

01672 A
2

UNAM
POSGRADO



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**"EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA
ACTIVIDAD REPLICATIVA DEL VIRUS SINCICIAL
RESPIRATORIO EN CÉLULAS PERMISIVAS HEP-2"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
MIGUEL ÁNGEL MARTÍNEZ CASTILLO
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TUTOR PRINCIPAL: Ph. D. HÉCTOR SUMANO LÓPEZ

COMITÉ TUTORAL

M. Sc. LUIS OCAMPO CAMBEROS

M.C. JESÚS CASASOLA FLORES.



MÉXICO, D.F.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

DEDICATORIA.

La luna que transita

Puesto que uno no puede escoger a su familia, pues no existe la aventura de elegir, de programar a quiénes serán sus padres, hermanos, hijos y esposa, y puesto que también, supongo, depende del azar, creo que fui, he sido y soy todo un afortunado.

Mi hijos son mi razón, mi causa y mi circunstancia, la ternura que me alcanza para enfrentar cada día, la pasión por mi trabajo, el aire que yo respiro, el trayecto cuando miro pasar sigilo y bonanza, el impulso que me avanza, las pilas para mi vida.

Mi esposa es la cadencia, el ritmo de mi templanza, armadura, escudo y lanza para vencer siempre a tiempo la incertidumbre y el ego, la arrogancia y el sosiego; es la mirada, el deseo, el aria de mis pasiones, el mar de mis emociones, mi paz, mi sol, mi ilusión

Mis hermanos simplemente creo que son buenas personas, no perfectos, ni tan rectos, no muy sabios, no unos santos, pero sí sin ayeres desolados, ni presentes tormentosos, sin ambiciones malsanas, ni pensamientos tortuosos, son honestos, son sencillos, sin dobleces, son felices

Mi padre fue una oda susurrada hacia mi vida que el silencio inclemente abruptamente interrumpió, un ser feliz y sabio, con primaria inconcluida, una luz que no se apaga a pesar de su partida, una lámpara votiva, una senda, una salida. . .

Mi madre es como viento, invisible y necesario, es la savia que alimenta a mis ramas, a mis hojas, es el párpado que rauda va y protégeme los ojos, es la luna que transita, ilumina, mengua y grita el secreto misterioso por el cual pende mi vida.

Y a sus setenta y cinco años es su rostro ya longevo, pero no sus intenciones, ni sus planes, ni sus sueños, pero no sus desatinos, ni su temple, ni su voz, y detrás de su mirada apacible siempre veo el rostro triste, la mano oculta y la intención de Dios.

-Miguel Ángel Martínez Castillo-

A los niños del Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

Aunque poca es tu conciencia sobre el mal que te doblega,
aunque muchas son tus dudas y muy pocas las respuestas
tu mayor miedo al llegar al umbral del nosocomio
son sus paredes y puertas, su silencio interminable,
sus aparatos tortuosos, sus horarios infranqueables

Son sus pasillos con eco, que destilan pesimismo,
sufrimientos y derrotas, ilusión y escepticismo,
son esas noche eternas, bañadas en soledad,
son esos días desolados, sin risas, juegos y ritmos,
envueltos en hermetismo y en rapaz tranquilidad

Te impresionan las personas con ropas albas cubiertas,
que caminan siempre erectas, desmenuzando respuestas,
que comprenden tus señales de malestar y dolor,
que son aptas y que saben si es el páncreas o el duodeno,
si el corazón o el riñón, si es la presión o es el sueño

Te sorprende su pericia, las técnicas que dominan,
todos hablan, todos miran, todo hierve en el sopor
de análisis y resultados obtenidos con rigor,
los miligramos de más, los nanómetros de menos,
las células desteñidas, los cromosomas enfermos

Es innegable ellos saben dosis de medicamentos,
duración de tratamientos, mil restricciones y dietas,
pero solo ven tu esfinge, tu cuerpo que se consume,
las cifras, las estadísticas, las líneas curvas y rectas,
los puntos en el currículum , sus objetivos y metas

Pero ¿quién pregunta por tus sueños, tus temores y tus miedos?,
¿quién desarticula enredos de tu paciencia enjaulada?
¿quién te hablará de princesas, de robots, de dinosaurios?
¿quién peleará entre corsarios ayudándote a vencer
la enfermedad de tu ánimo, la soledad de tu ser?

¿Quién con amor y con gusto te contará El Principito,
te leerá cuentos de Hoffman, Tagore, Andersen, Grimm?,
¿quién te dará una sonrisa sincera cada mañana?,
¿quién devolverá la calma a tu vida que está en un grito?,
¿quién te inyectará coraje y ganas para vivir?

Miguel Ángel Martínez Castillo.

AGRADECIMIENTOS.

ii

**Al Dr. Jesús Casasola
por su invaluable ayuda para la
realización de este trabajo y por
la amistad compartida.**

**Al Dr. Marcelino Rosas
por su asesoría en la obtención de
los resultados estadísticos y por
su compañerismo**

**Al personal del Bioterio del Hospital Infantil de México,
por su apoyo y colaboración.**

**Al personal del Laboratorio de Inmunoquímica
del Hospital Infantil de México.**

**Al personal del Laboratorio de Inmunología y Reumatología
del Hospital Infantil de México.**

**Al personal del Laboratorio de Biología del Desarrollo
del Hospital Infantil de México.**

**Al personal del Departamento de Fisiología y Farmacología
de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
especialmente al que labora en su Centro de Cómputo,**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Gracias.

ÍNDICE.

	Página
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Índice	iii
Resumen	iiii
1. Introducción.	01
2. Justificación.	17
3. Objetivos	18
4. Hipótesis.	19
5. Material y Métodos.	20
6. Resultados y Discusión.	32
7. Referencias.	36
8. Apéndices.	45
9. Cuadros.	54
10. Figuras.	61

Resumen.

“EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD REPLICATIVA DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO EN CÉLULAS PERMISIVAS HEP-2”.

Se ha comprobado que la melatonina ejerce un efecto protector ante algunas infecciones virales; en ratones de laboratorio, se ha observado que la administración exógena de melatonina previa a la infección con virus neurotrofos disminuye la morbilidad y la mortalidad. Este estudio se justifica para comprobar si la propiedad antiviral atribuida a la melatonina se manifiesta *in vitro* ante el Virus Sincicial Respiratorio humano (VSRh), utilizando como sustrato a células HEP-2. El VSRh es el principal causante de infecciones respiratorias en niños menores de 6 meses de edad. El objetivo del presente trabajo es conocer el efecto de la melatonina sobre la actividad replicativa del VSRh mediante la técnica de inmunofluorescencia a través de la infección experimental de células HEP-2, y la hipótesis planeada fue que la melatonina administrada exógenamente afecta la actividad replicativa *in vitro* del VSRh sobre células HEP-2. El trabajo realizado tuvo carácter prospectivo, comparativo, longitudinal y experimental. Las células HEP-2 fueron multiplicadas en medio esencial mínimo (MEM). Después se realizó un ensayo de Dosis Efectiva para conocer la cantidad de melatonina apropiada que se utilizaría como tratamiento (0.66M). En cajas de poliestireno y utilizando como base del cultivo celular vidrios circulares de 14 mm de diámetro, se sembraron 72 pozos con 20 000 células c/u, organizándolos en 6 Grupos: A = HEP-2 + Melatonina 24 horas preinfección + VSRh; B = HEP-2 + Melatonina y VSRh aplicados simultáneamente; C = HEP-2 + VSRh + Melatonina 24 horas posinfección; D = HEP-2 + VSRh; E = HEP-2 + Melatonina; F = sólo HEP-2. El tratamiento con melatonina consistió en la aplicación de 10 microlitros de sol al 0.66 M/pozo; la infección con VSRh Long consistió en suministrar 2×10^6 UFP/pozo. Todas las muestras se incubaron a 37°C, a 70% de humedad relativa y bajo una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂. 4 muestras de cada grupo o tratamiento se retiraron y se fijaron con acetona a las 24 horas posinfección; otras 4, a las 72 horas y las últimas 4, a las 120 horas. Simultáneamente se retiraron muestras de los grupos no infectados. Una muestra de cada tiempo de muestreo y de cada grupo fue teñida con hematoxilina-cosina y las 36 infectadas con el VSRh fue expuesta a 10 microlitros del anticuerpo monoclonal específico comercial. Después se contaron las células fluorescentes por c/200 observadas en c/muestra. Los datos obtenidos fueron sometidos a un Análisis de Varianza (AV), utilizando el procedimiento GLM del programa estadístico SAS. El AV encontró diferencias entre los tratamientos (P = 0.0002), entre los tiempos de muestreo (P = 0.0001) y en la interacción tratamiento*tiempo de muestreo (P = 0.0063). No se encontró diferencia al comparar los tratamientos A y C (P = 0.6878). Se concluye que la melatonina sí afecta la actividad replicativa *in vitro* del VSRh, lo que justifica investigaciones futuras en modelos animales para aspirar a la posibilidad de utilizar a esta hormona en humanos infectados.

EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD REPLICATIVA DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO EN CÉLULAS PERMISIVAS HEP-2.

TESIS DE MAESTRIA

Por MIGUEL ÁNGEL MARTÍNEZ CASTILLO, M.V.Z.
Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad
de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad
Nacional Autónoma de México.

*Después de haber perdido el tiempo
durante tanto tiempo,
tengo unas ganas enormes
de saber que existo*

Miguel Ángel Martínez Castillo

I. INTRODUCCIÓN

La melatonina fue descubierta en 1958 por Aarón B. Lerner, de la Universidad de Yale, al estudiar la glándula pineal (GP) bovina.¹⁻³ La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es sintetizada a partir de la serotonina (5-hidroxi-triptamina), que a su vez es derivada del triptofano.²⁻⁶ Su peso molecular corresponde a 232.3 daltons. Es una molécula excepcionalmente liposoluble y por ello, capaz de atravesar las membranas biológicas.⁶⁻⁹ Es una sustancia bastante vieja en la naturaleza, que ha resistido el embate evolutivo, lo cual sugiere que desempeña funciones clave dentro de la economía biológica, sin importar el nivel filogenético.⁸ Está presente en todos los animales y en muchos vegetales¹⁰ y aun en seres unicelulares.^{1,8,9} La melatonina posee una vida media de 10-24 minutos^{4,11} en el humano; se metaboliza principalmente en el hígado por hidroxilación a 6-hidroximelatonina,^{4,6,11,12} alternativamente es diacetilada a 5-metoxitriptamina.¹¹ Más del 90% de la melatonina que aparece en la orina se presenta en forma de conjugados 6-hidroxi y 6-sulfatoximelatonina.^{3,5,13}

Tanto la síntesis como la secreción de melatonina presentan ritmos circadianos y circaanuales.^{4,11,14-16} La melatonina de la GP sólo se secreta durante la noche^{2,4} (escotofase⁴), debido a la activación nocturna de los receptores β adrenérgicos pineales,¹⁷ independientemente de los hábitos etológicos¹¹ y metabólicos de la especie considerada; se le llama la "hormona de la oscuridad".^{7,18} La melatonina se secreta en mayor cantidad cuando los días son más cortos.^{11,16} Hasta hace poco, se consideraba que la melatonina se producía únicamente en la GP y durante mucho tiempo esta glándula constituyó el elemento central para escudriñar el papel de la melatonina dentro de la fisiología. Ahora se sabe que la melatonina puede ser producida también por las glándulas de Harder en roedores^{2,10,14} y pollos,^{12,19} por la retina,^{10,14} el epitelio intestinal,^{2,10} los megacariocitos, las plaquetas¹⁰ y los monocitos.²⁰ En los mamíferos, la pineal es un órgano circunventricular en forma de piña, que se desarrolla a partir del tercer ventrículo,^{17,18,21} bajo el extremo posterior del cuerpo caloso, cercano al hipotálamo.⁶ En los animales inferiores, esta glándula es un órgano constituido por varios segmentos (órgano supernumerario) y está ubicada en forma superficial, a tal grado que en peces y anfibios solo está protegida por la epidermis.⁹ Actualmente se utiliza el término "complejo pineal" para referirse al conjunto de tejidos productores de melatonina.¹⁰ La primera descripción de la GP fue realizada por Herófilo, 300 años A.C.⁴ Mucho tiempo después, René Descartes la concibe como "el asiento del alma".⁵ Después se observó que en el adulto, aparentemente involuciona y se calcifica y fue entonces considerada un remanente evolutivo del cerebro.²² No fue sino hasta el siglo XIX cuando vuelve a mencionársele debido a su apariencia hiperplásica en humanos con precocidad sexual.^{4,5}

En la rata, la pineal está constituida por células parenquimatosas, pinealocitos de luz, pinealocitos de oscuridad y células gliales;²² en animales lactantes y jóvenes la pineal es grande

y sus células se organizan en alvéolos.⁵ La GP de los mamíferos carece de barrera hematoencefálica y por ello, grandes moléculas provenientes de la sangre llegan a ella con facilidad.^{6,11,21,23} Los pincalocitos, las células secretoras de la GP, reciben inervación directa simpática²¹ y poseen abundantes aminas biógenas (noradrenalina, dopamina, serotonina, histamina), ácido gamma amino butírico (GABA), algunos péptidos hipotalámicos (hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), tiroliberina (TRH), somatostatina (STHII))⁶ y muchas otras proteínas como el polipéptido antigonadotrópico, arginina-vasopresina, oxitocina, hormona estimulante de los melanocitos (MSH), angiotensina II, sustancia P, péptido intestinal vasoactivo (PIV) y endorfinas.⁴ Aparentemente, la GP es la intermediaria entre el ambiente externo y el interno.^{10,17} Se sabe que existe comunicación estrecha entre la GP y el hipotálamo y dado que este último constituye el centro colector de información relacionada con el bienestar del organismo,^{24,25} la relación pineal-hipotálamo adquiere relevancia. Parece ser que a través de la melatonina, la GP modula el funcionamiento del hipotálamo y, si esto es verdad, entonces también influye sobre la hipófisis y sobre muchas glándulas periféricas. La modulación debe entenderse como la capacidad de modificar sutilmente el funcionamiento de órganos y tejidos. La melatonina es un modulador capaz de afectar a diversos sistemas fisiológicos.^{4,8,10,14} Los efectos de la melatonina son mediados por receptores específicos de alta afinidad,⁵ localizados en la membrana plasmática^{11,26,27} y acoplados al sistema guanocina trifosfato (GTP).²⁸ Se han identificado 2 proteínas G acopladas a los receptores,^{11,26} una de ellas sensible a la toxina pertusis y la otra sensible a la toxina del cólera.¹¹ Se han descrito 3 subtipos de receptores para melatonina: Mel 1A, Mel 1B y Mel 1C; los 2 primeros se encuentran en mamíferos y pueden distinguirse farmacológicamente utilizando antagonistas selectivos.¹¹ Los receptores para melatonina regulan a varios segundos mensajeros: adenocina monofosfato cíclico (AMPC), guanocina monofosfato cíclico (GMPc), diacilglicerol (DAG), trifosfato de inositol (IP3), ácido

araquidónico, [Ca] intracelular^{11,12,14} descritos principalmente en células de la pituitaria y en el núcleo supraquiasmático (NSQ) de la rata neonatal.¹¹ Asimismo, se han identificado en la membrana receptores específicos de baja afinidad.^{5,27-29}

La mayoría de los efectos de la melatonina son inhibitorios y requieren que las células hayan sido estimuladas previamente,^{11,14,30} ya que los niveles funcionales basales de éstas parecen no ser afectados por la melatonina.¹¹ La melatonina también afecta a terceros mensajeros (factores de transcripción).¹¹ Si bien se ha comprobado que la melatonina actúa a nivel de membrana plasmática, no debe excluirse un posible mecanismo de acción intracelular,^{7,31,32} ya que, experimentalmente, se han detectado sitios de unión para ella en núcleo y mitocondrias de células de la Bolsa de Fabricio, pero su número disminuye al avanzar la edad de los pollos.³³ Se ha sugerido que la melatonina afecta la organización del citoesqueleto de manera similar a los fármacos antagonistas de la calmodulina.³² Por su elevada liposolubilidad, la melatonina es una molécula ubicua, aunque esto no signifique que actúe sobre todos los tejidos en los que se ha encontrado.

Se ha comprobado que la GP y la melatonina transducen la iluminación ambiental también en signos que modulan las funciones inmunitarias.^{15,28,30,34} Hace 75 años se postuló la interrelación: GP-Sistema Inmunitario a través de una hipótesis que planteaba que la pineal y el timo influían en la regulación del crecimiento celular.²⁸ Desde hace muchos años se ha observado que la administración continua de extractos pineales incrementa el peso del timo en los animales de laboratorio,^{17,28} por el contrario, la pinealectomía neonatal conduce a atrofia tímica^{17,28,34} y a una disminución de la capacidad generadora de anticuerpos.^{28,36} La investigación actual de los efectos de la melatonina sobre el sistema inmunológico permite sugerir que esta sustancia es capaz de estimular la respuesta inmunológica^{12,28,31,33,36-38} y de corregir las inmunodeficiencias derivadas de la exposición al estrés agudo,^{17,27,34,37} a infecciones

virales,^{37,39} a algunos medicamentos³¹ y al producido por el envejecimiento.^{17,39} Existen receptores para la melatonina ampliamente distribuidos en los tejidos linfoides.³³

Dados su ritmos circadiano y circaanual,^{15,31} podría correlacionarse en el hombre la modulación del sistema inmunológico por parte de la melatonina^{17,40} con la manifestación cíclica de enfermedades tales como el asma, el síndrome de muerte súbita en el infante, algunos desórdenes psiquiátricos y cardiovasculares, etc.^{15,18} Existen evidencias que sugieren una relación inversa entre niveles plasmáticos de melatonina y patologías tales como: enfermedades psicósomáticas, alteraciones psiquiátricas, neurológicas y cáncer;^{30,34,39,41} Una relación similar parece existir entre la melatonina, la inmunodepresión y las enfermedades infecciosas.^{15,39} La melatonina estimula a los linfocitos CD4 para producir y liberar citocinas: interleucina (IL) 2 e interferón gamma, y también opioides endógenos linfocitarios,^{13,20,27,39} tanto en humanos como en roedores.^{37,38} Además de las propiedades inmunomoduladoras, la melatonina también ha mostrado tener un efecto antitumoral; la pinealectomía estimula el crecimiento de algunos tumores y la inyección de melatonina contrarresta dicho crecimiento, tanto en animales como en humanos²⁰. La IL-2 es una de las citocinas antitumorales más activas.⁴²

La melatonina también aumenta la producción de anticuerpos en ratones sanos,^{12,13,18,27,28} tanto en jóvenes (2 meses) como en viejos (12 meses).¹⁷ La inyección de melatonina durante 6 días en ratones clínicamente sanos estimula la producción de anticuerpos, incrementa el número de células formadoras de placa espláncnicas después de una inmunización previa y antagoniza la inmunosupresión inducida por los corticosteroides.^{12,13} Además, la melatonina también actúa sobre los monocitos humanos al incrementar la citotoxicidad, la secreción de IL-1 y la producción de intermediarios en las reacciones de oxígeno.^{20,27,43} Es factible postular que estos efectos de la melatonina sobre el sistema inmunitario, y probablemente otros más, sean parte del mecanismo mediante el cual la melatonina ejerza un efecto inmunoprotector ante infecciones

virales.^{13,27,39} Se ha observado que ante algunos virus murinos, la administración de melatonina, previa a la infección, disminuye la morbilidad y la mortalidad, e incluso en algunos casos, posterga la infección.^{34,37,39,44,45} También se ha comprobado que la melatonina protege a ratones infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV): al incrementar la dosis de 0 a 1000 μg de melatonina/kg de peso corporal, la mortalidad disminuyó del 100 al 16%; la melatonina también redujo los niveles de virus en sangre y encéfalo y aumentó la tasa de supervivencia de los animales infectados al incrementar el pretratamiento con melatonina de 3 a 10 días antes de la inoculación.⁴⁶ Asimismo, la melatonina incrementa la supervivencia de ratones inmunodeprimidos con dexametasona e infectados después con el VEEV: se aplicó melatonina en dosis de 500 μg /kg de peso corporal, 3 días antes y hasta 10 días después de la infección, logrando aumentar, a los 6 días de inoculación viral, de 0 a 32.5% la tasa de supervivencia de los ratones (dexametasona + VEEV y dexametasona + melatonina + VEEV, respectivamente).⁴⁷

Considerando estos antecedentes se planteó la realización de un experimento *in vitro* en el se que evaluara la capacidad antiviral potencial atribuida a la melatonina utilizando como sustrato a las células susceptibles HEP-2, las cuales fueron infectadas con el Virus Sincicial Respiratorio humano (VSRh). El VSRh es de gran importancia epidemiológica pues afecta en una gran proporción al tracto respiratorio de los niños, especialmente a aquellos menores de 6 meses de edad, aunque actualmente también se considera un agente infeccioso importante para los adultos seniles y/o inmunodeprimidos.

1.2 VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO.

EPIDEMIOLOGÍA.

La infección por VSRh tiene lugar en todo el mundo.⁴⁸ El VSRh constituye el agente viral más frecuente de las infecciones de las vías respiratorias bajas en niños, especialmente en aquellos menores de 6 meses de vida.⁴⁸⁻⁵³ En los países desarrollados existen de 1 a 20 casos/1000 niños menores de 1 año de edad.^{48,51} Puede afirmarse que el VSRh es el responsable más común de la bronquiolitis y de la neumonía en niños de entre 2 y 4 meses de edad.^{54,55} Existen epidemias anuales (final de otoño y principios de invierno), con picos máximos en diciembre, enero y febrero,⁴⁹ según las condiciones ambientales locales. En la década de los años 1980s, en USA se hospitalizaron 100 000 niños infectados con VSRh;^{49,56} ya en los años 1990s, la cantidad descendió a 91 000 hospitalizaciones y a 5000 muertes al año, aproximadamente.^{51,56} Virtualmente se considera que en USA todos los niños menores de 2 años han estado en contacto con el VSRh.^{48,49} Entre los niños, la infección con VSRh es la causa del 50-90% de las hospitalizaciones por bronquiolitis, del 5-40% de las hospitalizaciones por neumonía y del 10-30% de las hospitalizaciones por traqueobronquitis.⁴⁹ Actualmente también se reconoce como un patógeno respiratorio importante en adultos, especialmente en los seniles y/o inmunodeprimidos.^{49,51,54,57} Asimismo, se ha comprobado que puede afectar las vías respiratorias altas.⁴⁸ El virus se transmite por inoculación directa de secreciones contagiosas a partir de las manos o por grandes partículas de aerosol que se introducen en los ojos y nariz, y muy rara vez en la boca, por lo que es necesario el contacto estrecho de persona a persona.⁴⁹ El virus puede estar viable a temperatura ambiente durante algunas horas,⁴⁸ por lo que es muy importante el manejo adecuado del enfermo y de la persona que lo atiende, quien debe estar técnicamente calificado para manejar a este tipo de pacientes.^{48,49} En la piel humana el virus permanece viable por 30 minutos.⁴⁸ El principal problema de transmisión es a nivel

nosocomial.⁴⁹ Más del 45% de los niños admitidos en un hospital para atención pediátrica durante la estación invernal pueden adquirir al VSRh, especialmente aquellos con problemas cardiopulmonares.⁴⁸ Durante las epidemias, las tasas de infección entre los médicos y enfermeras es mayor al 60%,^{48,49} mismos que actúan como transmisores del virus y desencadenan infecciones nosocomiales.

FACTORES DE RIESGO.

En niños, los factores de riesgo para el establecimiento de la infección grave por VSRh son prematuridad, displasia broncopulmonar, cardiopatía congénita, inmunodeficiencia, fibrosis quística;^{48,49,58,59} también, los niños que nacen durante los 2 a 4 meses previos al pico epidémico, los que tienen niveles bajos de anticuerpos neutralizantes: los amamantados por períodos menores a 6 meses, los hijos de madres con bajo nivel de educación general y médica, los que habitan bajo condiciones de hacinamiento y promiscuidad, y aquellos con atopia o hipersensibilidad a cualquier alérgeno.⁵⁴ La apnea obstructiva puede ocurrir como una complicación de la infección con VSRh, especialmente en niños prematuros.⁴⁸

PATOGÉNESIS.

La infección primaria ocurre muy frecuentemente entre las 6 semanas y los 6 meses de edad.⁴⁸ Generalmente, el virus tiene como transmisor a un adulto portador.^{48,57} El VSRh entra en contacto con la mucosa de la nariz y de los ojos.⁴⁹ El período de incubación varía de 2 a 8 días (promedio 5 días); el virus se disemina hacia las vías respiratorias bajas en 2 a 3 días y posteriormente es eliminado a través de las secreciones nasofaríngeas.^{49,54} El virus se encuentra unido al epitelio respiratorio e induce efecto citopático (ECP) e inflamación especialmente a nivel de bronquiolos.⁴⁸ La bronquiolitis se caracteriza por infiltración linfocitaria peribronquial y edema de submucosa y tejidos adventicios, lo que conduce a proliferación y necrosis; estos cambios provocan obstrucción de los pequeños bronquiolos que se llenan de detritus, haciendo

la espiración difícil y mostrando hiperinflación pulmonar.^{48,49,55} El progreso de la infección conduce a la neumonía. En la neumonía las paredes interalveolares están infiltradas con células mononucleares. Hay acumulación proteica, macrófagos, células epiteliales y numerosas células gigantes, multinucleadas, sinciciales, con inclusiones intracitoplásmicas eosinófilas; como consecuencia hay consolidación pulmonar extensa, broncoconstricción, estribor y sibilancias.^{54,55} Los sincicios y las inclusiones intracitoplásmicas son lesiones muy frecuentes pero no pueden considerarse patognomónicas de infección por VSRh.⁴⁸ Generalmente se manifiestan evidencias histológicas de recuperación a las 2 semanas de iniciada la infección, pero el restablecimiento completo tiene lugar hasta las 4-8 semanas.⁴⁹

RESPUESTA DEL HOSPEDERO.

En general, la producción de anticuerpos en respuesta a la infección por VSRh es leve y de poca duración. Esta puede ser la razón de las reinfecciones frecuentes.⁴⁸ Las IgM séricas aparecen a los 3 días posinfección y se mantienen por 2-10 semanas; IgA e IgG son detectables a los 10 días posinfección y presentan una concentración máxima a las 3-4 semanas, persistiendo por menos de 6 meses.⁴⁸ En las secreciones respiratorias IgA, IgG e IgM aparecen a los 3 días de iniciada la enfermedad y presentan una concentración máxima a los 8-13 días, siendo detectables por un poco menos de 6 meses.⁴⁸

Las glicoproteínas F y G del VSRh constituyen las principales determinantes para que los anticuerpos neutralicen la infectividad viral *in vitro*.⁴⁹ La inhibición de F por anticuerpos evita la formación de sincicios. La severidad de la enfermedad causada por el VSRh es inversamente proporcional al nivel de la inmunidad pasiva adquirida de origen materno para neutralizar al virus en el neonato.⁵² Estudios en modelos animales han demostrado protección contra la replicación viral en los pulmones cuando los animales poseen altos niveles de títulos de anticuerpos contra VSRh.⁴⁸ IgA específicas contra VSRh se encuentran en el calostro, por lo

que el amamantamiento puede proveer alguna protección contra el virus.⁴⁸ Los pacientes asmáticos que se infectan con VSRh presentan grandes cantidades de IgE e histamina, los cuales provocan hipoxia, obstrucción de las vías aéreas y dificultad respiratoria.^{48,60}

ASPECTOS CLÍNICOS.

La signología varía de acuerdo a la edad del enfermo, sin embargo, en general, la infección con VSRh usualmente comienza con afección de las vías respiratorias altas: rinoresaca, congestión nasal, faringitis y fiebre.^{48,49,54} La bronquiolitis es una infección de los bronquios pequeños y de los bronquiolos, caracterizada por respiraciones rápidas, con espiraciones prolongadas.^{48,55} Las radiografías del tórax revelan hiperreacción con aire atrapado, pudiendo haber atelectasia segmental.⁴⁸ Como ya se mencionó, la primoinfección más común tiene lugar entre las 6 semanas y los 6 meses de edad, y es altamente sintomática, teniendo de 25 a 40% de probabilidad para desarrollar infecciones de vías respiratorias bajas.^{49,49} Las reinfecciones son menos frecuentes y menos intensas.^{48,54} Hay bronquiolitis caracterizada por disnea mayor de 50 respiraciones por minuto, hipoxemia (saturación de O₂ menor al 90%) y frecuentemente hay hiperexpansión pulmonar.⁴⁸ Cuando este cuadro se presenta en niños muy pequeños es necesaria la hospitalización.⁵⁶ Del 80 al 90% de dichos pacientes se recuperan de 6 a 10 días; otros tienen convalecencias prolongadas.⁴⁸ En USA, de la totalidad de los niños hospitalizados, la mortalidad es del 1%; en los que además presentan otras enfermedades asociadas, la mortalidad asciende a 2-5 %.^{48,56} Cuando se presenta neumonía en un neonato, además del cuadro respiratorio superior, también hay períodos de apnea de 10 a 15 segundos de duración, asociados con cianosis y bradicardia. Los niños con factores de riesgo, como los cardiópatas, neumópatas, inmunodeficientes, prematuros y con fibrosis quística,^{48,59} son sujetos de mal pronóstico y el riesgo de muerte es muy alto (30-75%).⁴⁸ Después de los 3 años de edad, la reinfección se restringe a las vías respiratorias altas o traqueobronquitis.^{48,49}

En el caso de los ancianos, la infección con VSRh afecta típicamente las vías respiratorias altas; tienen riesgo de infección neumónica pero de poca gravedad e incluso puede ser asintomática.^{48,61} En casos graves, el VSRh puede exacerbar las enfermedades pulmonares y cardíacas.^{50,62} Se ha demostrado que el VSRh es de los 3 patógenos más comúnmente detectados durante el invierno en adultos con neumonía adquirida comunitariamente.^{49,50} En general, los adultos afectados tienden a mostrar más variabilidad y menos hallazgos clínicos distintivos que los niños, y las causas de la infección frecuentemente son insospechables.^{49,61,62} En el caso de los pacientes inmunodeprimidos, el VSRh, así como el virus de la parainfluenza, constituyen agentes infecciosos oportunistas.^{49,63} Pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) infectados también con VSRh, presentan cursos de enfermedad respiratoria muy prolongados y recuperaciones sumamente lentas.^{49,63}

INFECCIONES ASOCIADAS Y SECUELAS.

Las complicaciones más frecuentes son: otitis media aguda, neumonía bacteriana y conjuntivitis.⁴⁸ Los niños pequeños que padecieron la infección con VSRh comúnmente presentan anormalidades de la función pulmonar durante toda su infancia; se pueden detectar hasta por 8 años bajos niveles de oxihemoglobina y obstrucción periférica de las vías aéreas.⁴⁸

DIAGNÓSTICO.

La manifestación clínica de bronquiolitis y/o neumonía durante las epidemias sugieren la infección con VSRh: la confirmación requiere del cultivo del virus, detección antigénica o pruebas serológicas.^{48,49,54} La detección del virus depende en gran medida de la obtención adecuada de la muestra obtenida por lavado o aspirado nasal.^{48,58} Se han identificado los siguientes métodos directos para identificar al VSRh: inmunofluorescencia (IF), microscopía electrónica, análisis inmunsorbente enzimático (ELISA) y la técnica de inmunohistoquímica.^{48,49,54} La IF es el método más utilizado para el examen directo de

secreciones respiratorias en busca del VSRh.⁵⁴ Sin embargo, la prueba más rápida y eficaz para reconocer la presencia de VSRh se realiza a base de ELISA (duración de la prueba: 2-5 horas).^{49,54} El momento óptimo para el diagnóstico es durante los primeros 3 días de evolución de la enfermedad.⁵⁴ El diagnóstico por métodos serológicos es de importancia secundaria.^{48,54}

TRATAMIENTO.

La terapia depende del estado clínico del paciente y es sólo de soporte. Las afecciones severas demandan hospitalización.⁵⁶ La administración de oxígeno húmedo es muy útil para contrarrestar la hipoxemia; en los casos graves se requiere intubación y ventilación mecánica asistida; alimentación, aseo, aspiración de secreciones y restricción de líquidos.⁴⁸ El antiviral ribavirina es un derivado nucleósido sintético análogo de la guanosina y de la inosina que posee un extraordinario espectro contra varios virus, incluido el VSRh.⁴⁸ Su administración mediante sistema automatizado de aerosol durante 18-20 horas continuas, de 3 a 5 días, mejora notablemente el curso de la neumonía y la bronquiolitis.^{48,64} La ribavirina parece interferir con la expresión del RNAm, con lo cual inhibe la síntesis proteica viral. En casos graves se utilizan gammaglobulinas.^{48,65}

MEDIDAS PREVENTIVAS.

Puesto que el virus es sensible a detergentes, por su capa externa lipídica, el aseo y limpieza de objetos de uso diario es necesario.^{48,57} Para evitar la diseminación, es recomendable usar guantes y cubrebocas.⁴⁸ La protección en edades tempranas de la vida requiere del uso de vacunas que puedan inducir rápidamente una respuesta inmune protectora a pesar de la relativa inmadurez del sistema inmune y de la persistencia de anticuerpos de origen materno que pudieran interferir con la respuesta ante la vacuna por parte del infante.^{52,66} Ambos son obstáculos significativos para desarrollar una vacuna eficiente.⁵² Actualmente se encuentran en

investigación de campo vacunas con cepas de VSRh activo modificado, así como con subunidades vacunales G o F.^{49,66}

EL VSRh EN MÉXICO.

A pesar de que en México se cuenta con estadísticas de mortalidad por año desde 1929, no fue sino hasta 1959 en que hay informes de infecciones provocadas por síndromes respiratorios.⁶⁷ A partir de 1976 no solo se reporta la mortalidad causada por enfermedades infecciosas, sino también la morbilidad.⁶⁷ Sin embargo, a pesar de que se considera que en México, como en otros lugares del mundo, el agente etiológico más importante que provoca infecciones de las vías respiratorias bajas en los niños menores de un año es el VSR, no existen suficientes estudios que muestren la situación epidemiológica del virus en el país.^{67,68} Sí hay estudios publicados relacionados a brotes de infección identificados en hospitales⁶⁹ o al aislamiento del agente viral.⁷⁰⁻⁷² En México son pocos los laboratorios que realizan el diagnóstico de este virus y también es reducido el conocimiento que se tiene de las variantes virales que afectan a su población.⁶⁸

CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL VSR.

El VSRh pertenece al orden mononegaviral, al Grupo de los Paramyxovirus, a la familia Paramyxoviridae y al género *Pneumovirus*.^{48,49,54} Puesto que el VSRh posee características morfológicas y biológicas similares al Virus Pneumónico del ratón (PVM) y al Virus Sincicial Respiratorio bovino (RSVb), se ha sugerido que estos virus podrían clasificarse juntos como un grupo separado, el que por su tamaño intermedio, podría llamarse Metamyxovirus.^{49,54} El VSRh también posee muchas similitudes estructurales, patogénicas, epidemiológicas y clínicas con el virus de la Parainfluenza Tipos 1, 2, 3 y 4.⁴⁹

Es un virus envuelto, cuyo genoma es lineal, no segmentado, con una tira sencilla de RNA y con sentido negativo.^{48,49} Su hélice interna (nucleocápside helicoidal) tiene un peso molecular

de 5000 kilodaltons (KD) y un valor de sedimentación de 50s; posee un diámetro de 13.5 nm, el cual es un valor intermedio entre el tamaño de la hélice correspondiente al virus de la influenza y a aquella de los paramyxovirus más representativos.^{49,54} Bajo microscopía electrónica el virus se observa pleomórfico, con variaciones tanto esféricas como filamentosas, con diámetros que oscilan entre 80 y 500 nm y con longitudes mayores a 2.5 μm ⁴⁹ Su genoma codifica para al menos 10 polipéptidos cuyo peso molecular oscila entre 4.8 y 200 KD; 8 de éstas proteínas son estructurales (F, G, SH, M, M2, N, P Y L) y 2 (NS1 (1C) y NS2 (1B)), no lo son.⁴⁹ La glicoproteína G, que pesa de 70 a 90 KD, funciona mediando la adhesión, por adsorción, del virus a la membrana plasmática de las células blanco⁴⁸ y es considerada análoga a la proteína hemaglutinina-neuraminidasa de otros paramyxovirus.⁶⁸ Con base en las características bioquímicas de la proteína G, se han identificado y caracterizado 2 tipos o grupos de VSR: A, con 6 subgrupos o linajes (SHL1 a SHL6) y B, con 3.^{49,68} Al grupo A se le asocia con cuadros clínicos de mayor severidad, especialmente al subgrupo SHL5.⁶⁸

La proteína F pesa 68 KD y está constituida por 2 polipéptidos unidos por puentes disulfuro; es la responsable de que el virus penetre a la célula pues es una glicoproteína que promueve la fusión de las envolturas virales con la membrana plasmática de la célula afectada; después, la nucleocápside viral es liberada hacia el citoplasma donde se inicia la replicación: el ARN viral sirve como plantilla para el RNA mensajero, el cual a su vez sirve también para el traslado de las proteínas y de la transcripción del ARN del virión.⁴⁹ Las glicoproteínas denominadas F, G y SH constituyen sus principales determinantes antigénicos; son expresadas en la superficie de viriones y en células infectadas.⁴⁸ Las glicoproteínas F y G inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, no tienen actividades hemoaglutinina, ni neuroaminidasa, y provocan la respuesta inmune;^{48,53} generalmente en ellas se basa el diagnóstico viral y son el blanco al que van dirigidas las estrategias para el desarrollo de vacunas, especialmente a la

proteína G.⁶⁸ Las cadenas carbohidratadas de las glicoproteínas F y G parecen ser esenciales para la infectividad del virus ya que el tratamiento con endoglicosidasas específicas o la inhibición de la glicosilación alteran la infectividad viral.⁴⁸

La infección natural con VSRh parece estar limitada a humanos y a chimpancés.⁴⁸ Dada su relación tan estrecha con el VSR bovino, el VSRh ha sido recuperado de brotes epidémicos de bronquiolitis y neumonía en el ganado.⁴⁸ Con base en la reactividad hacia anticuerpos monoclonales, se han reconocido 2 cepas de VSRh: Long (subgrupo A o 1) y cepa 18537 (subgrupo B o 2).^{48,49}

Es un virus termolábil que puede ser inactivado con éter, cloroformo, tripsina al 0.25%, disoxicolato de sodio al 0.1% y por exposición a medios con valores de pH de 3.0 o menores.⁷³ Es particularmente sensible a la congelación y descongelación.^{54,73} El virus no se ha adaptado a la replicación en huevos embrionados.⁵⁴ El VSRh es adsorbido en un 60 – 90% por las células susceptibles en 30 minutos a 37°C y penetra a ellas en 45 minutos; a las 12-16 horas es producido el virus de progenie y de 36 a 48 horas genera 45-150 unidades formadoras de placa por mililitro de medio (UFP/ml).⁷³ Este virus no provoca inhibición del metabolismo celular, pero sí produce efecto citopático (ECP).^{49,73,74}

El VSRh se replica bien en varias líneas celulares humanas, principalmente en células heteroploides tales como HEp-2 y HeLa.^{49,54,75} La presencia del VSRh en las células cultivadas infectadas es detectada por la manifestación de sincicios celulares característicos, también llamados células gigantes multinucleadas, sin embargo, el grado de formaciones sinciciales depende del tipo de células susceptibles utilizadas, del medio de cultivo, de la cepa viral y de su virulencia.⁷⁵

Las células HEp-2 constituyen una línea heteroploide derivada de un carcinoma humano epidérmico proveniente de la laringe.^{76,77} La línea celular HEp-2 fue establecida en 1952 por

Moore, Sabachewsky y Toolan a partir de tumores desarrollados en ratas lactantes, inmunodeprimidas, que recibieron células del carcinoma laríngeo proveniente de un hombre caucásico de 56 años de edad.⁷⁷ El aislamiento *in vitro* fue acompañado de varias soluciones biológicas (fluido amniótico bovino, extractos embrionarios, sueros de humano y caballo, etc.) mezclados con soluciones salinas balanceadas.^{54,77} Las HEP-2 crecen bien en varios medios de cultivo comerciales, especialmente el denominado medio esencial mínimo (MEM).⁵⁴ Es una línea celular muy estable, que resiste variaciones sustanciales nutricionales y ambientales, sin perder viabilidad.⁷⁷ La línea celular HEP-2 permite la replicación de 10-14 arbovirus y de otros virus como el del sarampión; también es susceptible al virus de la polio Tipo 1, al adenovirus Tipo 3 y al virus de la estomatitis vesicular (cepa Indiana).⁷⁷ Ha sido utilizada en estudios experimentales para inducir tumores en ratas, hámsters, ratones, huevos fértiles y en pacientes voluntarios con cáncer terminal.⁷⁷ Fue incluida en el American Type Culture Collection (ATCC) en 1961.⁷⁷

El VSRh también puede afectar a algunas cepas de ratones para laboratorio como la BALB/c, C57BL/6, DBA/2J.^{52,53}

2. JUSTIFICACIÓN.

Comprobar si la propiedad antiviral atribuida a la Melatonina se manifiesta *in vitro* ante el Virus Sincicial Respiratorio humano utilizando como sustrato a las células HEp-2. Dadas las pocas alternativas terapéuticas para prevenir y contrarrestar al VSRh, es necesario seguir buscando opciones. Si bien la ribavirina en aerosol es casi la única opción en los infantes hospitalizados y en pacientes inmunodeprimidos, es un producto caro. Las gammaglobulinas y los anticuerpos monoclonales solo han tenido beneficios marginales. Las vacunas desarrolladas hasta ahora no solo no han sido efectivas, sino en algunas ocasiones, hasta contraproducentes. La melatonina puede ser una alternativa, un complemento con posibilidades terapéuticas, sin aparentes efectos secundarios y accesible para la población.

*Solo hubo algo peor que tu partida
la partida de madre que le diste
a mi rutina,
a mi homeostasis,
a mi vida.
Diciembre del 2001.*

Miguel Ángel Martínez Castillo.

3. OBJETIVO GENERAL.

Conocer el efecto de la Melatonina sobre la actividad replicativa del Virus Sincial Respiratorio humano mediante la técnica de inmunofluorescencia, a través de la infección de células HEp-2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

3.1 Determinar la concentración adecuada de la melatonina * en disolución para esta línea celular.

3.2 Conocer si la melatonina* afecta *in vitro* la capacidad de replicación del VSRh en esta línea celular humana.

3.3 Determinar si la aplicación del tratamiento con melatonina* sobre las células HEp-2 es mejor 24 horas antes de la infección, 24 horas después de la infección o aplicado de manera simultánea a la infección con el VSRh.

* *Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V.*

*Si aún me necesitas dímelo, házmelo saber
porque aunque la corteza cerebral se agite y se entorpezca,
el hipotálamo sigue siendo fiel. . .
por lo menos durante un buen tiempo.*

Miguel Ángel Martínez Castillo.

4. HIPÓTESIS.

La Melatonina administrada exógenamente afecta la actividad replicativa *in vitro* del Virus Sincicial Respiratorio humano sobre células HEP-2.

*Sin importar los títulos profesionales
o los grados académicos obtenidos,
la persona verdaderamente inteligente
es la que disfruta plenamente de la vida.*

Miguel Ángel Martínez Castillo.

5. MATERIAL Y METODOS.

Arrastrado es aquél que piensa que LA DIGNIDAD es el nombre de una cantina.
Miguel Ángel Martínez Castillo.

5.1 OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE LAS CEPAS CELULAR Y VIRAL.

El trabajo realizado fue de carácter prospectivo, comparativo, longitudinal y experimental; tuvo verificativo en el Laboratorio de Inmunoquímica y en el Bioterio del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", así como en el Depto. de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. Las células HEP-2 con las cuales se realizó el experimento fueron donadas por el del Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y correspondieron al pase celular No. 95 (23 de diciembre de 2000). Previamente ya se había preparado el medio específico para estimular el crecimiento del cultivo celular, denominado Medio Esencial Mínimo (MEM)⁷⁸ (Apéndice 1). Posteriormente, MEM fue enriquecido con un 10% de suero fetal bovino y complementado con una mezcla de antibióticos (MEM-1)⁷⁸ (Apéndice 2). El mismo día de adquisición se hizo el pase No. 96 y se sembraron 4 frascos de cultivo (de 25 cm³, de poliestireno, estériles y libres de pirógenos; *Corning Costar Corporation*, Cambridge, MA, U.S.A.). El procedimiento detallado relativo al pase celular puede ser consultado en el Apéndice 3. Estos procedimientos y todos los demás que tuvieron lugar durante el proceso experimental, y que demandaron condiciones de esterilidad y de alta seguridad, fueron realizados dentro de un Flujo Laminar Clase II, Tipo A/B 3. Gabinete de Seguridad Biológica (*NuAire, Inc. U.S.A. Modelo: UN-602-400*). Asimismo, los procesos de incubación requeridos se realizaron utilizando una incubadora *LAB-LINE CO₂ modelo 460*, que permitió exponer a 37°C, a 70% de humedad relativa y con una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂.⁷⁸ La técnica de cultivo celular tuvo que ser aprendida y dominada

progresivamente para posteriormente ejecutar el procedimiento experimental propiamente dicho sin contratiempos técnicos.

5.2 ELABORACIÓN DE UN ENSAYO DE DOSIS EFECTIVA DE MELATONINA PARA LAS CÉLULAS HEP-2.

Para conocer la concentración de la melatonina en solución que se aplicaría como tratamiento dentro del proceso experimental, se realizó un ensayo en el que se evaluó el desarrollo y evolución de las células cultivadas frente a diferentes diluciones de melatonina, para así elegir, de manera fundamentada, la solución final de trabajo.

Dada la alta liposolubilidad de la melatonina, se procedió a disolverla en etanol.⁸⁰ Puesto que el peso molecular de la melatonina corresponde a 232.3 daltons, mediante una balanza analítica (marca: *Sartorius, modelo 2442*) se pesaron 232.3 mg de melatonina (*Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V.*) y se agregó etanol al 70% c.b.p. 1 ml (Solución 1 M). Después se prepararon las diferentes diluciones a partir de esta solución madre:

- a) 100 μ l melatonina 1 M + 10 μ l PBS = 0.91 M
- b) 100 μ l melatonina 1 M + 30 μ l PBS = 0.77 M
- c) 100 μ l melatonina 1 M + 50 μ l PBS = 0.66 M
- d) 100 μ l melatonina 1 M + 70 μ l PBS = 0.59 M

Una vez preparadas las diluciones con diferentes concentraciones de melatonina se esterilizaron mediante un microfiltro de 0.2 μ m de diámetro ("*Minisart NML Sartorius*").

Para realizar el ensayo se trabajó dentro de un gabinete de seguridad y se utilizaron cajas nuevas y estériles de poliestireno especiales para cultivos celulares ("*Cell Wells*", *Corning, New York 14831*, con 24 pozos en total). Se utilizaron 12 pozos. En cada uno se depositó un vidrio esterilizado, de 14 mm de diámetro, que sirvió como superficie base para el cultivo celular. En

cada pozo se sembraron 20 000 células HEp- 2. Las células se suministraron suspendidas en 1 ml de medio MEM-1. Este procedimiento se encuentra descrito en el Apéndice 4.

Después, las células sembradas se incubaron bajo las condiciones ambientales ya descritas (página 18). A las 48 horas, se constató el desarrollo homogéneo de la monocapa celular. Posteriormente se agregaron las diluciones a los pozos de cultivo celular: 3 de ellos recibieron 10 μ l c/u de la dilución al 0.91 M; otros 3 recibieron la misma cantidad pero de la dilución al 0.77 M; otros tantos recibieron nuevamente 10 μ l c/u de la dilución al 0.66 M y los últimos 3 también recibieron la misma cantidad pero de la dilución al 0.59 M.

Se hicieron evaluaciones a las 24 y 48 horas, tanto del desarrollo como de la evolución celular, para elegir la dilución de melatonina que protegiera o, en todo caso, no afectara adversamente al cultivo celular. Con base en observaciones histológicas, mismas que pueden ser consultadas en el Cuadro 1, se consideró que la dilución más adecuada fue aquella al 0.66 M. Cabe mencionar que en la dilución al 0.59 M ya se observó cierto grado de precipitación de la melatonina. Una vez conocida la dilución de melatonina más adecuada (Solución de Trabajo = ST) se procedió a realizar la siguiente fase del experimento.

5.3 MÉTODO DE INFECCIÓN.

Una vez determinada la concentración de la ST se procedió a infectar 2 frascos de cultivo con el VSRh, cepa Long, originalmente donado por el Dr. Víctor Peña, del Children's Hospital Medical Center, de Boston, Mass., Estados Unidos de América, y posteriormente proporcionado por el Laboratorio de Virología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social (alícuota 35, congelada el 11 de octubre de 1999 y mantenida en nitrógeno líquido a -180°C). El procedimiento general fue el siguiente: mediante

observación con microscopio invertido (*Correct Tokio, Seiwa Optical*) se verificó que los frascos de cultivo tuvieran una monocapa celular bien establecida para después aspirar y desechar el medio MEM-1 mediante pipeta Pasteur y sistema de vacío; posteriormente se lavó la monocapa mediante una solución balanceada de fosfatos (PBS) esterilizada y entibiada a 37° C. Después, se infectó la monocapa celular agregando la cepa viral resuspendida en medio MEM-2; se dejó adsorber por 30 minutos y se agregaron 5 ml nuevamente de medio MEM-2. Finalmente, los frascos de cultivo se incubaron a 37°C, bajo una atmósfera de 5% de CO₂. El procedimiento detallado de infección puede consultarse en el Apéndice 5.

Aproximadamente a los 2 días posinfección, las células HEP-2 de algunos campos se mostraron redondeadas y brillantes (refringentes); a los 3 días posinfección se conjuntaron en grupos de 5-7 células ("rosetas") y a los 4 días posinfección se fueron deformando y adquiriendo la apariencia sincicial característica. A los 5 días posinfección se realizó el segundo pase viral.

Pase Viral.

Uno de los frascos de cultivo infectados se congeló a -86° C por 24 horas; después se extrajo y fue expuesto súbitamente a 37° C utilizando un "Baño María" (*Constant Temperature Shaking Bath, YAMATO, Modelo BT-25*); de él se obtuvieron alícuotas de 200 µl para infectar a cada frasco nuevo de cultivo (con monocapa celular bien establecida). Inmediatamente después, se volvió a congelar a -86° C el contenido sobrante del frasco originalmente infectado. Los frascos recién infectados fueron incubados a 37° C, bajo una atmósfera de 5% de CO₂. El procedimiento completo puede consultarse en el Apéndice 6.

Posteriormente, se realizaron otros 4 pases virales.

5.4 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD REPLICATIVA DEL VIRUS SINICIAL RESPIRATORIO EN CELULAS PERMISIVAS HEP-2.

5.4.1 PROCEDIMIENTO GENERAL

Trabajando dentro del gabinete de seguridad, al inicio del trabajo experimental, se utilizaron 6 de las cajas de poliestireno especiales para cultivos celulares ("Cell Wells", Corning, New York 14831) ya descritas. De cada caja se utilizaron 12 pozos, en los cuales se depositaron correspondientes vidrios circulares esterilizados que sirvieron como base para el cultivo de las células. Cada caja constituyó un Grupo Experimental. La organización de los Grupos y la asignación de los Tratamientos fue la siguiente:

Grupo A: céls. HEp-2 + melatonina "Previa" *	+ VSRh	= 12 pozos	= 12 muestras
Grupo B: céls. HEp-2 melatonina "Simultánea" **	+ VSRh	= 12 pozos	= 12 muestras
Grupo C: céls. HEp-2 melatonina "Posterior" ***	+ VSRh	= 12 pozos	= 12 muestras
Grupo D: céls. HEp-2 + VSRh	"Control 1"	= 12 pozos	= 12 muestras
Grupo E: céls. HEp-2 + melatonina	"Control 2"	= 12 pozos	= 12 muestras
Grupo F: solo células HEp-2	"Control 3"	= 12 pozos	= 12 muestras
TOTAL		= 72 pozos	= 72 muestras

* La ST de melatonina se aplicó 24 horas antes de la infección con el VSRh.

** La ST de melatonina se aplicó conjuntamente con la infección con el VSRh.

*** La ST de melatonina se aplicó 24 horas después de la infección con el VSRh.

Tomando como referencia el momento de la infección de las células con el VSRh Long, en general, se realizaron 3 muestreos: a) a las 24 horas, b) a las 72 horas y c) a las 120 horas posinfección.

5.4.2 DESCRIPCIÓN DIARIA DURANTE EL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

DÍA 0

Cada pozo, de los 72 en total, recibió 20 000 células HEp-2 suspendidas en 0.5 ml de medio MEM-1 (Apéndice 2). Después todas las cajas fueron incubadas a 37°C mediante una estufa de cultivo, con atmósfera enriquecida con 5% de CO₂ y manteniendo una humedad relativa del 70%. En el Apéndice 4 se encuentra descrito el procedimiento completo.

DÍA 1

Mediante microscopio invertido se observó y constató el crecimiento celular en los pozos sembrados de cada una de las cajas. A partir de este momento, verificaciones similares se llevaron a cabo cada 24 horas. Todas las muestras se mantuvieron en incubación.

DÍA 2

Mediante pipeta Pasteur estéril y sistema de vacío se retiró el medio MEM-1 de los 12 pozos pertenecientes al Grupo A. Para lavar la monocapa celular, se agregó 1 ml de PBS esterilizado y a 37 °C, mismo que se retiró también con pipeta Pasteur transcurrido un minuto. Se agregaron 10 µl de la ST de melatonina a cada pozo y se permitió la adsorción sobre la superficie celular durante 30 minutos. Finalmente, se agregó 1 ml de medio MEM-1 a cada pozo y nuevamente, toda la caja correspondiente al Grupo A, fue sometida a incubación.

DÍA 3

Se retiró el medio MEM-1 a los pozos de las cajas correspondientes a los Grupos A, B, C y D (48 en total) mediante pipeta Pasteur y sistema de vacío. Para lavar la monocapa celular, a cada pozo se agregó 1 ml de PBS esterilizado y a 37°C, mismo que se retiró también con pipeta Pasteur transcurrido 1 minuto. Se procedió a infectar a la monocapa celular de cada pozo con el VSRh Long con una concentración de 2×10^6 Unidades Formadoras de Placa (UFP)⁷³

contenidas en 50 μ l de suspensión viral. Siempre se utilizó el mismo título viral. En el Apéndice 7 se puede consultar el procedimiento para la titulación del VSRh. Inmediatamente después, a los 12 pozos correspondientes al Grupo B se les agregaron 10 μ l de la ST de melatonina a cada uno. Una vez hechos estos procedimientos, se permitió que el virus en suspensión depositado en los pozos de todos los Grupos (A, B, C y D) tuviera oportunidad de adsorberse a la monocapa celular por un lapso de 30 minutos. Concluido este tiempo, se agregó 1 ml de medio MEM-2 a cada pozo. Después, todas las cajas de cultivo (A, B, C y D) se incubaron bajo las condiciones ya descritas.

Mediante pipeta Pasteur estéril y sistema de vacío se retiró el medio MEM-1 de los 12 pozos pertenecientes al Grupo E. Para lavar la monocapa celular, se agregó 1 ml de PBS esterilizado y a 37 °C, mismo que se retiró también con pipeta Pasteur transcurrido un minuto. Se agregaron 10 μ l de la ST de melatonina a cada pozo y se permitió la adsorción sobre la superficie celular durante 30 minutos. Finalmente, se agregó 1 ml de medio MEM-2 a cada pozo y nuevamente, toda la caja correspondiente al Grupo E, fue sometida a incubación.

DÍA 4

Mediante pipeta Pasteur y sistema de vacío se retiró el medio MEM-2 de los 12 pozos correspondientes al Grupo C. Se agregaron 10 μ l de la ST de melatonina a cada pozo, dejando oportunidad para la adsorción durante 30 minutos; después se agregó 1 ml de medio MEM-2 a cada uno y se incubó nuevamente la caja de cultivo.

Por separado, se retiró el medio de los 20 pozos correspondientes al tiempo de muestreo: 24 horas, de los Grupos A, B, D, E y F (4 de c/u) a través de pipeta Pasteur y sistema de vacío. Para lavar la monocapa celular, se agregó 1 ml de PBS esterilizado y a 4°C, mismo que se retiró también con pipeta Pasteur transcurridos 3 minutos. Cuidadosamente y auxiliándose con pinzas

esterilizadas especiales, se retiraron los vidrios que sirvieron como soporte del cultivo celular en cada uno de los pozos. Cada vidrio fue ubicado dentro de una caja de petri a la cual se le agregaron 5 ml de acetona a 4°C para lograr fijar a las células;⁵⁴ el tiempo de exposición fue de 5 minutos. Después, cada vidrio se colocó en un portaobjetos limpio y fue inmovilizado aplicándole lateralmente cintas adhesivas tipo maskin-tape. Cada portaobjetos con la muestra fue identificado de acuerdo al Grupo o tratamiento y al tiempo de muestreo correspondiente. Finalmente, las muestras fueron organizadas alojándolas en cartulinas rígidas/Grupo, se envolvieron en papel aluminio y se ultracongelaron a -86°C. Las muestras restantes se mantuvieron en incubación.

DÍA 5

Se retiró el medio de cultivo de los 4 pozos del Grupo C, correspondientes al tiempo de muestreo: 24 horas, mediante pipeta Pasteur y sistema de vacío. Siguiendo exactamente el mismo procedimiento aplicado a las muestras del día anterior (DÍA 4), las células fueron fijadas con acetona y los vidrios de soporte se inmovilizaron sobre portaobjetos limpios; se identificaron adecuadamente y se envolvieron en papel aluminio para finalmente ultracongelarlas a -86°C. Las muestras restantes se mantuvieron en incubación.

DÍA 6

Nuevamente, aplicando exactamente el mismo procedimiento del DÍA 4, se retiraron cuidadosamente los vidrios de los pozos de todos los Grupos (A, B, D, E y F), excepto del C, pero ahora correspondientes al tiempo de muestreo: 72 horas (20 en total), para después fijar sus células correspondientes con acetona y ultracongelarlas a -86°C. Las muestras restantes se mantuvieron en incubación.

DÍA 7

De la misma manera en la que se procedió el DÍA 5, se retiraron los 4 vidrios de soporte celular del Grupo C, pero ahora correspondientes al tiempo de muestreo: 72 horas. Las células fueron fijadas mediante la exposición a acetona y después, las muestras adheridas a portaobjetos limpios, fueron envueltas en papel aluminio y ultracongeladas a -86°C . Las muestras restantes se mantuvieron en incubación.

DÍA 8

Otra vez, aplicando exactamente el mismo procedimiento del DÍA 4, se retiraron los vidrios de los pozos de todos los Grupos (A, B, D, E y F), excepto del C, pero ahora correspondientes al tiempo de muestreo: 120 horas (las últimas 20 muestras). Después, las células fueron fijadas con acetona y los vidrios de soporte se inmovilizaron sobre portaobjetos limpios; se identificaron adecuadamente y se envolvieron en papel aluminio para finalmente ultracongelarlas a -86°C .

DÍA 9

Se retiró el medio de cultivo de los últimos 4 pozos del Grupo C, correspondientes al tiempo de muestreo: 120 horas, utilizando pipeta Pasteur y sistema de vacío. El retiro, el lavado, la fijación, la identificación y el resguardo de las muestras se realizó de manera idéntica al procedimiento aplicado el DÍA 4.

DÍA 10

El último día del procedimiento experimental. De las 72 muestras obtenidas (ver Cuadro 2), 3 de cada tiempo de muestreo y de cada Grupo (54 en total) fueron enfrentadas al anticuerpo monoclonal específico acoplado a isotiocianato de fluoresceína, manejando el procedimiento de tinción específico para la técnica de fluorescencia; las 18 restantes (1 de cada tiempo de

muestreo y de cada Grupo) fueron teñidas con Hematoxilina- Eosina (H-E) para realizar evaluaciones histopatológicas.

Se preparó la solución PBS tween (*Kit Comercial VSR, de Chemicon Light Diagnostic*).

Apéndice 8.

Se retiraron las 54 muestras (vidrios circulares que sirvieron de soporte para el crecimiento celular) del ultracongelador (-86°C) y se colocaron “cara arriba” (sitio del crecimiento celular) individualmente en cajas de petri para después lavarlas con PBS tween (5 ml/muestra), durante 5 minutos. Posteriormente se retiró el PBS tween mediante pipeta Pasteur y bomba de vacío y se dejaron secar las muestras al medio ambiente, pero dentro del gabinete de seguridad. Después se agregaron 10 µl del monoclonal específico (bajo penumbra) a cada una de las muestras, para posteriormente incubarlas a 37°C, durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron nuevamente con PBS tween (5 ml/5 minutos); se retiró el PBS tween y las muestras se dejaron secar al medio ambiente. Posteriormente, mediante cintas adhesivas laterales, cada lenteja se inmovilizó sobre un portaobjetos limpio, se identificó correctamente y, por grupos se cubrieron con papel aluminio y se guardaron en un congelador doméstico. (0°C). Todo el procedimiento experimental se encuentra resumido en el Cuadro 3.

5.5 EVALUACIONES MICROSCÓPICAS.

5.5.1 Microscopía de Fluorescencia.

Para determinar el número de células fluorescentes, se utilizó un microscopio para epifluorescencia (*Olympus BH2, Tokio, Japan*). La evaluación se realizó con el objetivo de inmersión (100x) y se anotó el número de células fluorescentes por cada 200 contadas por muestra, sin importar el número de campos necesarios para acumularlas; también se hicieron observaciones citopatológicas. Se valoraron 36 muestras en total en 4 sesiones (9/sesión). Los resultados acumulados aparecen en el Cuadro 4.

Durante las sesiones también se tomaron fotografías utilizando una cámara *Olympus c-35AD-4* y película fotográfica ASA 400 (*Kodak*). El tiempo de exposición por imagen fue de 1 minuto, 25 segundos.

Las muestras más representativas fueron observadas en un microscopio confocal (*Carl Zeiss, Axiovert 100 μ , utilizando el programa de Carl Zeiss LSM 510*). Se obtuvieron imágenes para diapositivas y para realizar impresiones en papel fotográfico.

5.5.2 Microscopía de Luz.

Después de teñir con hematoxilina-cosina (H-E) las 18 muestras obtenidas (una por cada tratamiento y tiempo de muestreo), se observó cada una con el microscopio óptico (*Carl Zeiss Modelo 470801-9099*).

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para validar y demostrar el cumplimiento del supuesto de normalidad, los datos obtenidos relativos al número de células fluorescentes por muestra (Cuadro 4) fueron sometidos a la prueba de Shapiro-Wilks. Después, se analizaron los datos utilizando el siguiente modelo de efectos fijos que incluyó: los efectos tratamiento, tiempo de muestreo y la interacción de primer orden entre estos dos factores:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + M_j + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ijk} = k-ésima respuesta asociada al i-ésimo tratamiento y al j-ésimo tiempo de muestreo.

μ = Media poblacional.

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento (administración de melatonina previa, simultánea y posterior a la infección viral).

M_j = Efecto del j-ésimo tiempo de muestreo (24, 72 y 120 horas posteriores a la infección viral)

e_{ij} = error aleatorio. NIID $(0, \sigma^2)$

Los datos obtenidos fueron procesados mediante el paquete estadístico SAS, utilizando el Procedimiento de Modelos Lineales Generalizado (PROC-GLM).⁷⁹

Posteriormente, para comparar los promedios entre los tratamientos, entre los tiempos de muestreo y en las interacciones: tratamientos * tiempos de muestreo, se utilizaron pruebas de t.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Una de las desventajas de la democracia es tener que escuchar también a los pendejos.
Miguel Ángel Martínez Castillo.

En el Cuadro 4 se indica la cantidad de células fluorescentes por cada 200 células contadas en cada muestra (36 en total) que pertenecen a los grupos experimentales o tratamientos (A, B, C y D) en los que las células fueron infectadas con VSRh. Mediante el análisis de varianza (Cuadro 5) se encontraron diferencias entre los tratamientos ($P = 0.0002$), entre los tiempos de muestreo ($P = 0.0001$) y en la interacción: tratamiento-tiempo de muestreo ($P = 0.0063$). Al comparar entre tratamientos se encontró diferencia ($P = 0.0431$) entre A y B (Cuadro 6 y Figura 1), lo cual indica que sí es diferente aplicar melatonina antes de la infección que de manera simultánea a la infección, y esto concuerda con la mayoría de la literatura consultada la cual recomienda aplicar melatonina en calidad de pretratamiento antes de cualquier desafío.^{39,44,45,46,47,81,82} En este experimento se utilizó una sola variante de tratamiento previo a la infección, pero algunas referencias enfatizan que entre más tiempo de aplicación de melatonina anteceda al reto de infección, mayor capacidad tendrá el individuo^{39,46,47} o las células⁸² para contrarrestar efectos adversos. También se utilizó una sola dosis, en nuestro caso, elegida después de llevar a cabo un ensayo de dosis efectiva de melatonina para esta línea celular humana, pero algunos investigadores reportan efectos diversos al proporcionar diferentes dosis, con diferentes tipos celulares también.^{80,81,83}

No se encontró diferencia ($P = 0.6878$) entre los tratamientos A y C (Cuadro 6), lo que indica aparente intrascendencia en la aplicación de melatonina 24 horas antes ó 24 horas después de la infección con VSRh. A pesar de que varios autores recomiendan, ante un desafío experimental, la aplicación de melatonina como pretratamiento, es importante recordar, como ya se mencionó en la introducción de este trabajo, que la melatonina es un modulador que generalmente inhibe

o regulariza procesos ya iniciados; aparentemente, la melatonina no ejerce una función preventiva, sino correctiva de procesos ya alterados. Por lo tanto, al aplicarse con antelación a la infección viral, aparentemente no confiere ventaja alguna, si se compara con su aplicación posinfección, cuando las células ya están infectadas y experimentando replicación viral. Parece que la melatonina sólo ejerce su efecto una vez iniciado el proceso de infección y no antes. Cabe mencionar que en la literatura en que se argumenta que es mejor proporcionar melatonina como pretratamiento ante un reto experimental (de infección, de intoxicación, de degeneración), varios de sus autores trabajaron con modelos animales, por lo que la respuesta favorable atribuible al suministro de la melatonina puede ser imputable al efecto modulador que esta sustancia ejerce sobre una gran cantidad de procesos biológicos que tienen lugar en un individuo, tales como la liberación de citocinas, la generación de anticuerpos, la secreción de opioides endógenos y otros autacoides, la estimulación de los sistemas inmunitario y hematopoyético, etc.

Sí se encontraron diferencias entre los tratamientos A y D ($P = 0.0037$), entre C y D ($P = 0.0013$) y entre B y D ($P = 0.0001$) (Cuadro 6). Puesto que los tratamientos A, B y C incluyen la administración de melatonina, estos resultados hacen evidente la utilidad de su aplicación en cultivos celulares infectados con VRS_h, pues en ellos se afecta el curso natural de la infección viral en estas células cultivadas.

No hay diferencia ($P = 0.0967$) al comparar los tratamientos B y C. Puesto que sí hay diferencia entre A y B ($P = 0.0431$), pero no entre A y C ($P = 0.6878$), es probable que el tiempo con el que se administró la melatonina posinfección (24 horas) haya sido ya tardío para contrarrestar la infección viral. Esta posibilidad se refuerza si se observa que al comparar las interacciones tratamiento*tiempo: B 24 y C24, sí hay diferencia estadística ($P = 0.0013$), pero al comparar B 72 y C72, ya no la hay ($P = 0.9075$), como tampoco la hay al comparar B 120 y C 120 ($P =$

0.4528), lo cual indica que aunque la melatonina tiene efecto en el tratamiento C, ya que es similar al tratamiento A (comparando únicamente entre tratamientos), no tuvo el tiempo suficiente para contrarrestar la infección viral. Figura 1.

Al comparar solamente entre los tiempos de muestreo, se encontraron diferencias ($P < 0.0078$), lo cual indica que el proceso estudiado se va modificando conforme transcurre el tiempo (Cuadro 6). Evidentemente, la máxima diferencia se encuentra al comparar el tiempo de muestreo 24 horas y el de 120 horas ($P = 0.0001$), en el que el promedio de células fluorescentes se reduce prácticamente a la mitad (39.1666 y 20.5833, respectivamente).

Es importante hacer notar que el tratamiento 2 mostró relativa constancia con respecto al número de células fluorescentes al transcurrir el tiempo (Figura 3), de lo que puede inferirse que la aplicación simultánea de melatonina y VSRh tiene alguna consecuencia en las células. Es probable que la presencia física de la melatonina interfiera de alguna manera la capacidad replicativa del virus, pues es el único tratamiento que manifiesta un menor grado de infección desde el inicio (tiempo de muestreo: 24 horas), por lo que la magnitud de la infección lograda no progresa de la misma manera que aquella manifestada por el tratamiento D (Control 1), en el que las células solo fueron infectadas, sin recibir melatonina. Se sabe que la melatonina es capaz de influir la expresión de moléculas de adhesión de la membrana celular (E-cadherina y beta 1 integrina),⁸² pero ahora también se sabe que la melatonina puede inducir arreglos estructurales en el citoesqueleto, y esta puede ser una probable explicación al fenómeno antes descrito.^{32,82}

Dado que se ha argumentado que la melatonina actúa principalmente a nivel de membrana celular y puesto que el VSRh requiere adherirse a la membrana plasmática de la célula permisiva, puede interpretarse que en general, la melatonina no alteró la capacidad infectiva del VSRh ya que éste se adhirió, se fusionó y liberó su nucleocápside hacia el citoplasma de la

célula permisiva, y la prueba de ello es que en todos los grupos en los que hubo infección con VSR hay fluorescencia y efecto citopático, lo cual al mismo tiempo indica que la melatonina sí puede actuar a nivel citoplasmático y que en los tratamientos en los que ésta se aplicó (A, B y C) sí interfirió de alguna manera la replicación viral, ya que la intensidad de la infección en ninguno de los 3 casos es similar al del tratamiento D, en el que se infectaron las células HEp-2 pero sin recibir melatonina, y esta diferencia se hace más evidente conforme transcurre el tiempo (a las 72 y a las 120 horas). Figuras 3 y 4. Ahora también se sabe que la melatonina puede afectar la expresión del RNAm.⁸³ Esto permite afirmar que la hipótesis planteada para este trabajo sí se cumple pues la melatonina sí interfiere con el proceso replicativo del VSRh que tiene lugar en las células susceptibles. Queda pendiente el conocer el mecanismo específico a través del cual la melatonina logra este efecto, sin embargo, estos resultados justifican investigaciones futuras en modelos animales para aspirar a la posibilidad de utilizar esta hormona en humanos infectados.

7. REFERENCIAS

*Fidelidad
Curiño, si te soy fiel es por dos razones:
"tantito" porque te quiero muchísimo,
y "muchísimo" por miedo al SIDA.
Miguel Ángel Martínez Castillo.*

1. Cassone V, Natesen A. Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *J Biol Rhythms* 1997; 12: 489-497.
2. Dubocovich M. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J* 1988; 2: 2765-2773.
3. Heinze G. La melatonina en psiquiatría. *Gac Méd Méx* 1997; 133 :49-51.
4. Reyes C. La glándula pineal y órganos circunventriculares. En: Zárate A, Morán C, Feria A, Kubli C, compiladores. *Fundamentos de Neuroendocrinología*. México (D.F.): Secretaría de Salud, Fondo de Cultura Económica, 1993: 53-72.
5. Ganong W. *Fisiología Médica*. 18a. ed. México (D.F.): El Manual Moderno, 2002.
6. Ruckebusch Y, Phaneuf L, Dunlop R. *Fisiología de pequeñas y grandes especies*. México (D.F.): El Manual Moderno, 1994.
7. Guardiola B. Toxicology of melatonin. *J Biol Rhythms* 1997; 12: 697-706.
8. Reiter R, Tan D, Poeggeler B, Menéndez A, Chen L, Saarela S. Melatonin is a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann NY Acad Sci* 1994; 719: 1-12.
9. Korf H. The pineal organ as a component of the biological clock: phylogenetic and ontogenetic considerations. *Ann NY Acad Sci* 1994; 719: 13-42.
10. Pierpaoli W. Neuroimmunomodulation of aging. A program in the pineal gland. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 840: 491-497.
11. Vanacek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998; 78: 687-721.

12. Huether G. Melatonin as an antiaging drug: between facts and fantasy. *Gerontology* 1996; 42: 87-96.
13. González M, García S, Calvo J, Goberna R, Guerrero J. High-affinity binding of melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4+). *FASEB J* 1995; 9: 1331-1335.
14. López M, Guerrero J, Sánchez B, Delgado F. Melatonin restores and enhances the human type B tonsillar lymphocyte subset in recurrent acute tonsillitis. *Neurosci Lett* 1998; 247: 131-134.
15. Maestroni G, Conti A, Pierpaoli W. Role of pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate-ergic mechanism. *Clin Exp Immunol* 1987; 68: 384-391.
16. Demas G, Klein S, Nelson R. Reproductive and immune responses to photoperiod and melatonin are linked in *Peromyscus* subspecies. *J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol* 1996; 179: 819-825.
17. Caroleo M, Doria G, Nistico G. Melatonin restores immunodepression in aged and cyclophosphamide-treated mice. *Ann NY Acad Sci* 1994; 719: 343-352.
18. Hofbauer L, Heufelder A. Endocrinology meets immunology: T lymphocytes as novel target for melatonin. *Eur J Endocrinol* 1996; 134: 424-425.
19. Kliger C, Gehad A, Hulet R, Roush W, Lillehoj H, Mashaly M. Effects of photoperiod and melatonin on lymphocyte activities in male broiler chickens. *Poultry Sci* 2000;79:18-25.
20. Morrey K, McLachlan J, Serkin C, Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal hormone. *J Immunol* 1994; 153: 2671-2680.
21. Yen S, Jaffe R. *Reproductive Endocrinology. Physiology, pathophysiology and clinical management*. 3ed ed, Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1991.

22. Humbert W, Pevet P. The decrease of pineal melatonin production with age: causes and consequences. *Ann NY Acad Sci* 1994; 719: 43-63.
23. Pedersen E, McNulty J, Castro A, Fox L, Zimmer J, Finsen B. Enriched immunoenvironment of blood-brain barrier deficient areas of normal adult rats. *J Neuroimmunol* 1997; 76: 117-131.
24. Duker H. *Physiology of domestic animals*. New York: Cornell University Press, 1977.
25. Feria A. Morfología y organización de los elementos centrales del sistema neuroendocrino. En: Zárate A, Morán C, Feria A, Kubli C, compiladores. *Fundamentos de Neuroendocrinología*. México (D.F.): Secretaría de Salud, Fondo de Cultura Económica, 1993: 37-52.
26. Reppert S, Weaver D, Godson C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17: 100-102.
27. Pozo D, Delgado M, Fernández J, Calvo J, Gomariz R, Guerrero J. Expression of the Mel 1a-melatonin receptor mRNA in T and B subset of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J* 1997; 11: 466-473.
28. Guerrero J, Reiter R. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr Res* 1992; 18 : 91-113.
29. Raffi-El-Idrissi, Calvo J, Giordano M, Guerrero J. Specific binding of 2-[super ⁽¹²⁵⁾]iodomelatonin by rat spleen crude membranes: day-night variations and effects of pinealectomy and continuous light exposure. *J Pineal Res* 1996; 20: 33-38.
30. Fraschini F. Melatonin and immunity. *Acta Oncol* 1990; 29: 775-776.
31. Cardinali D, Brusco L, García M, Esquifino A. Effect of melatonin on ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis in submaxillary lymph nodes and spleen of young and aged rats. *Neuroendocrinology* 1998; 67: 349-362.

32. Wöfler A, Liebermann P. Lack of calmodulin antagonism of melatonin in T-lymphocyte activation. *Life Sci* 1998; 63: 835-842.
33. Liu Z, Pang S. [¹²⁵I]iodomelatonin-binding sites in the bursa of Fabricius of birds: binding characteristics, subcellular distribution, diurnal variations and age studies. *J Endocrinol* 1993; 138: 51-57.
34. Maestroni G, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology* 1988; 63: 465-469.
35. Poon A, Liu Z, Tang F, Pang S. Cortisol decreases 2[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the duck's thymus. *Eur J Endocrinol* 1994; 130: 320-324.
36. Wajs E, Kutch E, Gupta D. Melatonin effects proopiomelanocortin gene expression in the immune organs of the rat. *Eur J Endocrinol* 1995; 133: 754-760.
37. Maestroni G, Conti A. The pineal-immuno-opioid network. Mechanisms and significance. *Ann NY Acad Sci* 1992; 650: 56-59.
38. Maestroni G, Conti A, Lissoni P. Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4¹. *Cancer Res* 1994; 54: 4740-4743.
39. Ben-Nathan D, Maestroni G, Lusting S, Conti A. Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis viruses. *Arch Virol* 1995; 140:223-230.
40. Gilad E, Wong H, Zingarelli B, Virág L, O'Connor M, Salzman A, Szabó C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFκB activation. *FASEB J* 1998; 12: 685-693.
41. Mahmoud I, Salman S, Al-Khateeb A. Continuous darkness and continuous light induce structural changes in the rat thymus. *J Anat* 1994; 185: 143-149.

42. Lissoni P, Pittalis S, Rovelli F, Roselli M, Ardizzoia A. Modulation of cytokine production from TH2-lymphocytes and monocytes by the pineal neurohormone melatonin. *Oncol Rep* 1996; 3: 541-543.
43. Finocchiaro L, Nahmod V, Launay J. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem J* 1991; 280: 727-731.
44. Pierpaoli W, Regelson W. *El Milagro de la melatonina*. Barcelona, España. Editorial Urano, 1996.
45. Maestroni GJ. Therapeutic potential of melatonin in immunodeficiency states, viral diseases, and cancer. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467:217-226.
46. Bonilla E, Valero N, Pons H, Chacín L. Melatonin protects mice infected with Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53:430-434.
47. Bonilla E, Rodón C, Valero N, Pons H, Chacín L, García J, Rodríguez Z, Medina S, Añez F. Melatonin prolongs survival of immunodepressed mice infected with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95:207-210.
48. Walter EB. Paramyxovirus. In: Joklik W, Willett H, Amos B, Wilfert C, editors. *Zinsser microbiology*. 20th edition. Norwalk, Connecticut, USA. Appleton and Lange 1992: 999-1002.
49. Breese C. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001; 344:1917-1928.
50. Han L, Alexander J, Anderson L. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. *J Infect Dis* 1999; 179:25-30.
51. Karron R, Singleton R, Bulkow L, Parkinson A, Kruse D, DeSmet I, Indorf C, Peterse K, Leombruno D, Hurlburt D, Santosham M, Harrison L. Severe respiratory syncytial virus disease in Alaska native children. *J Infect Dis* 1999; 180:41-49.

52. Siegrist C, Plotnick H, Córdova M, Berney M, Bonnefoy J, Nguc T, Lambert P, Power U. Protective efficacy against respiratory syncytial virus following murine neonatal immunization with BBG2Na vaccine: influence of adjuvants and maternal antibodies. *J Infect Dis* 1999; 179:1326-1333.
53. Tekkanat K, Maassab H, Berlin A, Lincoln P, Evanoff H, Kaplan M, Lukacs N. Role of interleukin-12 and stat-4 in the regulation of airway inflammation and hyperreactivity in respiratory syncytial virus infection. *Am J Pathol* 2001; 159:631-639.
54. McIntosh K, Clark J. Virus parainfluenza y virus respiratorio. En: Lennette E, Balous A, Hausler W, editores. 3ª edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Pamericana 1992: 1012-1020.
55. Kattan M. Epidemiologic evidence of increased airway reactivity in children with a history of bronchiolitis. *J Pediatr* 1999;135:8-13.
56. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA* 1999; 282:1440-1446.
57. Glezen WP, Greenberg SB, Atmar RL, Piedra PA, Couch RB. Impact of respiratory virus infections on persons with chronic underlying conditions. *JAMA* 2000; 283:499-505.
58. Arnold S, Wang E, Law B, Boucher F, Stephens D, Robinson J. Variable morbidity of respiratory syncytial virus infections in patients with underlying lung disease: a review of the PICNIC RSV database. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18:866-869.
59. Hiatt PW, Grace SC, Kozinetz CA, *et al.* Effect of viral lower respiratory tract infection on lung function in infants with cystic fibrosis. *Pediatrics* 1999; 103:619-626.
60. Ball TM, Castro JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000; 343:538-543.

61. Falsey AR, Walsh EE. Relationship of serum antibody to risk of respiratory syncytial virus infection in elderly adults. *J Infect Dis* 1998; 177:463-466.
62. Walsh EE, Falsey AR, Hennessey PA. Respiratory syncytial and other virus infections in person with chronic cardiopulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:791-795.
63. Whimbey E, Ghosh S. Respiratory syncytial virus infections in immunocompromised adults. *Curr Clin Top Infect Dis* 2000; 20:232-255.
64. Adams R, Christerson J, Petersen F, Beatty P. Preventive use of aerosolized ribavirin in the treatment of asymptomatic pediatric marrow transplant patients testing positive for RSV. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24:661-4.
65. Rodríguez WJ, Gruber WC, Groothuis JR. Respiratory syncytial virus immune globulin treatment of RSV lower respiratory tract infection in previously healthy children. *Pediatrics* 1997; 100:937-942.
66. Dudas RA, Karron RA. Respiratory syncytial virus vaccines. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:430-439.
67. Manjarrez M. Virus sincitial respiratorio y su participación en las infecciones respiratorias agudas. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1991; 4: 161-169.
68. Archundia F, Alejandre J, Cabello C, Rosete D, Manjarrez M. Incorporación de la técnica de RT-PCR para la detección del virus sincitial respiratorio. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2000; 13: 145-152.
69. Murguía T, Casasola J, Rosales S, Nava V, Navarrete S. Brote de infección por virus sincicial respiratorio en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales en la Ciudad de México. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1993; 50: 709-716.
70. Manjarrez M, Thompson O. Aislamiento del virus sincicial respiratorio en niños hospitalizados por infecciones respiratorias agudas. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1992; 5: 28-34.

71. Manjarrez M, Montufar E, Rosete D, Chapela R, Calderón I, Villalba J. Infección en pacientes con inflamación y enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1999; 12: 101-106.
72. Manjarrez M, Rosete D, Navas A, Santiago J, Calderón I, Chapela R. Adenovirus en un grupo de pacientes con infección respiratoria aguda. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2002; 15: 64-68.
73. Casasola VH. Infección de macrófagos alveolares de rata con virus respiratorio sincicial. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM., Edo. de México. 1992.
74. Fenner F, White D. *Medical Virology*. 2th edition. New York, USA. Academic Press. 1976.
75. Peña V, Reiss C, McIntoch K. Effect of respiratory syncytial virus infection on mice with protein malnutrition. *J Med Virol* 1991; 33:219-223.
76. Laboratorio de Microbiología e Inmunología. Diagnóstico viral en fluidos y secreciones. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1989: 7-17 y 27-37.
77. American Type Culture Collection. ATCC cell lines and hybridomas. 8th edition. Parklawn Drive, Rockville, MD. USA. 1994.
78. Bird BR, Forrester FT. *Basic laboratory techniques in cell culture*. Atlanta, Georgia, USA. U.S. Department of Health and HUMAN Services. Center for Disease Control. 1981.
79. SAS. 1990. SAS/STAT^R User's Guide. 4th edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
80. Walters E, Furman C, Fouquet S, Martin F, Lestavel S, Gozzo A, Lesier D, Fruchart J, Duriez P, Teissier E. A high concentration of melatonin inhibits *in vitro* LDL peroxidation but not oxidized LDL toxicity toward cultured endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32: 582-592.

81. Baldwin W, Barrett J. Melatonin attenuates hydrogen peroxide toxicity in MCF7 cells only at pharmacological concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250: 602-605.
82. Cos S, Fernández R, Guezmes A, Sánchez E. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4383-4390.
83. Osborne N, Nash M, Wood J. Melatonin counteracts ischemia-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 2374-2383.

8. Apéndices.

LOS DIEZ MANDAMIENTOS

PRIMERO: "COME BIEN"

*En la medida de lo posible come de lo mejor,
no de lo más caro, sino de lo más nutritivo.*

*Come con mesura, come con paciencia,
porque siempre es grato saborear
el pan que te has ganado.*

*Disfruta siempre la comida y al ingerirla piensa
que ella es la fuente de la cual pende tu vida. . . .*

Apéndice 1. Preparación del Medio Esencial Mínimo (MEM).

1. Pesar mediante balanza analítica (*Marca: Sartorius, Modelo 2442, capacidad 200 g*):
 - 13.5 g de medio MEM en polvo (*Lab. Sigma*)
 - 2 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) (*Lab. Merck*).
 - 2 g de "Hepes" (*Lab. Sigma*). Hepes = $\text{C}_8 \text{H}_{18} \text{N}_2 \text{O}_4 \text{S} = \text{N} - [2\text{-Hydroxyethyl}] \text{ piperazine-N}^+ - [2\text{-ethane sulfonic acid}]$
2. En un matraz Erlenmeyer depositar los ingredientes que fueron pesados y agregar 950 ml de agua desionizada.
3. Agitar para disolver . Utilizar agitador magnético durante 5 minutos.
4. Ajustar el pH a 7.26 mediante hidróxido de sodio (NaOH) 2 M.
5. Aforar a 1 litro mediante agua desionizada y esterilizada.
6. Aplicación de las indicaciones generales.*
7. Esterilizar por filtración mediante equipo específico (*Bellco Glass Inc.*), dotado con filtro de $0.22 \mu\text{m}$; forzar la filtración mediante trampa de vacío. Este procedimiento debe ejecutarse dentro de un gabinete de seguridad (flujo laminar) (*Flujo Laminar Clase II, Tipo A/B3. Gabinete de Seguridad Biológica. NuAire, Inc. Modelo UN-602-400. U.S.A.*).
8. Verificar la esterilidad del medio: tomar una muestra e incubarla por 5 días a 37°C en estufa (*LAB-LINE CO_2 Incubador*) a 70% de humedad relativa y enriquecida con CO_2 al 5%. No debe haber ninguna evidencia de crecimiento microbiológico.

*Indicaciones Generales:

- a) Conectar y encender la lámpara de luz ultravioleta del gabinete de seguridad (flujo laminar) 2 horas antes de comenzar a trabajar.
- b) Encender el gabinete de seguridad media hora antes de trabajar bajo su área estéril.
- c) Limpiar la superficie de trabajo del gabinete de seguridad , primero con torundas y agua potable y después con gasas estériles y alcohol al 70%.

Apéndice 2. Preparación de los medios de cultivo enriquecidos.

Preparar cuidadosamente dentro de un gabinete de seguridad (flujo laminar) y trabajar con material esterilizado.

A. Medio Esencial Mínimo enriquecido con suero fetal bovino y complementado con una mezcla de antibióticos (MEM-1).

1. Aplicar las indicaciones generales*.
2. Mezclar en un frasco ámbar esterilizado las siguientes soluciones:
89 ml de medio MEM
10 ml de Suero Fetal Bovino
01 ml de una mezcla de antibióticos*

* 400 000 UI de Penicilina Sódica Cristalina + 1 g de estreptomicina + c.b.p. 2 ml con agua inyectable.⁵⁴

B. Medio Esencial Mínimo enriquecido con suero fetal bovino (MEM-2).

1. Aplicar las indicaciones generales*.
2. Mezclar en un frasco ámbar esterilizado las siguientes soluciones:
98 ml de medio MEM
02 ml de Suero Fetal Bovino.⁵⁴

***Indicaciones Generales:**

- a) Conectar y encender la lámpara de luz ultravioleta del gabinete de seguridad (flujo laminar) 2 horas antes de comenzar a trabajar.
- b) Encender el gabinete de seguridad media hora antes de trabajar bajo su área estéril.
- c) Limpiar la superficie de trabajo del gabinete de seguridad , primero con torundas y agua potable y después con gasas estériles y alcohol al 70%.

Apéndice 3. Pase Celular.

1. Aplicar las indicaciones generales *.
2. Retirar el medio del frasco de cultivo mediante pipeta pasteur y trampa de vacío.
3. Agregar 2 ml de PBS (a 37°C) al frasco de cultivo para lavar y desprender los residuos y células muertas. Tiempo de exposición: 1 minuto.
4. Retirar el PBS mediante pipeta pasteur y trampa de vacío.
5. Agregar 200 µl de tripsina (*Lab. Gibbco*) al 10% y exponer a ella durante 2 minutos, permitiendo que entre en contacto con toda la monocapa celular deladeando lenta y rítmicamente el frasco de cultivo.
6. Retirar la tripsina con pipeta pasteur y trampa de vacío. Dejar actuar por 2-3 minutos hasta que sea evidente el comienzo del desprendimiento celular.
7. Golpear enérgicamente en forma manual el frasco de cultivo para acelerar el desprendimiento celular.
8. Agregar 3 ml de medio MEM-1 y hacer disgregaciones celulares (a manera de "lavados") mediante una jeringa de 5 ml y aguja estériles. Ejecutar como mínimo 12 disgregaciones.
9. Pasar 1 ml de la solución disgregada a cada frasco nuevo de cultivo; depositar lentamente en sobre la superficie de crecimiento.
10. Agregar 4 ml de medio MEM-1 a cada frasco de cultivo nuevo.
11. Identificar correctamente cada frasco de cultivo: anotar la cepa celular específica, el número de pase realizado y la fecha.
12. Incubar a 37°C en estufa de cultivo, a 70 % de humedad relativa y con atmósfera enriquecida con 5% de CO₂.

*Indicaciones Generales:

- a) Conectar y encender la lámpara de luz ultravioleta del gabinete de seguridad (flujo laminar) 2 horas antes de comenzar a trabajar.
- b) Encender el gabinete de seguridad media hora antes de trabajar bajo su área estéril.
- c) Limpiar la superficie de trabajo del gabinete de seguridad, primero con torundas y agua potable y después con gasas estériles y alcohol al 70%.

Apéndice 4. Método utilizado para la siembra de células HEP-2 en pozos de cultivo.^{76,78}

1. Aplicar las indicaciones generales*.
2. Para desprender las células de los frascos de cultivo se aplicó parte de la técnica descrita en el Apéndice 2.
3. Una vez que las células fueron resuspendidas, se procedió a determinar su concentración mediante una cámara de Neubauer:
 - 20 μ l de suspensión celular + 80 μ l de solución de azul tripán al 5%
 - depositar esta solución en la cámara previamente preparada, hasta saturarla
 - observación mediante microscopio óptico
 - contabilizar las células viables en los 4 recuadros extremos mayores (4 de 9) de la superficie de la cámara.
 - obtener el promedio
 - aplicar la siguiente fórmula:
Concentración Celular/ml = promedio celular X proporción de dilución X volumen en ml X factor de dilución de la cámara.

4. Para este efecto la concentración final fue: 3.65×10^6 células/ml.

5. Si se desean sembrar 20000 células/lenteja, con un volumen final de 40 μ l, entonces
- $$\begin{array}{r} 20000 \text{ células} \text{ ----- } 40 \mu\text{l} \\ 3.65 \times 10^6 \text{ células} \text{ ----- } X \\ X = 7300 \mu\text{l} = 7.3 \text{ ml} \end{array}$$

Por lo tanto, la suspensión celular original (20 μ l + 80 μ l) se diluyó, agregando medio MEM al 10% de SFB para aforar a 7.3 ml

$$\begin{array}{r} 7300 \mu\text{l} \text{ ----- } 3.65 \times 10^6 \text{ células} \\ 40 \mu\text{l} \text{ ----- } X \\ X = 20000 \text{ células} \end{array}$$

*Indicaciones Generales:

- a) Conectar y encender la lámpara de luz ultravioleta del gabinete de seguridad (flujo laminar) 2 horas antes de comenzar a trabajar.
- b) Encender el gabinete de seguridad media hora antes de trabajar bajo su área estéril.
- c) Limpiar la superficie de trabajo del gabinete de seguridad, primero con torundas y agua potable y después con gasas estériles y alcohol al 70%.

Apéndice 5. Método de infección de las células HEp-2.

Trabajar siempre dentro de un gabinete de seguridad (flujo laminar).

1. Aplicar las indicaciones generales*.
2. Aspirar y desechar el medio mediante pipeta pasteur y sistema de vacío.
3. Lavar la monocapa celular utilizando 2 ml de PBS tibio (37°C) para así eliminar desechos celulares y suero propio del medio.
4. Infectar la monocapa celular agregando 500 µl de la cepa viral (alícuota) resuspendida en medio MEM-2.
5. Dejar adsorber durante 30 minutos, a 35°C.
6. Agregar 5 ml de medio MEM-2.
7. Incubar a 37°C, con 70% de humedad relativa y con atmósfera enriquecida con 5% de CO₂.
8. Observar al microscopio invertido los frascos de cultivo cada 24 horas para apreciar los cambios celulares.

***Indicaciones Generales:**

- a) Conectar y encender la lámpara de luz ultravioleta del gabinete de seguridad (flujo laminar) 2 horas antes de comenzar a trabajar.
- b) Encender el gabinete de seguridad media hora antes de trabajar bajo su área estéril.
- c) Limpiar la superficie de trabajo del gabinete de seguridad, primero con torundas y agua potable y después con gasas estériles y alcohol al 70%.

Apéndice 6. Pase Viral. Trabajar siempre dentro de un gabinete de seguridad (flujo laminar).

1. Aplicar las indicaciones generales*.
2. Congelar a $-86^{\circ}\text{C}/24$ horas los frascos de cultivo infectados, mediante un ultracongelador (*Form Scientific Inc, modelo 916*).
3. Extraer los frascos del ultracongelador y exponerlos súbitamente a 37°C utilizando un "Baño María" para descongelar su contenido y provocar la ruptura celular, liberando así al virus.
4. Tomar alícuotas de $200\ \mu\text{l}$ e infectar cada frasco de cultivo. Inmediatamente después, volver a congelar a -86°C el contenido sobrante en el frasco de cultivo original.
5. Incubar los frascos de cultivo recién infectados a 37°C , con 70% de humedad relativa y con atmósfera enriquecida con 5% de CO_2 .
6. Observar al microscopio invertido los frascos de cultivo cada 24 horas para apreciar los cambios celulares.

***Indicaciones Generales:**

- a) Conectar y encender la lámpara de luz ultravioleta del gabinete de seguridad (flujo laminar) 2 horas antes de comenzar a trabajar.
- b) Encender el gabinete de seguridad media hora antes de trabajar bajo su área estéril.
- c) Limpiar la superficie de trabajo del gabinete de seguridad, primero con torundas y agua potable y después con gasas estériles y alcohol al 70% .

Apéndice 7. Titulación del VSRh por el método *OVER LAYER*.⁷⁵

1. Preparar placas *Falcon* de 24 pozos con monocapas confluentes de células HEP-2 (48 horas después de sembradas).
2. Preparar, en tubos estériles de 5 ml, diluciones seriadas 1:10 de la suspensión viral en medio Leibovits L-15 (*Microlab*).
3. Tomar 300 μ l de cada solución e infectar 3 pozos con 100 μ l c/u (por triplicado).
4. Dejar adsorber durante 90 minutos.
5. Agregar a cada pozo 1 ml de solución de Metil-Celulosa al 0.5% en medio Leibovitz L-15.
6. Incubar a 35°C, con 70% de humedad relativa y con atmósfera enriquecida con 5% de CO₂, hasta observar el ECP (4-5 días).
7. Lavar cada pozo con 2 ml de PBS tibio estéril; retirar el PBS por aspiración y eliminar. Repetir otras 3 veces.
8. Fijar las células con formaldehído al 10% durante 60 minutos; después, lavar nuevamente con 2 ml de PBS y retirarlo. Repetir 2 veces más.
9. Teñir con hematoxilina durante 3 minutos; lavar y desprender el colorante excedente utilizando PBS hasta por 5 ocasiones.
10. Calcular el título viral de la siguiente manera: número de placas/pozo X 10 X factor de dilución = 20 placas X 10⁵ = 2 X 10⁶.

Apéndice 8. Exposición de las muestras al Anticuerpo Monoclonal Específico (Kit Comercial).

Trabajar dentro de un Gabinete de Seguridad con material esterilizado.

1. Aplicar las indicaciones generales*.
2. Preparación del PBS tween:
 - a) Disolver el contenido del sobre de la sal de PBS proporcionada en el kit en 950 ml de agua destilada.
 - b) Agregar el Tween 20/Ácido de Sodio 100X concentrado (10 ml) a la solución de PBS y mezclar vigorosamente.
 - c) Aforar a 1 litro con agua destilada e identificarlo adecuadamente.
3. Retirar las muestras del ultracongelador (-86°C).
4. Colocar cada muestra "cara arriba" (sitio de crecimiento celular) dentro de una caja de petri.
5. Agregar 5 ml/muestra de PBS tween frío (a 4°C).
6. Cinco minutos después, retirar el PBS tween con pipeta pasteur y bomba de vacío.
7. Dejar secar las muestras al medio ambiente, pero dentro del gabinete de seguridad.
8. Agregar 10 µl del anticuerpo monoclonal específico, sin luz pero dentro del área estéril del gabinete de seguridad (bajo penumbra).
9. Incubar a 37°C, con 70% de humedad relativa y con atmósfera enriquecida con 5% de CO₂, durante 30 minutos.
10. Lavar cada muestra nuevamente con 5 ml c/u con PBS tween.
11. Cinco minutos después, retirar el PBS tween con pipeta pasteur y bomba de vacío.
12. Dejar secar las muestras dentro del área estéril del gabinete de seguridad.
13. Con cintas adhesivas, fijar cada muestra a portaobjetos limpios; identificar correctamente y guardar en plantillas de papel cartulina, agrupando por tiempos de muestreo y después, envolver con papel aluminio; finalmente, guardar en ultracongelación a -86°C.

*Indicaciones Generales:

- a) Conectar y encender la lámpara de luz ultravioleta del gabinete de seguridad (flujo laminar) 2 horas antes de comenzar a trabajar.
- b) Encender el gabinete de seguridad media hora antes de trabajar bajo su área estéril.
- c) Limpiar la superficie de trabajo del gabinete de seguridad, primero con torundas y agua potable y después con gasas estériles y alcohol al 70%.

9. Cuadros.

SEGUNDO: "DUERME BIEN"

*Duerme y disfruta el estar en el lecho,
y acércate a él
solo cuando tus sueños tengan hambre de jugar entre ellos,
solo cuando tus manos hayan sido saturadas de trabajo,
solo cuando sientas que las fuerzas se te acaban,
porque solo se descansa cuando se está cansado.
Nunca duermas por hacerlo,
nunca duermas por horario,
ni por ciclo circadiano. . . .*

Cuadro 1. Evaluación del impacto de la melatonina diluida (diferentes concentraciones) sobre el desarrollo de células HEP-2

Concentración de Melatonina	de	Tiempo	Observaciones relativas al desarrollo celular. Objetivos: 4 y 10.
0.91 M		24 horas	Céls. Poliédricas; relación: citoplasma-núcleo = normal. Núcleo basófilo. Citoplasma basófilo.
0.91 M		48 horas	Igual a la anterior.
0.77 M		24 horas	Bitintorialidad: núcleo basófilo, citoplasma acidófilo. Forma celular regular.
0.77 M		48 horas	Núcleo fuertemente basófilo; citoplasma fuertemente acidófilo. Poca actividad celular.
0.66 M		24 horas	Céls. Poliédricas. Núcleos basófilos. Citoplasmas ligeramente basófilos.
0.66 M		48 horas	Céls. Fusiformes. Núcleos basófilos y ovalados. Citoplasmas basófilos. Poca actividad celular.
0.59 M		24 horas	Céls. Poliédricas. Alta unión intercelular.. Núcleos débilmente basófilos.
0.59 M		48 horas	Buena unión intercelular. Citoplasma intensamente acidófilo; núcleo débilmente basófilo.

TESE
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2. Planteamiento general del procedimiento experimental.

Tiempo de Muestreo en horas	Grupo A "Previo" HEp-2 + Melatonina previa + VSR	Grupo B "Simultáneo" HEp-2 + Melatonina simultánea + VSR	Grupo C "Posterior" HEp-2 + VSR + Melatonina 24 h después	Grupo D Control 1 HEp-2 + VSR	Grupo E Control 2 HEp-2 + Melatonina	Grupo F Control 3 Solamente HEp-2
24	4 muestras	4 muestras	4 muestras	4 muestras	4 muestras	4 muestras
72	4 muestras	4 muestras	4 muestras	4 muestras	4 muestras	4 muestras
120	4 muestras	4 muestras	4 muestras	4 muestras	4 muestras	4 muestras
Total	12 muestras	12 muestras	12 muestras	12 muestras	12 muestras	12 muestras

Notas:

- *Tres muestras de cada tiempo de muestreo y de cada grupo experimental (36 en total) fueron sometidas a la técnica de inmunofluorescencia.*
- *Una muestra de cada tiempo de muestreo y de cada grupo experimental (18 en total) fue teñida con H-E.*

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Cuadro 3. Cronograma del desarrollo experimental.

Día 0	Se sembraron 72 pozos (6 cajas de 12), c/u con 20 000 células HEp-2 contenidas en 0.5 ml de MEM-1. Después, se incubaron todas las muestras.
Día 1	Se observó y constató el desarrollo celular en los pozos sembrados. En general, verificaciones similares se ejecutaron c/24 horas. Las muestras se mantuvieron en incubación.
Día 2	Se agregaron 10 µl de ST de melatonina a cada pozo del Grupo A. Se agregó 1 ml de medio MEM-1 a cada pozo y después se volvieron a incubar.
Día 3	Cada pozo de los Grupos A, B, C y D se infectaron con VSR Long con una concentración de 2×10^6 UFP contenidas en 50 µl de suspensión viral. Simultáneamente se agregaron 10 µl de la DT a cada pozo del Grupo B. El virus en suspensión se dejó adsorber sobre la monocapa celular durante 30 minutos y después se agregó 1 ml de MEM-2 a c/pozo. Finalmente, todas las muestras se sometieron a incubación. Se agregaron 10 µl de la DT a cada pozo del Grupo E. Se agregó 1 ml de medio MEM-2 a cada pozo y después se volvieron a incubar.
Día 4	Se agregaron 10 µl de ST a cada pozo del Grupo C. Se agregó 1 ml de medio MEM-2 a cada pozo y se volvieron a incubar. Se retiraron los vidrios de los pozos de todos los grupos (A, B, D, E y F), excepto del C, correspondientes al tiempo de muestreo: 24 horas, para después fijar sus células con acetona y congelarlas a -86°C . Las muestras restantes se mantuvieron en incubación.
Día 5	Se retiraron los vidrios de los pozos del Grupo C correspondientes al tiempo de muestreo: 24 horas, para después fijar sus células con acetona y se congelarlas a -86°C . Las muestras restantes se mantuvieron en incubación.
Día 6	Se retiraron los vidrios de los pozos de todos los Grupos (A, B, D, E y F), excepto del C, correspondientes al tiempo de muestreo: 72 horas, para después fijar sus células con acetona y se congelarlas a -86°C . Las muestras restantes se mantuvieron en incubación.
Día 7	Se retiraron los vidrios de los pozos del Grupo C correspondientes al tiempo de muestreo: 72 horas, para después fijar sus células con acetona y se congelarlas a -86°C . Las muestras restantes se mantuvieron en incubación.
Día 8	Se retiraron los vidrios de los pozos de todos los Grupos (A, B, D, E y F), excepto del C, correspondientes al tiempo de muestreo: 120 horas, para después fijar sus células con acetona y se congelarlas a -86°C .
Día 9	Se retiraron los vidrios de los pozos del Grupo C correspondientes al tiempo de muestreo: 120 horas, para después fijar sus células con acetona y se congelarlas a -86°C .
Día 10	Preparación de la Solución PBS tween. Sometimiento de todas las muestras al anticuerpo monoclonal comercial específico (<i>Kit VSR, Chemicon Light Diagnostic, Chemicon International, Inc. Respiratory Syncytial Virus. DFA. Cat. No. 3125 *</i>).

* Este kit utiliza la técnica directa de anticuerpos fluorescentes para la identificación del VSR. Los anticuerpos monoclonales son marcados mediante isotiocianato con fluoresceína (FITC) y manifestarán fluorescencia de color verde manzana cuando se ilumina la muestra con luz ultravioleta.

FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4. Cuadro de Resultados en el que se indica la cantidad de células fluorescentes por cada 200 células contadas en cada una de las muestras que forman parte de los grupos experimentales en los que las células fueron infectadas con VSR.

<i>Tiempo de muestreo en horas</i>	<i>Grupo A "Previo": HEp-2 + Melatonina 24 hrs. Preinfección + VSR</i>	<i>Grupo B "Simultáneo": HEp-2 + Melatonina simultánea con VSR</i>	<i>Grupo C "Posterior": HEp-2 + Melatonina 24 hrs. después</i>	<i>Grupo D Control 1: HEp-2 + VSR</i>	<i>Grupo E Control 2: HEp-2 + Melatonina</i>	<i>Grupo F Control 3: Únicamente HEp-2</i>
24 muestra 1	55	17	28	36	No aplica	No aplica
24 muestra 2	49	26	46	52	No aplica	No aplica
24 muestra 3	42	21	52	46	No aplica	No aplica
72 muestra 1	28	21	18	32	No aplica	No aplica
72 muestra 2	34	32	36	48	No aplica	No aplica
72 muestra 3	19	28	29	46	No aplica	No aplica
120 muestra 1	10	18	12	29	No aplica	No aplica
120 muestra 2	17	22	19	38	No aplica	No aplica
120 muestra 3	13	19	15	35	No aplica	No aplica

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 5. Análisis de Varianza para el número de células fluorescentes.

Fuente de Variación	de Grados de Libertad	de Suma de Cuadrados	de Cuadrado de la Media	de Valor de F	de Pr > F
Tiempo de Muestreo	2	2080.72222	1040.36111	21.51	0.0001
Tratamiento	3	1448.66667	482.88889	9.99	0.0002
Tiempo de Muestreo* Tratamiento	6	1166.16667	194.36111	4.02	0.0063
Error	24	1160.66667	48.36111		
Total	35	5856.22222			

R- Cuadrada	de Coeficiente de variación	de Raíz ² del Cuadrado Medio del error	Promedio del número de células
0.801806	23.01027	6.95422	30.2222

Tiempo de Muestreo
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 6. Promedio de células fluorescentes por tratamiento, por tiempo de muestreo y por la interacción: tratamiento*tiempo de muestreo.

Fuente de Variación	Media \pm Desviación Estándar
Tratamiento: Melatonina preinfección (A)	29.6666 \pm 16.3095 ^b
Melatonina simultánea a la infección (B)	22.6666 \pm 5.0000 ^c
Melatonina posinfección (C)	28.3333 \pm 14.0089 ^{b,c}
Sin Melatonina (D)	40.2222 \pm 7.9807 ^a
Tiempo de Muestreo: 24 horas	39.1666 \pm 13.1690 ^a
72 horas	30.9166 \pm 9.4624 ^b
120 horas	20.5833 \pm 8.9590 ^c
Interacción: A * 24 horas	48.6666 \pm 6.5064 ^{a,c,d,h}
B * 24 horas	21.3333 \pm 4.5092 ^{b,e,f,g,i,j,k}
C * 24 horas	42.0000 \pm 12.4899 ^{a,c,d,h}
D * 24 horas	44.6666 \pm 8.0829 ^{a,c,d,h}
A * 72 horas	27.0000 \pm 7.5498 ^{b,e,f,g,j,k,l}
B * 72 horas	27.0000 \pm 5.5677 ^{b,c,f,g,j,k,l}
C * 72 horas	27.6666 \pm 9.0737 ^{b,e,f,g,j,l}
D * 72 horas	42.0000 \pm 8.7177 ^{a,c,d,h}
A * 120 horas	13.3333 \pm 3.5118 ⁱ
B * 120 horas	19.6666 \pm 2.0816 ^j
C * 120 horas	15.3333 \pm 3.5118 ^k
D * 120 horas	34.0000 \pm 4.5825 ^l

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.0431$).

TEMA (C)
FALLA DE ORIGEN

10. Figuras.

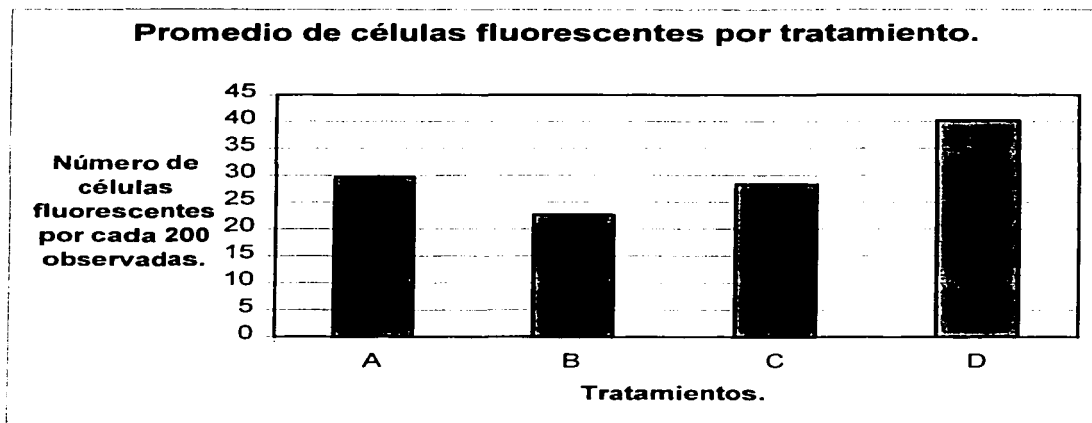
TERCERO: "HAZ EL AMOR MUY BIEN"
*Haz el amor solo con quien amor te inspire.
 Haz el amor solo cuando el amor te guíe.
 Haz el amor con sinceridad y no como deporte.*

*Y no juegue con el amor
 pues terminarás por construir
 castillos de hielo,
 sobre falacias erigir;
 no juegues al amor pues
 no solo es infructuoso
 sino a la larga agotador*

*Haz el amor
 con un poco de arrebato
 pero también con serenidad,
 con un poco de locura
 pero también con sensatez,
 siempre con mucha imaginación
 pero atada bien la piel,
 porque al fin y al cabo
 el amor es solo esencia
 y al mundo lo construyes tú. . . .*

TEORÍA DEL
 FALLA DE ORIGEN

Figura 1.



A = Melatonina preinfección

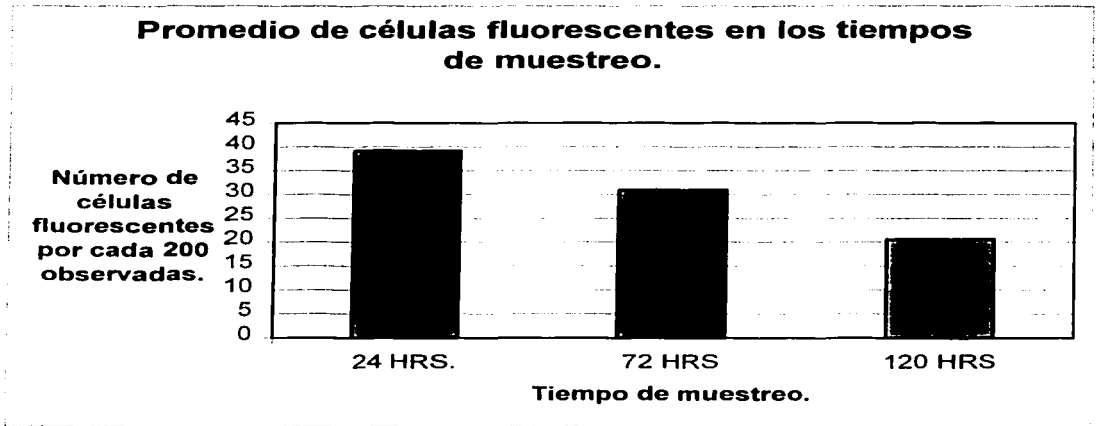
B = Melatonina simultánea a la infección.

C = Melatonina posinfección

D = Sin Melatonina.

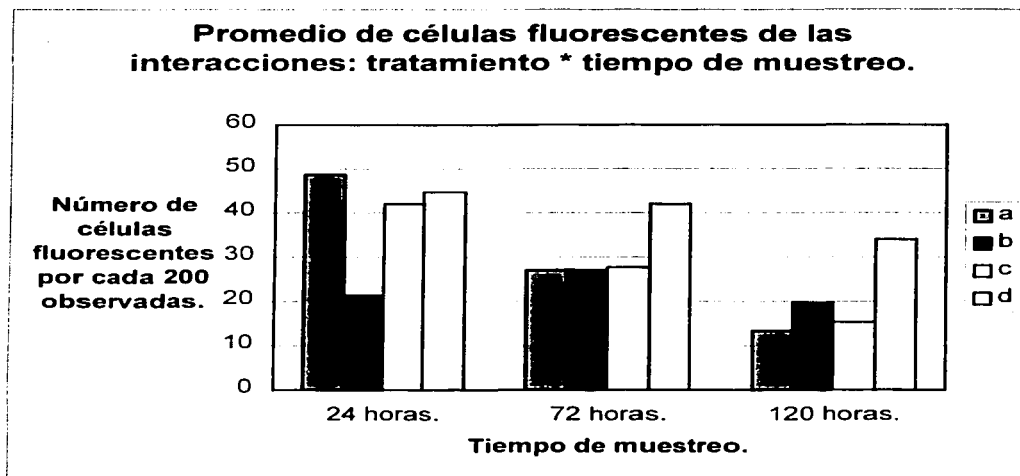
TEL. 02
FALLA DE ORIGEN

Figura 2.



TEMPERATURA
FALLA DE ORIGEN

Figura 3.



a = Melatonina preinfección.

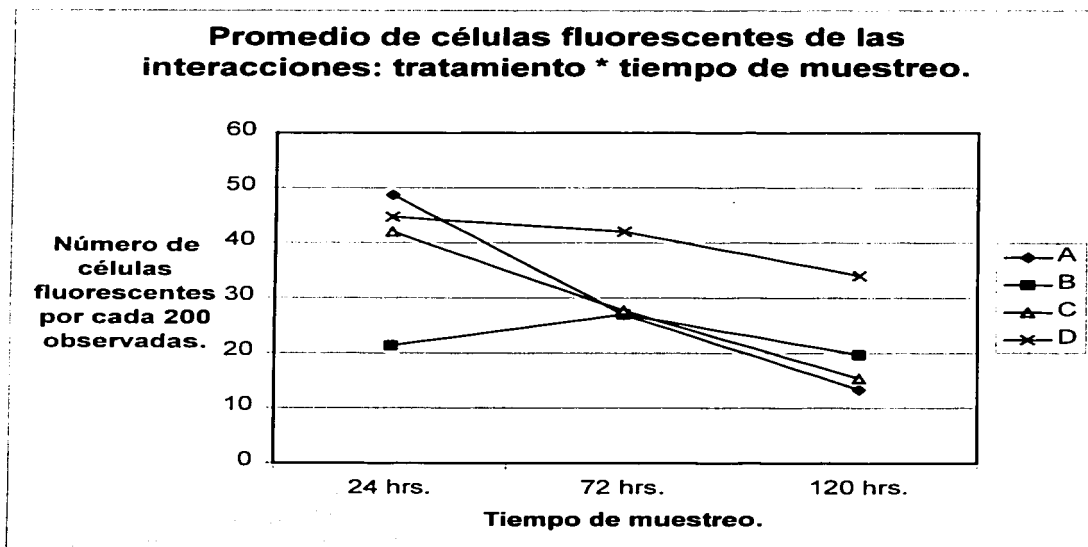
b = Melatonina simultánea a la infección

c = Melatonina posinfección

d = Sin Melatonina

Tesis de
FALLA DE ORIGEN

Figura 4.



A = Melatonina preinfección

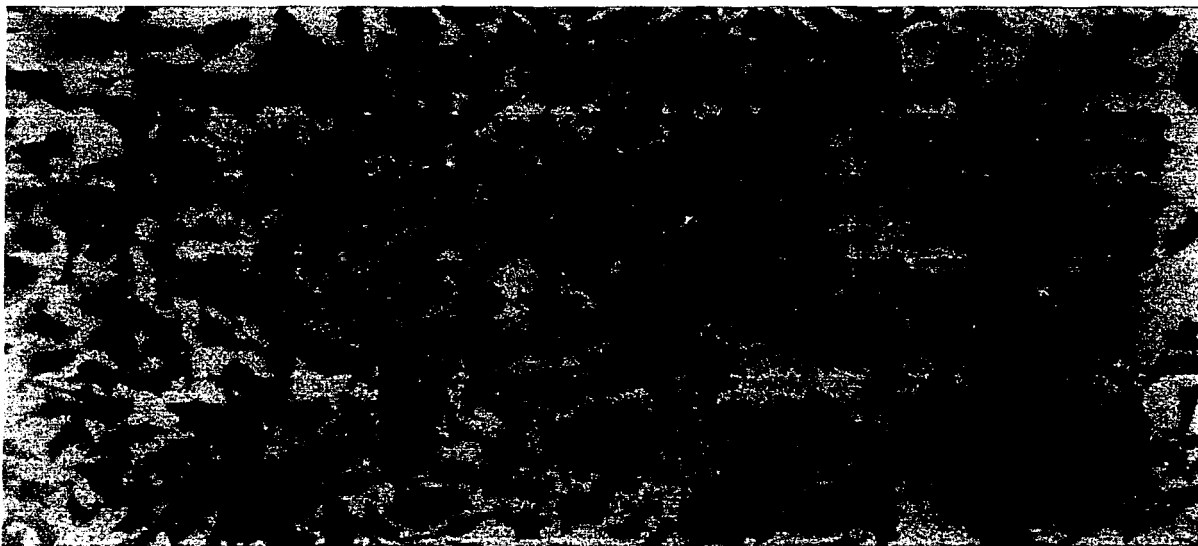
B = Melatonina simultánea a la infección

C = Melatonina posinfección

D = Sin Melatonina

FALLA DE ORIGEN

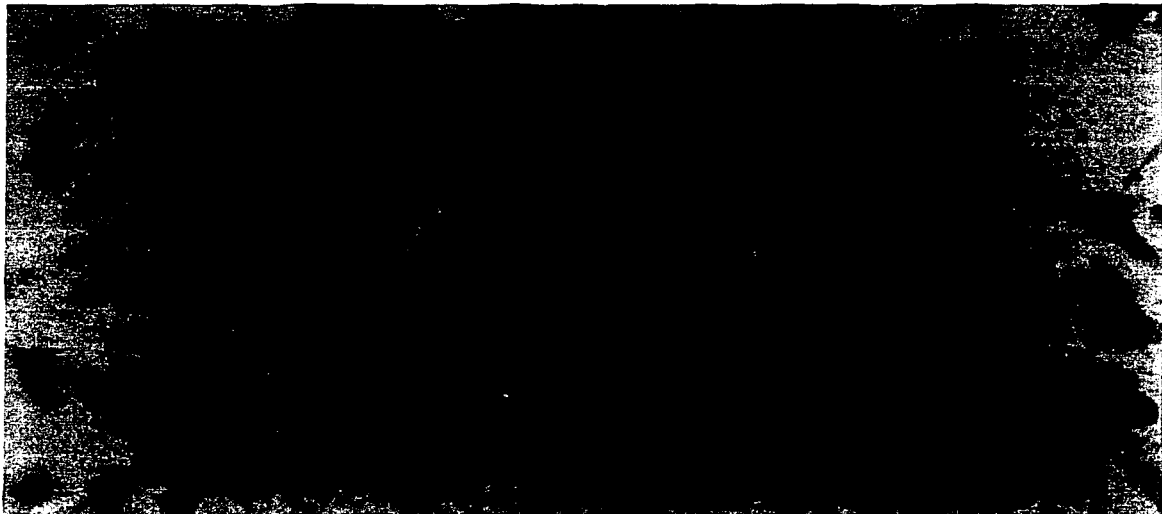
Figura 5.



*Células HEp-2 48 horas después de la exposición a una solución de etanol con melatonina
al 0.66 M. Tinción: H-E. Objetivo: 10x.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6.



Células HEP-2 48 horas después de la exposición a una solución de etanol con melatonina al 0.66 M. Tinción: H-E. Objetivo: 20x. Se observan los nucleolos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

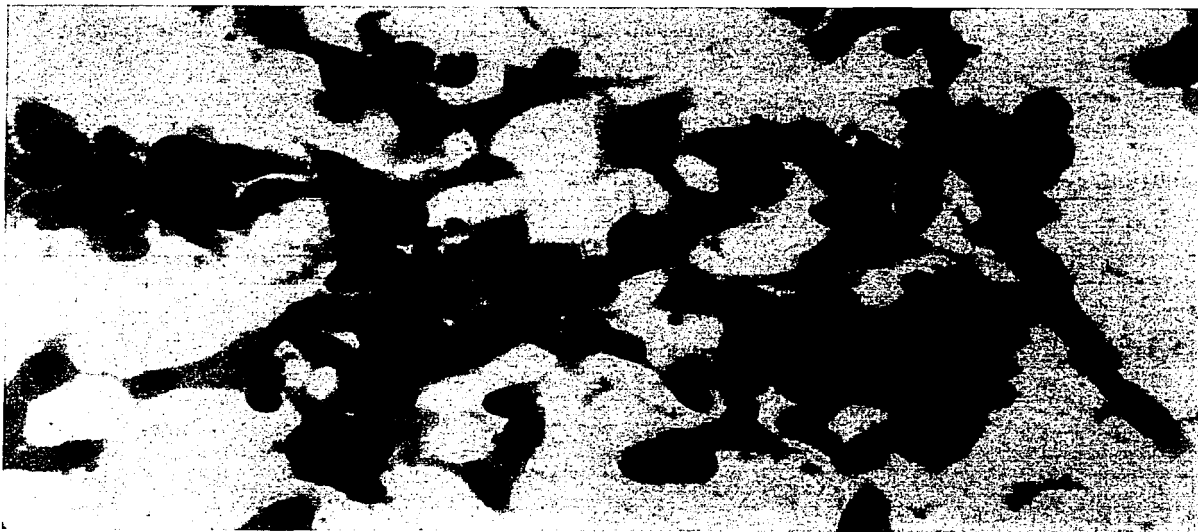
Figura 7.



Células HEp-2 48 horas después de la exposición a una solución de etanol con melatonina al 0.77 M. Tinción: H-E. Objetivo: 10x. Se observan núcleos intensamente basófilos.

TESIS DE
FALLA DE ORIGEN

Figura 8.

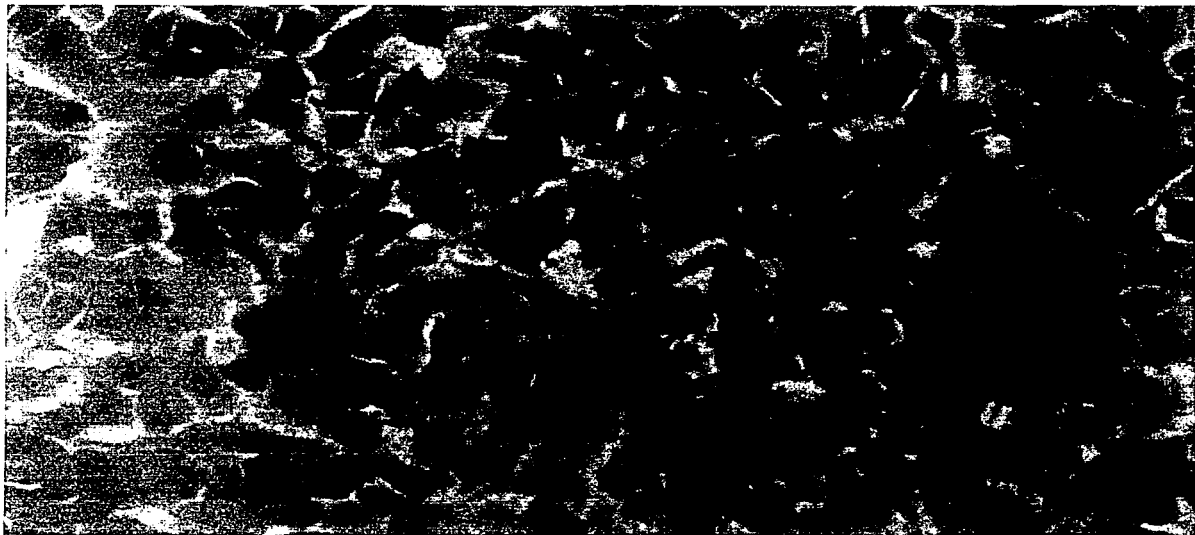


Células HEp-2 48 horas después de la exposición a una solución de etanol con melatonina al 0.77 M. Tinción: H-E. Objetivo: 20x.

TESIS COMPLETA
FALLA DE ORIGEN

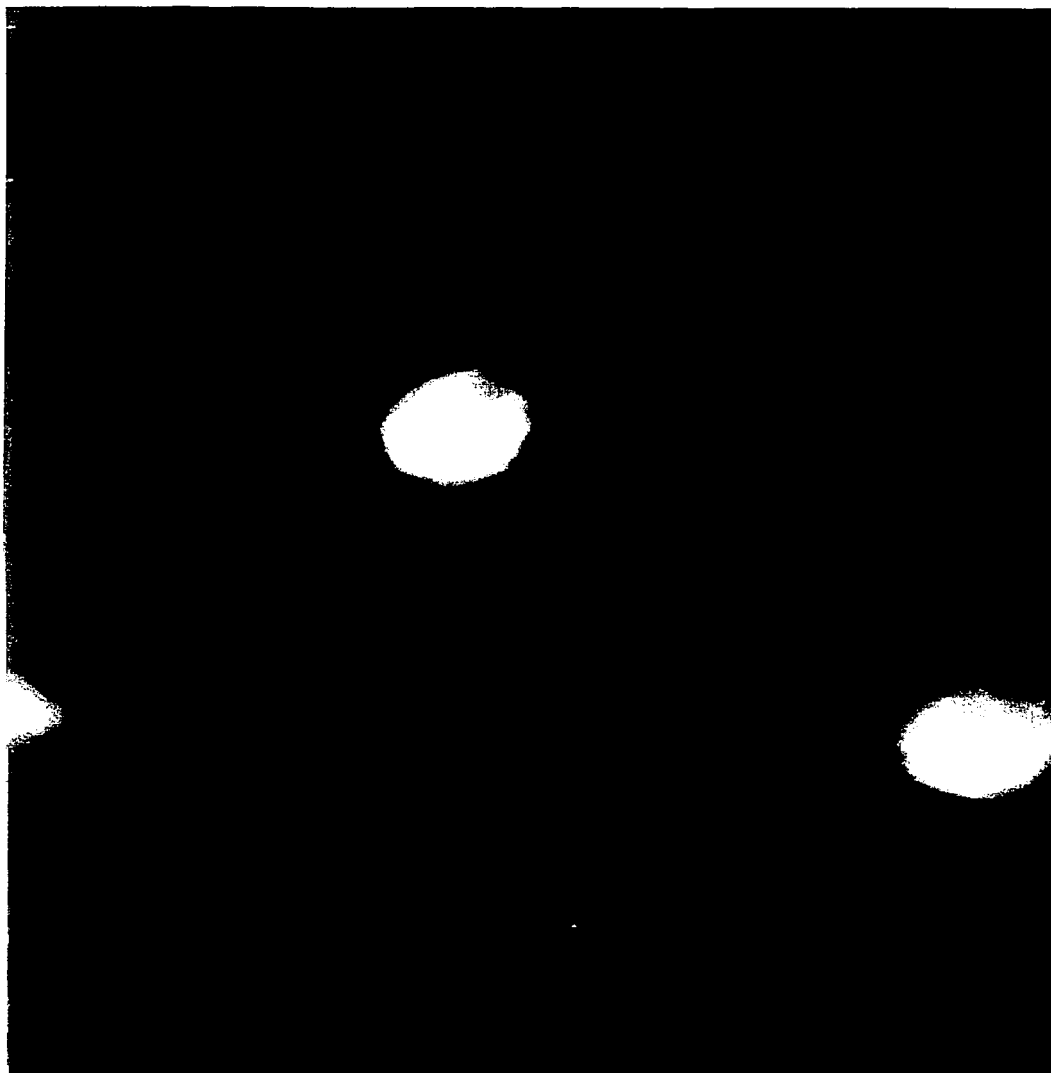
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Figura 9.



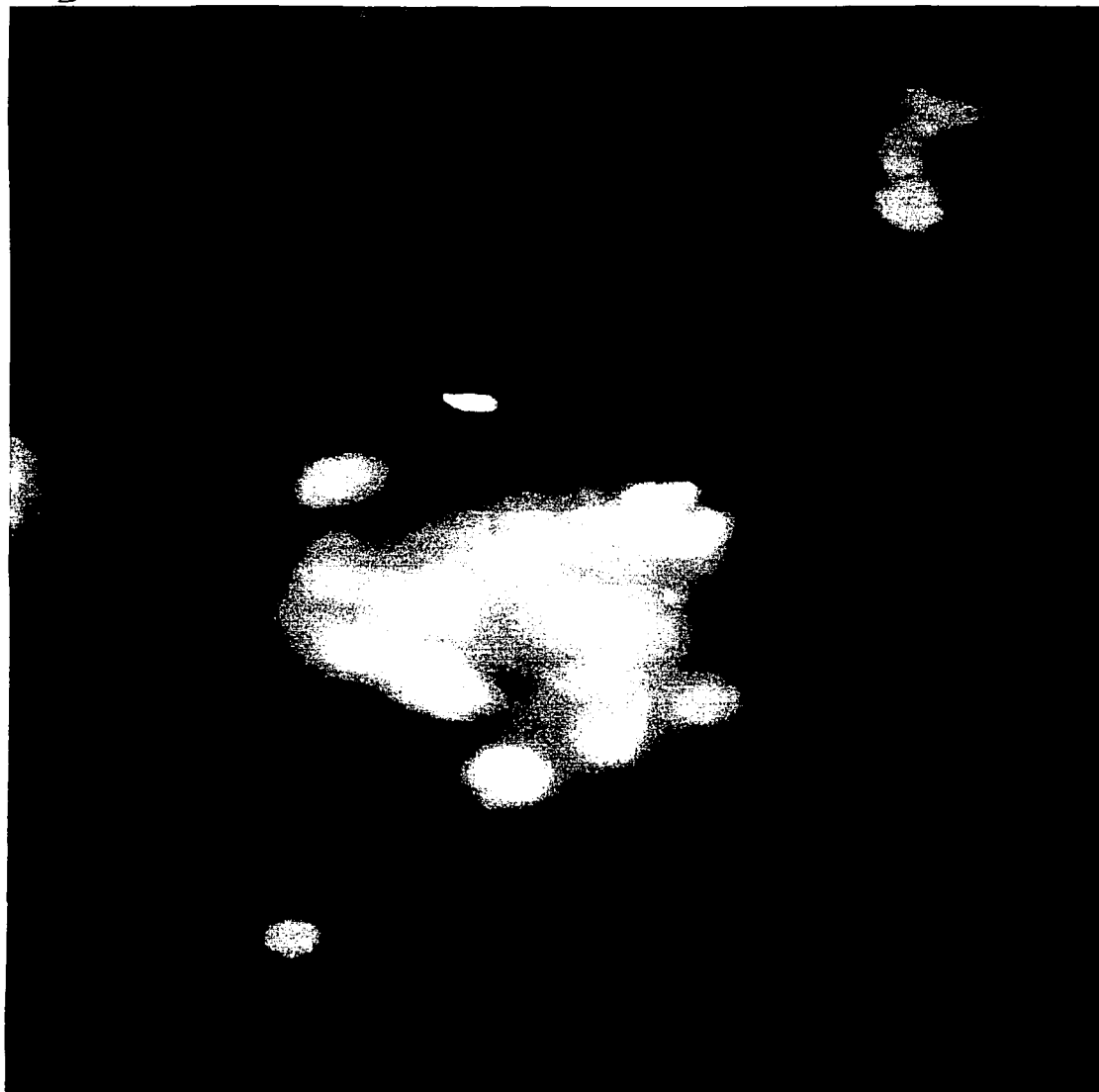
Células HEp-2 48 horas después de la exposición a una solución de etanol con melatonina al 0.59 M. Tinción: H-E. Objetivo: 20x. Se observa buen nivel de unión intercelular, citoplasma intensamente acidófilo y núcleos débilmente basófilos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS

Células HEp-2 infectadas con VSR y expuestas a anticuerpos monoclonales. Epifluorescencia



Células HEp-2 que recibieron melatonina 24 h posinfección.

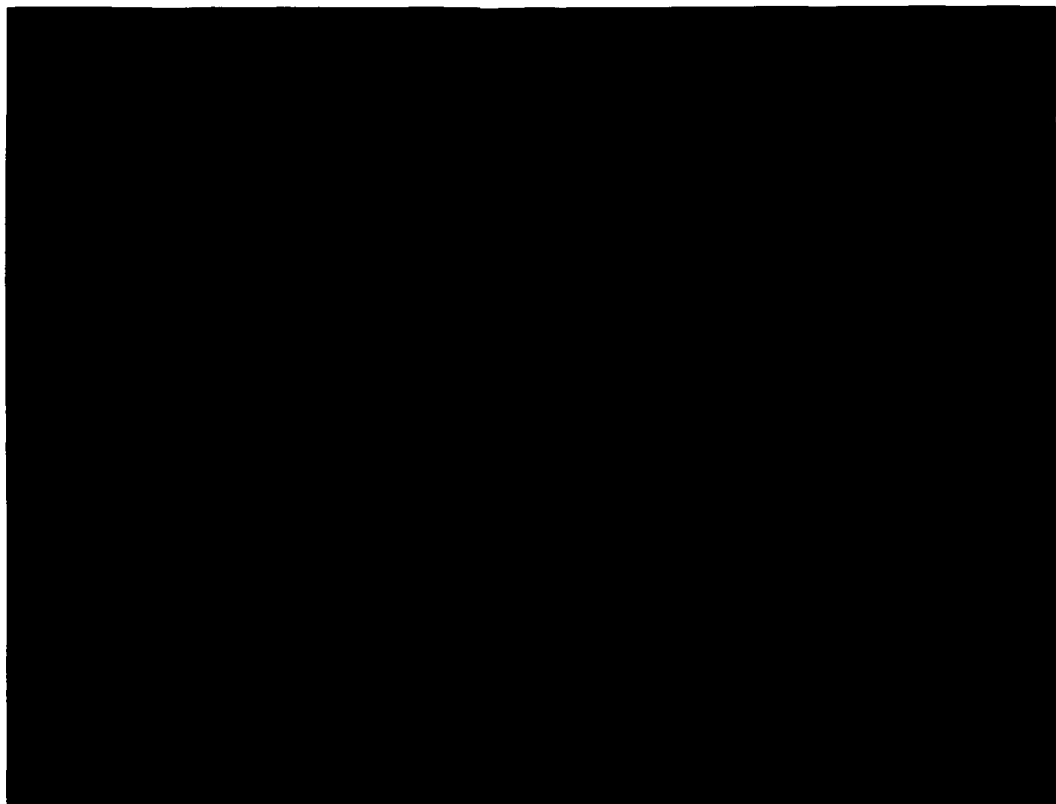
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 12.*Células HEp-2 24 h después de ser expuestas simultáneamente a VSR y Melatonina.*

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

Figura 13.*Células HEp-2 720 h después de ser expuestas simultáneamente a VSR y a Melatonina.*

Figura 14.



Células HEp-2 infectadas con VSR. Las células fluorescen sobre un campo oscuro. Visualizadas utilizando un microscopio confocal. Objetivo: 40x.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**CUARTO: "ESFUÉRZATE POR ENCONTRAR SABISURÍA...
CUANDO LO LOGRES A NADIE SE LO DIGAS."**

QUINTO: "... .."

SEXTO: "... .."

SÉPTIMO: "... .."

OCTAVO: "... .."

NOVENO: "... .."

DÉCIMO: "... .."

**POSDATA: Cumple plenamente los cuatro primeros
y todo lo demás
lo obtendrás por añadidura.**

Miguel Ángel Martínez Castillo.