



Universidad Nacional Autónoma De México
Facultad De Estudios Superiores Zaragoza

Inhibición de la replicación del virus Sincitial Respiratorio y
virus Herpes Simplex tipo I mediante el uso de
nanopartículas.

Tesis

Qué para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta

Lucero Guadalupe Flores Díaz

Director de tesis: Dr. Carlos Cabello Gutiérrez

Asesor: Q.F.B. José Oscar González Moreno



México D.F. a 7 de Marzo del 2016.



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.

DEDICATORIAS

A mi madre Obdulia Salustia Flores Díaz por su apoyo incondicional, comprensión, amor y por siempre alentarme a seguir adelante. Es un orgullo contar con una madre como tú, de ti aprendí a luchar por mis metas y sueños, y sobre todo a cumplirlos. Eres para mí un ejemplo de vida. Este es nuestro logro, Te amo mama.

A mis hermanos Jessica y David por estar en las buenas y en las malas, por su amistad y amor. Por todos los momentos de felicidad, y siempre estar junto a mí no importando el momento, ni las circunstancias.

A mis abuelos Alfonso y Felipa, gracias por cuidarme, por los consejos, por los regaños, por el inmenso amor que me dieron.

A mis tíos Rodolfo y Nicolás por amarme, apoyarme, por alentarme a seguir adelante.

A ti por tu paciencia y comprensión, por tu amor, por tus regaños, por los abrazos y las palabras de aliento. Gracias Jesús.

A mis amigos Mario, Eduardo, Javier, Berenice, Salomón, Rodrigo, Jesús, por compartir los momentos buenos y malos, por su paciencia y soportar mi terrible carácter.

A mis profesores que por la educación, por los conocimientos transmitidos por la confianza y el apoyo siempre.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Cabello, por su paciencia por su guía, por la confianza brindada, por los conocimientos transmitidos, por los momentos compartidos.

Al Q.F.B. José Oscar González por su apoyo, por su guía por los consejos, por ser la gran persona que es.

A la empresa Gresmex S. A. de C. V. por haber financiado el proyecto y por la confianza que depositaron en mí.

A las personas que me apoyaron, que me brindaron su casa, su apoyo, un abrazo una palabra de aliento, que me escucharon, a todos ellos gracias.

ÍNDICE

Introducción	5
Antecedentes	6
Clasificación virus Sincitial Respiratorio	6
Características virales	6
Patogenia	9
Cuadro clínico	9
Tratamiento	10
Prevención	10
Clasificación del Virus del Herpes Simplex 1	11
Características virales	11
Ciclo de Replicación viral	13
Patogenia y Latencia	14
Cuadro clínico	14
Tratamiento	15
Prevención	16
Antisépticos y Desinfectantes	17
Características de un antiséptico y desinfectantes ideales	18
Usos	19
Nanotecnología	20
Planteamiento del Problema	23
Objetivos particulares	23
Hipótesis	20
Material Biológico	24
Reactivos y Soluciones	24
Equipos	25
Métodos	25
Diagrama de flujo	28
Diseño de investigación	28
Resultados	29
Análisis de resultados	43
Conclusiones	46
Referencias bibliográficas	47
Referencias de imágenes	48

INTRODUCCIÓN

La piel representa una barrera notablemente eficaz contra las infecciones. Cuando se produce una interrupción de la superficie de la piel, sea accidental o intencionalmente, el lecho de la herida puede verse invadida por un gran número de organismos potencialmente patógenos, comenzando así un proceso que puede derivar en una infección clínicamente establecida.

La mayoría de los organismos patógenos pueden persistir sobre superficies inanimadas por meses, el contacto con estas superficies favorece la transmisión de dichos patógenos.

Los virus están ampliamente distribuidos a nivel mundial, causantes de altas tasas de morbilidad y mortalidad.

La Organización Mundial de la Salud estima que el Virus Sincitial Respiratorio (VSR) es responsable de provocar 64 millones de infecciones alrededor del mundo y 160, 000 muertes por año mientras que alrededor del 70 al 90 % de la población adulta tienen anticuerpos para el Virus de Herpes Simplex y cerca del 40 % sufre infecciones recurrentes. Por lo que prevenir su brote y epidemias se ha vuelto un problema de salud pública.

Durante muchos años se han utilizado sustancias químicas aplicadas en la piel, con la finalidad de evitar infecciones. Para desinfectar áreas y materiales, generalmente se emplean soluciones desinfectantes como detergentes y productos clorados que suelen ser tóxicos, irritantes e incluso cancerígenos por exposición prolongada, que no poseen efectos virucidas. El compuesto nanoparticulado a probar se encuentra compuesto de agentes surfactantes aniónicos e iónicos, emolientes y humectantes, con un principio activo de extractos naturales nanoparticulado, lo que lo hace más noble con la piel, disminuyendo efectos secundarios. Por lo que se evaluara su efecto a diferentes concentraciones, sobre la replicación e inhibición de efecto citopático (ECP) de los virus Herpes Simplex y Sincitial Respiratorio propagados en cultivos celulares.

ANTECEDENTES

El virus sincitial respiratorio (VSR) se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, y en los países en desarrollo causa altas tasas de morbilidad y mortalidad en niños pequeños. Es muy contagioso y causa brotes agudos y epidemias. Se ha descrito que el VSR es capaz de infectar de manera recurrente las vías respiratorias de humanos a lo largo de la vida. A partir de los 4-5 años de edad la mayoría de los niños ya han generado anticuerpos específicos contra los antígenos del VSR ^{2, 3, 4, 6, 10, 11, 12}.

Estudios realizados en niños menores de seis meses muestran que el VSR es el agente etiológico del mayor número de bronquiolitis y neumonías que requieren hospitalización. Las infecciones por VSR en la niñez se han asociado a problemas pulmonares posteriores como el asma. ^{3, 4, 6, 11, 12}

Además, el VSR ocasiona enfermedades graves en pacientes geriátricos, adultos inmunodeprimidos, así como también en pacientes con diabetes y cirrosis. Es además asociado con enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, donde puede ser mortal. ^{3, 11, 12}.

CLASIFICACIÓN

El VSR está clasificado dentro del orden de los **Mononegavirales** (virus de una sola cadena RNA de polaridad negativa, con una nucleocápside helicoidal) y pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*.

CARACTERÍSTICAS VIRALES

El VSR es un virus pleomórfico de 150 a 300 nm, con genoma de RNA monocatenario y no segmentado de polaridad negativa con 15 385 nucleótidos, envoltura lipoproteíca que la obtiene por gemación, su nucleocápside es helicoidal de 13.5 nm de diámetro, con gradiente de sedimentación de 50s y un peso molecular aproximado de 5000 KD. El genoma contiene 10 RNAm, cada uno codifica para una proteína individual, de las cuales 9 son estructurales (F, G, SH, N, P, L y M), y dos no estructurales (NS1 y NS2), como se observa en la figura 1. ^{4, 5, 6, 11, 12}

Ancladas a la envoltura se encuentran tres proteínas transmembranales virales (F, G y SH). La proteína G, permite la unión al receptor de la célula hospedera, está glicosilada y se considera necesaria para la adsorción del virus a la célula huésped. La proteína F, factor esencial en la infección y la patogenia, ya que media la fusión de la envoltura y la membrana celular.

Es la responsable de iniciar el proceso de fusión virus-célula y célula-célula, ya que induce la fusión de membranas originando sincitios. También encontramos a una pequeña proteína hidrofóbica (**SH**) cuya función aún no está clara.

Asociadas al RNA viral se encuentran las proteínas virales la de nucleocápside (N), la fosfoproteína (P) y la polimerasa viral (L), estas proteínas constituyen el complejo ribonucleoprotéico (RNP).

La proteína L; con 1600 a 2200 aminoácidos, con un peso molecular de 160 a 200 KD. Se ha sugerido que es la polimerasa vírica. Se encuentra en baja proporción.
4, 12

La Proteína de matriz M. Interactúa con la bicapa lipídica y con la nucleocápside. Formada por 230 a 375 aminoácidos, tiene un peso molecular de 23 a 28 KD, es la proteína más abundante. Sus funciones principales son estabilizar la envoltura y organizar el ensamblaje durante la morfogénesis del virión. Por su abundante contenido de residuos básicos puede interactuar con la nucleocápside^{4, 5, 6, 12}.

La infectividad del virus es destruida por el éter, el cloroformo, la tripsina, por cambios de pH, es termolábil y su vida media a 56 °C es de 0.5 a 2.8 minutos, mientras que a 38° C es de 1 a 7 horas, sin embargo, es estable por varios meses a -50 °C. Algunas sales inorgánicas principalmente los cationes divalentes como el magnesio, calcio, o la glucosa y la sacarosa protegen al virus de la inactivación. La densidad de flotación del VSR en el cloruro de cesio es de 1.21 a 1.24 mg/ mL y en sacarosa es de 1.16 a 1.26 g/mL.

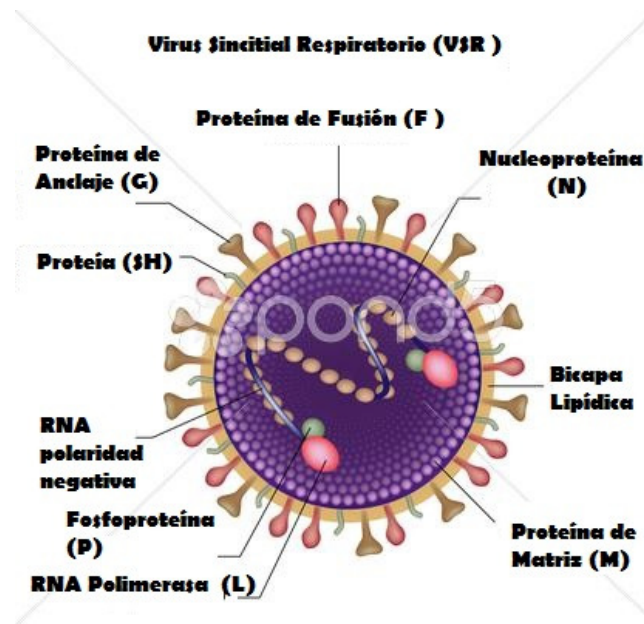


Figura 1. Representación esquemática del Virus Sincitial Respiratorio, donde se ilustran las proteínas de superficie F, G y SH, así como las proteínas estructurales, proteína M, Proteína N y el genoma viral una cadena de ARN de polaridad negativa. Así mismo la bicapa lipídica que lo envuelve.¹

EL ciclo de replicación lo encontramos esquematizado en la figura 3. Donde la replicación se lleva a cabo en el citoplasma celular. Una vez que el virus se une al receptor celular por la proteína G, el virión ingresa a la célula y por medio de la proteína F, fusiona su envoltura con la membrana celular, por lo que el proceso por el que entra a la célula se conoce como fusión. El genoma viral es liberado en el citoplasma e inicia la transcripción del RNA viral. Iniciando con la transcripción del genoma viral de cadena negativa para obtener secuencias de RNAm de 10 genes, ya que cada secuencia de RNAm codifica una sola proteína.

La transcriptasa se posiciona en el extremo 3' desplazándose a lo largo del genoma, a partir del gen NP. Una vez que finaliza la transcripción de genes con la participación de SH, NS y M, inicia la replicación del genoma, sintetizando cadenas positivas de RNA completas, que servirán como plantillas para la replicación de RNA genómico. Las cadenas negativas de RNA recién sintetizadas interactúan con la proteína NP y la transcriptasa del virión y luego con la proteína M. Las proteínas pasan al aparato de Golgi para glicosilarse y posteriormente migran a la membrana celular, mientras las demás proteínas y el genoma se van ensamblando y migrando hacia la superficie, para unirse a las glicoproteínas. Una vez ensamblados los viriones recién sintetizados son liberados de la célula infectada por gemación de la membrana plasmática. Posteriormente se lleva a cabo la unión célula-célula, por lo que no es necesario que los viriones recién sintetizados salgan al medio extracelular.

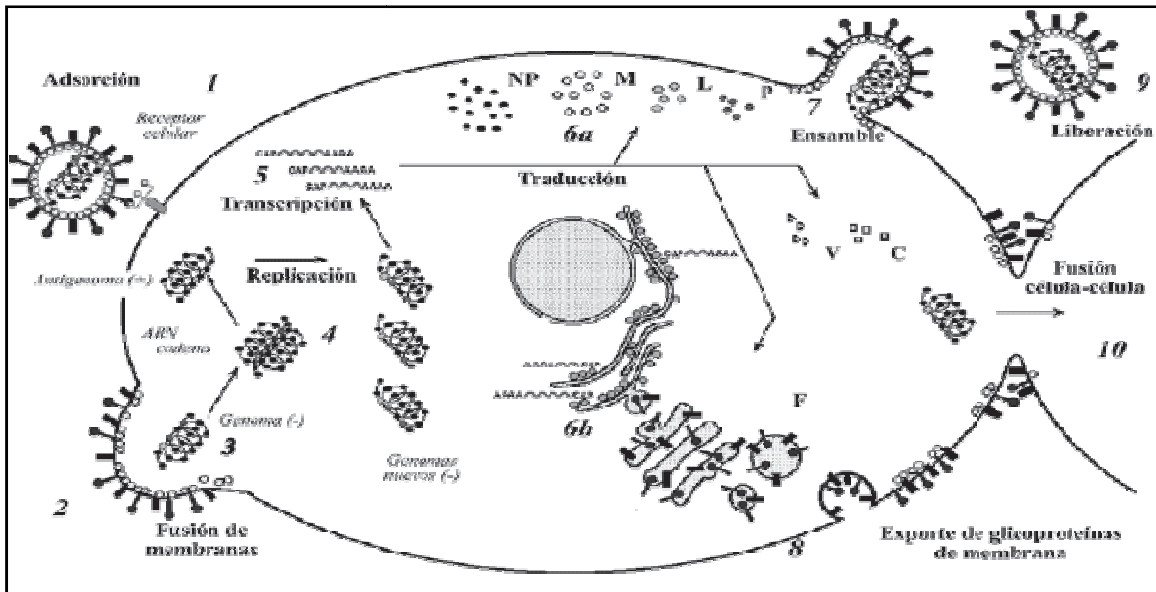


Figura 2. Proceso de replicación del VSR, 1) Unión de la proteína G al receptor celular, 2) El virus ingresa a la célula por fusión de la membrana celular y la viral, 3) El genoma viral es liberado en el citoplasma celular 4) Inicial la replicación del genoma viral, 5) Inicia la transcripción de los genes 6) Traducción de proteínas virales 7) Ensamblaje, 8) Exporte de glicoproteínas de membrana, 9) Liberación de viriones, 10) Fusión célula-célula por medio de la proteína F.⁴

PATOGENIA DE LA INFECCIÓN RESPIRATORIA

La transmisión se lleva a cabo a través de secreciones respiratorias en forma de partículas, así como contacto directo con manos, fómites y vía ocular.^{1, 2, 3, 4, 9, 10, 11,12}

El VSR se disemina por las vías respiratorias superiores tras el contacto con secreciones infectantes. La infección parece confinarse al epitelio respiratorio, con afección progresiva de las vías respiratorias medias e inferiores. Después de un periodo de incubación de dos a cinco días, el virus se replica en nasofaringe, ocasionando infecciones respiratorias agudas de vías altas como resfriado, faringitis, donde puede quedar limitado. Sin embargo el virus puede llegar a vías bajas por arrastre o por su capacidad de fusión de membranas celulares, ya que puede pasar de célula a célula.^{4, 10, 11,12}

El daño ocasionado por este virus se localiza principalmente en bronquios, bronquiolos y alvéolos pulmonares. Este consiste en necrosis de células y fibrina, lo que ocasiona taponamiento de vías respiratorias pequeñas con material que contiene moco. Dado que las vías respiratorias de los lactantes son de diámetro pequeño, ocasiona obstrucción a diferentes grados de los bronquiolos, lo que ocasiona colapso pulmonar.^{8, 9,10,11}

CUADRO CLÍNICO

El periodo de incubación de este virus es de cuatro a cinco días. La primera infección se presenta en los seis primeros meses de edad, inicia con escurrimiento nasal, tos, estornudos, faringitis, malestar general y fiebre. Esta forma clínica puede resolverse o evolucionar a bronquitis, bronquiolitis o neumonía, con presencia de rinorrea, disnea, taquipenia, sibilancias y cianosis. La infección es rara vez asintomática. Con alta frecuencia es necesaria la hospitalización.^{5, 7, 8, 9, 10, 11}

La bronquiolitis es la enfermedad más común causada por este virus. El daño es localizado en los bronquiolos, con lesión de epitelio bronquial y alveolar, con edema de mucosa e hipersecreción, por lo que conlleva a la obstrucción bronquial difusa e hiperinsuflación pulmonar.¹²

La severidad de la enfermedad es mayor en niños con cardiopatías, patología respiratoria congénita, prematuros, displasia broncopulmonar e inmunocomprometidos. La mortalidad es alta. En los pulmones de niños fallecidos de muerte súbita se ha identificado al VSR con frecuencia, razón por la cual se le ha asociado al síndrome.

TRATAMIENTO

El tratamiento farmacológico utilizado es la ribavirina (1- α -D-ribofuranosil-1-2-4-triazol-3-carboxamida) es un nucleótido sintético. Su administración es en aerosol en pequeñas partículas de 1.3 μ m de diámetro, no se ha observado efectos tóxicos, pero tampoco efectos benéficos. Actualmente se realizan ensayos en modelos animales con la 2-deoxi-D-glucosa la cual inhibe al virus en cultivos celulares pero no se ha observado éxito. Se ha comprobado que el VSR es sensible al interferon alfa como el gamma los cuales inhiben su proliferación.¹²

La lactancia materna parece conferir cierto grado de protección, pues se ha detectado en el calostro una gran actividad neutralizante contra el VSR que se debe a la presencia de IgA secretora y del interferon alfa.^{9,11, 12}

El salbutamol puede emplearse como fármaco inicial, debido a la gran mejoría que presentan los niños después de su administración, su baja toxicidad y fácil empleo, éste se utiliza por vía inhalatoria, con aerosol de dosis media de 100 μ g lo cual equivale a un disparo. Con el uso de corticoesteroides no se ha observado mejoría en el estado de salud del paciente.^{11, 12}

PREVENCIÓN

Para prevenir la infección se han desarrollado algunas vacunas, que hasta el momento no han sido efectivas y al contrario con una de ellas se incremento la severidad de la enfermedad. Con otras vacunas al igual que la infección natural, no se ha logrado inducir una protección por lo que las epidemias anuales, y la reinfección en niños pequeños sigue siendo la principal causa de hospitalización.¹¹

Entre las vacunas que se han usado se encuentran:

- Vacuna de virus inactivado con formalina y concentrado, programada para la administración parenteral.^{11,12}
- Vacuna de virus mutantes, sensibles a la temperatura, administrada por vía intranasal.^{11,12}
- Vacuna recombinante donde se usa como vector el virus de la vaccina.^{11,12}
- Vacunas de virus atenuados, en la cual se reemplaza algunos fragmentos de las glicoproteínas F y G, tanto de los grupos A Y B. Induce inmunidad local y circulante. Infechan e inmunizan en presencia de anticuerpos maternos. Puede aplicarse en múltiples dosis.¹¹

Actualmente se está empleado un tratamiento profiláctico con Anticuerpo monoclonal de VSR humanizado (Palivizumab) contra la proteína de fusión del VSR. Se administra vía intramuscular a niños pequeños con riesgo de infección severa, siendo la dosis de 15 mg/kg de peso corporal/mes (durante 5 meses consecutivos), su uso no presenta efectos secundarios.^{9, 10, 11} Otro recurso es el uso de inmunoglobulina policlonal hiperinmune, obtenida de donantes con títulos elevados de anticuerpos neutralizantes contra el VSR.

VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO I

La mayoría de los virus humanos responsables de los cuadros de infección son de tipo DNA y se contraen durante la infancia o adolescencia, a través del contacto directo con las lesiones, sangre, saliva o secreciones genitales. Los herpes virus son de tipo DNA importantes en patología oral, erupciones en piel y mucosas; y adquieren especial importancia cuando afectan a individuos infectados con VIH o sujetos con cuadros de inmunosupresión.

CLASIFICACIÓN

El virus de Herpes Simplex tipo I (VHS-I) está clasificado dentro del orden de los **Herpesvirales**, y en la familia **Herpesviridae** que son virus de DNA bicatenario envueltos, con una cápside icosaédrica. La familia **Herpesviridae** contiene a su vez tres subfamilias que se clasifican de acuerdo a su homología, organización del genoma y rango de huésped. Las tres subfamilias son: **Alfaherpesvirinae**, **Betaherpesvirinae**, y **Gammaherpesvirinae**. Dentro de la familia **Alfaherpesvirinae** encontramos al virus del Herpes Simplex tipo I.

CARACTERÍSTICAS VIRALES

El virus del Herpes Simplex tipo I mide aproximadamente entre 150 y 250 nm. El material genético de los herpes virus consiste en una cadena doble de DNA lineal, pero que se circulariza inmediatamente tras ser liberado de la cápside en el núcleo de la célula infectada, está dividido en dos fragmentos U_L y U_S . Ambos fragmentos están franqueados por segmentos de DNA repetitivo, pero invertidos (palindrómicas), que permiten que eventualmente el virus pueda unirse por esas secuencias formando una estructura circularizada. Tiene un tamaño aproximado entre 120 y 230 kpb, dependiendo de las consecuencias repetitivas internas y terminales que pueda tener el virión. El contenido de bases de Guanina + Citocina, puede ser de setenta y cinco por ciento.

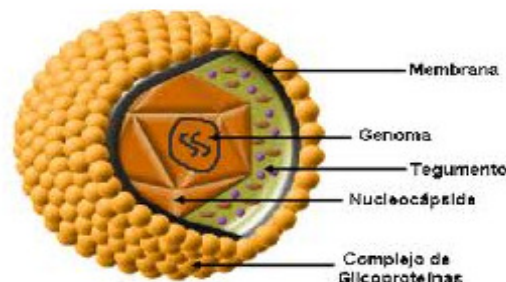


Figura 3. Esquema de la estructura del Virus del Herpes Simplex tipo I.²

El core: contiene al DNA viral que en algunos casos está asociado a una estructura proteínica.

La cápside es una de las estructuras características de todos los herpes virus, con 100 nanómetros de diámetro y 162 capsómeros, tanto pentaméricos como hexámeros, normalmente constituida a partir de 6 proteínas.

El tegumento, es una estructura de apariencia amorfa, se localiza entre la cápside y la envoltura, es de grosor variable. El cual contiene al péptido VP-16 (Viral Protein), importante por su participación en la replicación viral.

La envoltura se encuentra cubriendo a las estructuras anteriores, presenta una naturaleza lipídica, pues proviene de las membranas celulares parcialmente modificadas. La envoltura contiene 11 diferentes proteínas virales (glicoproteínas) de 8 nm de tamaño, de las cuales las más importantes son: gB, gC, y gD, cuya función es reconocer e interactuar con su receptor celular, mientras que gG, permite el diagnóstico diferencial al ser diferente a la presente en VHS II. La naturaleza lipídica de la envoltura correlaciona al virión con la sensibilidad a solventes de lípidos y detergentes.

CICLO VIRAL

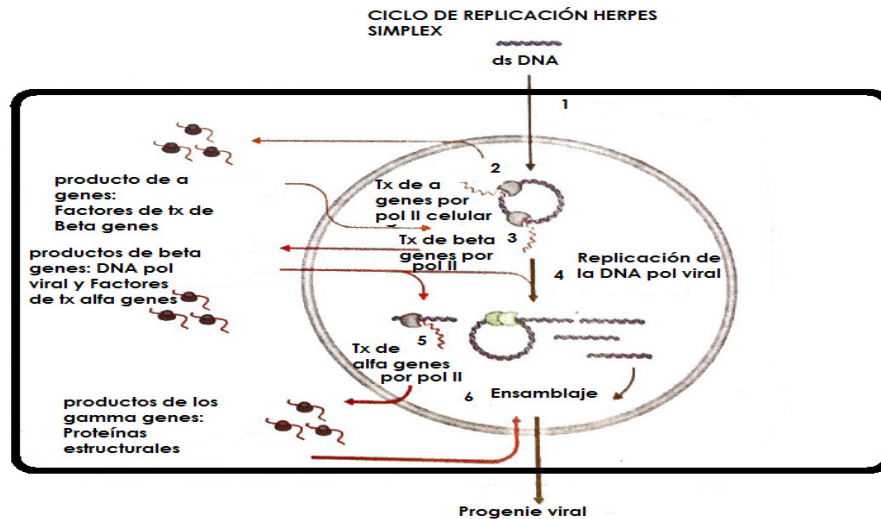


Figura4. El ciclo de replicación inicia con la fusión de la membrana viral con la membrana celular por medio de receptores celulares de glicoproteínas virales, de esta manera penetra la nucleocápside al citoplasma celular, la nucleocápside se une a la membrana nuclear, en el núcleo inicia la replicación y transcripción viral, produciéndose los genes α , β , γ , posterior ocurre el ensamblaje, liberación al citoplasma, glicosilación de proteínas en el retículo endoplasmico, para su posterior liberación al exterior de la célula.¹⁷

Inicialmente la glicoproteína B (gB) y la glicoproteína C (gC) interaccionan con proteoglicanos de la superficie celular como el heparan sulfato y el condroitin sulfato. A esta unión inicial le sigue la interacción de la glicoproteína D viral con algunos correceptores celulares pertenecientes a tres subfamilias de moléculas como son; receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), ahora identificados como HVEM (Mediador de Entrada del Herpes Virus), otro grupo de correceptores es de la familia de las inmunoglobulinas (Nectina 1 α 1 β) y por último el grupo del 3- O heparan sulfato. La entrada del virus se produce por fusión de la membrana viral con la membrana celular.

Una vez dentro de la célula la nucleocápside es transportada hasta los poros nucleares con ayuda del citoesqueleto celular, y el DNA viral es liberado en el nucleoplasma. El genoma viral entra acompañado por proteínas del tegumento, α TIF, presente en 500 de cada 1000 copias. La otra proteína del tegumento, es la vhs o UL41 (Virión Host Shut Off) que se queda en el citoplasma, donde ocasiona la degradación de RNA mensajeros tanto celulares como virales, para permitir al HSV apoderarse totalmente de la maquinaria de síntesis de proteínas y aumentar la eficiencia en la producción viral.

El DNA viral se circulariza gracias a secuencias repetitivas y es transcrito por la RNA polimerasa celular tipo II, en varios ciclos. La síntesis de proteínas es regulada en el tiempo, apareciendo tres tipos sucesivos de proteínas en las células; genes inmediatamente tempranos (genes α), genes tempranos (genes β) y genes tardíos (genes γ).

Los genes α , son proteínas reguladoras, codifican los factores de transcripción que median la RNA polimerasa del hospedero y el reconocimiento de promotores para la síntesis de los genes β .

Los genes β codifican a la polimerasa viral y otros factores requeridos en la replicación del genoma. Las otras proteínas tempranas que puede codificar el virus, están involucradas en incrementar la fuente de desoxirribonucleótidos y enzimas de reparación de DNA. La replicación del DNA viral se lleva a cabo por un mecanismo denominado círculo rodante. Con este proceso se producen grandes concatameros los cuales son cortados en la encapsidación.^{12, 13,14 15.}

Los genes gamma son los encargados de la producción de proteínas estructurales.

El ensamblaje se produce en el núcleo. Los genomas concatenados generados por el mecanismo de círculo rodante, se cortan en monómeros y se empaquetan en cápsides preformadas, que contiene la proteasa viral, factores de transcripción para la expresión de los genes α en la infección de la siguiente célula, así como los genes UL26 (proteínas de plataforma). La cápside se une a la membrana interna nuclear y antes de pasar al espacio internuclear adquiere la membrana. En el tránsito adquiere las proteínas del tegumento α TIF y vhs, así como su envoltura definitiva la cual contiene las glicoproteínas virales.

La eficiencia de la producción de partículas virales aparentemente es baja, ya que solo el 25 % del DNA y proteínas sintetizadas son incorporados para la producción de viriones. El resto se acumula dentro de la célula. La salida de los viriones puede ser por lisis o por fusión con membranas de células sanas.^{12, 13,14 15.}

PATOGENIA

La infección primaria generalmente es asintomática, aunque pueden presentarse lesiones vesiculares. El virus inicia la infección en las membranas de las mucosas, se replica en las células muco-epiteliales originando infección lítica y se disemina a las células adyacentes y neuronas que inervan el sitio donde se inició la infección aguda. La infección latente en la neurona no produce daño aparente, pero diferentes estímulos la pueden reactivar. Una vez reactivado, el virus se multiplica, viaja a lo largo del nervio en forma centrifuga y ocasiona lesión en la terminal del nervio, por lo tanto todas las recidivas se producen en el mismo sitio. La expresión del genoma se requiere para la reactivación, pero no para el establecimiento de la latencia. El mecanismo para el establecimiento de latencia se desconoce, sin embargo, se piensa que para la expresión del genoma se requiere una proteína celular, tan es así que no en todas las estirpes celulares establece latencia.

El tipo de infección que resulta depende del estado inmune del individuo; los sujetos susceptibles desarrollan infección primaria después de la primera exposición al virus. El virus se transmite por diferentes vías e infectan diferentes sitios del cuerpo.

La infección por VHS-1 puede originar cuadros clínicos de variada severidad, que oscilan desde la gingivoestomatitis, herpes labial, panadizo herpético, meningitis, encefalitis con alta mortalidad y overanitis herpética que a su vez puede originar ceguera.

El VHS-1 en ubicación oral se transmite por saliva, por compartir vasos, cepillos de dientes y en otras partes del cuerpo se debe a contacto del virus con la piel, se autotransmite con frecuencia, principalmente a los ojos.

La posibilidad de que VHS I establezcan infecciones latentes con recidivas asintomáticas favorece su transmisión, ya que un individuo infectado puede ser transmisor durante toda su vida.

LATENCIA

El mecanismo para el establecimiento de latencia se desconoce, sin embargo, se piensa que para la expresión del genoma se requiere una proteína celular, tan es así que no en todas las estirpes celulares establece latencia. Las neuronas donde se establece primariamente la latencia residen en el ganglio sensorial, aunque existe evidencia de virus latente en el sistema nervioso central. La transcripción de una porción restringida del genoma ocurre durante la latencia, siendo dirigida por un solo promotor generando RNAs nucleares que se han designado como transcriptos asociados a latencia, cuya función aún no está definida.

TRATAMIENTO

Las estrategias terapéuticas para el manejo de recidivas de VHS se manejan de dos formas: terapia episódica y terapia supresora.

La terapia episódica se pone en práctica cuando se presentan síntomas de un brote, es recomendable para personas con recidivas infrecuentes o leves. Los antivirales penetran en las células actuando como análogos de los nucleótidos y se unen a la timidincinasa viral, resultando en su fosforilación, posteriormente son nuevamente fosforilados por enzimas celulares y compiten con los nucleótidos para unirse a la ADN polimerasa viral, provocando una inactivación de la enzima y una reducción de la replicación viral. Se han descrito cepas deficientes en Timidincinasa, las cepas denominadas TK, en las que estos antivirales no actúan y deben ser reemplazados por otros.

El Aciclovir en particular es un análogo acíclico de la guanósina que inhibe la acción de la DNA polimerasa viral, al ser un inhibidor competitivo de la guanósintrifosfato. Tras la ingesta oral se fosforila inicialmente por la timidincinasa viral, posteriormente por las cinasas celulares a Aciclovir trifosfato, que se une a la DNA polimerasa viral, inhibiéndola y actuando como finalizador de la cadena de DNA.

La principal limitación del aciclovir (20%) es su baja biodisponibilidad, por lo que es necesario administrarlo en dosis frecuentes a lo largo del día. El valaciclovir es un profármaco del Aciclovir con mucha mayor biodisponibilidad (65%). El famciclovir es un profármaco que tiene como metabolito activo el penciclovir, que es un análogo acíclico de la guanósina. Sufre un proceso similar al del Aciclovir, inhibiendo a la DNA polimerasa viral, bloqueando la replicación viral. El penciclovirtrifosfato posee una vida media intracelular mucho más prolongada que el Aciclovir trifosfato, ya que persiste de 10 a 20 horas. El famciclovir posee una biodisponibilidad del (75%).

Sin tratamiento las lesiones suelen curar espontáneamente en menos de 4 semanas, con el uso de fármacos antivirales, se consigue una recuperación más rápida, atenuando síntomas, y reduciendo el número y tiempo de recidivas. Hasta la fecha no existe un fármaco para la erradicación definitiva de la infección por VHS.^{12, 13,14 15.}

PREVENCIÓN

Evitar el contacto con secreciones de lesiones, es la mejor profilaxis.

No existen vacunas disponibles contra el VHS. Esto se debe a que no podrían usarse vacunas con virus inactivos, tampoco es posible con virus atenuados, ya que es peligroso inyectar con virus latentes debido a que presenta propiedades oncogénicas in vitro, y porque no se conoce a perfección el mecanismo de latencia. Las vacunas preparadas por ingeniería genética utilizando solo algunos antígenos virales están aún en fase de experimentación, pero es muy complejo inducir cualquier tipo de respuesta inmune.

ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES

Los **antisépticos** son sustancias químicas que se aplican sobre tejidos vivos, con la finalidad de destruir, inhibir el crecimiento o infección por microorganismos patógenos. Son sustancias de uso estrictamente externo. Deben responder a un doble criterio de inocuidad y eficacia. Su objetivo es eliminar microorganismos presentes en la piel sin alterar las estructuras.

Un **desinfectante** es un agente químico que se aplica sobre las superficies o materiales inanimados, para destruir los microorganismos y prevenir infecciones. Los desinfectantes no tienen capacidad selectiva.

Se han realizado considerables progresos en el conocimiento de los mecanismos de acción antibacterianos de los antisépticos y desinfectantes, pero existen escasos estudios sobre el mecanismo de acción de los antisépticos contra hongos, virus y parásitos.

Los desinfectantes y antisépticos actúan con tres mecanismos básicos de acción: Capacidad de coagular y precipitar proteínas, alterar las características de permeabilidad celular, y toxicidad o envenenamiento de los sistemas enzimáticos.

FACTORES QUE AFECTAN LA POTENCIA DE LOS ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES.

- Concentración del agente y tiempo de actuación. Existe una estrecha correlación entre la concentración del agente y el tiempo necesario para eliminar una determinada fracción de microorganismos. Si se modifica la concentración se provocan cambios en el tiempo para lograr un mismo efecto.
- EL pH afecta al grado de ionización del agente, las formas ionizadas de los agentes disociables pasan mejor a través de las membranas biológicas y por lo tanto son más efectivos.
- Normalmente al aumentar la temperatura aumenta la potencia de los desinfectantes.
- La potencia del antiséptico o desinfectante dependerá de la especie y tipo de agente microbiano, presencia capsula, esporas u otros factores de virulencia, así como el número de microorganismos.
- La presencia de materia orgánica como sangre, suero o pus afecta negativamente la potencia de los antisépticos de tipo oxidante, como los hipocloritos y de tipo desnaturante de proteínas hasta el punto de hacerlos inactivos.^{16 17 18.}

TIPO DE AGENTE MICROBIANO

Las bacterias, hongos, virus, parásitos, poseen estructuras y una composición química diferente. Por lo tanto la acción toxica va a ser selectiva y diferencial.

Las bacterias, son fáciles de destruir por la gran mayoría de los antisépticos químicos. Las micobacterias y otros bacilos ácido- alcohol resistentes no son sensibles a compuestos acuosos, pero son sensibles jabones con alto grado de fenol.

Los hongos son más resistentes a desinfectantes comunes como los compuestos clorados, yodo, cristal violeta, y compuestos mercuriales. Algunos compuestos de amonio cuaternarios poseen gran actividad antifúngica.

La acción **virucida** de estos compuestos químicos está menos definida, el yodo, el cloro, el glutaraldehído y formaldehido parecen ser los agentes más activos contra los virus. Los solventes orgánicos tales como el éter y el cloroformo se utilizan algunas veces para inactivar virus con envoltura. En cuanto a sensibilidad los virus desnudos son menos sensibles a los agentes químicos.

Los agentes patógenos más resistentes a los desinfectantes y antimicrobianos con los priones, virus desnudos y de pequeño tamaño, esporas microbianas, las micobacterias y esporas de hongos.

CARACTERÍSTICAS DE UN ANTISÉPTICO Y DESINFECTANTE IDEAL

ANTISÉPTICO:

- Amplio espectro de actividad. Sobre bacterias, virus, hongos y parásitos.
- Bajo costo.
- Inocuo para los tejidos.
- No toxico.
- Rapidez y eficacia en la materia orgánica.
- Baja capacidad para generar resistencia.
- No ser irritante, ni sensibilizante.
- Compatible químicamente con otras sustancias.
- Estable por varios meses en sus preparados comerciales, y permanecer activo.
- Qué posean acción residual del agente químico. Es la propiedad de permanecer activo en el sitio y zona de aplicación.
- Presentar una baja tensión superficial para penetrar fácilmente.
- Actividad en soluciones acuosas.
- No perder actividad por temperatura o pH.

DESINFECTANTES

- Germicida de amplio espectro.
- Bajo costo.
- No corrosivo, no alterar objetos.
- Baja toxicidad.
- Amplia acción.
- Disponibilidad.
- No generar resistencia.
- Soluble en agua.
- Estabilidad conveniente.
- Sin olor desagradable.

USOS DE LOS ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES.

Los antisépticos y desinfectantes están destinados para:

- Prevenir infecciones intrahospitalarias, disminuir el impacto económico de las infecciones intrahospitalarias por el uso de productos de alto costo.
- Disminuir la colonización por microorganismos.
- Preparación de la piel para procedimientos invasivos
- Para la atención de pacientes inmunosuprimidos o con muchos factores de riesgo de infecciones.
- Posterior a la manipulación de material
- Lavado quirúrgico de las manos
- Preparación preoperatoria de la piel.

Los antisépticos y los desinfectantes son usados ampliamente en los hospitales y otros centros del cuidado de la salud. Son parte esencial de las prácticas del control de la infección y ayudan a la prevención de las infecciones nosocomiales.

El uso de antisépticos en heridas abiertas es la prevención y tratamiento de infecciones y por consiguiente incrementar el proceso de curación de heridas. Los microorganismos patógenos retardan la curación de las heridas, a través de mecanismos tales como la persistencia de la producción de los mediadores inflamatorios, desechos metabólicos, toxinas y el mantenimiento del estado de actividad de los neutrófilos, los cuales producen enzimas citolíticas y radicales libres de oxígeno. Por tanto el objetivo primario del cuidado de una herida es la creación de un medio ambiente óptimo, para el proceso de curación de una herida.

NANOTECNOLOGÍA

Es la ciencia dedicada al estudio, diseño, creación, síntesis, control, manipulación, y aplicación de materiales aparatos y sistemas funcionales a una nano escala, es decir a una milmillonésima parte de un metro (10^{-9}) y por lo tanto permite manipular de forma individual, átomos y moléculas.

Al manipular la materia entre 1 y 100 nanómetros modifica sus propiedades físicas y químicas: la conductividad eléctrica, el color, la resistencia o elasticidad entre otros.

La nanotecnología puede aplicarse de 5 formas distintas:

- Partículas con estructura simple.
- Sistemas combinados de partículas (sistemas)
- Estructuras con dos dimensiones (superficies)
- Estructuras sumamente complejas, equipadas con unidades mecánicas, químicas y eléctricas (nanodispositivo)
- Procedimientos y métodos

La nanomedicina es una rama de la nanobiotecnología con aplicaciones directas en medicina, que permiten el estudio, diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades, a nivel celular o molecular.

La nanomedicina agrupa tres áreas principalmente: biofarmacia, diagnóstico y medicina regenerativa. Donde el nanodiagnóstico consiste en el desarrollo de sistemas de análisis y de imagen para detectar una enfermedad o mal funcionamiento celular en los estadios más tempranos posibles tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”.

La nanoterapia pretende dirigir sistemas activos que contenga elementos de reconocimiento para actuar, transportar y liberar medicamentos exclusivamente en células o zonas afectadas, a fin de lograr un tratamiento más efectivo, minimizando los efectos secundarios. En tanto la medicina regenerativa tiene como objetivo reparar o reemplazar tejidos u órganos dañados mediante la aplicación de herramientas nanotecnológicas.

Los **nanomateriales** son muy diversos en su naturaleza química, física y biológica. Tienen propiedades muy diferentes de sus homólogos a gran escala debido a su elevado cociente área/superficie, fuerza/peso, y a la aparición de efectos cuánticos.

Los nanomateriales se clasifican de acuerdo al número de dimensiones.

- Una dimensión: películas, capas y baños de superficie.
- Dos dimensiones: nanotubos, nanocables, nanoporos, nanofibras y biopolímeros.
- Tres dimensiones: Fullerenos, dendrímeros y **Nanopartículas**.

Nanopartículas son partículas esféricas con diámetro entre 0.1 a 100 nanómetros. En comparación con partículas del mismo material pero diferente tamaño, tienen nuevas propiedades relacionadas con su tamaño.

Para terapia podemos encontrar sistemas liberadores de fármacos que permiten mejorar la liberación de principios activos con problemas para acceder al lugar de acción, Nanopartículas con principios activos e implantes activos.^{23,24}

Las nanocápsulas, nanopartículas, nanoesferas, dependiendo de su preparación pueden presentar diferentes propiedades y métodos de liberación.

Nanopartículas inorgánicas, como la albúmina, la silicona y la titania puede unirse a principios activos protegiéndolos de la desnaturalización por el pH estomacal y la temperatura.

Dendrímeros: Son capaces de encapsular agentes terapéuticos en sus cavidades internas, así como en los grupos externos que posee.

Nanovainas: consisten en una capa de silicio rodeadas de algún conductor metálico, como el oro. Estas partículas pueden ser diseñadas para absorber o dispersar la luz en gran parte de las regiones visible o infrarroja del espectro electromagnético. Estas moléculas son fácilmente conjugadas con otras biomoléculas o anticuerpos.^{23,24,25}

LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

La nanomedicina se a propuesto diseñar estructuras que transporten el fármaco hasta la zona dañada y solamente cuando han reconocido esa zona lo liberen como respuesta a un cierto estímulo. Para ello es necesario la previa encapsulación o inactivación de los fármacos para que no actúen en su tránsito por el cuerpo hasta llegar al lugar afectado, de forma que mantengan intactas sus propiedades físico-químicas y que se minimicen posibles efectos secundarios en otras zonas del cuerpo.^{24,25}

Una vez que el fármaco ha llegado a su destino debe liberarse a una velocidad apropiada, para que sea efectivo, lo cual puede lograrse mediante una variación de ciertas condiciones en la zona dañada o mediante un control preciso de la degradación del material encapsulante, permitiendo que la liberación del fármaco sea controlada.

Dentro de las estructuras para la administración encontramos nanocápsulas, nanopartículas, dendrímeros, liposomas y micelas. La nanotecnología permite que la liberación del fármaco sea mínimamente invasiva ya que estos nanosistemas pueden atravesar poros y membranas celulares.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones por los virus Herpes Simplex tipo I y virus Sincitial respiratorio son un problema de salud pública en nuestro país igual que a nivel mundial, causando altas tasas de morbilidad y mortalidad. Estudios realizados en niños menores de seis meses muestran que el VSR es el agente etiológico del mayor número de bronquiolitis y neumonías que requieren hospitalización, mientras que el VHSl es principal causante de patologías en la piel y mucosas. Por lo que evitar su transmisión se ha vuelto un reto y una necesidad. El principal tratamiento profiláctico es desinfectar áreas, materiales y superficies, donde se emplean generalmente detergentes y soluciones que llegan a ser tóxicos contaminantes e incluso cancerígenos, que además no poseen efectos virucidas.

El compuesto nanoparticulado a probar se encuentra compuesto de agentes surfactantes anionicos, emolientes y humectantes, además un principio activo de compuestos naturales, lo que lo hace más noble con la piel y el medio ambiente por ser totalmente biodegradable, además al encontrarse en tamaño nano difiere de los materiales homólogos a gran escala debido a su elevado cociente área/superficie, fuerza/peso, el cual es su principal ventaja.

Se determinará la concentración letal 50 del compuesto nanoparticulado, posteriormente se probará su efecto sobre la inhibición de la replicación y efecto citopático de los virus VHSl y VSR, a diferentes tiempos.

HIPÓTESIS

Se espera que al usar el compuesto nanoparticulado a la concentración de la CL50 se inhiba la replicación y efecto citopático de VHSl y VSR en el menor tiempo de contacto posible.

OBJETIVO GENERAL. Determinar el efecto inhibitorio del compuesto nanoparticulado sobre la replicación del virus sincitial respiratorio y Herpes simplex tipo I

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinación de CL50 en células MK2 y VERO por el método de MTT.
- Establecer el tiempo mínimo a la cual el compuesto nanoparticulado inhibe la replicación del VSR en células MK2.
- Verificar la presencia de antígenos virales en células MK2 infectadas con el VSR previamente tratado con nanopartículas
- Establecer el tiempo mínima al cual el compuesto nanoparticulado inhibe la replicación del virus de Herpes simplex tipo I en células VERO
- Verificar la presencia de antígenos virales en células VERO infectadas con el virus de Herpes simplex tipo I previamente tratado con nanopartículas.

MATERIALES BIOLÓGICOS

- ✓ **Virus Sincitial Respiratorio (VSR):** cepa Long (ATCC VR-26 American type Culture Collection, Rockville, MD; USA).
- ✓ **Virus del Herpes Simplex tipo I:** cepa Long (ATCC)
- ✓ **Línea celular:** línea celular MK2 ATCC CCL-7 (aislada de riñón de mono rhesus) y la línea celular VERO ATCC CCL-81 (riñón de mono verde africano1962).

REACTIVOS Y SOLUCIONES

- ✓ **Solución stock de MTT.** El MTT (Sigma) 5 mg/ mL de agua desionizada y posteriormente se esteriliza por filtración. Almacenado con aluminio en frasco ámbar debido a su sensibilidad a la luz y a una temperatura de 4 °C hasta por seis meses en refrigeración.
- ✓ **HCl 1.0 M (MERCK)**
- ✓ **200 mL Isopropanol: ácido clorhídrico (25:1).** Preparado con 192 mL de isopropanol (MERCK) y 8 mL de ácido clorhídrico 1.0 M (MERCK).
- ✓ **MEM 10X :** Medio Esencial de Eagle con sales de Eagle con L-glutamina, con aminoácidos no esenciales y sin bicarbonato de sodio, el cual se añadirá por separado.
- ✓ **Antibiótico:** Antibiótico-Antimicótico 100X (marca IN VITRO S.A.). Compuesto de penicilina 10 000 µg/ mL, Estreptomina 10 000 µg/ mL y Anfotericina B,D 25 µg/ mL.
- ✓ **Suero fetal bovino:** Libre de Endotoxinas, Micoplasmas y virus, 0.1m estéril por filtración.
- ✓ **Trypsina 0.25m yerseno al 0.1 %:** En solución salina de fosfatos sin iones calcio (Ca²⁺), sin iones magnesio (Mg²⁺), para uso en cultivo de tejidos.

EQUIPOS

- ✓ **Ultracongelador.** Marca revco, modelo, ULT2186-9, serie 410P219918-48.
- ✓ **Gabinete.** Marca sterilgard III, modelo SG-305, serie 105268.
- ✓ **Centrifuga beckman.** Modelo J-6 centrifuga, serie 14646242131.
- ✓ **Incubadora.** Marca precision, modelo188, serie 23AT3.
- ✓ **Incubadora de CO₂.** Marca sanyo, modelo MCO14AC1, serie 412431.
- ✓ **Microscopio.** Marca Zeus, modelo primo vert, serie 3844000701.
- ✓ **Campana de extracción.** Marca labcono, modelo 29241000, serie 120778200.
- ✓ **Refrigerador.** Marca whirlpool, modelo W18029, serie v544025240.
- ✓ **Balanza analítica.** Marca sartorius, modelo 1601, serie 2404055.
- ✓ **Balanza granataria.** Marca ohaus, serie 050081.
- ✓ **Espectofotometro multivol.** Marca biotek, modeloepoch, serie 242133.
- ✓ **pHmetro.** Marca beckman, modelo 41, serie 20024.
- ✓ **Esterilizador para laboratorio de va.** Marca turnaver, modelo 2859EL, serie 1008074.
- ✓ **AGITADOR MAGNÉTICO.** marca salbot, modelo 25-01, serie 1664.

MÉTODOS

CULTIVO CELULAR

En cajas de 25 cm² descongelar viales con 1mL de células de las líneas celulares a trabajar, agregar 4ml de MEM incompleto 1X y 10 % de suero fetal bovino. Incubar a 37 °C y una atmosfera de 5% de CO₂. Al alcanzar una confluencia de 70 % proceder a dividir la monocapa celular en dos cajas añadiendo 10% de tripsina el tiempo necesario hasta observar el desprendimiento celular, posteriormente añadir 10 % de suero fetal bovino para detener el proceso de tripsina, por último añadir 4mL de MEM 1X incompleto. Incubar a 37°C, con una atmosfera de CO₂. Repetir el procedimiento anterior las veces necesarias, de acuerdo a la cantidad de células que se requieran.

PROPAGACIÓN VIRAL

En cajas de 25 y 75 cm² propagar las líneas celulares VERO y MK2, cuando la monocapa se encuentre con una confluencia del 80% infectar con VSR a la línea celular MK2 y con VHS I a la línea celular VERO. Incubar a 37 °C con 5 % de CO₂, y buscar diariamente el efecto citopático (ECP). Raspar las células que presentan efecto citopático (Sincitios) al 50 % sin desprenderse la monocapa celular, para la lisis celular y liberación de partículas virales. Recolectar el raspado y conservar a -72 °C.

TITULACIÓN DE VIRUS POR ENSAYO EN PLACA.

Preparar placas de 24 pozos con células al 80 % de confluencia, lavar con solución salina isotónica, y agregar 1 mL de MEM incompleto. Por otro lado preparar tubos eppendorf con 900 microlitros de MEM incompleto para realizar diluciones seriadas (en logaritmo 10) hasta 10^{-12} para el VSR y 10^{-22} para el VHS I. Colocar inicialmente 100 ml de la cosecha viral y 900 microlitros de MEM incompleto. Retirar el medio de la primera hilera de la caja de 24 pozos, al primer pozo colocar 100 microlitros de cosecha viral, a partir del segundo pozo colocar 900 microlitros de cada dilución en orden ascendente, excepto al último pozo que servirá como control negativo. Incubar 2 horas a 37 ° C con 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo lavar con solución salina y añadir 1 mL de MEM incompleto e incubar por 48 horas a 37 °C con una atmosfera de CO₂ al 5 %. Lavar nuevamente y añadir 200 microlitros de la mezcla alcohol-acetona (1:2) por 10 minutos, se retirara el exceso y se dejara secar. Añadir cristal violeta al 1 % por 1 minuto y lavar con agua corriente después examinar y contar las placas líticas o presencia de sincitios en cada pozo.

DETERMINACIÓN DE LA CL50 DEL COMPUESTO NANOPARTICULADO EN LA LÍNEA CELULAR MK2 y VERO POR EL MÉTODO COLORIMETRICO MTT.

Llevar a cabo el procedimiento para preparar 2 placas de 24 pozos para cada línea celular a trabajar. Por separado realizar diluciones seriadas en log10 para el compuesto nanoparticulado hasta 10^{-8} utilizando MEM incompleto como diluyente. Lavar las placas con solución salina isotónica y agregar MEM incompleto, dejar sin tratamiento la primera fila la cual fungirá como control positivo de viabilidad celular, a la segunda fila agregar 100 microlitros de peróxido de hidrógeno concentrado, a la tercera fila adicionar el compuesto nanoparticulado sin diluir, a partir de la cuarta fila añadir el compuesto nanoparticulado diluido hasta llegar a la dilución de 10^{-8} . Posteriormente incubar por dos horas a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido el tiempo retirar y lavar para eliminar el tratamiento al que fue sometido. Agregar a cada muestra 30 microlitros de la solución stock de MTT e incubar por 2 horas 30 minutos cubriéndolo de la luz a 37°C y 5% de CO₂. Después eliminar todo el medio por decantación dejándose las cajas invertidas para retirar el exceso de líquido (en este punto las muestras se pueden congelar máximo un mes a -20°C). Para cuantificar el formazan adicionar 300 microlitros de isopropanol ácido para disolver los cristales, dejar en reposo de 5-10 minutos hasta que se disuelvan en su totalidad los cristales, la placa debe estar tapada para evitar pérdida de volumen por evaporación. Realizar la lectura en un lector de ELISA realizando a 570 nm. Por separado preparar blancos de reactivos en placas de 24 pozos sin células, colocar en la primera fila únicamente peróxido de hidrógeno concentrado, en la segunda fila isopropanol ácido, en la tercer fila isopropanol ácido más células, en la cuarta fila colocar el compuesto nanoparticulado sin diluir más isopropanol ácido, en la quinta fila adicionar el compuesto nanoparticulado sin diluir más solución STOCK de MTT más isopropanol ácido y en la última fila solamente el compuesto nanoparticulado.

En una segunda placa colocar las diluciones del compuesto nanoparticulado log10 hasta la dilución de 10^{-8} sin células, y agregar la solución stock de MTT e incubar por 2 hrs a 37°C y 5% de CO₂. Reportar los valores como índice o porcentaje de viabilidad celular.

INHIBICIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO DE VSR Y VHS I MEDIANTE EL USO DE NANOPARTÍCULAS A LA CONCENTRACIÓN LETAL CL50.

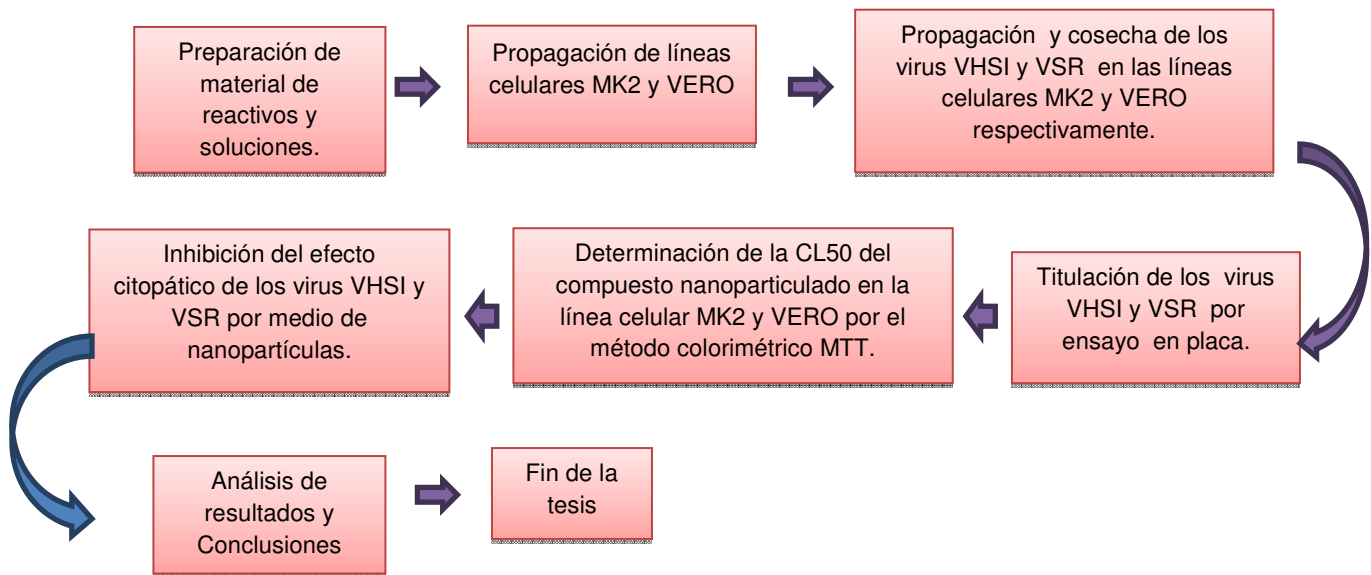
Preparar placas de 24 pozos con las líneas celulares a trabajar con una confluencia del 80 % y lavar con solución salina isotónica y colocar 1 mL de MEM incompleto.

Preparar diluciones de las cosechas virales a una concentración de 1 MOI, utilizando como diluyente MEM incompleto. Probar tiempos diferentes de interacción fármaco nanoparticulado- partícula viral, siendo los siguientes 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 180 segundos. Al primer pozo dejar sin tratamiento pues fungirá como control negativo de infección. Al segundo pozo agregar 200 microlitros de compuesto nanoparticulado únicamente este fungirá como control de viabilidad y no infección. Al tercer pozo colocar el volumen de cosecha viral de concentración 1 MOI, este pozo es control positivo de infección.

Por otra parte colocar en un tubo ependorff el volumen de cosecha viral de concentración 1 MOI y 200 microlitros de nanopartículas a la concentración de la CLD50 , y mezclar por 10 segundos para después colocar en el cuarto pozo, al cual con se retiro el medio de cultivo. Repetir este paso con los demás tiempos, Realizar por cuatruplicado. Al término incubar por 2 horas a 37 °C y 5 % de CO₂.

Posterior al tiempo de incubación retirar la condición a la que fueron sometidas y lavar cuidadosamente. Posteriormente añadir metilcelulosa al 1.5 % y dejar incubar por 48 horas para VHS I y 96 horas para VSR. Transcurrido el tiempo retirar la metilcelulosa y lavar las placas y para después añadir 300 microlitros de alcohol-acetona por 5 minutos. Por decantación eliminar el exceso y dejar secar. Para finalizar teñir las placas con cristal violeta al 1% e inspeccionar la caja en busca de placas líticas o sincitios en cada una de las condiciones que se probaran.

DIAGRAMA DE FLUJO



DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

VARIABLES

Variable Independiente: MOI, Tiempos de contacto, CL50 de compuesto nanoparticulado.

Variable dependiente: Inhibición de la replicación, Inhibición del efecto citopático

TIPO DE ESTUDIO

Es una investigación de tipo: Experimental, Prolectivo, Transversal

DISEÑO ESTADÍSTICO

Los datos se analizarán mediante estadística descriptiva, se realizaran gráficos, tablas de datos.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN: Virus Sincitial Respiratorio, Virus Herpes Simplex tipo I, línea celular MK2, línea celular VERO, compuesto nanoparticulado, solución stock MTT, cuantificación en placa lítica.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN: línea celular Hep-2, línea celular MDCK, línea celular eAi, otros virus ajenos a VSR y VHSI, otros antisépticos y desinfectantes, VHS II, técnica inhibición de la hemaglutinación, técnica de rojo neutro.

Porcentaje de viabilidad celular en la línea Mk2 por método del MTT

Dilución nano-partículas	Control de muerte celular	Control de viabilidad celular	Dilución 10 ⁰	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻⁴	Dilución 10 ⁻⁵	Dilución 10 ⁻⁶	Dilución 10 ⁻⁷	Dilución 10 ⁻⁸
Absorbancia 1	0.044	0.449	0.338	0.174	0.056	0.08	0.386	0.442	0.584	0.593	0.606
Absorbancia 2	0.048	0.455	0.323	0.179	0.058	0.074	0.381	0.446	0.576	0.595	0.593
Absorbancia 3	0.046	0.435	0.326	0.18	0.057	0.076	0.382	0.45	0.579	0.614	0.603
Absorbancia 4	0.049	0.446	0.322	0.173	0.061	0.078	0.39	0.49	0.573	0.598	0.613
Promedio	0.046	0.446	0.037	0.057	0.058	0.077	0.384	0.457	0.578	0.6	0.603
Porcentaje de viabilidad celular			8.403	12.885	12.997	17.254	86.218	102.408	129.523	132.885	135.294

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad en la línea celular Mk2 por método del MTT absorbancias medidas a 540 nanómetros.

Concentración de nanopartículas	Porcentaje de viabilidad celular En cultivo de mk2
10⁰	8.403%
10⁻¹	12.885%
10⁻²	12.997%
10⁻³	17.254%
10⁻⁴	86.218%
10⁻⁵	102.408%
10⁻⁶	129.523%
10⁻⁷	132.885%
10⁻⁸	135.294%

Tabla 2. Porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones a las que fueron sometidas las células del cultivo de mk2.

RESULTADOS

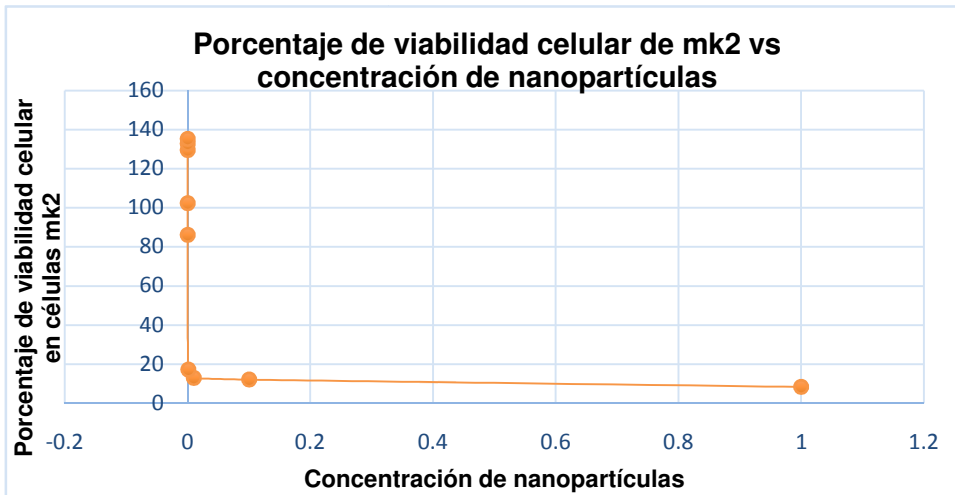


Gráfico 1.- Porcentaje de viabilidad celular MK2 vs concentración nanopartículas.

<i>Log Concentración Nanopartículas</i>	<i>Porcentaje de viabilidad celular En células mk2</i>
0	8.403%
-1	12.885%
-2	12.997%
-3	17.254%
-4	86.218%
-5	102.408%
-6	129.523%
-7	132.885%
-8	135.294%

Tabla 3. Porcentaje de viabilidad en relación al Log de Concentración a las que fueron sometidas las Células del cultivo de MK2.

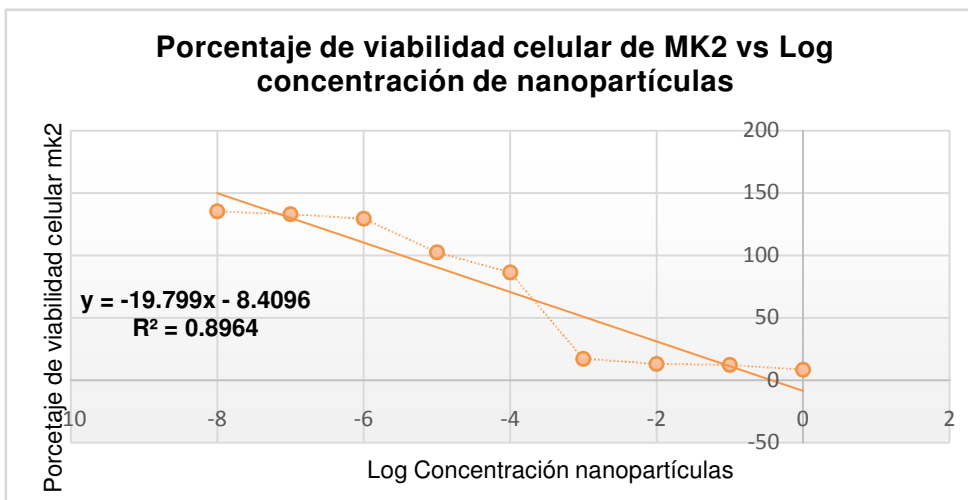


Gráfico 2.- Porcentaje de viabilidad celular MK2 vs Log concentración nanopartículas

Log Concentración Unidades Probit
Nanopartículas

0	3.62111
-1	3.8299
-2	3.8688
-3	4.05378
-4	6.08939
-5	8.71908
-6	8.71908
-7	8.71908
-8	8.71908

Tabla 4 .Unidades probit correspondientes al Log de la concentración.

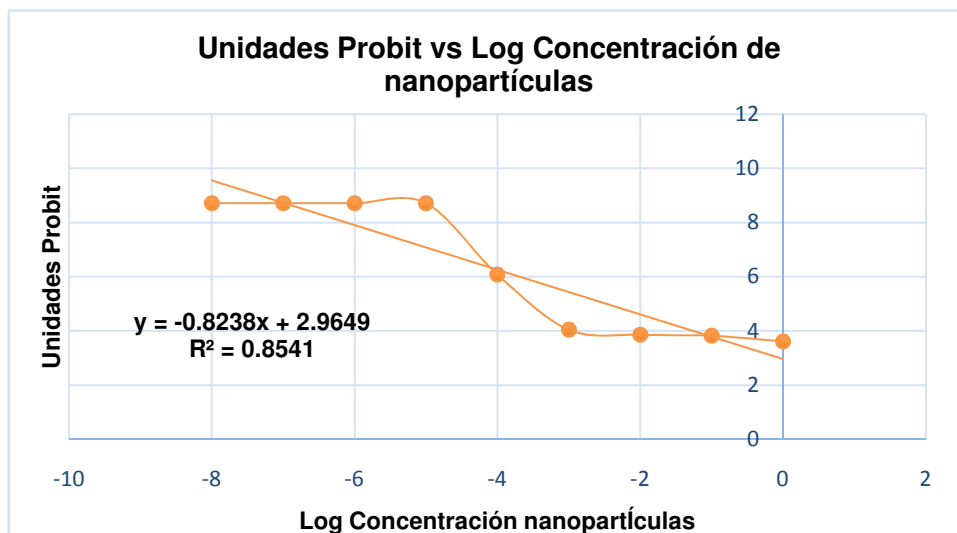


Gráfico 3.- Unidades probit vs Log concentración nanopartículas.

Cálculo de la concentración letal 50 (CL50) en la línea celular MK2

$$y = 1.037x + 7.3182$$

$$5.0 = 1.037X + 7.3182$$

$$5.0 - 7.3182 / 1.037 = X$$

$$CL50 = -2.23$$

$$y = -19.799x - 8.4096$$

$$50.0 = -19.799x - 8.4096$$

$$x = (50.0 + 8.4096) / -19.799$$

$$CL50 = -2.95$$

La concentración letal 50 calculada con la gráfica de logaritmo de la concentración vs porcentaje del efecto arroja una CL50 de $10^{-2.23}$, mientras que utilizando el gráfico de logaritmo de la concentración vs unidades probit arroja una CL50 $10^{-2.95}$.

Porcentaje de viabilidad celular en la línea VERO por método del MTT

Dilución de nanopartículas	Control de muerte celular	Control de viabilidad celular	Dilución 10 ⁻⁰	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻⁴	Dilución 10 ⁻⁵	Dilución 10 ⁻⁶	Dilución 10 ⁻⁷	Dilución 10 ⁻⁸
Absorbancia 1	0.083	0.325	0.325	0.17	0.088	0.2	0.216	0.215	0.217	0.239	0.296
Absorbancia 2	0.081	0.323	0.325	0.18	0.089	0.21	0.217	0.215	0.217	0.233	0.299
Absorbancia 3	0.083	0.326	0.323	0.176	0.083	0.216	0.216	0.211	0.217	0.239	0.291
Absorbancia 4	0.082	0.325	0.327	0.179	0.086	0.217	0.217	0.211	0.217	0.234	0.298
Promedio	0.082	0.324	0.035	0.057	0.086	0.210	0.216	0.213	0.217	0.236	0.296
Porcentaje de viabilidad celular			10.85	17.63	26.64	64.90	66.67	65.59	66.82	73.60	91.15

Tabla 5. Porcentaje de viabilidad en la línea celular VERO por método del MTT, absorbancias medidas a 540 nanómetros.

Concentración de nanopartículas *Porcentaje de viabilidad celular En células VERO*

10⁻⁰	10.87%
10⁻¹	17.62%
10⁻²	26.63%
10⁻³	64.89%
10⁻⁴	66.66%
10⁻⁵	65.58%
10⁻⁶	66.82%
10⁻⁷	73.59%
10⁻⁸	91.14%

Tabla 6. Porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones a las que fueron sometidas las Células del cultivo de VERO.

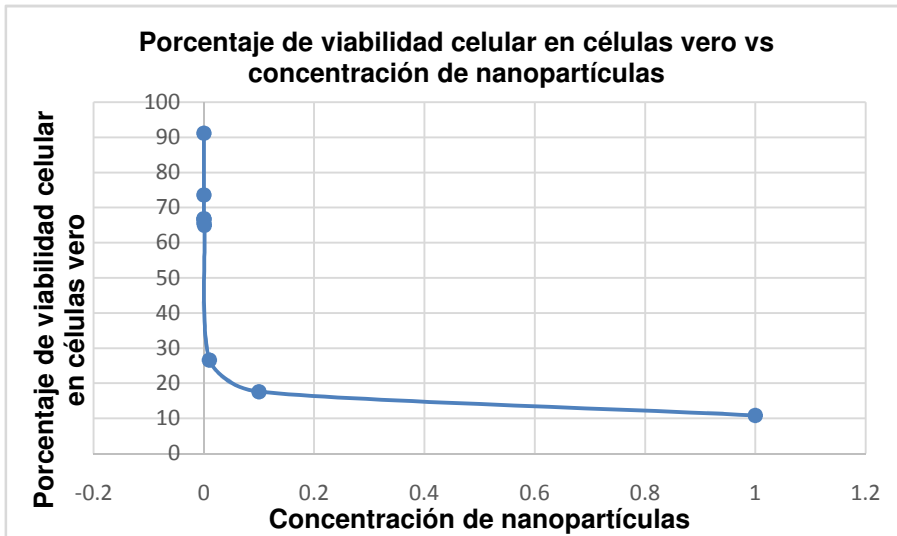


Gráfico 4.- Porcentaje de viabilidad celular VERO vs concentración nanopartículas

Log concentración Nanopartículas	Porcentaje de viabilidad celular En células VERO
0	10.87%
-1	17.62%
-2	26.63%
-3	64.89%
-4	66.66%
-5	65.58%
-6	66.82%
-7	73.59%
-8	91.14%

Tabla 7. Porcentaje de viabilidad en relación al Log de concentración a las que fueron sometida las Células de la línea celular VERO.

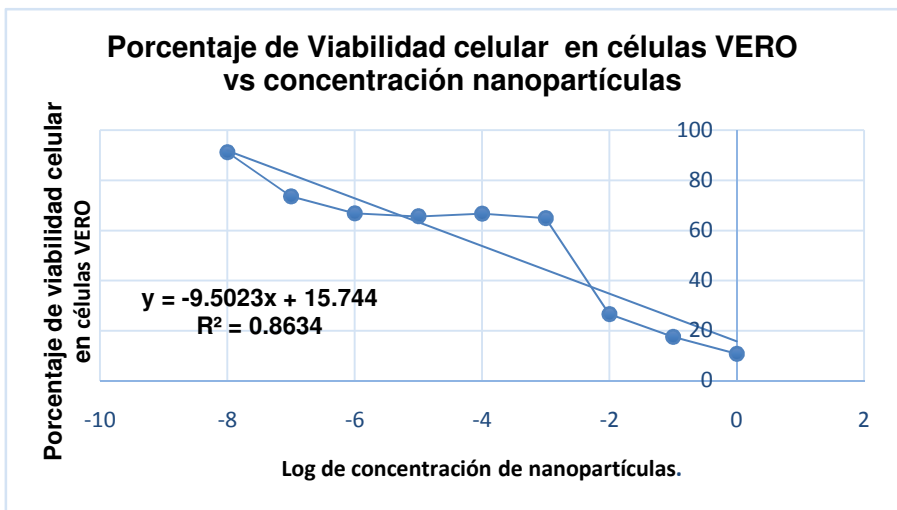


Gráfico 5.- Porcentaje de viabilidad celular VERO vs Log concentración nanopartículas

Log Concentración Nanopartículas Unidades Probit

0	3.76262
-1	4.06937
-2	4.36621
-3	5.37948
-4	5.42846
-5	5.40657
-6	5.43396
-7	5.62767
-8	6.34716

Tabla 8 .Unidades probit correspondientes al Log de la concentración.

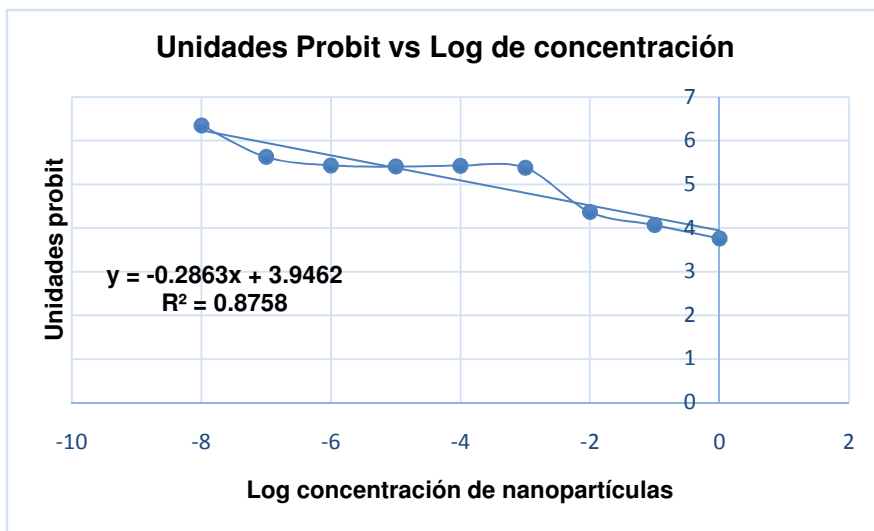


Gráfico 6.- Unidades probit vs Log concentración nanopartículas

Cálculo de la concentración letal 50 (CL50) en la línea celular VERO

$$y = -9.5023x + 15.744$$

$$50.0 = -9.5023x + 15.744$$

$$x = (50 - 15.744) / -9.5023$$

$$X = -3.6$$

$$CL50 = -3.6$$

$$y = -0.2863x + 3.9462$$

$$5 = -0.2863x + 3.946$$

$$x = (5 - 3.946) / -0.2863$$

$$x = -3.68$$

$$CL50 = -3.68$$

La concentración letal 50 calculada con la gráfica de logaritmo de la concentración vs porcentaje del efecto arroja una CL50 de $10^{-3.6}$, mientras que la utilizando el gráfico de logaritmo de la concentración vs unidades probit arroja una CL50 $10^{-3.6}$.



Figura 6. Ensayo de viabilidad celular en células VERO por método de MTT, el blanco se observa opaco pues las nanopartículas se encuentran sin diluir e interfieren en la lectura de absorbancia, el control negativo de viabilidad fue realizado con peróxido de hidrógeno el cual destruye por completo la monocapa celular por lo que no hubo formación de formazan como indicador de vida mostrándose así el pozo color amarillo, el control positivo de viabilidad solo fue utilizado MEM 1 X, por lo que la monocapa se encuentra íntegra y representa el 100% de vida, a partir de la dilución 10⁰ hasta la dilución 10⁻⁴, se aprecia el pozo color amarillo que representa muerte celular, de la dilución 10⁻⁵ hasta 10⁻⁹ se aprecia un color morado debido a la reducción formazan el cual forma un compuesto de color púrpura, lo cual es indicador de vida, por lo que podemos inferir que la dosis letal 50 se encuentra entre la dilución 10⁻³ a la dilución 10⁻⁴.

PROPAGACIÓN VIRAL DE HERPES SIMPLEX TIPO I (VHS-I) EN CULTIVO DE CÉLULAS VERO

La propagación del virus Herpes Simplex tipo I se llevó a cabo en la línea celular Vero, mostrando como efecto citopático, la formación de Sincitios celulares (Células multinucleadas). Tras la infección con 1 microlitro de cosecha viral a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 horas, se observó la fusión de membranas celulares (ECP). La monocapa celular infectada presentó efecto citopático en su totalidad como se observa en las figuras 7 y 8, en las cuales se aprecian sincitios de gran tamaño, lo que indican que el virus se está replicando. El título viral incrementó con el número de pases.

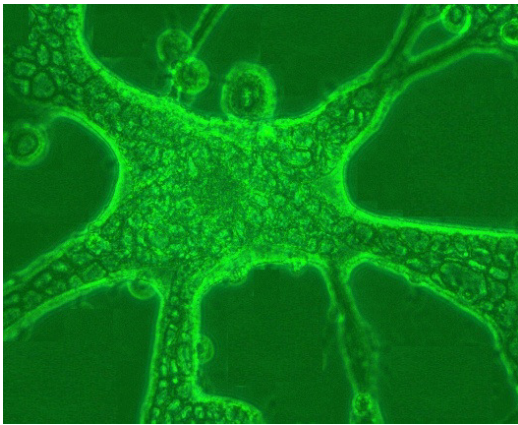


Figura 7. Sincitio formado (ECP) por virus Herpes Simplex tipo I en cultivo de células Vero. 40X

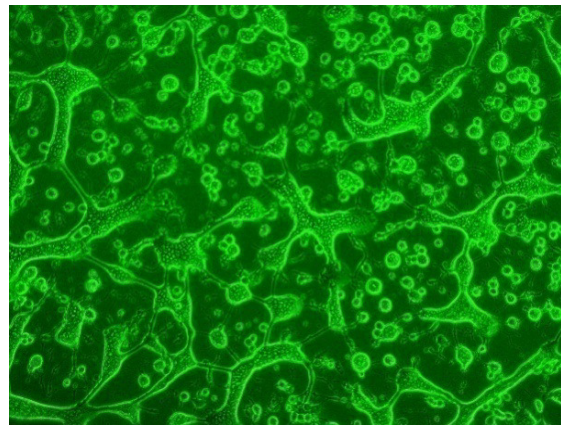


Figura 8. Sincitios formado (ECP) por virus Herpes Simplex tipo I en cultivo de células Vero. 10X

PROPAGACIÓN VIRAL DE VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (VSR) EN CULTIVO CELULAR DE MK2

La propagación del Virus Sincicial se llevó a cabo en células MK2, donde fue muy lenta su activación pues su capacidad para formar sincitios se encontraba disminuida, fue poco evidente el ECP en los primeros cultivos de células infectados con el virus, después de varios pases se logró apreciar sincitios pequeños, esperándose un título bajo del virus. En las figura 10 se aprecian sincitios pequeños, pero abundantes en toda la monocapa celular. En la figura 9 se aprecia un sincitio en un objetivo diferente, se parecía una célula gigante multinucleada, y en la periferia células sin presentar efecto alguno. El efecto citopático de VSR es al igual que VHS-I es la formación de sincitios.

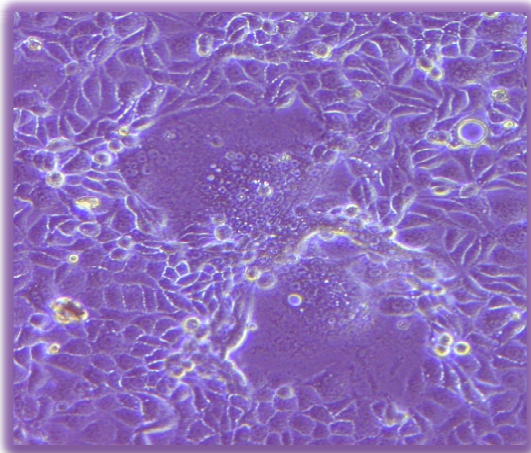


Figura 9. Sincitio formado por virus Sincicial Respiratorio (VSR) .40X

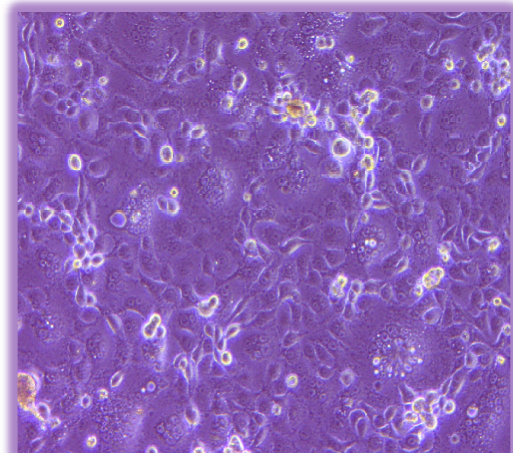


Figura 10. Sincitios formados por el virus Sincicial Respiratorio (VSR) en cultivo celular de MK2. 10

TITULACIÓN DEL VIRUS DEL HERPES SIMPLEX TIPO I

La titulación del virus se realizó por placa lítica, en la línea celular Vero, realizándose diluciones seriadas de cosecha viral, se buscó ECP en cada uno de los pozos, encontrándose ECP aun en la dilución 10^{-20} , en la dilución 10^{-21} no se aprecia ECP, así como en el control negativo de infección donde se encuentra la monocapa celular integra. En el control positivo de infección la monocapa ya no logra apreciarse pues el virus infecto la totalidad de la monocapa y la desprendió. La dilución 10^0 la monocapa al igual que en el control positivo no se logra apreciar pues fue destruida, en las diluciones posteriores el virus causo la lisis celular, y desprendimiento después de la infección, en los cuales se aprecia el grado de infección de acuerdo a la dilución de cosecha viral a la cual fue infectada la monocapa celular.

El virus presenta un título viral alto, pues la última dilución a la cual se presentó ECP fue de 10^{-20} . En la figura 13 se aprecia la infección y la lisis celular, la cual va disminuyendo al aumentar la dilución. En la figura 14 se aprecia el daño celular en cada uno de los pozos, disminuyendo al aumentar la dilución.



Figura 13.-Titulación en placa del virus de Herpes Simplex tipo I en la línea celular VERO, empleando diluciones serias de la cosecha viral, a las 48 horas de Incubación con una atmosfera de CO_2 . Utilizando cristal violeta como colorante. Se utilizó como control positivo de infección al virus sin diluir, como control negativo únicamente MEM 1x. En las primeras diluciones se observa la lisis total de la monocapa de células, el efecto disminuye con forme aumenta la dilución. En el control negativo se observa la monocapa integra.

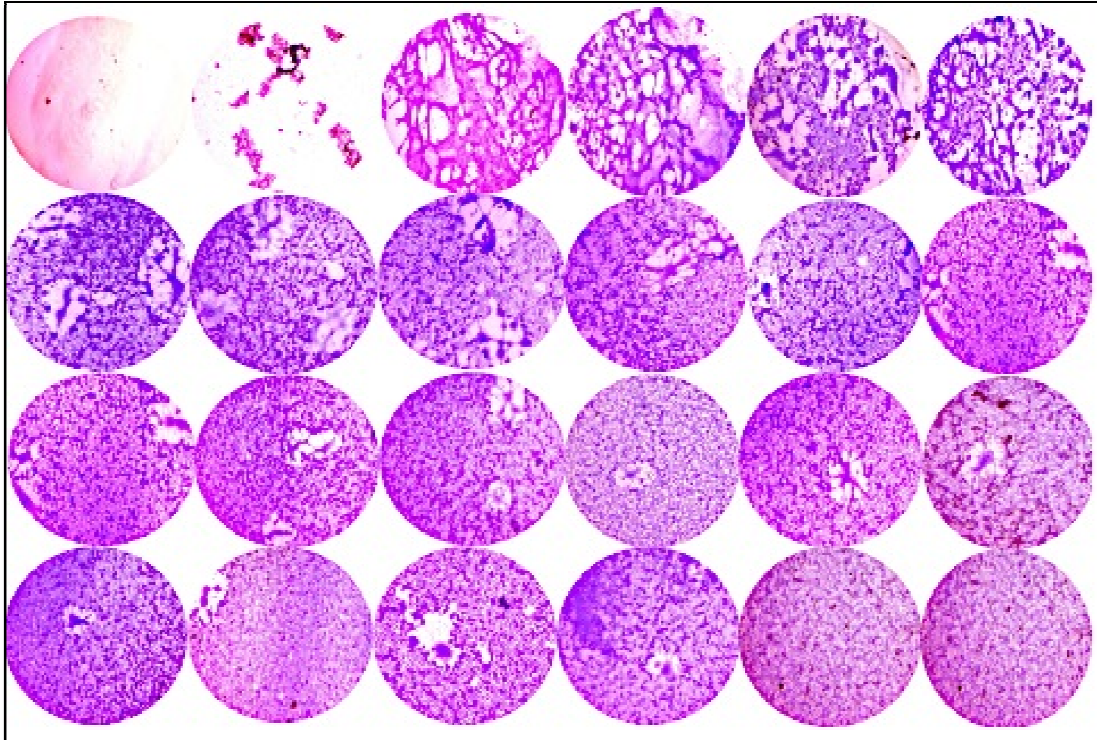


Figura14.-Titulación en placa lítica del Virus Herpes Simplex tipo en células VERO, imágenes tomadas con objetivo 10x, La primera imagen fue tomada del control positivo de infección, donde se observa la lisis total de la monocapa celular, el efecto se presentó de acuerdo a la concentración viral, presentándose hasta la dilución 10^{-20} . El control negativo la monocapa de células se encuentra intacta. El título del virus es 10^{20} (TCID₅₀ = $10^{20.5}$ partículas virales por mililitro).

TITULACIÓN VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO EN PLACA LITICA

Al igual que VHSI, el VSR se tituló por placa lítica debido a su capacidad de formar sincitios. El control positivo presentó sincitios con desprendimiento de la monocapa celular. La dilución 10^0 presento abundantes sincitios como pocas placas líticas, así las siguientes diluciones presentan sincitios cada vez más escasos, la última dilución donde se presentó efecto citopático es 10^{-9} tal y como se observa en la figura15. El control negativo de infección es un pozo sin virus, únicamente medio en el cual no se presentó ECP, la monocapa celular se encuentra integra. El cultivo viral fue incubado por 72 horas, pues el ECP se presenta más lento en este tipo de línea celular. Además de que el título viral fue bajo, por lo que en una sola placa de titulación se realizó por duplicado.

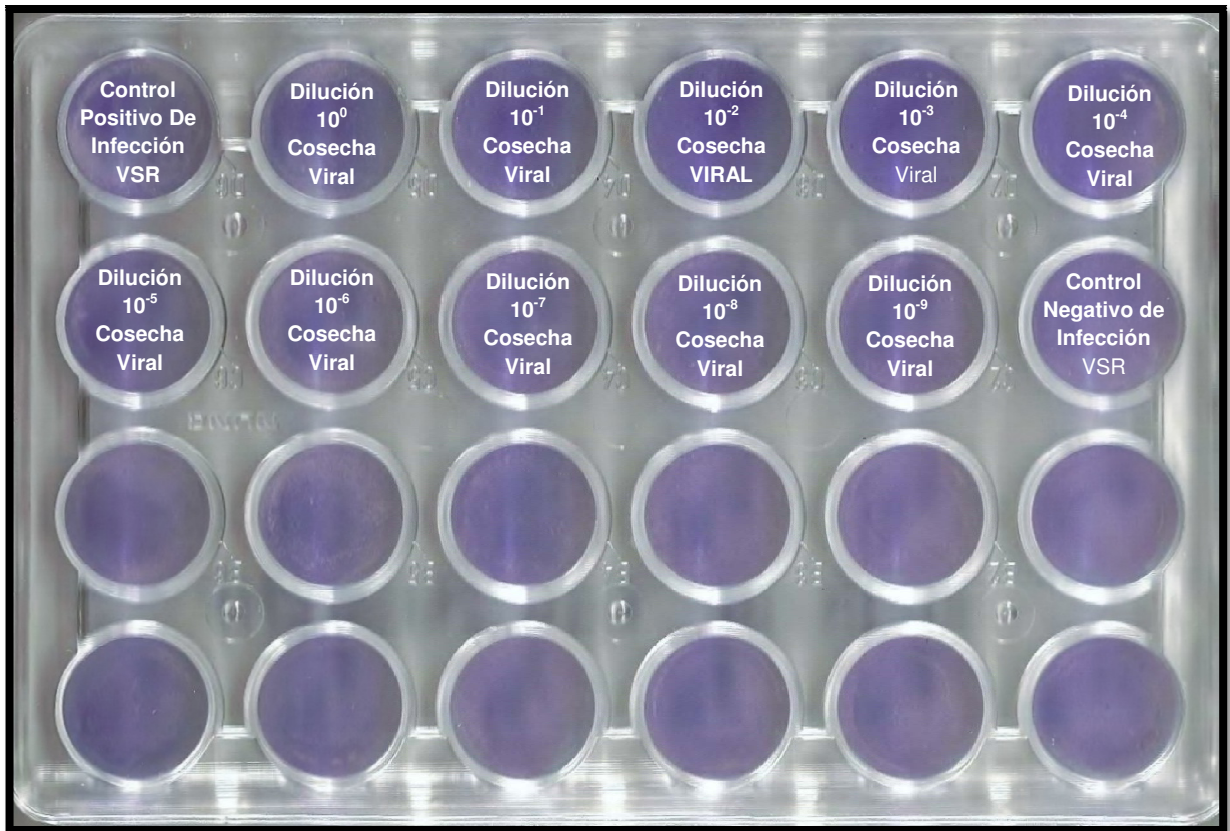


Figura 15.-Placa de titulación VSR en línea celular MK2, incubado durante 72 horas a 37°C en atmosfera de CO₂, posteriormente teñida con cristal Violeta. La titulación se realiza por duplicado, pues el titulo viral es bajo, presentándose el ECP en la dilución 10⁻⁹. Como control positivo se utilizó cosecha viral sin diluir, y como control negativo de infección únicamente MEM 1X. Imagen macroscópica de daño celular por infección con VHS-I

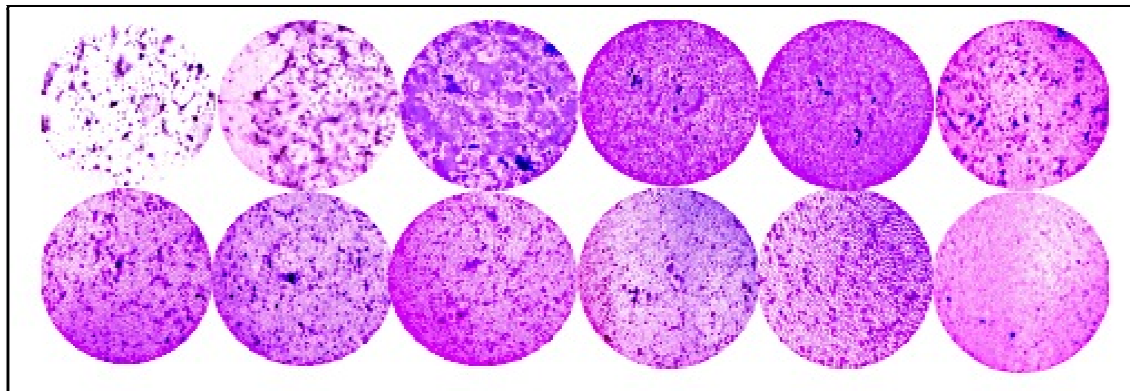


Figura 16.-Placa de titulación VSR, tomado con objetivo 10x, representación esquemática de titulación, se observa la lisis celular total en el control positivo y la monocapa íntegra en el control negativo de infección, con el aumento de la dilución de la cosecha viral disminuye el efecto citopático. Los sincitios formados por el VSR en la línea celular mk2 son pequeños. El título del virus fue 10⁻⁹ (TCID₅₀=10⁹ partículas virales por mililitro mediante el método de Karber).

CINETICAS DE INHIBICIÓN

En los pozos control no se observa efecto alguno de infección o muerte celular, conservándose la integridad de la monocapa celular, el pozo control de infección de VHS-I, se parecía la formación de ECP, pequeños sincitios, aislados uno de otro pero presentes, mientras que en los pozos que fueron puestos en combinación con nanopartículas no se observa la presencia de ECP, mostrando así el efecto de las nanopartículas para este Virus desde los 5 segundos, a una concentración no toxica para las células. Los demás pozos de la cinética Se observan igualmente sin ECP, estableciendo como tiempo mínimo de acción de las nanopartículas 5 segundos.

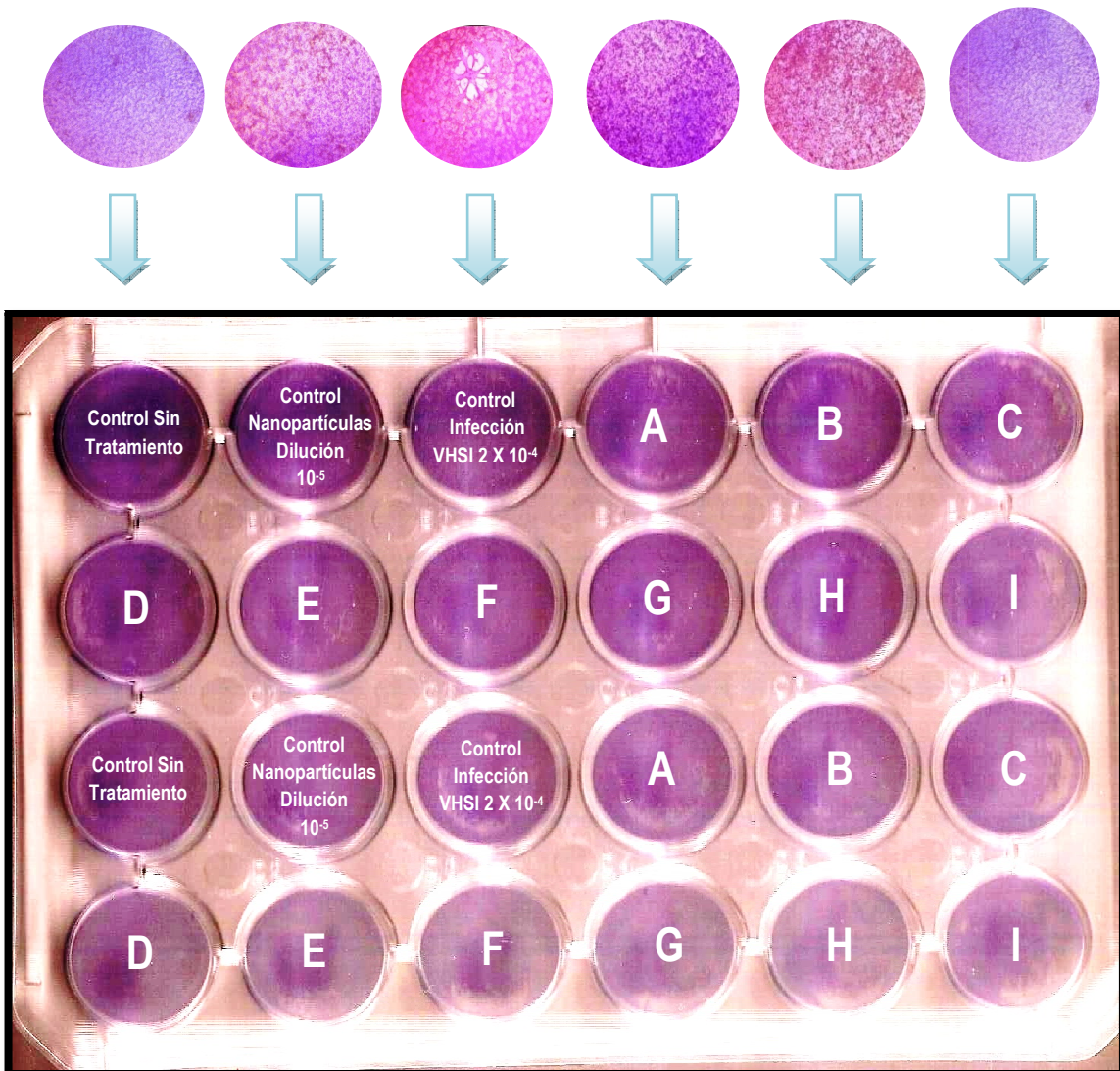


Imagen 17. Cinéticas de inhibición del Virus Herpes Simplex tipo I. El pozo A fue tratado con 200 microlitros concentración 1 MOI, al cual fue agregado el compuesto nanoparticulado a 10^{-5} , y puesto en contacto por 5 segundos. B fue tratado en las mismas condiciones solo se modificó el tiempo de exposición de compuesto nanoparticulado el cual fue 10 segundos, C 15 segundos, D 20 segundos, E 30 segundos, F 60 segundos, G 90 segundos, H 120 segundos e I 180 Segundos.

En los pozos control sin infección se observa la monocapa de células MK2 integra, el pozo tres fungió como control positivo de infección donde se observa efecto citopático de VSR. El pozo A no presenta efecto citopático, lo cual significa que el compuesto nanoparticulado inhibe la formación de ECP a los 5 segundos de estar en contacto con VSR, por consiguiente los tiempos de contacto más prolongados también inhiben su ECP. El estudio se tiene reproducibilidad pues en cada una de las repeticiones se observa el mismo efecto de las nanopartículas

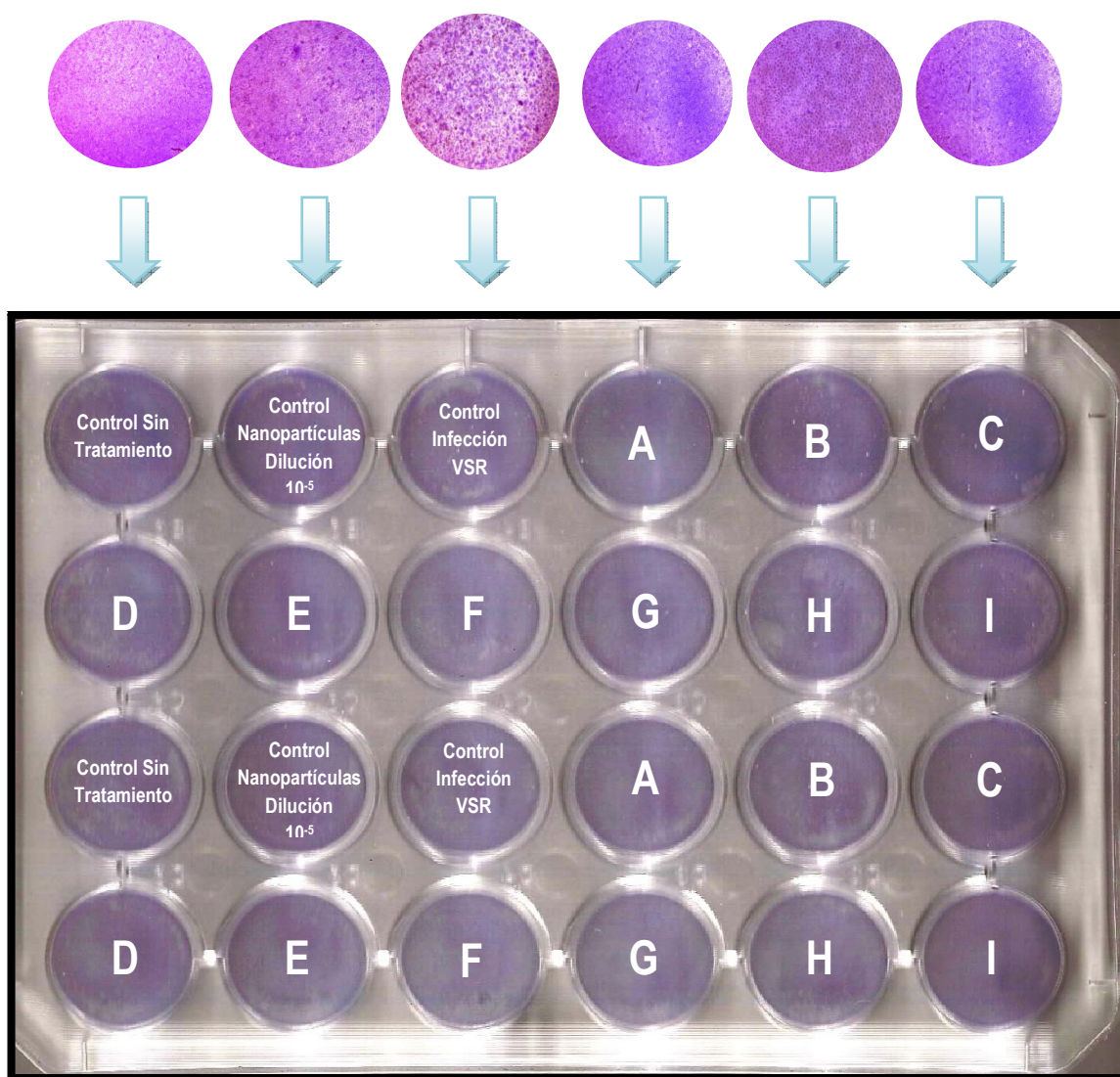


Imagen 18. Cinéticas de inhibición del Virus Sincitial Respiratorio. El pozo A fue tratado con 200 microlitro concentración 1 MOI, al cual fue agregado el compuesto nanoparticulado a 10^{-5} , y puesto en contacto por 5 segundos. B fue tratado en las mismas condiciones solo se modificó el tiempo de exposición de compuesto nanoparticulado el cual fue 10 segundos, C 15 segundos, D 20 segundos, E 30 segundos, F 60 segundos, G 90 segundos, H 120 segundos e I 180 Segundos.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El cultivo del virus Sincitial Respiratorio se realizó en la línea celular MK2, y se logró observar el efecto citopático. La formación de efecto citopático se debe a la presencia de la glicoproteína F, la cual es la encargada de la fusión de membranas celulares, a lo que se debe la apreciación de células multinucleadas. Para la activación del virus se requirió de largos periodos de incubación, los cuales eran permisibles debido a la estabilidad de la línea celular utilizada. Al establecer la propagación viral en la línea celular MK2 demuestra que también es permisible para su propagación pues los títulos virales son altos, aunque el proceso de activación sea lento. Esto se debe también a que el virus es muy lábil a variaciones bruscas de temperatura por poseer envoltura, por lo que su manipulación se debe realizar con especial cuidado, especialmente al momento de su almacenamiento y descongelamiento para su activación. Los tiempos de incubación en esta línea celular llegan a ser hasta de 5 días para lograr su activación, después se vuelven cortos al ir aumentando la carga viral en cada pase, puesto que el virus se replica con facilidad.

De igual manera la propagación y cosecha del virus del Herpes Simplex tipo I se llevó a cabo en la línea celular VERO, la cual es la recomendada para la propagación de éste. La presencia de efecto citopático se observó abundante debido a que el título viral de la alícuota de virus utilizada para la activación era alto. Tras su activación se requirió cada vez menos volumen de cosecha viral para la infección y conservación del virus en propagación. Llegando a ser hasta un microlitro de cosecha viral para infectar una caja de 25 cm² de células vero, con un tiempo de incubación de menos de 24 horas, pues a las 10 horas ya se observa la formación de sincitios, lo que indica que el título viral es alto. Los sincitios observados eran de gran tamaño, y se apreciaba con facilidad los núcleos de las células que lo formaron.

Los ensayos de viabilidad celular fueron realizados en cada una de las líneas celulares a trabajar puesto que cada una posee características diferentes, así la línea celular VERO es fácil de propagar, más sensible a cambios de temperatura y presión de CO₂, y muy susceptible de contaminación por lo que requiere mayores cuidados. La línea celular MK2 por otro lado es más estable pues puede durar en cultivo hasta 10 días sin tratamiento o adición alguna de nutrientes siempre y cuando se mantenga en MEM 1x, resistiendo así cambios de temperatura, por lo que las hace muy prácticas para trabajar.

La determinación de la viabilidad celular requiere de muchos cuidados, puesto que cualquier cambio afecta directamente sobre el resultado de absorbancia, el primer cuidado a tener en cuenta es la confluencia y uniformidad de la monocapa celular puesto a que son líneas celulares tumorales, y no se ven inhibidas por contacto por lo que puede haber sobre crecimiento, como es el caso principalmente de la línea celular MK2 en la cual en cultivo se observa el crecimiento de una monocapa encima de la otra. Por otro lado en la línea celular vero el sobrecrecimiento provoca desprendimiento de la monocapa y por tanto pérdida de masa celular.

Otro factor importante son el cuidado en la realización del ensayo, especialmente al colocar las nanopartículas a cada pozo, donde se debe realizar de la forma más rápida puesto que de no ser así, al encontrarse sin MEM puede secarse y provocar la muerte celular, arrojando así resultados falsos de muerte celular. En cada lavado es importante cuidar que no se seque la monocapa o de no llevársela pues que disminuye la masa celular, o bien provocar su muerte.

La variación de resultados de absorbancia es mínima entre cada repetición. El ensayo de viabilidad celular por el método del MTT es muy práctico y confiable ya que la producción de formazan (compuesto color púrpura) es proporcional a la cantidad de células vivas, así a mayor cantidad de células vivas mayor producción de formazan.

En la realización del ensayo del MTT en la línea celular MK2, se colocó un control negativo de viabilidad celular, el cual representa 0 % de vida, o bien 100% de muerte, por otro lado también se colocó un control de viabilidad celular el cual no se realizó tratamiento algún, este control representa el 100 % de células vivas, a partir de esto se tomó en cuenta el control positivo de células vivas para la determinación de los porcentajes de viabilidad de los pozos sometidos a los diferentes tratamientos, siendo el siguiente cálculo (absorbancia condición sometida x 100 / absorbancia control positivo de viabilidad celular). Se observó que a diluciones muy bajas de nanopartículas, estas absorbían luz a 540 nm por lo que se procedió a realizar a cada una de las condiciones un blanco de reacción. Demostrando que a la dilución 10^0 y 10^{-1} los valores de absorbancia de los blancos son considerables, mientras que a partir de la dilución 10^{-2} en adelante los valores de absorbancia de los blancos son despreciables en la corrección de la absorbancia de la condición. Después del cálculo se observó que a partir de la dilución de 10^{-5} las medidas de absorbancia sobrepasan a las absorbancias del control positivo de viabilidad, por lo que encontramos valores de viabilidades mayores al 100 por ciento. El ensayo se realizó en repetidas ocasiones (cuatro veces) arrojando los mismos resultados, se cuidó que la monocapa celular se encontrara en la misma confluencia y proporción en cada uno de los pozos a

estudiar, por lo que un sobre crecimiento celular no explica los valores altos de formazan producido. Además que el aumento es gradual con forme aumenta la dilución. Por lo que en los gráficos realizados de porcentaje de viabilidad celular vs concentración se parecían porcentajes mayores a 100. Debido a que las diluciones se realizaron en base 10 no se logra apreciar a simple vista en el grafico la CL50. Es por eso que se procedió al graficar porcentaje de viabilidad celular vs Log de la concentración de nanopartículas obteniendo un gráfica sigmoidea, en el cual el valor de correlación lineal es 0.89. Se calculó la fórmula de la gráfica lineal y de acuerdo a esto se determinó la CL50, siendo de $10^{-2.95}$. Mientras que para la linealización con el uso de unidades probit arrojo una CL50 $10^{-2.25}$. Por lo tanto la concentración de compuesto nanoparticulado produce el 50 % de muerte en la línea celular MK2 es $10^{-2.6}$.

Por otro lado la línea celular vero presento una CL50 de $10^{-3.6}$. Es decir que la línea celular vero es más sensible al compuesto nanoparticulado esto en gran medida a sus características, ya que por sí mismas en cultivo resisten menos los cambios físico-químicos que se presentan en el medio de cultivo. Además que en ellas no logramos apreciar valores de viabilidad por encima de 100 por ciento, aunque el tratamiento para ambas líneas celulares fue el mismo.

La titulación del virus sincitial respiratorio se realizó por titulación en placa lítica, en el cual se buscó la máxima dilución donde se presentara el efecto citopático y posteriormente se realizó el cálculo por método de Karber siendo el TCID50 igual a 10^9 partículas virales por mililitro. Aunque los sincitios presentes fueron de pequeño tamaño lo que demuestra que la inefectividad del virus es baja. Lo contrario con lo sucedido con el virus Herpes Simplex Tipo I, donde el titulo viral es de 10^{20} partículas virales por mililitro. El virus presento sincitios de gran tamaño de manera que en las primeras diluciones se observa la destrucción total de la monocapa, su grado de infectividad es muy grande. Además de que su capacidad de replicación es rápida pues a las 24 horas de incubación el efecto citopático en diluciones grandes ya se hacía presente.

Teniendo los resultados de CL50 Y título viral se procedió a realizar las cinéticas de inhibición del efecto, observándose que el control positivo de infección en cada uno de los virus presentaba efecto citopático, mientras que a partir de los 5 segundos en contacto con el compuesto nanoparticulado se ve inhibido, así en cada una de las condiciones y con cada uno de los virus no se hizo presente, pues se observan las monocapas celulares integras, esto quiere decir que el compuesto nanoparticulado tiene como tiempo mínimo de acción los 5 segundos a una concentración de 10^{-5} , con respecto al VSR Y VHS-I.

Además que la concentración de nanopartículas es realmente pequeña para causar la inhibición de la replicación, esto puede deberse a que los dos virus presentan envoltura lipídica y el compuesto nanoparticulado al poseer agentes surfactantes desestabilizaron la doble capa lipídica y por lo tanto su capacidad de infección, pues en la membrana se encontramos las glicoproteínas G, F, SH, en el caso del VSR necesarias para su entrada en la célula.

Por otro lado es posible que la nanopartículas debido a su tamaño pudiese atravesar por canales iónicos la membrana viral, y de esta forma desestabilizar al material genético ARN en VSR y DNA en VHSI, impidiendo su replicación. Por lo que la realización de otras técnicas para la evaluación de la replicación viral se hace necesaria, e inclusive para el establecimiento de un mecanismo de acción.

Así como la realización de ensayos con otros virus, como son los de menor tamaño, o bien los que no presentan envoltura.

La realización de ensayos in vitro permite determinar que la inhibición se pudo realizar mediante el uso de nanopartículas en ambos virus, pues comparten características en común la envoltura y la formación de efecto citopático, aunque el material genético es diferente, así como el tropismo celular.

La realización de ensayos in vivo permitiría evaluar el efecto de las nanopartículas como tal, en combinación con respuestas inmunes, comprobar su efecto citotóxico.

Con los ensayos realizados se demostró que su uso es muy seguro y que a pequeñas concentraciones y cortos periodos de tiempo de acción de puede obtener un efecto favorable. Evitando así el uso de compuestos que son potencialmente tóxicos, y con espectros de acción muy bajos.

CONCLUSIONES

- ✓ Se logró determinar la CL50 para ambas líneas celulares siendo $10^{-2.6}$ y $10^{-3.6}$ para VERO y Mk2 respectivamente.
- ✓ La CL50 demuestra que el compuesto nanoparticulado no es toxico.
- ✓ Se logró la inhibición del Efecto citopático de VSR mediante el uso de nanopartículas a una concentración 1×10^{-5} .
- ✓ Se logró la inhibición del Efecto citopático de VHS mediante el uso de nanopartículas a una concentración 1×10^{-5} .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romero Cabello R. Microbiología y Parasitología Humana. 3 ed. Madrid: Médica Panamericana; 2007.
2. Koneman E. Diagnóstico microbiológico 6 ed. Madrid: Médica Panamericana; 2008.
3. Rosete Olvera DP. Archundia Sánchez FJ. Cabello Gutiérrez C. Manjarrez Zavala ME. Patogenia de la Infecciones Respiratorias por Virus. Rev. del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 2002.
4. Manjarrez Zavala ME. , Familia Paramyxoviridae, en, Bacteriología y virología, Molina J. Manjarrez ME. Tay J. Méndez Editores, 2010; México D.F., pg 502-517.
5. Manjarrez ME. Thompson O. Aislamiento del virus sincicial respiratorio en niños hospitalizados por infecciones respiratorias agudas. Rev. del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 1992. pg 28-34.
6. WahyuS.Samsó M. Torres J. Structural and Functional Aspects of Viroporins in Human Respiratory Viruses: Respiratory Syncytial Virus and Coronaviruses. En Respiratory Disease and Infection. Bassam HM., Mayank GV., 2013, Croatia, pg 4- 46.
7. Weissenbacher M. Ávila M. Los Virus Como Causa de IRA alta y baja en niños: Características Generales y Diagnostico.
8. Benítez J., Brac E., Frías L.,El Virus Sincicial Respiratorio Aspectos Generales y Básicos sobre la Evolución Clínica, Factores de Riesgo y Tratamiento. . Rev. de Posgrado de la VI Cátedra de Medicina.
9. Escobar López B, Luchsinger V, .Palomino M, Avendaño L. Gravedad clínica de la Infección Respiratoria Aguda baja primaria por Metapneumovirus humano y virus respiratorio sincicial. Revista pediátrica: [en línea] 2005 [7 enero del 2006]; 2: (1-4). URL disponible en: <http://www.revistapediatria.cl/vol2num3/resumenes2005.htm>
10. Callejón A., Hernández C., Pérez C., Carrasco E., Infección Respiratoria por Virus Sincicial. Bronquiolitis. Rev. Actitud Diagnostica Terapéutica. 2004. Volumen 28: pg 249-264.
11. Razón R. Prevención de la Infecciones Respiratorias Agudas. Presente y Futuro. Rev. Cubana de Pediatría. 2003. Volumen 75. Numero 4.
12. Manjarrez ME. Virus Sincicial Respiratorio y su Participación en las Infecciones Respiratorias Agudas. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx. 1991. Volumen 4, Numero 3. pg 161-169.
13. López S., Hernández J., Borraz MT., Reyes J., Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del *Rubulavirus* porcino, Rev. Arch. med. vet. 2004. Volumen 36, Numero 2. pg 119-136.
14. Bascones A., Posua C., Herpesvirus. Rev. Avances en odontoestomatología. 2009. pg 11-24.
15. Drew W., Herpesvirus infections. Rev. Infectious Disease clinics of North America.1988. pg 495-509.
16. Negroni M., Microbiología Estomatológica 2da edición. Madrid: Medica Panamericana; 2009.
17. Griffin D., Lamb R., Howley P., Fields Virology, fifth edition. North America: WoltersKlower; 2007. Pg 1449-1526, 2479-2501.

18. Saldaña L., Anduaga E., Antisépticos y Desinfectantes. Rev. Dermatología Peruana. 2005. vol 15, pg 83 -103.
19. Lopez P., Moreno A, Leza J., Farmacología Basica y Clínica. 18 Edición., Madrid: Medica Panamericana; 2008 pg887-898.
20. Belluci S., Blumetti I., Cortes J., Remigton Farmacia. 20 edición. United States of Northamerica : Panamericana; 2000. pg 1782-1806.
21. Arrebola D., Fernández I., Curveco D., Principales Ensayos Para Determinar la Citotoxicidad de una Sustancia, Algunas Consideraciones y su Utilidad. Rev. Toxicología Clínica. Cuba. 2003. pg 44-52.
22. Rodríguez V., Ortega V., Valor del Ensayo Colorimétrico con MTT, en el estudio de Crecimiento y Citotoxicidad in vitro de las Líneas de Melanoma. Rev. Patología; España. 2007. pg 18-27.
23. Lechuga M., Nanomedicina aplicación de la Nanobiotecnología en la Salud. Rev. Nanobiotecnología aplicada a la Salud Humana. 2005, pg 98 -112.
24. Bogunia K. Sugisaka M. From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. Biosystems. 2002; pg 65 -123.
25. Vassita R., Katti V., Nanotecnología en medicina: Tecnologia emergente. Rev., Ministerio e Innovación., España. 2007; pg 11-50.

REFERENCIAS DE IMÁGENES

1. Disponible en:
http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Virus+Sincitial+Respiratorio+Humano&lang
2. Disponible en: http://www.respyn.uanl.mx/viii/1/ensayos/vih_sida_corregido.html