del número de células para los ensayos de citotoxicidad....	41
7.2 Ensayos de citotoxicidad de los extractos sobre células de mamífero HuH-7.....	42
7.2.1 <i>Codium amplivesiculatum</i> .....	42
7.2.2 <i>Macrocystis pyrifera</i> .....	44
7.3 Ensayos para la detección de la partícula NS1 .....	45
7.3.1 Infección del DENV-2 en células HuH-7 .....	46
7.4 Actividad antiviral de fracciones de <i>Codium amplivesiculatum</i> .....	47
7.5 Actividad antiviral de fracciones de <i>Macrocystis pyrifera</i> .....	48
<b>8. DISCUSION .....</b>	<b>49</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
<b>11. REFERENCIAS .....</b>	<b>56</b>
<b>12. ANEXOS .....</b>	<b>63</b>
Anexo 1 Método de titulación de DENV-2.....	63
Anexo 2 Cálculos para determinar la Multiplicidad de Infección (MOI) .....	64

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Aedes aegypti</i> (der.) y <i>Aedes albopictus</i> (izq.), principales especies de mosquito transmisores del virus del dengue .....	2
<b>Figura 2.</b> Distribución del virus del dengue a nivel mundial .....	3
<b>Figura 3.</b> Eventos de infección mediados por anticuerpos .....	5
<b>Figura 4.</b> Respuesta y función de anticuerpos a los blancos proteicos del virus del dengue .....	6
<b>Figura 5.</b> Interacción del virus sobre la membrana celular .....	8
<b>Figura 6.</b> Material genómico del virus del dengue .....	12
<b>Figura 7.</b> Ciclo de maduración del virus del dengue .....	15
<b>Figura 8.</b> Incidencia y serotipos aislados de casos de dengue por entidad federativa en México .....	22
<b>Figura 9.</b> Diagrama de fraccionamiento de <i>Codium amplivesiculatum</i> .....	31
<b>Figura 10.</b> Diagrama de fraccionamiento de <i>Macrocystis pyrifera</i> .....	32
<b>Figura 11.</b> Determinación del número de células óptimo para el cultivo en placa .....	41
<b>Figura 12.</b> Evaluación del efecto citotóxico del compuesto CC13 sobre la línea celular HuH-7 .....	42
<b>Figura 13.</b> Evaluación del efecto citotóxico de la fracción CC20 de <i>C. amp.</i> sobre la línea celular HuH-7 .....	43
<b>Figura 14.</b> Evaluación del efecto citotóxico de la fracción F1A del alga <i>Macrocystis pyrifera</i> sobre la línea celular HuH-7 .....	44
<b>Figura 15.</b> Evaluación del efecto citotóxico de la fracción F2A del alga <i>M. pyr.</i> sobre la línea celular HuH-7 .....	45
<b>Figura 16.</b> Grupo control para los ensayos de evaluación del efecto antiviral de los extractos de alga marina .....	46
<b>Figura 17.</b> Evaluación del efecto antiviral de dos fracciones de <i>C. amplivesiculatum</i> en células HuH-7 infectadas con DENV-2 .....	47
<b>Figura 18.</b> Determinación del efecto antiviral de <i>M. pyrifera</i> en células HuH-7 infectadas con DENV-2 .....	48

## ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
Å	ångström
µg	microgramos
µL	microlitro
<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
<b>AcMo</b>	Anticuerpos monoclonales
<b>ADE</b>	Potenciación Dependiente de Anticuerpos, del inglés <i>Antibody-Dependent Enhancement</i>
<b>BHK</b>	del inglés, <i>Baby Hamster Kidney</i>
<b><i>C. amp.</i></b>	<i>Codium amplivesiculatum</i>
<b>CD</b>	Cúmulo de diferenciación, del inglés <i>Cluster of Differentiation</i>
<b>CICIMAR</b>	Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas
<b>cm</b>	centímetros
<b>DC-SIGN</b>	del inglés, <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
<b>DENV</b>	Virus del Dengue
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico, del inglés <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoenzimático, del inglés <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>Fc</b>	Fracción cristalizante de los anticuerpos
<b>FD</b>	Fiebre por dengue
<b>FHD</b>	Fiebre hemorrágica por dengue
<b>g</b>	gramos
<b>h</b>	hora
<b>h.p.i.</b>	horas post-infección
<b>HCT-15</b>	Línea celular tumoral de cáncer de colon
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IgG, IgM</b>	Inmunoglobulina G e Inmunoglobulina M
<b>IL-#</b>	Interleucina - #
<b>IPN</b>	Instituto Politécnico Nacional
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>LAV</b>	Virus vivo atenuado, del inglés <i>Live Attenuated Virus</i>
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>M</b>	Molar
<b>m</b>	metros
<b><i>M. pyr.</i></b>	<i>Macrocystis pyrifera</i>

<b>MCF-7</b>	Línea celular tumoral de cáncer de mama
<b>MCP-1</b>	Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1, del inglés <i>Monocytes Chemoattractant Protein 1</i>
<b>mg</b>	miligramos
<b>mL</b>	mililitro
<b>MOI</b>	Multiplicidad de Infección, del inglés <i>Multiplicity Of Infection</i>
<b>N</b>	Normal
<b>nm</b>	nanómetros
<b>PBS</b>	Buffer Fosfato Salino, del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PIV</b>	Virus Inactivado Purificado, del inglés <i>Purified Inactivated Virus</i>
<b>RNA</b>	Acido ribonucleico, del inglés <i>Ribonucleic Acid</i>
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SSD</b>	Síndrome de Shock por Dengue
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral, del inglés <i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>VLP</b>	Partículas similares a virus, del inglés <i>Virus-Like Particles</i>
<b>VSV</b>	Virus de la estomatitis vesicular
<b>WHO</b>	World Health Organization

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la actividad citotóxica y antiviral de extractos de algas marinas (*Codium amplivesiculatum* y *Macrocystis pyrifera*), las cuales fueron recolectadas en las costas de Baja California Sur, México. Para la evaluación citotóxica y los posteriores ensayos virucidas se utilizó la línea celular HuH-7 derivada de hepatoma humano y el virus utilizado fue el serotipo 2 del Virus del Dengue.

Tomando en cuenta que dicho virus representa un problema actual de salud pública y el desarrollo de una vacuna contra el mismo aún se encuentra en fases de desarrollo, es necesario explorar alternativas naturales para combatir los padecimientos que el virus provoca. Estudios han demostrado la actividad biológica de distintos géneros de algas con resultados significativos en modelos celulares *in vitro*, sin embargo, aun no se esclarecen los mecanismos moleculares que se llevan a cabo a este nivel, debido principalmente por la heterogeneidad de los compuestos presentes en las algas.

Por otro lado, los extractos de las dos algas marinas *Codium amplivesiculatum* y *Macrocystis pyrifera*, muestran actividad a diferentes concentraciones contra el virus del Dengue 2, disminuyendo los títulos de la proteína NS1, la cual es una de los principales indicadores en sangre circulante de infección por dengue en los primeros días de infección.

# 1. INTRODUCCION

## 1.1 Dengue

El dengue es una enfermedad infecciosa de causa viral que ha reemergido en las últimas décadas con una distribución geográfica expandida que ha incrementado la actividad epidémica, el desarrollo de hiperendemicidad (la co-circulación de múltiples serotipos) y la emergencia del dengue hemorrágico en nuevas regiones geográficas (Mercado, 2003), siendo esta enfermedad una de las más importantes transmitidas por artrópodos en términos de morbilidad, constituye un reto para la salud pública ya que aún no se dispone de una vacuna y las medidas de control del vector solo tienen un carácter reactivo. Aunque las tasas de mortalidad del dengue son relativamente bajas comparadas con otras enfermedades infecciosas como la malaria, el dengue se extiende y afecta cada vez más a sistemas de salud con bajos recursos (Sanchez *et al*, 2008).

La infección por dengue es transmitida a los humanos por mosquitos del género *Aedes* (que previamente recibieron el virus de personas infectadas en la fase de viremia), siendo la principal especie *Aedes aegypti* en términos de contagio (Mojica, 1999).

## 1.2 Vector

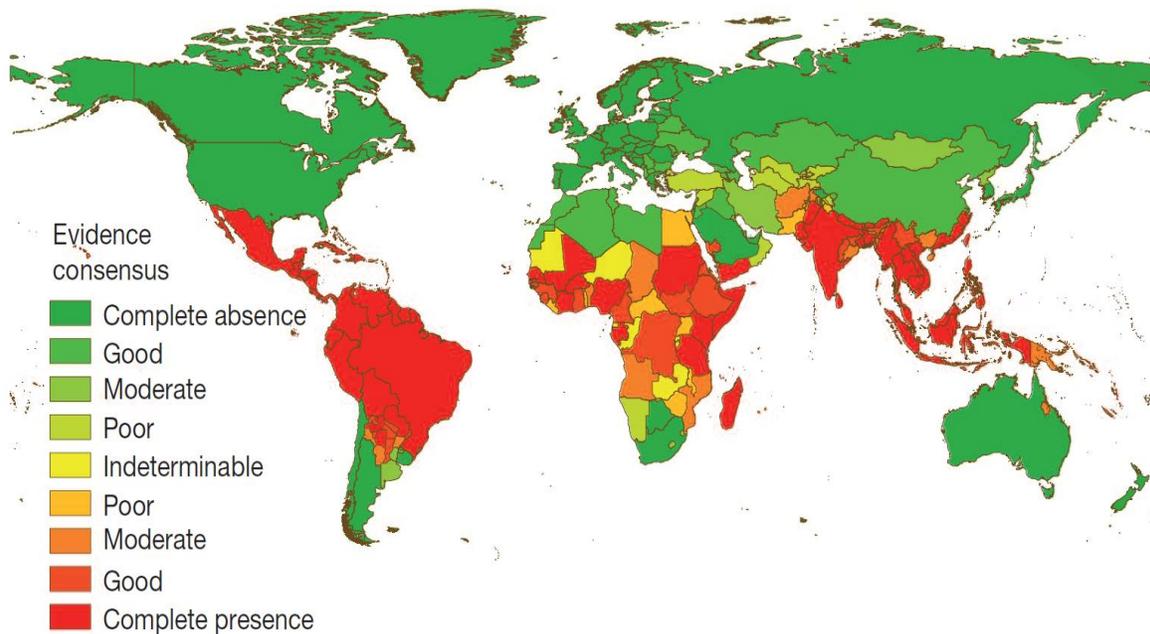
Existen varias especies de mosquitos en el mundo que han sido asociados a la transmisión de los virus del dengue y todas ellas pertenecen al subgénero *Aedes* (*Stegomyia*). Especialmente importantes son *Aedes aegypti* (Linneo, 1762) y *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), sin embargo, el primero es el principal responsable de la transmisión en el mundo (Ibañez y Gomez, 1995).



**Figura 1. *Aedes aegypti* (der.) y *Aedes albopictus* (izq.), principales especies de mosquito transmisoras del virus del dengue.**

La especie *Aedes aegypti* probablemente es originaria de Etiopía. En el continente africano existen tres formas. Una es la forma típica, otra *Ae. aegypti queenslandensis* y *Ae. aegypti formosus*; este último es un mosquito selvático de color más oscuro y talla pequeña. Únicamente *Ae. aegypti* se encuentra en el continente americano y muy probablemente las formas inmaduras fueron introducidas en los barriles de agua de los barcos durante las primeras exploraciones y colonizaciones europeas; les tomó décadas adecuarse y dispersarse por el Caribe y establecerse en el continente, lográndolo debido a que el tránsito marítimo se intensificó en esta región desde entonces (Thirion, 2010).

De esta forma, se le considera cosmotropical, presente en las regiones del globo entre las isothermas de 20°C, y más recientemente con distribución circuntropical y subtropical, dentro de los límites de la isoterma de verano de 10°C con ciertas expansiones a regiones más frías en las épocas del año más calurosas. En términos generales se le ha encontrado en áreas geográficas con una temperatura media anual mayor a los 16.9°C (Ibañez y Gomez, 1995).



**Figura 2. Distribución del virus del dengue a nivel mundial.** En verde se muestran los países con ausencia completa hasta países en color rojo, donde hay presencia completa del virus (Bhatt *et al*, 2013).

### 1.3 Transmisión

El mosquito es predominantemente urbano, aunque se encuentra también en zonas rurales y suburbanas. Se cría en recipientes artificiales y naturales dentro o en los alrededores de las viviendas humanas, como son barriles, cisternas, floreros, llantas, recipientes diversos, agujeros en árboles o entre las hojas de plantas. Los huevos son depositados en áreas húmedas, sombreadas y sobre todo en agua limpia. La precipitación pluvial mantiene los cuerpos de agua adecuados para su crianza, pero en épocas de sequía o en áreas con escasa precipitación; el patrón humano de acumular agua para el consumo favorece el establecimiento, proliferación y continuidad generacional de la especie. La hembra succiona la sangre del hombre y también de animales domésticos (Fonseca, 2000).

*Aedes aegypti* adquiere la infección al picar a un individuo enfermo desde antes de la aparición de la fiebre y durante la etapa febril. Existe un periodo mínimo de 6 a 8

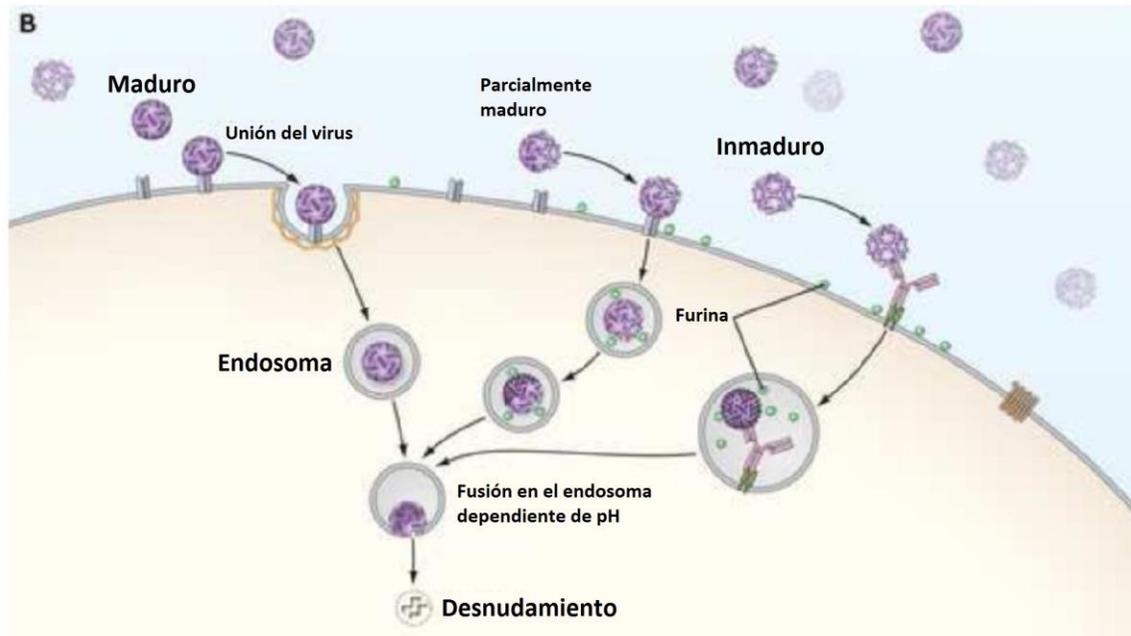
días necesario para que el mosquito reproduzca al virus en su tubo digestivo y se vuelva infectante y capaz de transmitir la infección y funcionar como vector el resto de su vida. Existen múltiples factores que influyen en la capacidad del vector para transmitir la infección y están en estrecha relación con la preferencia por un huésped humano, los hábitos de picadura, la susceptibilidad del vector y del hospedero, la densidad vectorial, su longevidad y las variables del microambiente: temperatura, clima, lluvias, humedad y vegetación. La interacción de todas estas variables determinan la probabilidad y la intensidad de la transmisión (Fonseca, 2000).

#### **1.4 Patogénesis**

##### *Potenciación dependiente de anticuerpos y otros eventos mediados por anticuerpos*

Durante infecciones secundarias con un serotipo heterotípico del DENV, extensa evidencia de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren fuertemente que niveles pre-existentes, subneutralizantes y no protectivos de anticuerpos contra el dengue potencian la replicación viral en células que llevan receptores Fc, especialmente en monocitos y macrófagos. Han sido implicados anticuerpos IgG así como potenciación vía IgM y receptores C3 del complemento. El aumento de la replicación del DENV en estas células blanco son probablemente responsables por los altos niveles de viremia en las etapas tempranas de la enfermedad que han sido correlacionadas con la incidencia de FHD. Además de la potenciación dependiente de anticuerpos (ADE), también han sido implicados anticuerpos de reacción cruzada dirigidos contra la proteína no estructural NS1 del DENV, que causan daño a células endoteliales. Estudios *in vitro* indican que la producción de citocinas y quimiocinas en células endoteliales, incluyendo interleucina-6 (IL-6), IL-8 y MCP-1, se incrementaron después de tratarlas con anticuerpos anti-NS1 sugiriendo la posibilidad de una patogénesis autoinmune en FHD/SSD basado en un 'mimetismo molecular'. Además, los anticuerpos tienen una reacción cruzada potencial con el plasminógeno (debido a una similitud en la glicoproteína de

envoltura del dengue y una familia de factores de la coagulación) lo que podría jugar un rol en la etiología de la hemorragia en FHD/SSD (Pang *et al*, 2007).



**Figura 3. Eventos de infección mediados por anticuerpos.** La presencia de la proteasa furina en compartimentos endocíticos aumenta la posibilidad de que la proteína prM sobre viriones parcialmente maduros e inmaduros puedan ser procesados durante la entrada, contribuyendo al incremento de la infectividad aumentando la concentración de anticuerpos (Pierson y Diamond, 2012).

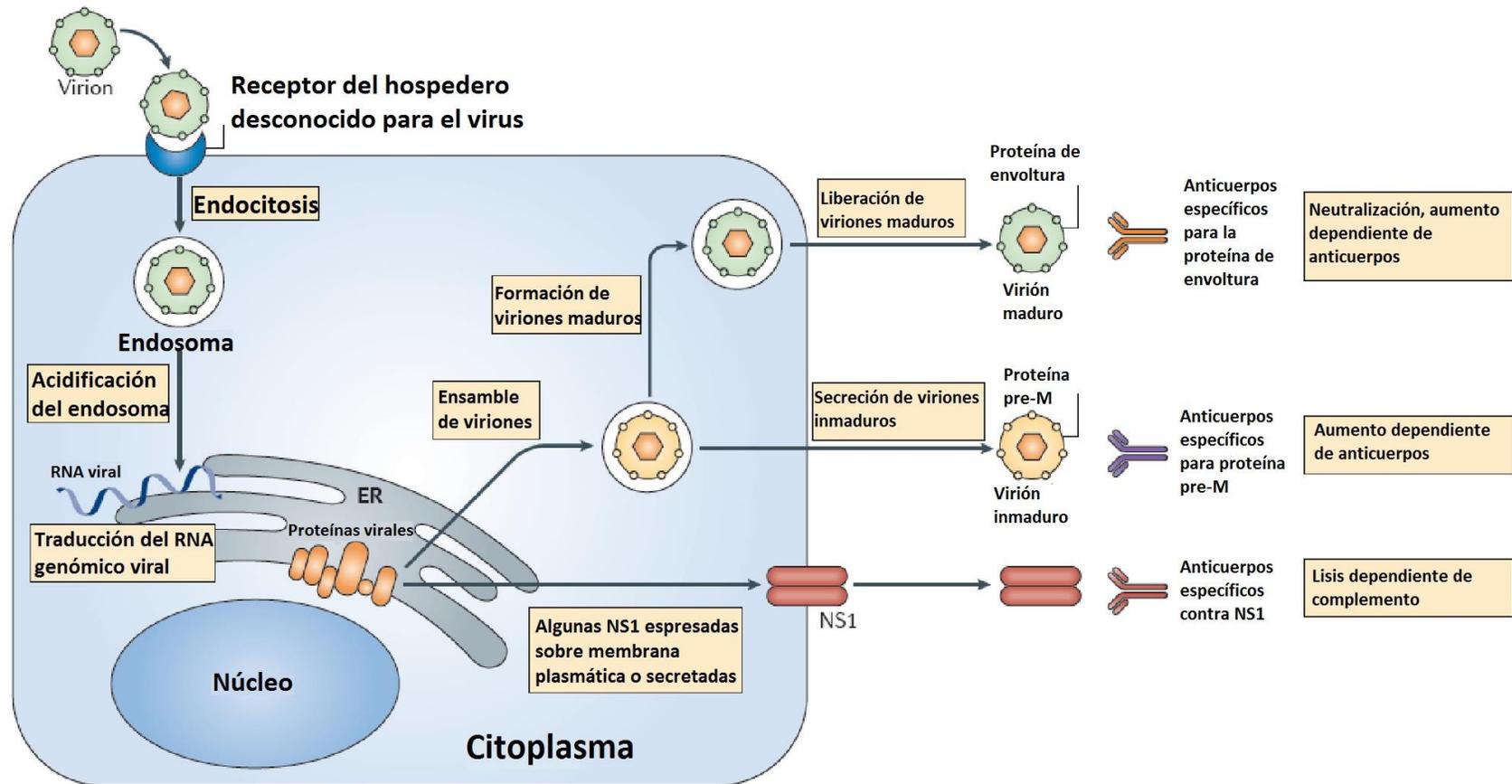


Figura 4. Respuesta y función de anticuerpos a los blancos proteicos del virus del dengue (Rothman, 2011).

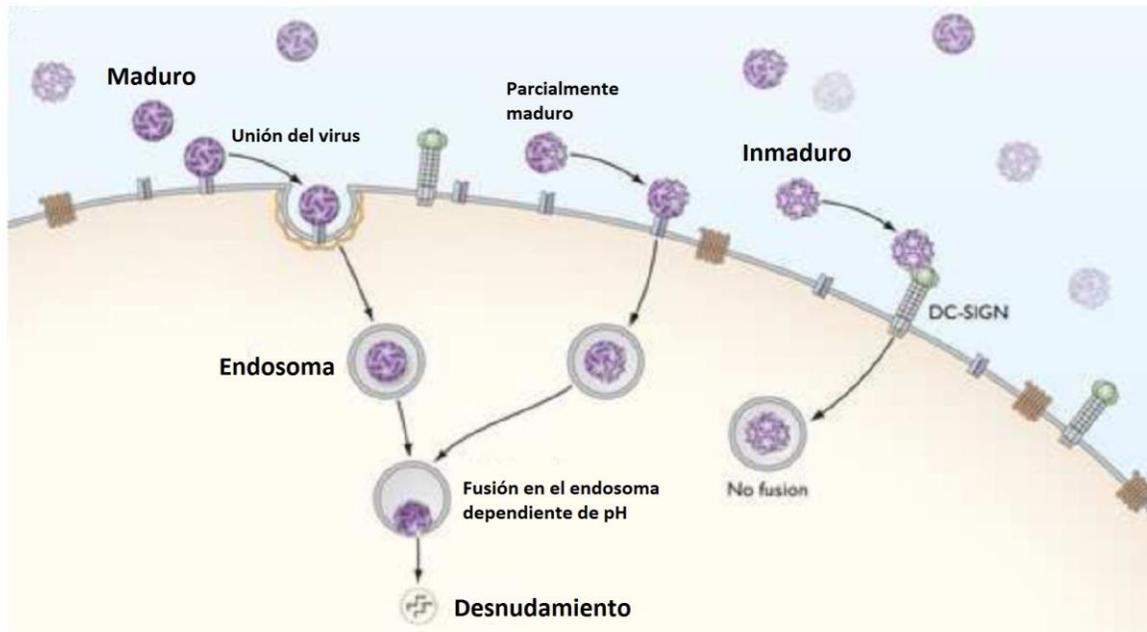
### *Activación de las células T*

Hay fuerte evidencia de la activación de células T in vivo durante la infección por DENV, y tal activación de células T CD4+ y CD8+ es mayor en pacientes con FHD que en aquellos con fiebre leve del dengue. Siguiendo la ADE de la replicación viral en monocitos y macrófagos, los antígenos virales son presentados en conjunto con moléculas antigénicas de linfocito humano sobre las superficies de dichas células. Esto es entonces seguido por la activación de las células T de memoria CD4+ y CD8+, sensibilizadas durante una infección previa, dando lugar a la proliferación y liberación de citocinas proinflamatorias como el interferón gamma ( $IFN\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ). Estas citocinas pueden actuar directamente sobre células del endotelio vascular resultando en una filtración plasmática (Pang *et al*, 2007).

### *Cascadas de citocinas*

Actualmente se cree que, seguido de una activación masiva de células T de memoria, una cascada de citocinas dirigidas a células del endotelio vascular son principalmente responsables del evento patológico crítico de crear un efecto de “tamizado” llevando a una filtración de proteínas y fluidos. Altas concentraciones de dichas citocinas, liberadas principalmente por células T, monocitos/macrófagos y células endoteliales han demostrado su existencia en el suero de pacientes con FHD/SSD y, además del  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$ , también se encuentran elevadas la IL-2, IL-6, IL-1- $\beta$  e IL-8. También es bien sabido que las citocinas pueden inducir el incremento y producción de otras citocinas. Las citocinas también suelen tener efectos sinérgicos, por ejemplo,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  e IL-1 juntas pueden inducir un mayor incremento en la permeabilidad comparado a cuando cada citocina está actuando por separado. Además,  $IFN\gamma$  es también capaz de sobrerregular la expresión de receptor del  $Fc\gamma$  sobre monocitos y macrófagos, facilitando entonces la replicación viral. La respuesta de citocinas esta clara y estrechamente vinculada a la activación de células T y similarmente, generalmente es aceptado que la secuencia ADE - replicación viral - activación de células T - liberación de citocinas

no es un proceso estrictamente lineal sino una compleja interacción de eventos patológicos que se refuerzan a sí mismos que en última instancia se manifiesta en FHD/SSD, incremento en la permeabilidad vascular y falla circulatoria (Pang *et al*, 2007).



**Figura 5. Interacción del virus sobre la membrana celular.** Los mecanismos de interacción con factores celulares sobre la superficie de células blanco dependen de los arreglos de la proteína E en viriones maduros, inmaduros y parcialmente maduros (Pierson y Diamond, 2012).

## 1.5 Manifestaciones clínicas

La infección por dengue tiene un amplio espectro clínico que incluye manifestaciones clínicas tanto severas como no severas. Después del periodo de incubación, la enfermedad comienza abruptamente y es seguida por las siguientes tres fases: febril, crítica y de recuperación (WHO, 2009).

### *Fase febril o Fiebre por Dengue (FD)*

Los pacientes típicamente desarrollan fiebre alta repentinamente. Esta fase aguda febril usualmente dura de 2-7 días y es a menudo acompañada por enrojecimiento facial, eritema de la piel, dolor corporal generalizado, mialgia, artralgia y dolor de cabeza. Algunos pacientes pueden presentar dolor de garganta, inflamación de faringe y conjuntiva. Anorexia, náusea y vómitos son comunes. Manifestaciones hemorrágicas leves como petequias y sangrado de las membranas mucosas (por ejemplo, nariz y encías) se pueden presentar. El hígado a menudo tiende a agrandarse y volverse sensible después de unos días de fiebre. La anomalía más temprana en los conteos sanguíneos es una disminución progresiva en el conteo total de células blancas (WHO, 2009).

### *Fase crítica o Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD)*

Cuando la temperatura desciende a 37.5 – 38°C o menos y permanece por debajo de este nivel, usualmente en los días 3-7 de la enfermedad, puede ocurrir un incremento en la permeabilidad capilar en paralelo con un incremento en los niveles de hematocrito. Esto marca el principio de la fase crítica. El periodo de una filtración plasmática clínicamente significativa usualmente dura 24-48 horas. Una leucopenia progresiva seguida de una rápida disminución en el conteo plaquetario usualmente precede a la filtración plasmática. El grado de aumento por encima de la línea base del hematocrito a menudo refleja la severidad de la filtración plasmática. El shock ocurre cuando un volumen crítico de plasma se pierde a través de la filtración. La temperatura corporal puede ser subnormal cuando el shock ocurre; con un shock prolongado, la consecuente hipoperfusión de los órganos resulta en un progresivo deterioro de los mismos, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada, que a su vez conduce a una hemorragia severa provocando la disminución del hematocrito y finalmente a un shock grave. En lugar de la leucopenia que suele presentarse durante esta fase de la infección, el conteo total de células blancas puede incrementar en pacientes con sangrado grave. Además, se puede desarrollar un deterioro grave de órganos como hepatitis

grave, encefalitis o miocarditis y/o sangrado grave sin una obvia filtración plasmática o shock (WHO, 2009).

#### *Fase de recuperación*

Si el paciente sobrevive las 24-48 horas de la fase crítica, una reabsorción gradual de fluido en el compartimiento extravascular se lleva a cabo en las siguientes 48-72 horas. El hematocrito se estabiliza y puede ser bajo debido al efecto de dilución de reabsorción de fluidos. El conteo de células blancas usualmente comienza a aumentar pronto después de la fiebre pero la recuperación del conteo plaquetario es típicamente después que el conteo de células blancas. La dificultad respiratoria debida a una efusión pleural masiva y ascitis pueden ocurrir en cualquier momento si se administraron fluidos intravenosos de manera excesiva. Durante las fases críticas y/o de recuperación, la terapia excesiva de fluidos está asociada con edema pulmonar o falla cardiaca congestiva (WHO, 2009).

#### *Dengue severo o Síndrome de Shock por Dengue (SSD)*

El dengue severo debe ser considerado si el paciente proviene de un área en riesgo por dengue presentando fiebre de 2-7 días más cualquiera de las siguientes características:

- Existe evidencia de pérdida plasmática, tal como:
  - Hematocrito alto o elevación progresiva.
  - Efusión pleural o ascitis.
  - Circulación comprometida o shock (taquicardia, extremidades húmedas y frías, tiempo de llenado capilar mayor a 3 segundos, pulso débil o indetectable, presión del pulso reducida o, en shock tardío, presión sanguínea inregistrable).
- Sangrado significativo.
- Nivel de conciencia alterado (letargo o inquietud, coma, convulsiones).
- Afectación gastrointestinal severa (vómito persistente, dolor abdominal intenso o creciente, ictericia).

- Deterioro de órganos severo (falla hepática aguda, falla renal aguda, encefalopatía o encefalitis, u otras manifestaciones inusuales, cardiomiopatía) y otras manifestaciones inusuales (WHO, 2009).

## 1.6 Virus

Existen cuatro serotipos del virus del dengue; Sabin y Schlesinger en 1945 fueron quienes aislaron las primeras cepas –Nueva Guinea y Hawaii- que posteriormente de denominaron DENV-1 y DENV-2. En 1957-1960 Hammon y sus colaboradores aislaron en las Filipinas los otros dos serotipos: DENV-3 y DENV-4. El DENV presenta una forma esférica con un radio aproximado de 250Å. Los cuatro serotipos de DENV (DENV-1 a -4), género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*), cuyo genoma consiste en una cadena simple de RNA de sentido positivo de aproximadamente 10,200 bases de longitud, rodeada por una nucleocápside y una envoltura lipídica que contiene las proteínas de la envoltura y la membrana. La proteína de la cápside o proteína C que junto con el RNA forma la nucleocápside, la cual es un complejo infeccioso. La proteína de membrana o M, que se sintetiza como un precursor llamado pre-M (prM) y la proteína E o de envoltura que presenta las principales funciones biológicas del virión como son: neutralización, tropismo celular, neurovirulencia, epítopes de tipo, grupo, familia y unión al receptor entre otros; y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b Y NS5) (Barreto dos Santos *et al*, 2002; Galarza, 2006; Encalada, 2008; Talarico, 2008).

## A. RNA genómico del virus DENV



## B. Traducción



**Figura 6. Material genómico del virus del dengue.** (A). Esquema de la organización del genoma del virus del dengue. (B). Esquema de la poliproteína sintetizada que muestra la organización de las proteínas estructurales (C, prM y E) y las no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5). (Velandia y Castellanos, 2011).

## 1.7 Proteínas virales

### *Proteínas estructurales*

#### Proteína C

La proteína de la cápside, también conocida como proteína *core* o de cubierta, posee aminoácidos de carácter básico que se asocian y unen fuertemente al RNA genómico recién sintetizado; de esta manera, se forma el complejo riboproteico o nucleocápside que protege al RNA de la degradación y promueve la organización del RNA en el interior de la partícula viral en formación. Además, la proteína de la cápside anclada en el retículo endoplásmico interactúa con las proteínas precursora de membrana (prM) y de envoltura, para favorecer y completar el ensamblaje de las partículas virales (Velandia y Castellanos, 2011).

#### Proteína precursora de membrana (prM) y proteína de membrana (M)

La proteína precursora de membrana (prM) está presente en los viriones inmaduros y junto con la proteína M participa fundamentalmente en el proceso de maduración de la partícula viral. La proteína tiene dos dominios transmembranales y un exodominio y podría estar involucrado en la muerte celular y el daño tisular sufrido durante la infección (Velandia y Castellanos, 2011).

### Proteína de envoltura E

La proteína de envoltura posee tres dominios denominados I, II, III y se distribuye sobre la superficie del virus, y son determinantes para las interacciones entre el virus y los receptores de las células vulnerables. Por otra parte, la glicoproteína E es el principal inmunógeno del virus, por lo tanto estimula la respuesta inmune del individuo e induce la producción de anticuerpos neutralizadores (Velandia y Castellanos, 2011).

La importancia funcional de la proteína E radica en que es la única proteína viral que interactúa con las moléculas receptoras de la membrana plasmática de las células vulnerables que favorecen las endocitosis del virus (Velandia y Castellanos, 2011).

### *Proteínas no estructurales (NS)*

La proteína NS1 puede estimular el sistema inmunitario. Se ha demostrado que las Ig contra la proteína NS1 puede estimular la lisis mediada por el complemento y dependiente de anticuerpos, tanto en células infectadas como no infectadas. Este último fenómeno podría explicar, los daños funcionales del endotelio, que conducen al sangrado y a la extravasación plasmática (Velandia y Castellanos, 2011).

La proteína NS2 promueve el ensamblaje y la replicación viral. Al parecer, la NS2a coordina el RNA genómico producido en cada ciclo de replicación y se utiliza como nueva plantilla para generar las formas replicativas. Por su parte, la proteína NS2b posee una región hidrofóbica que ancla a la membrana del retículo endoplásmico el complejo NS2b/NS3 y luego, por un procesamiento proteolítico, un pequeño dominio hidrofílico de NS2b recién liberado interactúa con el dominio proteasa de la proteína NS3 para actuar como cofactor de esta (Velandia y Castellanos, 2011).

La proteína NS3 es la encargada de generar el ambiente lipídico apropiado alrededor del retículo endoplásmico, al reclutar enzimas celulares de la vía de síntesis de lípidos (Fatty Acid Synthase), lo cual garantiza el inicio del ensamblaje.

La otra función de la proteína NS3 es actuar como helicasa (NS3Hel), enrollando las estructuras secundarias que se forman en el extremo 3' de RNA viral, para favorecer la unión de la polimerasa NS5 sobre el RNA y dar inicio a la replicación (Velandia y Castellanos, 2011).

Por último, la proteína NS5 es la más conservada entre todos los flavivirus, actúa como la única polimerasa durante la replicación y transcripción virales. Aunque estos procesos suceden exclusivamente en el citoplasma de la célula infectada, se ha identificado una señales de localización nuclear en la proteína NS5 que facilita su importación al núcleo; sin embargo, la razón y la función de la NS5 no se conocen (Velandia y Castellanos, 2011).

## **1.8 Ciclo viral**

Esta generalmente aceptado que para una infección productiva la entrada viral de los flavivirus se produciría a través de endocitosis mediada por receptor sobre todo de los miembros del linaje fagocíticos mononucleares (monocitos, macrófagos y células dendríticas) que son *in vivo* blancos primarios de DENV considerando que los receptores propuestos implicados en la entrada incluyen: heparán sulfato, Hps 70 (del inglés, Heat shock protein 70) y Hps 90, GRP78 (del inglés Glucose-Regulated Protein), CD14 y las DC-SIGN o CD209 (Talarico, 2008; Perez, 2010).

La adsorción del virus a la célula comienza con la unión de la glicoproteína E de la envoltura viral con un receptor de la membrana plasmática celular, seguida de la entrada de la partícula viral que conduce al desnudamiento y liberación del genoma viral en el citoplasma. El genoma viral es una molécula de RNA de polaridad positiva que posee en su extremo 5' una guanina metilada o "cap" y una secuencia que la une al ribosoma (IRES, del inglés "Internal Ribosome Entry Site"). Allí, el genoma es inmediatamente traducido a una única poliproteína, que es procesada por proteasas virales y celulares para producir simultáneamente todas las proteínas virales: las tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS), que cumplen diversas funciones en el ciclo. La RNA polimerasa RNA dependiente viral (NS5) asociada a otras proteínas NS,

replica el RNA genómico produciendo una molécula complementaria de RNA de polaridad positiva. Las réplicas de genoma viral son encapsidadas por la proteína C y luego, las nucleocápsides adquieren su envoltura por brotación a partir de la membrana del retículo endoplásmico hacia el espacio luminal. A partir de allí, las partículas virales son transportadas por el sistema exocítico secretorio hacia la superficie en tanto que las glicoproteínas virales adquieren su forma madura por procesamiento de los residuos hidrocarbonados en el sistema de Golgi y finalmente, los viriones son liberados al medio extracelular por fusión de la vesícula de transporte con la membrana plasmática (Damonte, 2006).

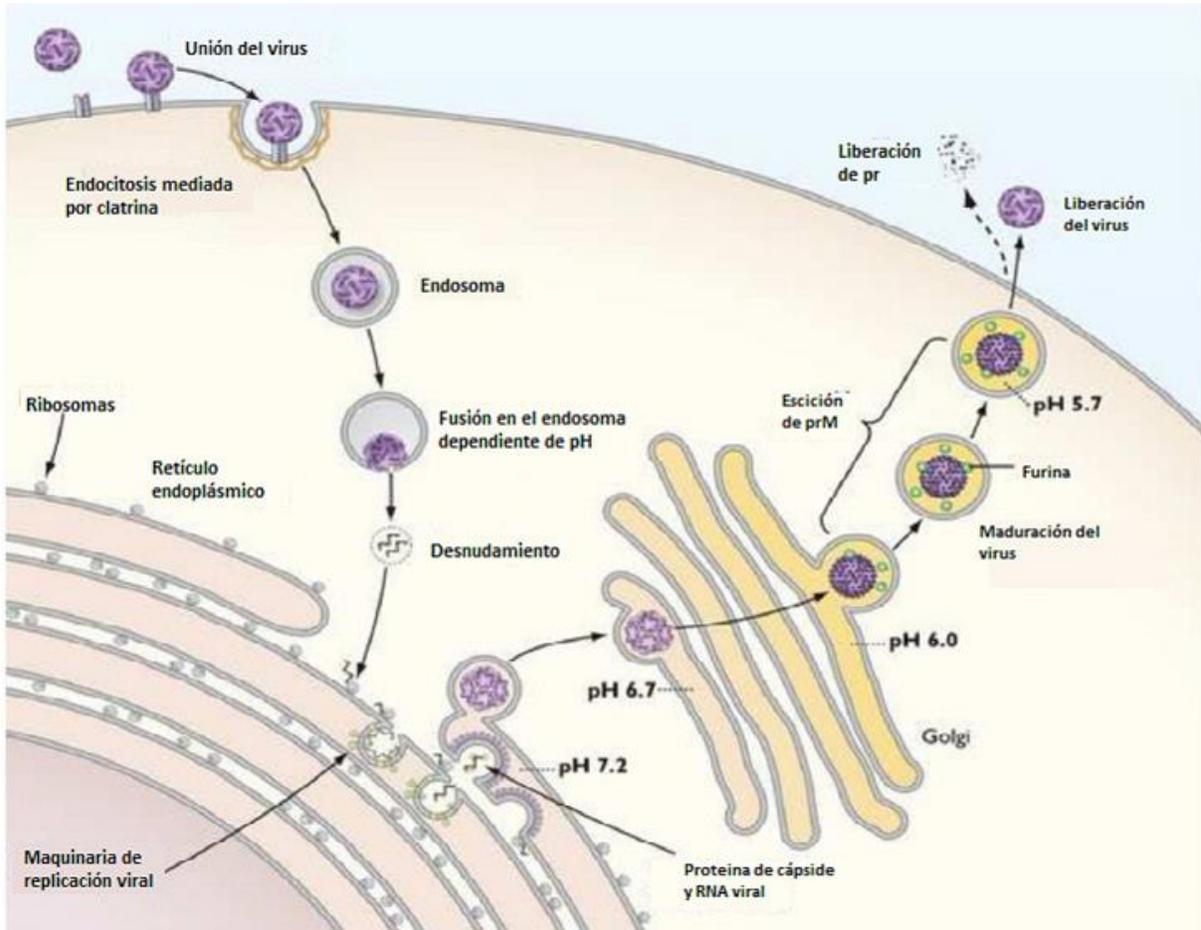


Figura 7. Ciclo de maduración del virus del dengue (Pierson y Diamond, 2012).

## 1.9 Tratamiento

Para una enfermedad que es compleja en sus manifestaciones, la gestión es relativamente simple, económica y muy efectiva para salvar vidas siempre y cuando se establezca una intervención correcta y oportuna. La clave es una identificación y entendimiento oportuno de los problemas clínicos durante las diferentes fases de la enfermedad, dando lugar a un buen enfoque del caso y resultados clínicos (WHO, 2009).

El tratamiento solo consiste en terapias de apoyo para reducir las consecuencias de la fiebre, deshidratación, hipotensión y hemorragias en el paciente, algunos lo han llamado “fisiológico intensivo” (Talarico, 2008; Ocazonez, 2010).

Durante la fase febril temprana, a menudo no es posible predecir clínicamente cuando se agrave la enfermedad en un paciente con dengue. Varias formas de manifestaciones graves pueden desarrollarse como un avance en la enfermedad a través de la fase crítica, pero signos de advertencia pueden ser buenos indicadores de un alto riesgo de desarrollar dengue severo. Luego entonces, los pacientes deberían tener evaluaciones ambulatorias del progreso de la enfermedad con una revisión cuidadosa de manifestaciones de dengue severo (WHO, 2009), las cuales se han mencionado con anterioridad.

El desarrollo de una quimioterapia para las infecciones por DENV requiere del conocimiento del ciclo de multiplicación viral, así como de las características estructurales y funcionales de las proteínas del virus, con el fin de dilucidar blancos potenciales para bloquear la infección y, de esta forma, obtener información para el diseño racional de compuestos antivirales. Diversos puntos, a lo largo del ciclo de multiplicación viral, están siendo objetos de estudio como potenciales blanco antivirales (Talarico, 2008). A continuación se mencionan algunos:

### Inhibidores de la síntesis de RNA

Uno de los compuestos más estudiados ha sido la rivavirina, un análogo de guanósina de amplio espectro antiviral *in vitro* contra diferentes virus con genoma de RNA. En forma reciente, se ha demostrado que la rivavirina actúa como mutágeno en el RNA, forzando a los virus RNA a una acumulación letal de mutaciones llamada catástrofe de errores. Sin embargo, el efecto inhibitorio de la rivavirina contra DENV es muy débil y poco selectivo debido a su acción citostática. (Damonte, 2006).

### Inhibidores de la entrada

El bloqueo de la entrada del virus a la célula es una estrategia antiviral interesante ya que representa una barrera para impedir la iniciación de la infección. Aquí el blanco de ataque es la glicoproteína E en su interacción con componentes de la membrana celular que permiten la unión e internalización del virus. A partir de hallazgo del heparán sulfato de los proteoglicanos celulares como receptor para el DENV en ciertos tipos de células, se ha demostrado la eficacia anti DENV *in vitro* de sustancias polianiónicas de estructura diversa, como heparina, suramin, polioxometalatos, carragenanos y galactanos extraídos de algas marinas. El modo de acción de los polisulfatos es por inhibición tanto de la adsorción del virus como su posterior internalización. La capacidad inhibitoria de este tipo de compuestos está relacionada con el grado y tipo de distribución de las cargas negativas y su peso molecular elevado, lo que puede representar una seria desventaja para su uso clínico en forma sistémica (Damonte, 2006).

### Inhibidores de la alfa-glucosidasa

La glicoproteína E también es un blanco antiviral, junto con la proteína prM, por su funcionalidad en las etapas finales del ciclo de multiplicación. El ensamblaje y posterior liberación de las partículas virales requiere la asociación de E con prM en las membranas del retículo antes de la brotación de los viriones, para lo cual debe haber un correcto procesamiento post-traducciona l y plegamiento de ambas

proteínas. Los inhibidores de la alfa-glucosidasa celular castanospermina y deoxinojirimicina impiden la remoción de las glucosas terminales de los N-glicanos de E y prM, las proteínas no adquieren un plegamiento normal y se bloquea la morfogénesis de los viriones, resultando en una infección no productiva (Damonte, 2006).

### Inhibición de la expresión génica

La información disponible sobre la secuencia y organización de los genomas virales ha permitido encarar una estrategia antiviral dirigida directamente a bloquear la expresión del genoma, utilizando pequeños oligonucleótidos antisentido, es decir, una cadena simple de DNA de 15-20 nucleótidos complementaria a una secuencia determinada de RNA genómico de DENV. Así se forma un dúplex RNA-DNA que impide la expresión génica. Las principales dificultades en el uso de oligonucleótidos como agentes terapéuticos son su entrada a la célula y su estabilidad frente a la acción degradativa de las nucleasas (Damonte, 2006).

Por otro lado, compuestos obtenidos de plantas o hierbas de la medicina tradicional han sido reportadas por tener actividad antiviral y una amplia variedad de fitoquímicos activos han sido identificados. Hay evidencia que muestra que los aceites esenciales de varias especies de plantas pueden inactivar directamente el virus (Ocazonez, 2010). Los polisacáridos sulfatados constituyen una clase de macromoléculas biológicas con estructuras diversas que presentan variadas propiedades fisicoquímicas, las cuales son la base de sus aplicaciones en el campo de la medicina y la farmacología. Dentro de las fuentes naturales donde se pueden aislar los polisacáridos sulfatados se encuentran las algas marinas, plantas superiores, invertebrados marinos y cianobacterias. Diversos factores estructurales influyen sobre la actividad antiviral de los polisulfatos, entre ellos el peso molecular, el grado de sulfatación, la distribución de los grupos sulfato en la molécula y la forma de la cadena hidrocarbonada (Talarico, 2008).

## 1.10 Vacunación

En los últimos 40 años, diferentes enfoques se han utilizado por laboratorios académicos e industriales para desarrollar vacunas contra el dengue. Estas incluyen virus vivos atenuados (LAV, por sus siglas en inglés), vectores de virus recombinantes que expresan antígenos de la envoltura del dengue (E), virus purificados inactivados (PIV), vacunas de subunidades recombinantes, partículas similares al virus (VLPs), y vacunas de DNA. (Guy *et al*, 2010; Schmitz *et al*, 2011; Lang, 2012)

Las vacunas vivas han demostrado producir una respuesta celular inmune fuerte, amplia y de larga duración, pero están asociadas con una alta tasa de eventos adversos, y no pueden ser usadas en algunos grupos de alto riesgo como personas inmunocomprometidas. Las vacunas inactivadas han reducido el potencial de reactogenicidad, pero tienden a disminuir la habilidad para inducir una respuesta inmune amplia y duradera (Lang, 2012).

Varias vacunas contra el dengue están en distintas etapas de evaluación. El entusiasmo inicial acerca de las vacunas tetravalentes para el dengue LAV, desarrolladas con técnicas empíricas clásicas de atenuación por pases celulares en serie, se vio afectado por la dificultad para lograr un balance apropiado entre la inmunogenicidad y reactogenicidad. Las cepas de la vacuna fueron genética y fenotípicamente inestables, y causaron síndromes similares al dengue (fiebre, leucopenia y rash) en altas proporciones de participantes en los primeros ensayos clínicos. Una segunda generación de vacunas contra el dengue fue desarrollada para superar estos problemas. A principios del 2000, *Acambios* (ahora Sanofi Pasteur) diseñó una segunda generación de vacunas contra flavivirus, usando una innovadora tecnología de DNA recombinante para producir cuatro vacunas vivas y atenuadas de virus basadas en la cepa de la vacuna 17D de la fiebre amarilla, una por cada serotipo de dengue (Lang, 2012).

Cada virus recombinante (CYD1, CYD2, CYD3 y CYD4) se construyó removiendo los genes que codifican la premembrana (prM) y proteínas de envoltura (E) del

virus 17D de la fiebre amarilla e insertando los genes correspondientes de un virus del dengue (Guy et al, 2011). Usando esta tecnología, Sanofi Pasteur ha desarrollado preclínica, clínica e industrialmente una vacuna tetravalente contra el dengue, combinando las cuatro vacunas de virus CYD en una sola. Este candidato de vacuna contra el dengue es la primera en marcar un hito en estudios clínicos fase III, sin embargo aún continúa en fase experimental (Lang, 2012).

### **1.11 Acciones de control**

Desde el punto de vista de prevención y control del dengue, la mayoría de las acciones se enfocan hacia el control del vector, con las siguientes medidas: a) la eliminación de criaderos desechables (latas, botellas, llantas viejas, cubetas, etc.); b) el control físico (lavado, cepillado y cambio de agua, en depósitos) o bien, control químico –con larvicidas- en depósitos no desechables (floreros, cisternas, tambos, tinacos, etc.); c) la eliminación del mosquito adulto con insecticidas; y d) evitar el contacto del huésped con el vector (uso de repelentes, mosquiteros en puertas y ventanas, etc.) (Montesano y Ruiz, 1995).

De acuerdo a los factores de riesgo señalados (población, vector, ambientales, individuales, virus, entre otros) las estrategias, procedimientos y actividades de vigilancia epidemiológica se enfocan principalmente hacia la vigilancia de la enfermedad en sus diversas formas, del virus y del vector, en el contexto poblacional y ambiental (Montesano y Ruiz, 1995).

Conseguir la participación efectiva de la población es uno de los grandes problemas en el control de las enfermedades transmitidas por vectores, y esta cuestión se torna vital para la eficacia de las medidas de control en el caso específico del dengue. La participación comunitaria en un proceso social inherente a los grupos humanos que comparten necesidades, que participan en la identificación de las mismas y en la implementación y evaluación de estrategias para solucionarlas (Toledo *et al*, 2006).

Ha sido práctica tradicional informar al público sobre la enfermedad y el vector, sin embargo, comúnmente no se explora el conocimiento previo de las personas acerca del tema. Además informar no se traduce necesariamente en un cambio de conducta (Toledo *et al*, 2006).

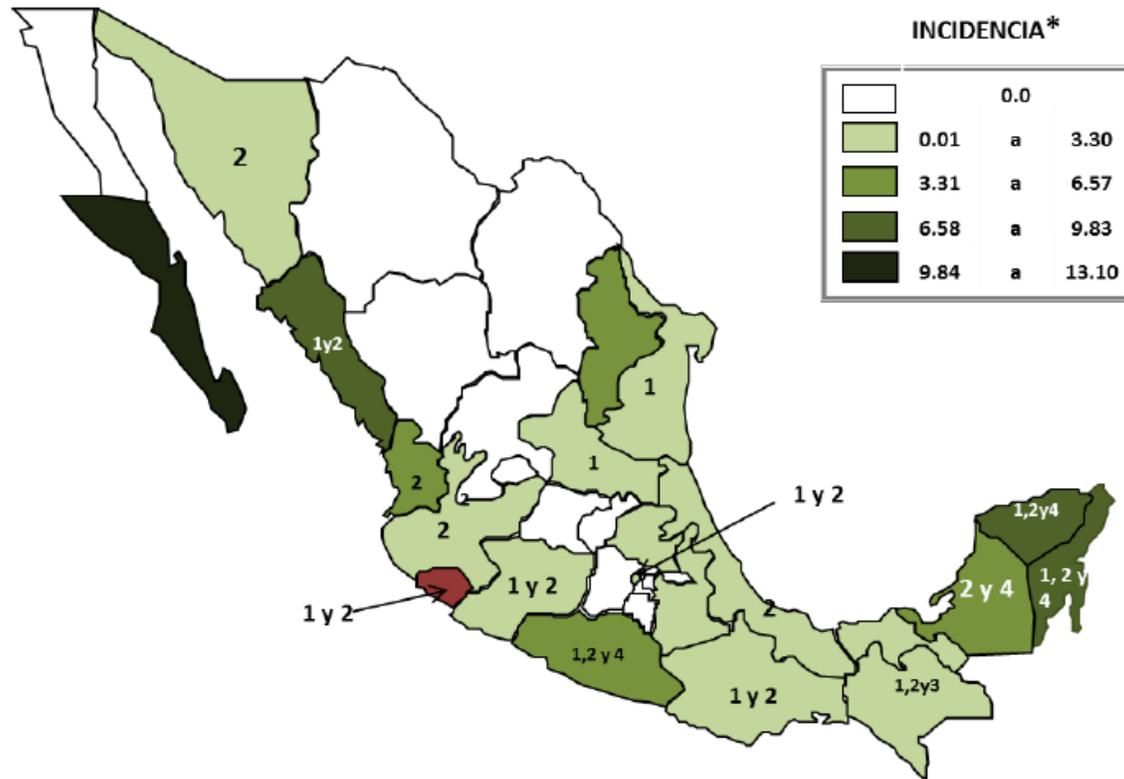
### **1.12 Epidemiología**

El patrón de transmisión de dengue se presentaba con incrementos bianuales, sin embargo, con la introducción del DENV-3 en el año 1995 dicho patrón se comenzó a modificar a grado tal que a partir del 2003 se observa una tendencia francamente ascendente de casos con acortamiento de la periodicidad de baja transmisión observada en años anteriores (CONAVE, 2012).

El actual comportamiento del dengue puede explicarse en gran parte por la circulación de los cuatro serotipos de dengue y el acortamiento en sus tiempos de alternancia, ya que cada uno de ellos circula de manera predominante por periodos de 4 a 5 años, al término de los cuales inicia, de acuerdo a la susceptibilidad de la población, casi de manera simultánea la circulación de otro serotipo (CONAVE, 2012).

Mediante dicho patrón de transmisión, la población susceptible, los movimientos poblacionales, así como de los índices vectoriales, ha sido posible alertar, desde años atrás, a las entidades con riesgo de brotes de dengue (CONAVE, 2012).

Hasta la semana 10 del presente año (10 de Marzo de 2014), la Secretaria de Salud reportó un decremento del 20% de los casos confirmados, al comparar el comportamiento de los casos con lo ocurrido a la misma fecha de corte del 2013, sin incremento significativo en casos probables (Secretaria de Salud, 2014).



**El estado de Colima Sur presentó la incidencia más alta con 14.36**

**\*Incidencia de casos de FD y FHD por cien mil habitantes**

**Figura 8. Incidencia y serotipos aislados de casos de dengue por entidad federativa en México, hasta Marzo de 2014.**

([http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2014/informes\\_2014.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2014/informes_2014.html))

En años anteriores se identificó la circulación del DENV-2 en 12 estados del centro y sur del país. De acuerdo a la temporalidad (mayor incidencia en temporada de lluvias) y los patrones de dispersión observados en años previos, es factible predecir incrementos de casos en la región sur y centro y gradualmente en los estados del norte (CONAVE, 2012).

### 1.13 El alga marina del género *Codium*

*Codium* es un género de algas cenocíticas, su condición multinucleada y la ausencia de paredes celulares le han conferido, en algunos casos, el ser

considerado el organismo más grande formado de una sola célula. Su tamaño puede ser de unos pocos milímetros hasta 15m. En México, *C. amplivesiculatum* habitante de la costa Pacífica de Baja California, llega a alcanzar los 10m de longitud. Por lo general estos organismos se fijan al fondo rocoso de las playas de todos los mares del mundo, a excepción de las latitudes polares; sin embargo, también pueden encontrarse adheridos a raíces de manglares, sobre conchas, cascos de barcos u otros objetos. Ocupan de la franja mesomareal hasta profundidades de 200m (Pedroche *et al*, 2002).

El género *Codium* cuenta mundialmente con cerca de 120 especies, de las cuales aproximadamente la mitad son distintivas mientras que el resto conforma agrupamientos o complejos de intrincada variación morfológica. El pacífico de México es una de las cuatro áreas geográficas de mayor diversidad en número de especies de este género, las otras tres son: la porción sur de Australia, Japón y África del sur (Pedroche *et al*, 2002).

*Codium amplivesiculatum* es una especie típica de lugares con aguas tranquilas y fondos arenosos, los cuales llegan a incluir lagunas costeras y manglares. Parece existir una relación entre la tranquilidad de las aguas que habita y la longitud de los talos y el grado de ramificación que exhiben. Se puede localizar de la Bahía San Quintín, Baja California a Mismaloya, Jalisco, incluyendo el Golfo de California; la Isla Guadalupe y Rocas Alijos, en Baja California y Baja California Sur, respectivamente (Pedroche *et al*, 2002).

#### **1.14 Actividad antiviral de algas del género *Codium***

La variedad de compuestos químicos aislados a partir del género *Codium* muestran un potencial de aplicación en el área biomédica, el cual se ve aumentado si se considera la posibilidad de ser modificados estructuralmente para incrementar su actividad biológica. Los compuestos aislados de *Codium* son del tipo esteroidal, glucósidos esteroidales, acilglucósidos, polisacáridos sulfatados, carotenoides, benzaldehído, derivados furfurales y esteres de fitol, con diferentes actividades a nivel membrana celular. Los glucósidos obtenidos de *Codium* tienen

diversas actividades biológicas, como antibacteriana, antiviral, antitumoral y citotóxica, así como el clerosterol que por su estructura química pudiera evaluarse en otro tipo de bioensayo (Marin, 2013).

Existen diferentes especies del género *Codium*, entre las cuales podemos mencionar a *C. adhaerens*, *C. fragile*, *C. latum*, *C. decorticatum* y *C. spongiosum* las cuales han sido estudiadas como fuentes de agentes antivirales derivados de galactanos y polisacáridos sulfatados, contra el virus del herpes simplex (HSV-1) (Soares *et al*, 2011; Thanh *et al*, 2011), del herpes simplex tipo 2 (HSV-2) (Ohta *et al*, 2009), el virus de la papa X (PVX) (Pardee *et al*, 2004), entre otros. El mecanismo de acción de los polisacáridos sulfatados son debido a la formación de complejos que bloquean la interacción virus-células, por lo que se hacen correlaciones entre los parámetros de la estructura mínima, iónica e hidrofóbica y la correspondiente actividad antiviral (Marin, 2013).

### **1.15 El alga marina del género *Macrocystis***

*Macrocystis pyrifera* constituye el alga marina conocida comúnmente como Sargazo gigante, que a veces alcanza una longitud de 50 metros o más. En México, se localiza en las áreas rocosas a lo largo de la costa oeste de la península de Baja California desde la frontera con Estados Unidos de América hasta Punta San Pablo en Baja California Sur. Se puede presentar desde las áreas entre mareas hasta profundidades mayores de 20 metros en aguas cercanas a las islas con aguas muy claras que permite la penetración de la luz. La máxima profundidad a la que esta alga se ha encontrado es a 40 metros, pero generalmente se distribuye entre los 8-20 metros (Hernandez Carmona, 1988).

*M. pyrifera* se utiliza fundamentalmente para la industria de alginatos, aunque en ciertos países se utiliza como complemento de forrajes y fertilizantes en forma de harina de algas. Los alginatos son utilizados ampliamente en la industria alimenticia en postres, geles, mezclas con leche, productos lácteos y productos enlatados. Otras de las aplicaciones industriales de los productos de alginatos es en revestimiento de papel, varillas para soldar e impresiones textiles; también se

encuentran usos importantes en los productos farmacéuticos, por ejemplo en tabletas, formulas antiácidas y compuestos; en la elaboración de cosméticos y para impresiones dentales (Hernández Carmona, 1988).

### **1.16 Actividad antiviral de algas del género *Macrocystis***

En estudios se han reportado algunos fraccionamientos y caracterizaciones químicas que presentaron actividad citotóxica, antitumoral, inmunológica, antimicrobiana y antiviral de *M. pyrifera*. La actividad antiviral de algunas de estas fracciones se determinaron por ensayos de inhibición del efecto citopático con el virus de la estomatitis vesicular, en un cultivo de monocapa de células amnióticas (células Wish) (Mayer *et al*, 1986). Estudios posteriores mostraron que *M. pyrifera* tuvo mayor actividad con dializados de extractos crudos que contienen fucosa, subunidad fundamental de los fucoidanos. Estos experimentos sugieren que el fucoidano es la molécula activa responsable de la actividad inhibitoria. Otros polisacáridos sulfatados han mostrado la capacidad de inhibir otros virus DNA y RNA, tan efectivamente como el fucoidano, sin embargo no ha sido esclarecido su mecanismo de acción. Se sugiere que pueden interferir en la absorción y penetración del virus a la célula o interacciona con la partícula viral para formar complejos, disminuyendo la tasa de unión a la membrana celular (Mayer *et al*, 1987).

## 2. JUSTIFICACION

Actualmente, la investigación de productos naturales como parte de una terapéutica contra distintos tipos de padecimientos ha despertado un interés renovado debido a que los tratamientos alopáticos tradicionales en ocasiones no son efectivos o llegan a perder su efectividad. Se ha documentado la eficacia de distintas plantas de origen marino actuando de manera profiláctica así como de manera directa contra el agente patógeno, ya sea inhibiendo sitios de unión en membrana celular o bien, frenando su multiplicación a través de la formación de complejos moleculares en algún punto durante el ciclo de vida del agente, sin embargo, estos mecanismos de acción aun no están completamente esclarecidos.

Siendo el virus del dengue un problema actual de salud pública, se busca de manera continua el tratamiento eficaz contra el mismo puesto que aún no hay una vacuna que pueda proteger al paciente y el tratamiento médico solo se basa en proporcionar soporte vital al paciente durante la infección.

La investigación de alternativas terapéuticas también es fundamental, por lo que en este trabajo nos enfocamos al estudio del potencial antiviral de algas marinas contra el virus del dengue,

### **3. HIPOTESIS**

Las fracciones de los extractos de las algas *Codium amplivesiculatum* y *Macrocystis pyrifera* tendrán actividad antiviral *in vitro* sobre el virus del Dengue 2 en células infectadas.

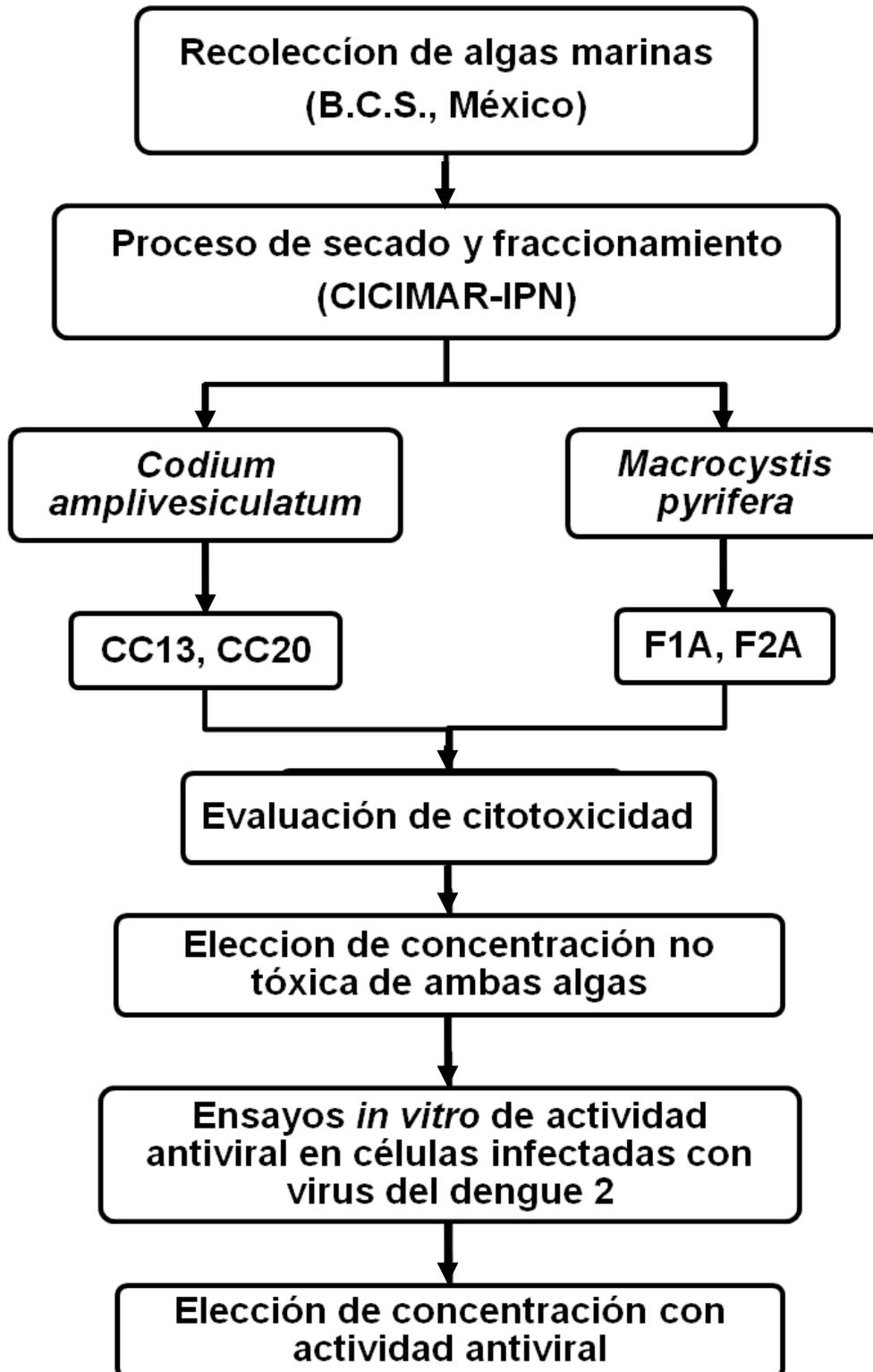
### **4. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el efecto antiviral de los extractos de alga marina *Codium amplivesiculatum* y *Macrocystis pyrifera*, en una línea celular infectada con DENV-2

#### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar el efecto citotóxico de los extractos de algas marinas en células de hepatoma humano HuH-7 a diferentes concentraciones.
- Determinar la concentración no citotóxica de los extractos para evaluarla posteriormente en los ensayos antivirales
- Evaluar y comparar la actividad antiviral de los extractos marinos a diferentes concentraciones sobre el cultivo celular infectado con virus del dengue 2

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 *Codium amplivesiculatum*

#### 6.1.1 *Recolección del material biológico*

El material biológico se recolectó en la zona de Bahía Magdalena, Baja California Sur (Verano de 2006). Se etiquetó y se conservó en hielo para su traslado al Laboratorio de Química de Algas Marinas del CICIMAR-IPN. Posteriormente el material se secó a temperatura ambiente y se conservó a -20°C hasta su procesamiento químico y biológico.

El alga marina del genero *Codium* recolectada, fue identificada como: *C. amplivesiculatum*.

#### 6.1.2 *Obtención de extractos orgánicos*

El espécimen recolectado y deshidratado (1.764 Kg) se maceró durante una semana en etanol destilado a temperatura ambiente (22-35°C) con 3.5L, 1.5L, 1L y 3L x 3 veces. La disolución resultante se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida en rota evaporador Yamato a 40°C, obteniendo el extracto etanólico, el cual fue sometido a extracción líquido-líquido con diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y agua destilada, en proporción 1:1, colocados en un embudo de separación (50mL x 8 veces), posteriormente la fase orgánica fue concentrada a presión reducida (Marin, 2013).

#### 6.1.3 *Fraccionamiento y aislamiento de compuestos*

El fraccionamiento del extracto se realizó mediante cromatografía en columna, utilizando como eluyentes mezclas de disolventes de polaridad creciente, comenzando con n-hexano, diclorometano, etanol y agua, en las proporciones correspondientes para el alga y las cantidades de muestra procesadas. De acuerdo con un análisis cromatográfico en capa fina (CCF), los eluatos se agruparon en fracciones de polaridad creciente. Las fracciones con el compuesto a separar, fue sometida a sucesivas separaciones en cromatografía en columna

(CC) son sílica gel de 60 Å, 230-400 de malla marca Whatman International®, de dimensiones de acuerdo a la cantidad de la fracción orgánica para esta especie, hasta la obtención del compuesto puro (Marín, 2013).

Se fraccionaron 7.5g de extracto orgánico en columna cromatográfica de sílica gel en las condiciones mencionadas anteriormente, con dimensiones de 50.0 x 2.0cm, en una proporción de muestra adsorbente 1:20, estabilizada y eluída con 1L de mezcla hexano:diclorometano (Hxn:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 1:1, seguida con la misma cantidad de eluyentes de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH (97:3), (97:7), (9:1); CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH:H<sub>2</sub>O (7:3:1), (6:3:1), (6:4:1); EtOH 100% y agua destilada 100%. Se colectaron 450 eluatos de aproximadamente 15mL cada uno en tubos de ensayo y el patrón de fraccionamiento se determinó por medio de cromatografía de capa fina (CCF), con fase estacionaria de sílica gel de 60Å, K6F marca Whatman International®.

Se obtuvieron 16 fracciones, de las cuales se purificaron los compuestos del 1 al 5. Se utilizaron columnas cromatografías con sílica gel de 60Å 230-400 de malla fase normal para las fracciones CC2F2, CC2F3, CC2F4 Y CC2F13 y con sílica gel de 60Å de fase reversa C-18, las fracciones CCF2F10 y la CC2F12 (Marín, 2013).

La fracción CC2F2, se procesó en la columna CC12, de la cual la fracción F3 (CC12F3), correspondió al compuesto 1. La fracción CC2F4, se procesó en la columna CC13, obteniéndose la fracción F2 de esta columna correspondiente al compuesto 2(a). El mismo compuesto 2(a') (CC15F3), se obtuvo de la fracción CC2F4, después de fraccionar sucesivamente la F2 de CC11, F2 de CC14, correspondiendo a la F3 de CC15. El compuesto 3 correspondió a la fracción 2F2CCF10, con origen en el fraccionamiento de CC2F10, como resultado del fraccionamiento de dos columnas sucesivas: la F2 de CC3F2 y la F2 de F2CF10. El compuesto 4 se obtuvo de la F2 de la fracción F12-F2, originada del fraccionamiento de CC2F12 y procesando las columnas CC4F2 y F12-F2. El compuesto 5(a) se derivó de la fracción F5 de la columna cromatográfica CC20, la derivó a su vez, de las columnas CC2F13 y CC16F5 (Marín, 2013).

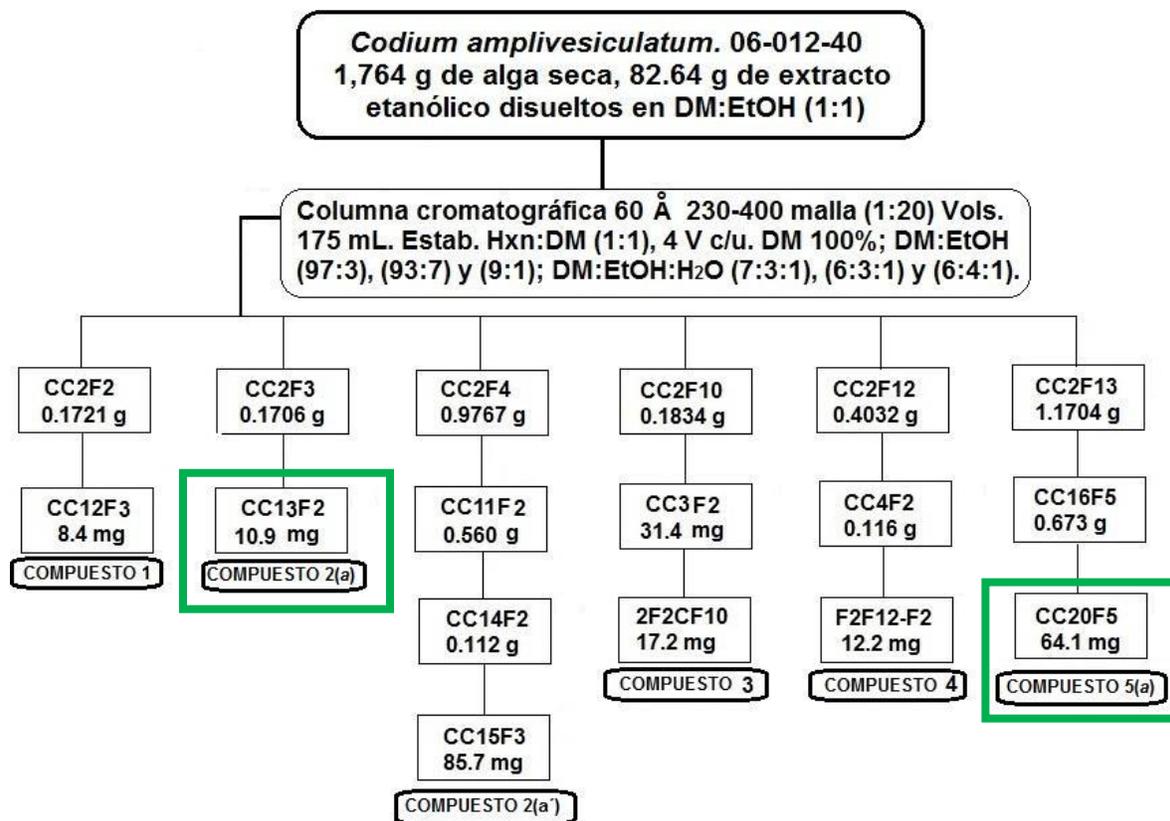


Figura 9. Diagrama de fraccionamiento de *Codium amplivesiculatum* (Marín, 2013).

Las fracciones que utilizamos en el presente trabajo fueron etiquetadas de manera siguiente: Compuesto 2(a), CC13/F2 y Compuesto 5(a), CC20/F5, denominados a partir de ahora únicamente como CC13 y CC20, respectivamente.

## 6.2 *Macrocystis pyrifera*

### 6.2.1 Recolección del material biológico

El alga café *Macrocystis pyrifera* fue recolectada por el equipo de Química de algas marinas del CICIMAR en agosto de 2006 en Punta Eugenia, Baja California Sur, México. El alga fue removida del sustrato rocoso en la zona intermareal a 1 metro de profundidad. Todo el material algal fue puesto a secar al sol por 3 días; se transportó al laboratorio donde las muestras fueron limpiadas de toda materia

extraña y se almacenaron en refrigeración en bolsas de plástico a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Castro, 2013).

### 6.2.2 Obtención de extractos, fraccionamiento y caracterización

Se tomó 1 Kg de alga seca-molida y se extrajo con agua destilada a  $55^{\circ}\text{C}$  en agitación continua por 4 horas. El tejido fue removido por filtración simple y el filtrado se centrifugó para remover sedimentos hasta obtener soluciones claras. La solución clarificada se precipitó con EtOH destilado y el sólido se colocó en una estufa eléctrica a  $50^{\circ}\text{C}$ ; posteriormente el sólido se sometió a extracción sólido-líquido en DEAE-celulosa eluidas con agua destilada en solución con NaCl a 0.5, 1 y 2M. se centrifugó y los precipitados obtenidos fueron secados en estufa eléctrica a  $50^{\circ}\text{C}$ , etiquetados como 06-019-61 F1A, 06-019-61 F2A, 06-019-61 F3A, 06-019-61 F4A y se almacenaron en refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización (Castro, 2013).

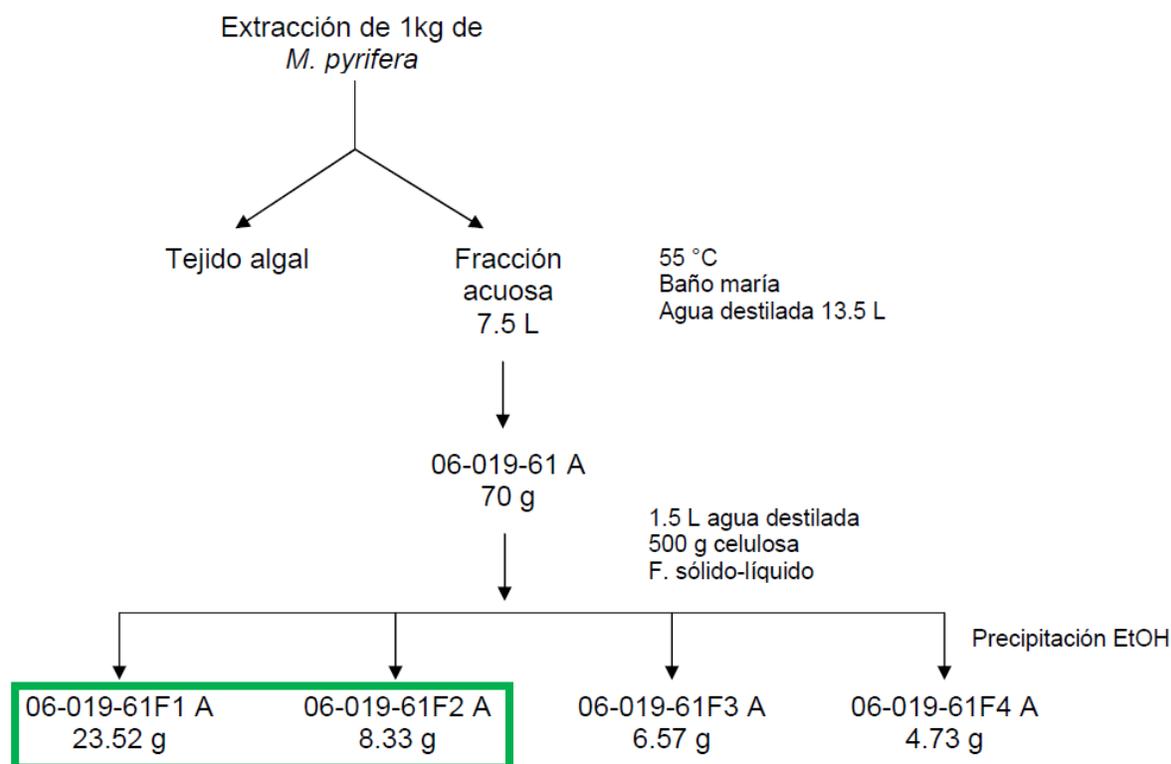


Figura 10. Diagrama de fraccionamiento de *Macrocyctis pyrifera* (Castro, 2013).

Las fracciones usadas en el presente trabajo fueron 06-019-61 F1A y 06-019-61 F2A, que para fines prácticos se mencionarán de ahora en adelante como F1A y F2A.

### **6.3 Línea celular HuH-7**

HuH-7 es una línea celular derivada de células de carcinoma hepático humano, que fueron originalmente tomadas de un tumor hepático de un hombre japonés de 57 años en 1982. La línea fue establecida por Nakabayshi, H. y Sato, J. (Disponible en: <http://huh7.com/>)

Para el mantenimiento de la línea celular HuH-7 se utilizó medio Advanced DMEM (GIBCO) suplementado con 5% de SFB (suero fetal bovino), L-glutamina [2mM], penicilina y estreptomina como antibiótico (100UI/mL y 100µg/mL, respectivamente) y fungizona como antimicótico (0.125µg/mL) y fueron crecidas a 37°C en incubadora húmeda con una saturación de CO<sub>2</sub> al 5%, cuidando de realizar de 2 a 3 pases por semana, revisando la confluencia de las mismas cada vez.

### **6.4 Propagación de la línea celular**

Partiendo de una caja con una monocapa de células en crecimiento y confluencia activa, bajo condiciones asépticas dentro de una cabina de seguridad biológica Clase II tipo A, se procedió a eliminar el medio de cultivo por aspiración, se lavó la monocapa con PBS y nuevamente se eliminó por aspiración; posteriormente se agregó tripsina (2-5mL) a la monocapa esperando aproximadamente 1 minuto observándose el desprendimiento de la monocapa, momento en el cual se agregó medio de cultivo para inactivar la tripsina. Posteriormente se traspasaron a un tubo falcon de 5mL, y se procedió a realizar un conteo para verificar la viabilidad y determinar el volumen de suspensión celular necesaria para sembrarlas en los pozos de la placa para cultivo.

El conteo se realizó transfiriendo 0.1mL de la suspensión celular a un tubo eppendorf de 1.5mL de capacidad y se agregó 0.9mL de azul de Tripán al 0.1%. Se llenó la cámara de Neubauer en ambos pozos, contando al microscopio las células viables y las no viables (azules), en los 4 cuadrantes de las esquinas y en el del centro, en ambos pozos de la cámara. Se consideró el siguiente factor:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \frac{\# \text{ de células contadas}}{\# \text{ de cuadros contados}} \times 10,000 \times 10$$

Considerando que 10,000 es el factor de conversión de la cámara (tomando en cuenta la dilución 1/10 del azul de tripán) y 10 es volumen final de la suspensión.

Después del sembrado de las células en placa, el volumen remanente de la suspensión celular se utilizó para realizar un nuevo pase celular.

## 6.5 Virus

Se trabajó con el serotipo 2 del virus del Dengue (DENV 2), cepa New Guinea C, amablemente donado por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), el cual fue propagado por inoculación de cerebro de ratón lactante de acuerdo a la técnica reportada por Gould (Gould, 1981) y titulado por la técnica de placa lítica en células BHK-21 de acuerdo al protocolo reportado por Álvarez (Álvarez, 2005); el virus del dengue se considera nivel 2, de acuerdo a los criterios de clasificación del CDC (Center for Disease Control and Prevention) de los niveles de bioseguridad (BSL, por sus siglas en inglés), por lo que todos los experimentos se realizaron dentro de una cabina de seguridad biológica Clase II tipo A. Asimismo, se tomaron todas las precauciones y medidas necesarias de protección personal.

## 6.6 Preparación de extractos

Los extractos de alga marina fueron obtenidos en el Laboratorio de Química de Algas Marinas del CICIMAR-IPN. Para su extracción se uso el método cromatografía en columna que ya se ha descrito anteriormente. Cada extracto fue

remitido al Laboratorio de Biomedicina Molecular II de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional. A continuación se describe cómo se dispusieron los extractos para su uso.

#### *6.6.1 Compuestos del alga parda *Codium amplivesiculatum**

Se prepararon stocks a una concentración de 10mg/mL, pesando 0.8mg de cada compuesto (CC13/F2 y CC20/F5) y se disolvieron en 80 $\mu$ L de DMSO a cada uno, siendo este volumen final el utilizado a lo largo de los experimentos, los cuales se almacenaron a -70°C.

#### *6.6.2 Compuestos del alga parda *Macrocystis pyrifera**

Para la fracción F1A se disolvieron 2.6mg del compuesto en 2600 $\mu$ L de PBS estéril para obtener una concentración final de 1mg/mL, y el volumen final, se distribuyó en alícuotas de la siguiente manera: 4 de 500 $\mu$ L y 12 de 50 $\mu$ L.

Para la fracción F2A se disolvieron 1.5mg en 1500 $\mu$ L de PBS para obtener una concentración final de 1mg/mL, y el volumen final fue repartido en alícuotas distribuidas de la siguiente manera: 2 de 500 $\mu$ L y 10 de 50 $\mu$ L.

Las alícuotas de ambas fracciones también se almacenaron a las condiciones antes mencionadas, hasta su utilización.

### **6.7 Ensayos de citotoxicidad**

Antes de evaluar el potencial antiviral de los extractos se determinó que las concentraciones a utilizar no produjeran toxicidad en la línea celular que se infectará con el virus. Los ensayos de toxicidad se hicieron de la siguiente manera.

Se utilizó el kit comercial CytoTox96® (Promega), el cual se basa en la medición cuantitativa de lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica que es liberada durante la lisis celular. La LDH liberada en el sobrenadante del cultivo celular es medida con un ensayo enzimático, que resulta en la conversión de una sal de tetrazolio (INT) en un producto formazán rojo. En el ensayo se incluyeron

controles como células lisadas con Tritón X-100 y células tratadas exclusivamente con el medio de cultivo; además pozos sin células donde sólo se adicionó el medio de cultivo y los reactivos del kit.

La cantidad de color formada es proporcional al número de células lisadas y esto se cuantificó en un espectrofotómetro a 490nm.

## **6.8 Determinación del número de células para sembrado en placa**

Con la finalidad de establecer el número óptimo de células a utilizar en los ensayos, se sembraron células HuH-7 en una placa para de 96 pozos de fondo plano para cultivo (Costar 3599) a razón de  $2.5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^3$  células por pozo con 100 $\mu$ L de medio de cultivo por pozo. Se incubaron 24 horas a 37°C en incubadora húmeda con 5% de saturación de CO<sub>2</sub> y entonces se eliminó el medio de cultivo por aspiración y se agregó nuevo (100 $\mu$ L/pozo). Posteriormente se agregaron 10 $\mu$ L/pozo de buffer de lisis 10X del kit Cytotox96 (Promega) y, se incubó durante 45 minutos en las mismas condiciones indicadas anteriormente. Después, la placa se centrifugó a 250g por 4 minutos a temperatura ambiente en la centrífuga Eppendorf 5430 R con el rotor para multiplacas A-2-MTP. Se tomaron 50 $\mu$ L de sobrenadante y se traspasaron a una placa de ELISA (Bioster 1187). Luego se agregaron 50 $\mu$ L/pozo del Substrate Mix del kit de Cytotox 96 previamente descongelado y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Pasado el tiempo, se agregaron 50 $\mu$ L/pozo de la Stop Solution del kit de Cytotox 96, se leyó la multiplaca en el lector para ELISA marca Biotek a 490nm.

## **6.9 Ensayos**

### **6.9.1 *Codium amplivesiculatum***

Una vez determinado el número óptimo de células a utilizar, se procedió a hacer el ensayo. Se sembraron las células HuH-7 en una placa de 96 pozos de fondo plano para cultivo (Costar 3599) a razón de  $5 \times 10^3$  células/pozo en 100 $\mu$ L de medio de

cultivo por pozo y se incubaron 24 horas a 37°C en incubadora húmeda con 5% de saturación de CO<sub>2</sub>.

Los compuestos CC13 y CC20 (del alga *Codium*) fueron preparados de la siguiente manera: a partir de un stock de 10mg/mL se tomaron 0.5, 2.5, 5 y 7.5µL que se llevaron a un volumen total de 500 µL usando medio de cultivo. De estas soluciones se tomaron alícuotas de 100µL para obtener una concentración final de 1, 5, 10 y 15µg/pozo respectivamente.

Antes de agregar los extractos a las células, se retiró el medio de cultivo por aspiración. Se adicionaron 100µL/pozo de los compuestos a las diferentes concentraciones y por cuadruplicado. Se utilizó como control positivo células con medio de cultivo y buffer de lisis (10µL/pozo); como control negativo, células sin tratamiento, sólo con medio de cultivo (100µL/pozo) ambos controles por triplicado. Además se incluyeron las correcciones de absorbancia de fondo para el ensayo, las cuales consistieron en adicionar medio de cultivo sólo (100µL/pozo) y medio de cultivo sin células pero con solución de lisis (100µL + 10µL/pozo, respectivamente), ambos por triplicado. La placa con los tratamientos se incubó por 48 horas a 37°C en las condiciones reportadas previamente.

Después se centrifugó la placa a 250 gravedades por 4 minutos a temperatura ambiente en la centrífuga Eppendorf 5430R con el rotor para multiplacas A-2-MTP. Se tomaron 50µL de cada sobrenadante y se traspasaron a una placa de ELISA (Bioster 1187) manteniendo el mismo esquema de posiciones de la placa Costar 3599 con los tratamientos; después, se siguió el procedimiento de acuerdo a las indicaciones del fabricante del kit de Cytotox 96: se añadieron 50µL/pozo del Substrate Mix y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Posteriormente, se agregó la Stop Solution (50µL/pozo). Por último se leyó la placa, en el lector de ELISA (marca Biotek) a 490nm. Este ensayo se repitió dos veces.

### 6.9.2 *Macrocystis pyrifera*

Para la evaluación de la citotoxicidad de *Macrocystis* se llevó a cabo el mismo procedimiento que para *Codium amplivesiculatum*, desde el sembrado de células en placas, hasta la utilización del kit Cytotox96, de manera que solo se hará mención de la disposición de los compuestos.

Los compuestos F1A y F2A (del alga *Macrocystis*) fueron preparados de la siguiente manera: a partir de un stock de 1mg/mL se tomaron 5, 25 y 50 $\mu$ L que se llevaron a un volumen total de 500 $\mu$ L, de cada solución se tomaron 100 $\mu$ l para obtener una concentración final por pozo de 1, 5 y 10  $\mu$ g respectivamente.

La lectura de la placa también se llevo a cabo de igual manera que el extracto anterior.

### 6.10 Infección de la línea celular HuH-7 con DENV-2

En una placa para cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano, previamente sembrada con células HuH-7, se retiró el medio de cultivo por aspiración y se lavó con 100 $\mu$ L de medio de cultivo fresco. Se adicionó a cada pozo 50 $\mu$ L del virus previamente diluido con PBS+SFB 0.5% a una dilución de 1:100, 1:500 y 1:1000. Como control negativo de infección se adicionó a un pozo 50 $\mu$ L de PBS+SFB 0.5%. Después se dejó proceder la infección por 1 hora a 37°C en agitación. Pasado el tiempo, se lavaron los pozos 5 veces con 100 $\mu$ L de PBS+SFB 0.5% y se agregaron 100 $\mu$ L de medio de cultivo fresco a cada pozo. La infección se dejó proceder por 48 horas a 37°C a una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

La Multiplicidad de Infección (MOI, por sus siglas en inglés) correspondiente a las diluciones 1:100, 1:500 y 1:1000 son 1, 0.5 y 0.1 respectivamente (Ver Anexo 1).

### **6.11 Determinación semicuantitativa de la infección por la técnica de Platelia**

Se utilizó el kit comercial Platelia Dengue NS1 AG (Biorad®), el cual se basa en la cuantificación de la proteína NS1 viral. El procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante: las placas de 96 pozos están sensibilizadas con anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-NS1. En cada pozo se añadieron 50µL/pozo de solución diluyente (PBS-Tween 20-SFB), 50µL/pozo de los sobrenadantes de los cultivos previamente infectados con el virus y los respectivos controles, además de 100µL/pozo del conjugado diluido 1:50 (AcMo antiNS1-peroxidasa); la placa se incubó durante 90 minutos a 37°C. Después se lavó 6 veces con 300µL/pozo de solución de lavado (Tris NaCl, 1% Tween 20) utilizando una pipeta Pasteur estéril cada vez y se adicionaron 160µL de solución de revelado (ácido cítrico, acetato sódico, 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 4% DMSO + 0.025% de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina); se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz y finalmente se adicionaron 100µL/pozo de solución de paro (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1N). El ensayo se leyó por triplicado en un lector ELISA ThermoScientific con dos filtros: 450/620nm.

La densidad óptica obtenida es proporcional a la cantidad de antígeno NS1 presente en la muestra.

### **6.12 Evaluación del efecto antiviral de extractos de *Codium amplivesiculatum*.**

Se sembraron células HuH-7 de acuerdo a las especificaciones anteriormente descritas. Posteriormente, a partir de un stock de DENV-2 1:10, se prepararon tres diluciones progresivas (1:100, 1:500 y 1:1000, MOI = 1, 0.5 y 0.1, respectivamente) las cuales se mezclaron con dos concentraciones de cada uno de los extractos del alga *Codium* (concentración final de 10 y 15µg/mL); se incluyó un control con DMSO, y se usó como diluyente PBS con SFB al 0.5%, en un volumen final de 500µL. La mezcla de virus con los extractos se incubó a 37°C durante 1 h.

Se retiró el medio de cultivo de la placa por aspiración y se agregaron las mezclas (virus-extractos) a razón de 100 $\mu$ L/pozo y se dejó proceder la infección durante 1 hora a 37°C en agitación. Pasado el tiempo, se lavaron los pozos 5 veces con 100 $\mu$ L/pozo de PBS-SFB 0.5% y después se agregaron 100 $\mu$ L/pozo de medio de cultivo fresco; la infección se dejó proceder por 48 horas a 37°C con una saturación de CO<sub>2</sub> al 5%.

Después del tiempo de incubación, se recuperaron los sobrenadantes de las células HuH-7 infectadas y se analizaron mediante el kit Platelia Dengue NS1 AG (Biorad®) de acuerdo al procedimiento descrito con anterioridad.

### **6.13 Evaluación del efecto antiviral en extractos de *Macrocystis pyrifera***

El método de evaluación es similar al de *Codium*, desde el sembrado de células en placa, hasta la evaluación de los sobrenadantes. La única diferencia son las concentraciones usadas:

A partir de un stock de DENV-2 1:10, se prepararon dos diluciones progresivas (1:100 y 1:500, MOI = 1 y 0.5, respectivamente) las cuales se probaron con dos concentraciones de cada uno de los extractos del alga *Macrocystis* (concentración final de 1 y 5 $\mu$ g/mL), se incluyó un control con DMSO, y se usó como diluyente PBS con SFB al 0.5%, en un volumen final de 500 $\mu$ L. La mezcla de virus con los extractos se incubó a 37°C durante 1 h.

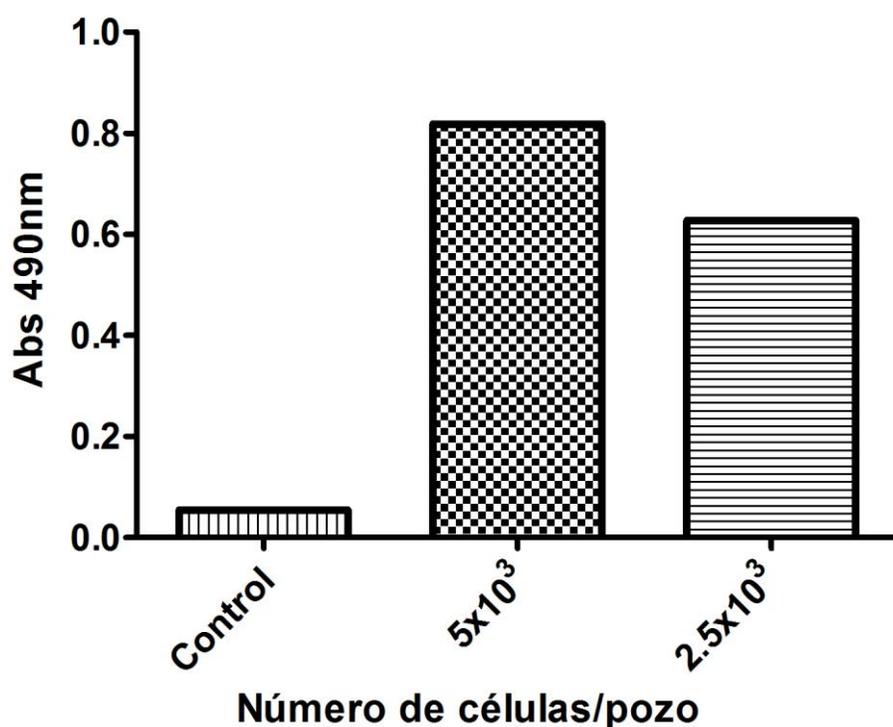
### **6.14 Análisis estadístico**

A los datos obtenidos en las pruebas, tanto de citotoxicidad como virucidas, se les aplicó el método estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis que compara las medias de 3 o más grupos, incluido en el programa GraphPad Prism para Windows, versión 5.01.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Determinación del número de células para los ensayos de citotoxicidad.

Para determinar el número adecuado de células HuH-7 a utilizar en los ensayos de citotoxicidad y los subsecuentes, se probaron dos cantidades de células para sembrar en placas de 96 pozos:  $2.5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^3$  células por pozo. Después de 24h de incubación se estableció que la concentración de  $5 \times 10^3$  células por pozo era la más adecuada ya que la confluencia de los pozos era alcanzada en un menor tiempo, en comparación a los pozos sembrados con  $2.5 \times 10^3$  células (Figura 11).

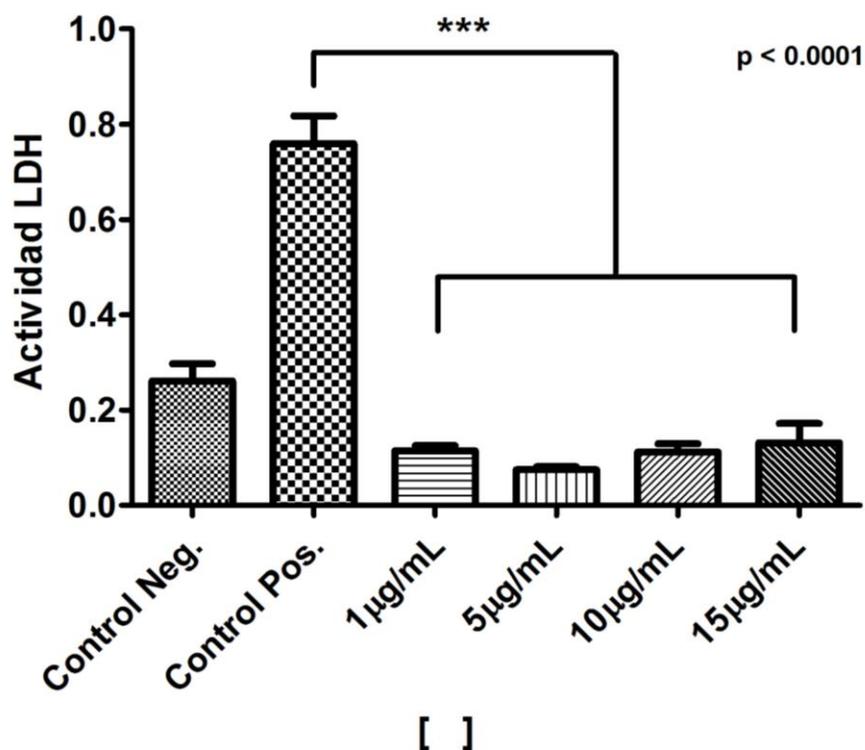


**Figura 11. Determinación del número de células óptimo para el cultivo en placa.** El kit CytoTox 96® mide indirectamente la actividad de LDH presente en el citoplasma de células intactas. La cuantificación celular puede llevarse a cabo solo si las células son lisadas para liberar la LDH presente en las células. Luego entonces, el número de células presentes será directamente proporcional a los valores de absorbancia, que representan la actividad de la LDH.

## 7.2 Ensayos de citotoxicidad de los extractos sobre células de mamífero HuH-7

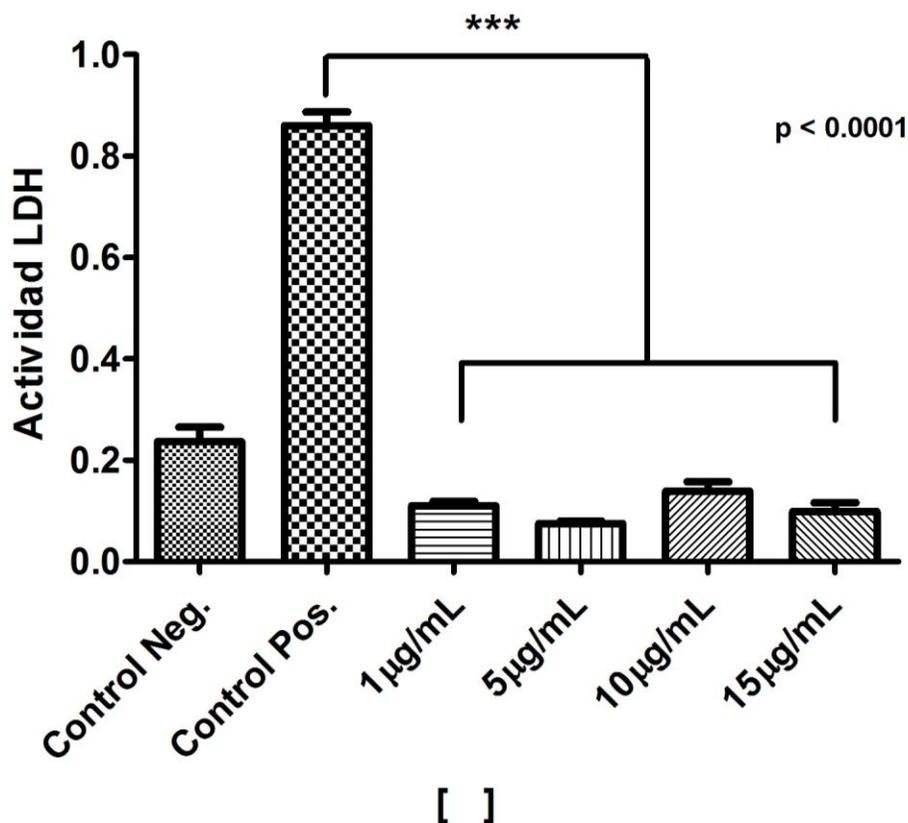
Antes de evaluar las propiedades antivirales de los extractos, se determinaron las concentraciones que en primer término no fueran tóxicas para células de mamífero. Para esto se probaron concentraciones crecientes de los diferentes extractos. Para estos ensayos se utilizaron células tratadas con DMSO como control negativo, ya que este se usó como diluyente para las fracciones de los extractos y no mostró citotoxicidad; el control positivo son células tratadas con Solución de lisis, proporcionada en el kit comercial. A continuación se muestran los resultados de cada uno de ellos.

### 7.2.1 *Codium amplivesiculatum*



**Figura 12. Evaluación del efecto citotóxico del compuesto CC13 sobre la línea celular HuH-7.** Se muestra la actividad de LDH a diferentes concentraciones de extracto de *Codium amplivesiculatum* (*C. amp.*) observándose diferencias significativas respecto al control positivo. (Abs = 490nm).

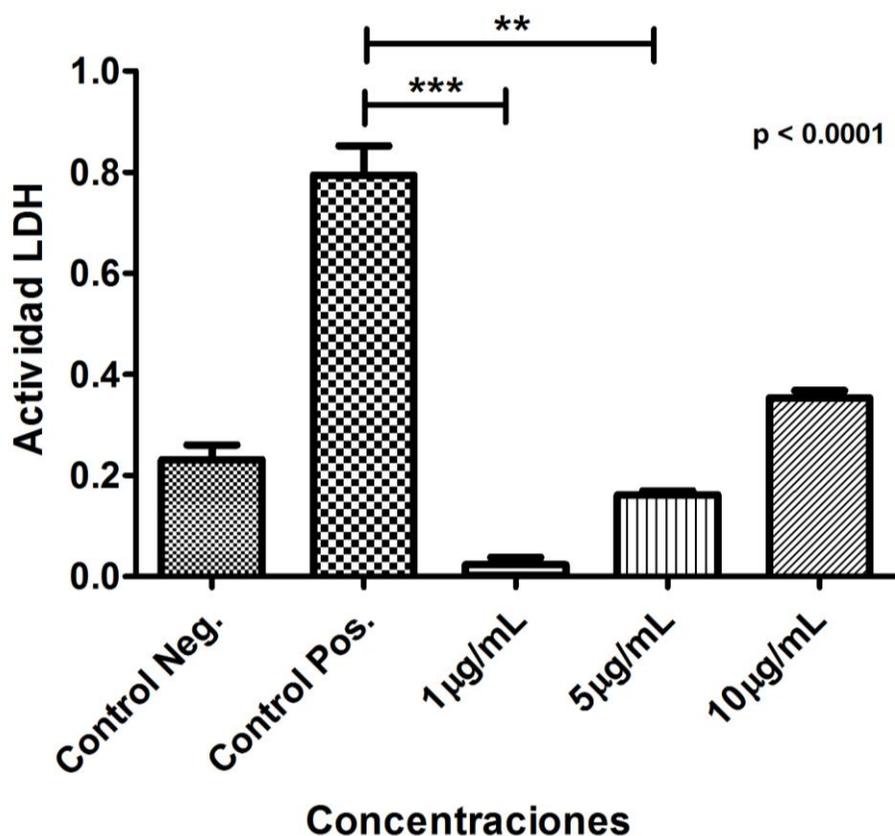
Para el extracto CC13 del alga *C. amplivesiculatum* se determinó que las concentraciones de trabajo para los ensayos antivirales fueron 10 y 15µg/mL, ya que estas mostraron un efecto citotóxico aceptable. Se determinó que las primeras concentraciones (1 y 5µg/mL), a pesar de su baja citotoxicidad, no eran necesarias para los ensayos posteriores (Figura 12).



**Figura 13. Evaluación del efecto citotóxico de la fracción CC20 de *C. amp.* sobre la línea celular HuH-7.** La actividad del extracto no mostró una disminución aparente de la población celular ya que respecto al control positivo, no hubo detección significativa de la enzima LDH en las lecturas. (Abs = 490nm).

De manera similar al extracto CC13 de *C. amp.*, el extracto CC20 de la misma alga, se determinó que las concentraciones de 10 y 15µg/mL fueron las más adecuadas ya que la viabilidad celular se mantuvo, demostrándose en la escasa detección de la enzima LDH, en comparación con el control positivo (Figura 13).

### 7.2.2 *Macrocystis pyrifera*



**Figura 14.** Evaluación del efecto citotóxico de la fracción F1A del alga *Macrocystis pyrifera* (*M. pyr.*) sobre la línea celular HuH-7. Donde las concentraciones de 1 µg/mL y 5 µg/mL no muestran actividad significativa respecto al control positivo. (Abs = 490nm).

Con respecto a la actividad citotóxica de las fracciones de *Macrocystis pyrifera* (F1A y F2A) se encontró que a concentraciones de 1 y 5 µg/mL ninguno de las dos concentraciones produjo toxicidad aparente sobre la población celular, sin embargo, a una concentración de 10 µg/mL ambas fracciones mostraron una toxicidad significativa ya que las lecturas de la actividad de la enzima LDH aumentaron respecto a las dos primeras concentraciones (Figura 14 y 15). Con estos resultados se decidió que las concentraciones de 1 y 5 µg, eran las más adecuadas para estudiar el potencial antiviral de las fracciones de *M. pyrifera*.

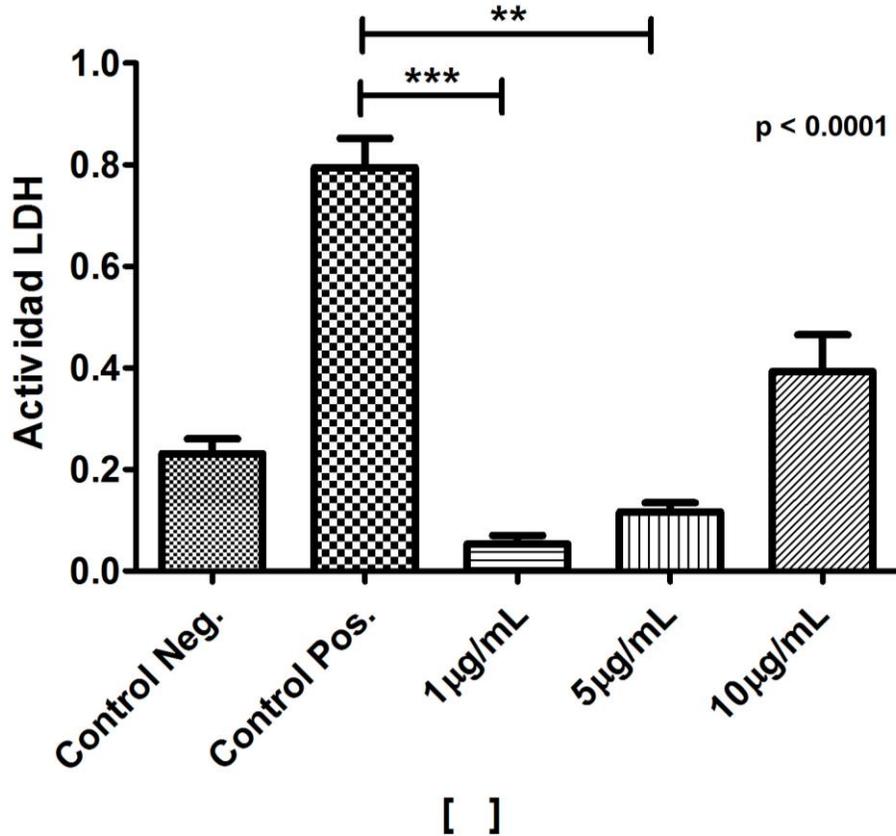


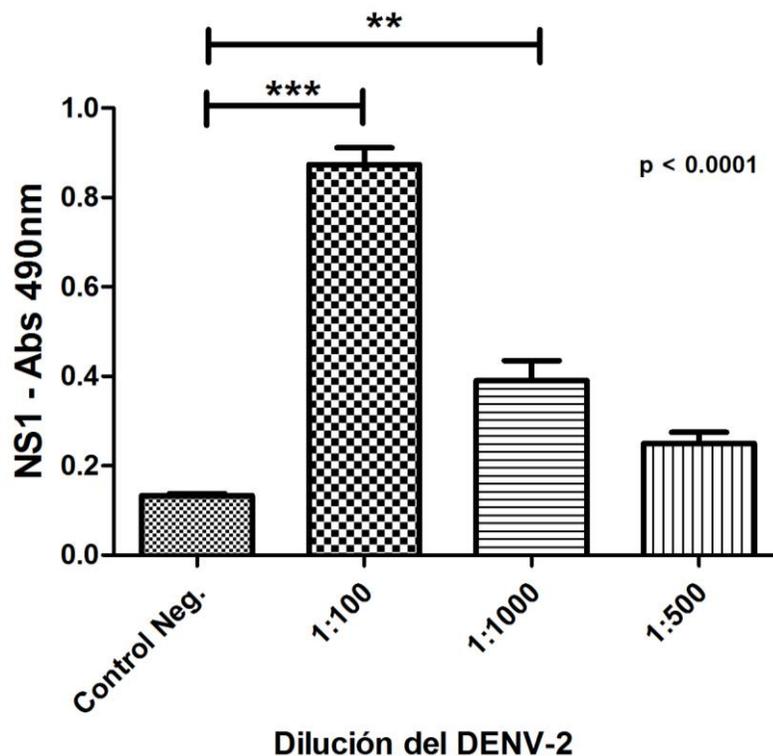
Figura 15. Evaluación del efecto de la fracción F2A del alga *M. pyr* sobre la línea celular HuH-7. Donde de igual manera que la fracción anterior, las primeras dos concentraciones presentan un grado de citotoxicidad aceptable. (Abs = 490nm).

### 7.3 Ensayos para la detección de la partícula NS1

Posteriormente, definidas las concentraciones no citotóxicas de las fracciones de las algas marinas, se procedió a cuantificar la presencia de la glicoproteína no estructural 1 (NS1) la cual es sintetizada durante la etapa replicativa del virus del dengue. La determinación se hizo por ELISA tipo sándwich como una estrategia para detectar en forma indirecta el grado de multiplicación del virus del dengue y se definió que la dilución 1:100, con una MOI aproximada de 1, fue el control positivo más adecuado para comparar la acción de los diferentes extractos a las diferentes concentraciones, puesto que la detección de la proteína NS1 a la

dilución mencionada, presentó valores significativamente más elevados que a las diluciones 1:500 (MOI=0.5) y 1:1000 (MOI=0.1), 48 h.p.i. (Figura 16).

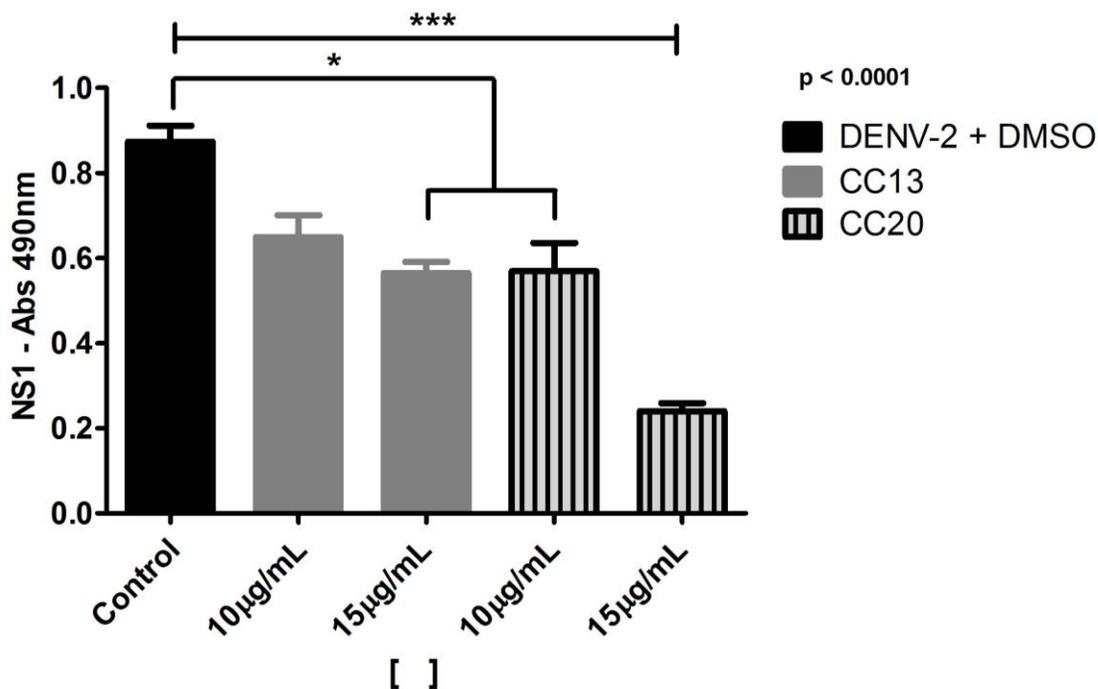
### 7.3.1 Infección del DENV-2 en células HuH-7.



**Figura 16. Grupo control para los ensayos posteriores de evaluación del efecto antiviral de los extractos de alga marina.** Se observa la detección de la proteína viral NS1 producida 48 h.p.i. La MOI para las diluciones 1:100, 1:500 y 1:1000 son 1, 0.5 y 0.1, respectivamente.

Se decidió utilizar como control positivo las células infectadas a una MOI = 1 ya que los títulos de NS1 fueron más significativos y el potencial efecto antiviral de los extractos podría ser más evidente. Se usó como control negativo células no infectadas con DENV-2.

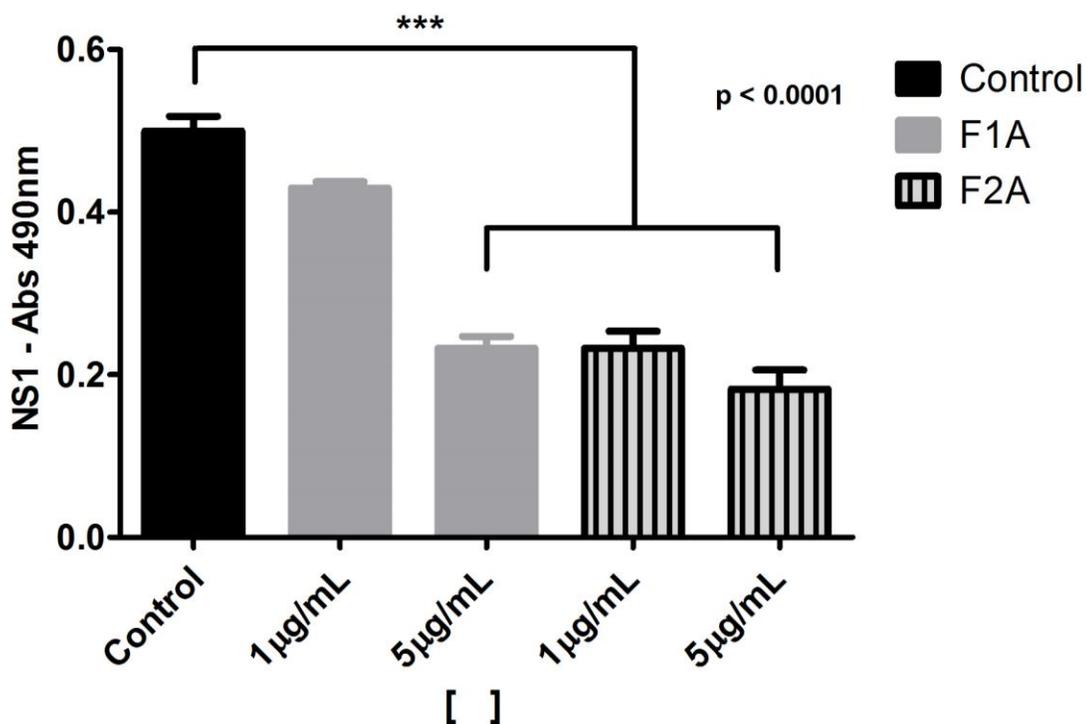
#### 7.4 Actividad antiviral de fracciones de *Codium amplivesiculatum*



**Figura 17. Evaluación del efecto antiviral de dos fracciones de *C. amp.* en células HuH-7 infectadas con DENV-2.** Se observa una disminución aparente respecto al control positivo, en las lecturas de la proteína NS1 en los compuestos CC13 y CC20 a una concentración de 15µg/mL, con una MOI = 1, 48 h.p.i.

Para el caso de *C. amplivesiculatum*, los resultados mostraron que las fracciones CC13 y CC20 a una concentración de 15µg/mL produjeron una disminución significativa en los títulos virales, con respecto al control positivo 48 h.p.i. (Figura 17).

## 7.5 Actividad antiviral de fracciones de *Macrocystis pyrifer*



**Figura 18. Determinación del efecto antiviral de *M. pyr.* en células HuH-7 infectadas con DENV-2.** Se utilizaron dos concentraciones de las fracciones F1A y F2A; en comparación con el control positivo, se observa una disminución significativa en la detección de la partícula NS1 a una concentración de 5µg/mL, a una MOI = 1, 48 h.p.i.

Con respecto al potencial antiviral de las fracciones de *M. pyrifer*, los ensayos demostraron que las fracciones F1A y F2A a una concentración de 5µg/ml tuvieron efecto en la disminución de las lecturas de la proteína viral NS1 del virus, 48 h.p.i. (Figura 18).

## 8. DISCUSION

El uso de productos naturales para tratar distintos padecimientos de salud se ha vuelto recurrente en la actualidad. La investigación de la actividad biológica de productos de origen marino, en especial de algas marinas, ha sido frecuente en los últimos años, ya que se ha observado *in vitro* que algunos de sus principios activos, han demostrado buena respuesta antiviral a concentraciones que no comprometen la viabilidad de cultivos celulares.

En la actualidad, la creciente resistencia bacteriana y viral ante los distintos tratamientos farmacológicos comienza a ser una grave problemática porque el número de microorganismos que presentan diversos mecanismos de defensa aumenta cada vez más. Los compuestos sintéticos desarrollados son cada vez más ineficaces debido al uso indiscriminado en la práctica médica, por lo tanto, el desarrollo de nuevos agentes antivirales y la posible combinación de éstos con productos naturales es fundamental para el tratamiento de la enfermedad.

Sin embargo, la dificultad que presenta el estudio de la actividad biológica de los metabolitos presentes en dichos productos, son la diversidad y complejidad de algunas de sus moléculas activas, es decir su heterogeneidad (Mandal *et al*, 2007); y por otro lado, establecer la relación entre la estructura y la actividad de estas moléculas sobre sistemas *in vitro*.

El uso de cultivos celulares abre la posibilidad de estudiar el comportamiento de determinadas sustancias metabólicas, observar el efecto de ciertos fármacos y moléculas innovadoras antes de ser aplicados a sistemas *in vivo*. En una revisión bibliográfica hecha por Talarico y colaboradores (2005), menciona que el DENV puede infectar diversos tipos celulares, sin embargo, algunas de ellas no son representativas de los verdaderos blancos tisulares en una infección natural, y consecuentemente, no son totalmente apropiados para estudios antivirales, sin embargo, en el presente trabajo se eligió la línea celular HuH-7, debido a su propagación relativamente sencilla además de que permite una rápida y positiva replicación del virus, de manera que estas células derivadas de hepatoma

facilitaron el estudio *in vitro* con el DENV-2 a distintos valores de MOI (Figura 16), para determinar el efecto potencial antiviral de extractos de origen marino.

Antes de evaluar el potencial antiviral de cualquier producto natural se debe determinar su citotoxicidad, pues un compuesto con una posible aplicación terapéutica debe tener poco o ningún efecto en el metabolismo celular y, en otro plano, no ser tóxico al hospedero. Se han desarrollado varios modelos para evaluar la citotoxicidad del producto; en una revisión hecha por Pérez y colaboradores (2012), mencionan que uno de los mejores métodos para evaluar dicho efecto es a través de ensayos colorimétricos, y el ensayo del MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) es el más común, donde se determina la capacidad de la células para reducir dicho compuesto, determinando la capacidad celular a través de la medición indirecta de la integridad mitocondrial y su actividad funcional. Sin embargo, la elección de un método para evaluar el efecto citotóxico debe ser en función de algunas características como son la sensibilidad de detección, la estabilidad de los reactivos, la disponibilidad de instrumentos de lectura, costo y reproducibilidad del método, por lo que el kit comercial Cytotox 96® fue de gran ayuda cumpliendo con estos parámetros: alta sensibilidad (en la detección de la enzima LDH), buena estabilidad de los reactivos (a diferencia del MTT, que es fotosensible) y bajo costo, por lo que se consideró que este método fue el más adecuado para evaluar la citotoxicidad de los extractos de alga marina utilizados en el presente trabajo.

Existen pocos trabajos disponibles donde evalúan la actividad citotóxica de extractos de alga marina del genero *Codium*. Otha y colaboradores (2009) evaluaron este efecto en células Vero y MDCK (células de epitelio de riñón canino *Madin-Darby*), donde reportan baja toxicidad a una concentración de los extractos de hasta 4300µg/mL. Por otro lado, Marin (2013) evaluó el mismo efecto citotóxico frente a líneas celulares tumorales de cáncer de próstata (PC-3), de cáncer de colon (HCT-15) y de cáncer de mama (MCF-7). Sin embargo, cabe destacar que ambos autores usaron un método completamente distinto al del presente trabajo para evaluar dicho efecto, donde el primero usó un método de tinción por

exclusión con azul de tripán y el segundo mediante un bioensayo de inhibición de crecimiento celular con sulfohordamina B. Marín (2013) reportó que los extractos de *C. amplivesiculatum* producen niveles bajos de inhibición celular con valores de 4.39% para las células MCF-7 y de 7.18% para las células HCT-15 a concentraciones de 50µg/mL; considerando lo anterior, a pesar de la diferencia de las metodologías de evaluación de citotoxicidad, se confirma el escaso efecto observado en la línea HuH-7 de ambos extractos del alga *C. amplivesiculatum* (CC13 y CC20) a concentraciones inclusive más bajas que las reportadas por otros autores (10 y 15µg/mL) (Figura 12 y 13), los cuales posteriormente se destinaron a evaluar su potencial antiviral, ya que cumplieron con las condiciones mencionadas en el párrafo anterior.

Por otro lado, respecto a la actividad citotóxica del alga *M. pyrifera*, no hay suficientes trabajos disponibles al respecto. Mayer y colaboradores (1987) evaluaron extractos dializados de esta alga en dos líneas tumorales; en estos ensayos utilizaron la línea celular P-388 (de leucemia linfocítica murina) y la línea KB (células de carcinoma epidermoide de nasofaringe humana), donde a concentraciones menores de 10µg/mL, mostraron una citotoxicidad aceptable en ambas líneas celulares, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde las concentraciones de 1 y 5µg/mL mostraron un bajo efecto tóxico frente a células de hepatoma humano (Figura 14 y 15), por lo que éstas concentraciones fueron seleccionadas para los posteriores ensayos antivirales.

A pesar del creciente auge de investigación de algas marinas, no existen suficientes reportes de la bioactividad de las algas *C. amplivesiculatum* y *M. pyrifera*, en especial acerca de la actividad de compuestos esteroidales y derivados glicosídicos -entre otros- (principales macromoléculas de *Codium* sp.) y fucanos (principal macromolécula de *Macrocystis* sp.). Cabe destacar que la mayoría de las investigaciones publicadas acerca de la bioactividad tanto de una como de otra alga, se enfocan principalmente a su actividad antimicrobiana y los escasos reportes acerca de ensayos antivirales con extractos de éstas algas se

han enfocado principalmente a determinar su efecto sobre la inhibición de algunos virus envueltos como el virus de la inmunodeficiencia humana, citomegalovirus humano y el virus herpes simplex, por mencionar algunos (Mandal *et al*, 2007).

De acuerdo a lo reportado por Marín (2013), el compuesto identificado del extracto CC13 es clerosterol (un derivado de los esteroides) y el del extracto CC20 es un diacilglucoglicérido, cuya estructura química es similar al grupo de los codiósidos; del primero se evaluó por primera vez su actividad antibacteriana (Marin *et al*, 2013) y del segundo compuesto, existen reportes de las diversas actividades biológicas que se han comprobado en diversos estudios: antitumoral, antibacteriana y citotóxica, por mencionar algunos. Entonces, hay realmente muy poca investigación de estos compuestos en particular relacionada a la actividad antiviral, por lo que este trabajo se enfocó precisamente a evaluar una nueva actividad biológica de dichos compuestos del alga *Codium amplivesiculatum*. Como se muestra en las Figura 17, las concentraciones de 10 y 15µg/mL de las fracciones CC13 y CC20 disminuyeron los títulos de la proteína viral NS1, siendo más significativa a la concentración de 15µg/mL, de la fracción CC20 correspondiente al diacilglucoglicérido, lo que podría dar lugar a una investigación más robusta acerca de su mecanismo de acción en otros posibles bioensayos, sin ser menos importante el efecto del compuesto clerosterol (de la fracción CC13).

Ya existen reportes acerca de la actividad biológica del alga *C. amplivesiculatum*, entre ellos su actividad antiviral, donde se destaca la actividad de algunos de sus metabolitos como galactanos y polisacáridos sulfatados, donde estos últimos tienen la capacidad de interferir con la unión inicial del virus con la célula blanco, y consecuentemente conduce al bloqueo de la entrada viral (Damonte *et al*, 2004).

El alga parda *M. pyrifera* contiene metabolitos entre los que destaca el alginato de sodio, laminaran y fucoidano, y es precisamente este último grupo de polisacáridos los que presentan una actividad antiviral. Las fracciones utilizadas en este trabajo fueron caracterizadas por Castro (2013) y corresponden al grupo de los polisacáridos sulfatados de acuerdo a los resultados que arrojaron la

resonancia magnética nuclear de protón, sin embargo no fue posible conocer su estructura ni su peso molecular exacto. Estos datos hubiesen podido ser de gran utilidad para compararlos con estudios efectuados por Mayer (1987) donde muestran que el peso de las moléculas de fucoidano oscilan entre 10,000 y 50,000 Daltons. No se puede asegurar que los extractos utilizados en este trabajo pertenezcan a este grupo, sin embargo, si se puede constatar su actividad. Los experimentos realizados por Mayer (1987) muestran que el fraccionamiento de fucoidano en 5 extractos, sólo dos presentaron una actividad relevante sobre el virus de la estomatitis vesical (VSV); estos resultados no pueden ser comparados con los de Castro (2013) puesto que el método de extracción fue completamente diferente, pero cabe mencionar que de las 5 fracciones que Castro obtuvo, también 2 de ellas presentaron actividad antiviral. Entonces, considerando que los extractos F1A y F2A como fucoidanos, la actividad que presentan sobre el DENV-2 puede ser análoga a los experimentos con VSV. Cabe destacar la actividad de las fracciones F1A y F2A a una concentración de 5µg/mL (Figura 18) donde los títulos de la proteína viral NS1 disminuyeron notablemente respecto al control positivo, lo cual también puede dar pie a estudios más específicos para evaluar el posible mecanismo de acción sobre el DENV-2.

Finalmente, se considera que todas las fracciones muestran un efecto antiviral significativo notándose en la reducción del título de la proteína NS1, en comparación con el control positivo, sin embargo, cabe destacar que el efecto más notable lo llevaron a cabo los extractos CC20 [15µg/mL], F1A [5µg/mL] y F2A [1 y 5µg/mL], los cuales pueden ayudar a plantear nuevas hipótesis sobre el efecto antiviral de los compuestos conocidos como clerosterol, diacilglucoglicérido y fucoidanos, realizando nuevos bioensayos para ampliar la investigación de las algas *C. amplivesiculatum* y *M. pyrifera*.

## 9. CONCLUSIONES

- Las fracciones CC13 y CC20 del alga *C. amplivesiculatum* no fueron tóxicas para las células de hepatoma HuH-7 a las concentraciones de 10 y 15µg/mL.
- Las fracciones F1A y F2A del alga *M. pyrifera* no fueron tóxicas para las células de hepatoma HuH-7 a las concentración de 1 y 5µg/mL.
- Las fracciones CC13 y CC20 a una concentración de 15µg/mL produce una reducción significativa de la infección por DENV-2 en células de hepatoma HuH-7 infectadas a una MOI=1, sin embargo, la segunda concentración fue de manera más notable.
- La fracción F1A y F2A a una concentración de 5µg/mL del alga *M. pyrifera*, reduce significativamente las lecturas de NS1 de DENV-2 en células de hepatoma HuH-7 infectadas con virus a una MOI=1.
- Se demostró un efecto antiviral indirecto in vitro de los extractos de alga marina sobre el DENV-2 a través de la disminución de los títulos de la proteína NS1.

## 10.PERSPECTIVAS

El estudio de metabolitos secundarios de productos naturales abre un panorama terapéutico alternativo ya que dilucidando la estructura exacta de la molécula que presenta cierta actividad, se podrían ampliar los estudios y dar lugar al entendimiento de nuevos mecanismos celulares para combatir, ya sea de manera profiláctica o terapéutica, la infección por DENV-2.

Se sugiere profundizar el estudio del efecto virucida de los extractos para determinar su mecanismo de acción.

Se recomienda realizar la técnica de titulación viral conocida como Unidad Formadora de Placas, con el fin de precisar la disminución efectiva de la replicación viral, adaptando la línea celular HuH-7 a las condiciones necesarias para llevar a cabo ésta técnica.

El presente trabajo puede dar pie a investigaciones más robustas acerca la actividad biológica de algas marinas, puesto que los metabolitos presentes en ellas son exclusivos y su aplicación a sistemas biológicos sería una alternativa interesante para desarrollo de terapias alternativas naturales, ya que después de todo son la base fundamental de la terapia farmacológica moderna.

## 11.REFERENCIAS

**Álvarez D.E.**, Lodeiro M.F., Ludueña S.J., Pietrasanta L.I., Gamarnik A.V. (2005) Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *Journal of Virology*. Jun;79(11):6631-43.

**Álvarez V.M.**, González R.A., Díaz M.D., Morier D.L., Guzmán M.G. (2010). Normalización de la técnica de neutralización por placas en las células Vero para los virus del dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 62(2): 138-145

**Aviso epidemiológico de dengue:** incremento de casos de dengue en México. [en línea]. México: *Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica (CONAVE)*, Julio 2012- [ref. de 27 de agosto de 2013]. Disponible en: <[http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/vigilanciaepidem/alerta\\_dengue\\_050712.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/vigilanciaepidem/alerta_dengue_050712.pdf)>

**Bhatt, S.**, Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., Myers, M.F., George, D.B., Jaenisch, T., Wint, G.R., Simmons, C.P., Scott, T.W., Farrar, J.J., Hay, S.I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*. Vol. 496. 504-507.

**Barreto dos Santos, F.**, Pereira-Miagostovich, M., Ribeiro N.R., Edjil D., Gonsalves S.H., Riley L., Harris E. (2002). Complete nucleotide sequence analysis of a brazilian dengue virus type 2 strain. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 97(7): 991-995

**Castro Silva, Elena Stephanie.** (2013) Evaluación *in vivo* de la actividad anticoagulante de polisacáridos sulfatados extraídos del alga *Macrocystis pyrifera*. *Tesis para maestría no publicada*. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S., México.

**Damonte, Elsa B.** (2006). Dengue: un viejo y nuevo desafío para la quimioterapia antiviral. *Química viva*. Buenos Aires, Argentina. 5(2): 52-62

**Damonte, E.B.**, M.C. Matulewicz & A.S. Cerezo. 2004. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Current Medicinal Chemistry*. 11(18):2399-2419.

**Encalada Díaz, G. A.** (2003). Estudio epidemiológico, perfil clínico y factores de riesgo del dengue en el hospital del niño Dr. Rodolfo Nieto Padrón. *Tesis para especialidad no publicada*. Villahermosa, Tabasco. México.

**Fonseca Coronado, S.** (2000). Inmunopatología del dengue clásico y hemorrágico: células blanco en la infección natural y perfil serológico de la respuesta inmune. *Tesis de licenciatura no publicada*. UNAM. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

**Galarza, Esteban J.** (2006). “Efecto de los dengue virus en la actividad plaquetaria”. *Tesis para maestría no publicada*. UNAM. Facultad de Química. México, D.F.

**Gould E.A.** and Clegg J.C.S. (1991) Growth, titulation and purification of alphaviruses and flaviviruses. En Mahy BWJ (ed). *Virology: a practical approach*. oxford, UK: IRL Press, pp. 43-78

**Guy, B.**, Barrere, B., Malinowski, C., Saville, M., Teysou, R., Lang, J. (2011). From research to phase III: Preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*. 29(2011), 7229-7241.

**Guy, B.**, Saville, M., Lang, J., (2010). Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Human vaccines*. 6:9, 696-705.

**Hernández Carmona, G.** (1988). Evaluación, crecimiento y regeneración de mantos de *Macrocystis pyrifera* en la costa occidental de la Península de Baja California, México. *Tesis para maestría no publicada*. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S., México.

**HuH-7 Cell Line.** Hepatocelular carcinoma cells. General Information. [ref. de 22 de Mayo de 2013] Disponible en: <http://huh7.com/>

**Ibáñez Bernal, S.** y Gómez Dantes, H. (1995). Los vectores del dengue en México: una revisión crítica. *Salud Pública de México*. 37supl:53-63

**Krelle, A.C.**, Okoli, A.S., Mendz, G.L. (2013). HuH-7 human liver cancer cells: A model system to understand hepatocellular carcinoma therapy. *Journal of cancer therapy*. 4:606-631

**Lang, Jean.** Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. (2012). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 54(Supl.18): S15-S17, October.

**Mandal, P.**, Mateu, C.G., Chattopadhyay, K., Pujol, C.A., Damonte, E.B. y Ray, B. (2007). Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. 18:153-162

**Marín Alvarez, Alejandro.** (2013). Potencial bioactivo de algas del género *Codium*, recolectadas en Baja California Sur, México. *Tesis para doctorado no publicada*. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S., México.

**Marin Alvarez, A.**, Murillo Alvarez, J.I., Muñoz Ochoa, M. & Molina Salas, G.M. (2013). Chemical constituents and bioactivity of *Codium amplivesiculatum* Setchell & N.L. Gardner (Chlorophyta; Bryopsidales). *CICIMAR Oceanides*. 28(2): 1-6

**Martinez Torres, Eric.** (1995). Dengue y dengue hemorrágico: aspectos clínicos. *Salud pública de México*. 37supl: 29-44

**Mayer, M.S.A.**, Diaz, A., Pesce, A., Criscuolo, M., Groisman, J.F., De Lederkremer, R. M. (1987). Biological activity in *Macrocystis pyrifera* from Argentina: sodium alginate, fucoidan and laminaran. III. Antiviral activity. *Hidrobiología*. 151/152: 497-500.

**Mayer, M.S.A.**, Panick, B., Bonfil, R.D., Espeche, M.E., Fraile, E.R., Diaz, A., Pesce, A., Criscuolo, M., Groisman, J.F., De Lederkremer, R.M.. (1986). Screening of antitumor, cytotoxic, immunologic, antimicrobial and antiviral activity in

Macrocystis pyrifera, a Patagonian marine alga of economic importance. *Actas II. Congr. Algas Mar. Chilenas*: 177-183.

**Mercado Meza, María M.** (2003). Epidemiología del dengue en el Hospital Infantil del Estado de Sonora. *Tesis de especialidad no publicada*. UNAM. Facultad de Medicina. Hermosillo, Sonora. México.

**Mojica Obrador, Josefina.** (1999). Frecuencia de las diferentes formas de presentación del cuadro clínico del dengue. *Tesis de especialidad en medicina familiar no publicada*. UNAM. Tampico, Tamaulipas. México.

**Montesano Castellanos, R.** y Ruiz Matus, C. (1995). Vigilancia epidemiológica del dengue en México. *Salud Pública de México*. 37supl; 64-76

**Ocazonez, R.E.,** Meneses, R., Torres, F.A., Stashenko, E. (2010). Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 105(3): 304-309

**Ohta, Y.,** Lee, J.B., Hayashi, K., Hayashi, T. (2009). Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect. *Biological & Pharmaceutical bulletin*. 32(5): 892-898

**Panorama epidemiológico** de fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue en entidades federativas. [en línea]. México: *Secretaría de Salud*, Marzo 2014- [ref. de 10 de Marzo de 2014]. Disponible en: <[http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2014/informes\\_2014.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2014/informes_2014.html)>

**Pang, T.,** Cardoso, M.J. y Guzman, M.G. (2007). Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunology and Cell Biology*. 85: 43-45.

**Pardee, K.I.,** Ellis, P., Bouthillier, M., Towers, G.H.N., French, C.J. (2004). Plant virus inhibitors from marine algae. *Canadian Journal of Botany*. 82(3): 304

**Pedroche, F.F.**, Silva, P.C. y Chacana, M. (2002). *Monografías ficológicas*. 1:11-74.

**Pérez Betancourt, Yunys.** (2010). Papel del sistema inmune en la patogenia de la infección por el virus del dengue. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*. 19(1): 23-29

**Perez Hernandez, Z.**, de Armas Sanabria, E., Oliva Hernandez, Y. (2010). Evaluación de la eficacia antiviral de nuevos fármacos candidatos a fitoproductos. *Revista electrónica de veterinaria*. 13(10): 1-14

**Pierson, T.C.** y Diamond, M.S. (2012). Degrees of maturity: The complex structure and biology of flaviviruses. *Current Opinion in Virology*. 2(2): 168-175.

**Ramos, C.**, Garcia, H., Villaseca, J. (1993). Fiebre hemorrágica y síndrome de choque por dengue. *Salud pública de México*. 35: 39-55

**Rothman, A.L.** (2011). Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature*. Vol. 11. 532-543

**Sánchez Burgos, G.G.**, López Alvarado, M.A., Castañeda Desales, D., Ruiz Gómez, J., Ramos Castañeda, J. (2008). Prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra los serotipos del virus dengue en universitarios de Tabasco, México. *Salud pública de México*. 50: 362-366

**Savi, A.L.**, Barardi, R.C., Simoes, O. C.. (2006). Evaluation of antiherpetic activity antenotoxic effects of Tea catechin derivates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(7): 2552-2557

**Schmitz, J.**, Roehrig, J., Barret, A., Hombach, J. (2011). Next generation dengue vaccines: a review of candidates in preclinical development. *Vaccine*. 7276-7284.

**Soares, A.R.**, Robaina, M.C.S., Mendes, G.S., Silva, T.S.L., Gestinari, L.M.S., Pamplona, O.S., Yoneshigue-Valentin, Y., Kaiser, C.R., Villela-Romanos, M.T.

(2011). Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22(4): 714-723

**Talarico, L.B.**, Pujol, C.A., Zibetti, R.G.M., Faría, P.C.S., Nosedá, M.D., Duarte, M.E.R. y Damonte, E.B. (2005). The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral research*. 66:103-110

**Talarico, Laura B.** (2008). La entrada del virus dengue a la célula como un potencial blanco antiviral: estudio de polisacáridos sulfatados como antivirales. *Química viva*. Buenos Aires, Argentina. 7(2): 113-133

**Thanh-Sang Vo**, Dai-Hung Ngo, Quang Van Ta, Se-Kwon Kim. (2011). Marine organisms as a therapeutic source against herpes simplex virus infection. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 44:11-20

**Thirión Icaza, J.** (2010). El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México. Bayer Environmental Science. Bayer de México, S.A. de C.V. pp.: 17

**Toledo Romani, M.E.**, Baly-Gil, A., Ceballos Úrsula, E., Boelaert, M., Van der Stuyft, P. (2006). Participación comunitaria en la prevención del dengue: un abordaje desde la perspectiva de los diferentes actores sociales. *Salud pública de México*. 48: 39-44

**Velandia, Myriam L.** y Castellanos, Jaime E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. Bogota, Colombia. 15(1): 33-43

**VonSydow, F.**, Santiago, M., Neves-Souza, P., Cerqueira, D., Gouvea, A., Lavatori, M., Bertho, A., Kubella, C. (2000). Comparison of dengue infection in human mononuclear leukocytes with mosquito C6/36 and mammalian Vero cells using flow cytometry to detect virus antigen. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 95(4): 483-489

**World Health Organization (WHO)**, (2009). Dengue. Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: 25-28.

## 12. ANEXOS

### *Anexo 1. Método de titulación de DENV-2*

Se utilizó el serotipo 2 del DENV, cepa New Guinea C donado por el INDRE, el cual se inoculó en cerebro de ratones BALB/c lactantes, procesados según el protocolo indicado por Gould (Gould, 1991) y almacenados en alícuotas de -80°C. Los títulos virales se determinaron por el ensayo de placas líticas en células BHK-21 mediante el siguiente protocolo.

Se dispusieron  $2.5 \times 10^5$  células/pozo en placas para cultivo de 24 pozos (Corning) en un volumen de 0.5mL de medio de cultivo por pozo y se incubaron a 37°C en incubadora húmeda con 5% de saturación de CO<sub>2</sub>. Después, se prepararon diluciones seriadas (sin diluir hasta 1:10,000) de los extractos de cerebro a titular en solución Hanks (Gibco) suplementado con SFB al 0.5% y se incubaron a 37°C por 1h. Entonces se agregaron 50µL/pozo de cada dilución viral y se incubó a 37°C por 4h y finalmente se agregó 0.5mL/pozo de solución de “overlay” (medio mínimo esencial suplementado con 7.5mL de SFB, 1% de carboximetilcelulosa de viscosidad media y estreptomycin/penicilina). Las placas se incubaron a 37°C por 5 días al final de los cuales se eliminó el medio de cultivo por aspiración y las monocapas se tiñeron con solución de naftol blue black (naftol blue black 0.1%, acetato de sodio 0.165M y ácido acético glacial 6%) durante 15 minutos a 37°C. Finalmente se lavaron con agua, se dejaron secar y se contaron las placas.

El título final de DENV-2 fue de  **$7 \times 10^6$  UFP/mL**.

Los datos de este protocolo no son mostrados a detalle puesto que fueron realizados previos a los experimentos de este trabajo.

## Anexo 2. Cálculos para determinar la Multiplicidad de Infección (MOI)

La determinación de la MOI se realizó para las diluciones de trabajo (1:100, 1:500 y 1:1000) de cada extracto (CC13, CC20, F1A Y F2A) de cada alga (*Codium amplivesiculatum* y *Macrocystis pyrifera*). Tomando en cuenta los siguientes factores:

$$MOI = \frac{UFP}{1000\mu L} \times \frac{Vol. DENV-2}{VF Stock} \times \frac{Alicuota Stock}{VF Mezcla} \times \frac{Vol. Adición}{Pozo} \times \frac{Pozo}{5000 Cels}$$

Para la dilución de trabajo 1:100, la MOI es:

$$MOI_{1:100} = \frac{7 \times 10^6 UFP}{1000\mu L} \times \frac{40\mu L}{400\mu L} \times \frac{50\mu L}{500\mu L} \times \frac{100\mu L}{Pozo} \times \frac{Pozo}{5000 Cels} = \mathbf{1.4 \sim 1}$$

Para la dilución de trabajo 1:1000, la MOI es:

$$MOI_{1:1000} = \frac{7 \times 10^6 UFP}{1000\mu L} \times \frac{40\mu L}{400\mu L} \times \frac{5\mu L}{500\mu L} \times \frac{100\mu L}{Pozo} \times \frac{Pozo}{5000 Cels} = \mathbf{0.14 \sim 0.1}$$

Para la dilución de trabajo 1:500, la MOI es:

$$MOI_{1:500} = \frac{7 \times 10^6 UFP}{1000\mu L} \times \frac{40\mu L}{400\mu L} \times \frac{10\mu L}{500\mu L} \times \frac{100\mu L}{Pozo} \times \frac{Pozo}{5000 Cels} = \mathbf{0.56 \sim 0.5}$$