



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIVIRAL DE LOS  
EXTRACTOS DE *CALEA TERNIFOLIA* Y *AGAVE TOBALA*  
SOBRE LA INFECCIÓN DE *METAPNEUMOVIRUS* HUMANO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**VIRIDIANA ASPRÓN MONCADA**

**MÉXICO, D.F.**

**2015**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                   **Profesor: Pastelín Palacios Rodolfo**

**VOCAL:**                           **Profesor: Camacho Cruz Alejandro**

**SECRETARIO:**               **Profesora: Tirado Mendoza Rocío Gabriela**

**1° SUPLENTE:**               **Profesora: Giles Gómez Martha**

**2° SUPLENTE:**               **Profesora: Ruiz Villafán Beatriz**

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología de Microorganismos en la Facultad de Medicina, UNAM.**

---

**ASESOR DEL TEMA**

**DRA. ROCÍO TIRADO MENDOZA**

---

**SUSTENTANTE**

**VIRIDIANA ASPRÓN MONCADA**

# CONTENIDO

1. Abreviaturas.....	10
2. Resumen.....	11
3. Antecedentes.....	13
1. Metapneumovirus humano.....	13
1. Estructura.....	14
1. Proteína N.....	14
2. Proteína P.....	15
3. Proteína M2-1.....	15
4. Proteína M2-2.....	16
5. Proteína L.....	16
6. Proteína M.....	17
7. Proteína F.....	17
8. Proteína G.....	18
9. Proteína SH.....	18
2. Genoma viral.....	18
3. Ciclo replicativo.....	20
4. Patogénesis.....	21
1. Infección.....	21
2. Síntomas clínicos.....	22
3. Diagnóstico.....	22
5. Respuesta inmunológica.....	22
1. Evasión del sistema inmunológico.....	24

6. Epidemiología.....	25
7. Crecimiento <i>in vitro</i> .....	26
8. Tratamiento.....	27
1. Ribavirina.....	27
2. Extractos herbolarios.....	28
3. <i>Calea ternifolia</i> .....	29
4. <i>Agave tobala</i> .....	30
4. Planteamiento del problema.....	32
5. Objetivos.....	33
1. Objetivo general.....	33
2. Objetivos particulares.....	33
6. Metodologías.....	34
1. Obtención de extractos.....	34
1. <i>Calea ternifolia</i> .....	34
2. <i>Agave tobala</i> .....	34
2. Células y virus.....	35
1. Propagación de células.....	35
2. Propagación de virus.....	35
3. Ribavirina.....	35
4. Ensayos de inocuidad.....	36
5. Ensayo en placa.....	38
1. Ensayo en placa con extractos.....	40
2. Ensayo en placa con ribavirina.....	41

6. TCID50.....	41
1. TCID50 con extractos.....	43
2. TCID50 con ribavirina.....	44
7. Análisis estadístico.....	44
7. Resultados y discusión.....	45
1. <i>Calea ternifolia</i> .....	45
1. Ensayo de inocuidad.....	45
2. Ensayo en placa.....	47
3. TCID50.....	49
2. <i>Agave tobala</i> .....	51
1. Ensayo de inocuidad.....	51
2. Ensayo en placa.....	53
3. TCID50.....	55
3. Ensayos de sinergismo.....	57
1. Ensayo en placa.....	58
2. TCID50.....	60
4. Ribavirina.....	62
1. Ensayo en placa.....	62
2. TCID50.....	64
8. Conclusiones.....	68
9. Perspectivas.....	69
10. Referencias.....	70
11. Anexos.....	78

1. Listado de figuras.....	78
2. Listado de ecuaciones.....	81
3. Listado de tablas.....	82

# 1. ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácidos.
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo celular, por sus siglas en inglés: Dulbecco's Modified Eagle Medium.
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>F</b>	Proteína de fusión.
<b>G</b>	Proteína de unión.
<b>HEp-2</b>	Células de epitelio respiratorio humano provenientes de carcinoma de laringe.
<b>kb</b>	Kilobases.
<b>L</b>	Proteína larga.
<b>M</b>	Proteína de matriz.
<b>MPV</b>	Metapneumovirus humano.
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>N</b>	Nucleoproteína.
<b>nt</b>	Nucleótidos.
<b>P</b>	Fosfoproteína.
<b>PBS</b>	Buffer de sales de fosfato, por sus siglas en inglés: Phosphate Buffered Saline.
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino.
<b>SH</b>	Proteína pequeña hidrofóbica.
<b>TCID50</b>	Dosis de infección en el cultivo de tejido en la mitad de la población, por sus siglas en inglés: Tissue Culture Infective Dose.
<b>UFP</b>	Unidades formadoras de placa.



## 2. RESUMEN

Metapneumovirus humano (MPV) es un virus de la familia *Paramyxoviridae* considerado como la segunda causa de mortalidad por infecciones agudas del tracto respiratorio bajo en infantes, ancianos y población inmunocomprometida. Para el tratamiento de este virus sólo se utiliza la ribavirina, sin embargo, este fármaco es muy caro y no es eficaz al 100%.

En México, hay una gran variedad de plantas y frutos que no han sido estudiados para conocer si tienen una posible actividad farmacológica antiviral. Tal es el caso de dos plantas que crecen mayoritariamente en nuestro país: *Calea ternifolia* y *Agave tobala*.

En este trabajo, se evaluaron los extractos de estas plantas *in vitro* por separado utilizando dos metodologías diferentes de título viral: ensayo en placa y TCID<sub>50</sub>, para observar si hay una acción antiviral sobre MPV a una concentración no citotóxica para las células HEp-2, y conocer en qué etapa del ciclo replicativo de MPV tienen efecto: en la unión del virus a la membrana celular, durante la replicación del virus o en la salida de las partículas virales de la célula y comparándolo con la acción de la ribavirina. Posteriormente se evaluaron los dos extractos en conjunto para evaluar una posible actividad sinérgica.

Se encontró que el extracto de *Calea ternifolia* tiene una actividad antiviral que se lleva a cabo durante la unión del virus a la membrana celular utilizando una dilución del extracto de 1:10 000. Mientras que para el extracto de *Agave tobala* se encontró que la actividad antiviral se desarrolla durante la unión del virus, a una dilución del extracto de 1:1 000. De igual manera se observó una actividad sinérgica entre ambos extractos ya que éstos actúan en la misma etapa del ciclo replicativo de MPV. Finalmente, al comparar la actividad antiviral de los extractos, juntos o separados, con la ribavirina se observó que para ambos extractos es considerablemente mayor.

Estos resultados indican que alguno o algunos de los componentes presentes en los extractos, que son mayoritariamente compuestos polifenólicos, tienen una actividad antiviral sobre MPV,

también es necesario elucidar cuáles son los componentes de ellos y cuál o cuáles son los que presentan la actividad antiviral, así como su mecanismo de acción detallado y, al utilizar diluciones muy bajas de ambos extractos, se podría generar un buen candidato para un tratamiento preventivo de la infección de MPV con una cantidad menor y menos costoso que la ribavirina junto con una efectividad mayor.

También es importante probar los extractos sobre otros virus de la misma familia que MPV, tales como el virus sincicial respiratorio y el virus de parainfluenza humana, ya que es probable que tengan una actividad antiviral por la similitud en sus genomas respectivos con MPV, lo cual podría potenciar su efectividad como tratamiento preventivo a las infecciones virales del tracto respiratorio.

### 3. ANTECEDENTES

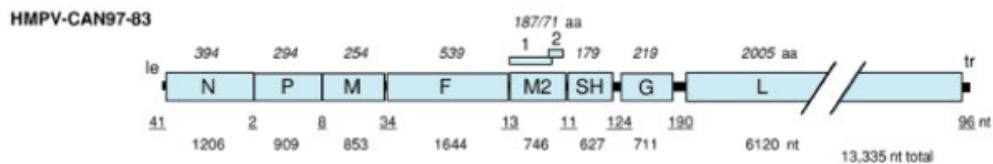
#### 3.1 METAPNEUMOVIRUS HUMANO

Metapneumovirus humano (MPV) pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, junto con los virus de Sarampión, Parainfluenza y Respiratorio Sincicial, al orden de los *Monomegavirales*, a la subfamilia *Pneumovirinae* y género *Metapneumovirus*, junto con Metapneumovirus aviar (AMPV).

MPV es la segunda causa de enfermedades agudas en el tracto respiratorio bajo en infantes, ancianos y personas inmunocomprometidas y la segunda causa de mortalidad por infecciones respiratorias a nivel mundial (1).

Fue descrito por primera vez en 2001 después de su aislamiento en infantes que padecían una enfermedad respiratoria con síntomas parecidos a una infección por virus sincicial respiratorio, la primera causa de muertes y enfermedades del tracto respiratorio bajo, pero tenían un agente etiológico desconocido (2). Sin embargo, se tienen datos de infecciones pediátricas de más de 4 décadas de antigüedad (1).

Es un virus envuelto de una cadena sencilla de RNA de polaridad negativa. La longitud de su genoma es de 13.3 kb con genes en tándem que codifican para 9 proteínas estructurales. Tiene dos genotipos (A y B) con dos subgrupos cada uno (Figura 1) (3).



**Figura 1.** Diagrama del genoma de MPV cepa CAN97-83 del extremo 3' al 5' (3).

### 3.1.1 ESTRUCTURA

El virión de MPV consiste en una nucleocápside de forma helicoidal (4) donde se encuentra el RNA genómico, la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), las proteínas M2-1 y M2-2 y la proteína larga (L). Esto se encuentra recubierto de una bicapa lipídica donde se encuentra la proteína de matriz (M), la proteína de fusión (F), la proteína de unión (G) y la proteína pequeña hidrofóbica (SH) (3).

El virión tiene una forma esférica de diámetro entre 150 y 600 nm con proyecciones de las proteínas G, F y SH de 13 a 17nm (6). La nucleocápside tiene un diámetro de 17 nm (Figura 2) (5).

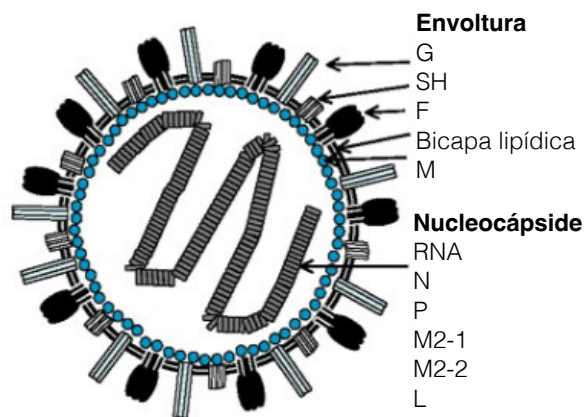


Figura 2. Estructura del virión de MPV (3).

#### 3.1.1.1 PROTEÍNA N

Es una proteína de 394 aa que se une al RNA genómico (Figura 3) (7) formando un complejo resistente a RNAsas para garantizar la integridad del RNA y del virión (8, 9).

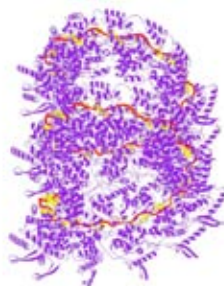
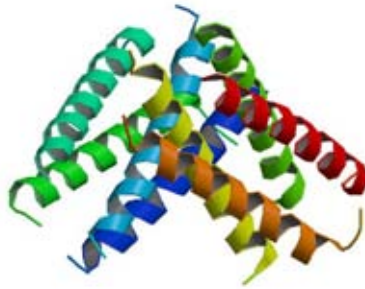


Figura 3. Proteína N, donde se observa el RNA genómico como bandas rojas y amarillas (10).

### 3.1.1.2 PROTEÍNA P

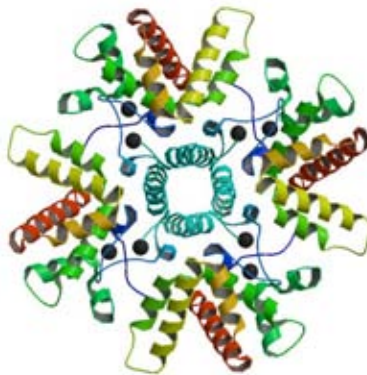
Proteína asociada a la nucleocápside de 294 aa. Es un cofactor de la polimerasa (11) y forma un complejo soluble con N libre para el ensamblaje de la nucleocápside (12) (Figura 4).



**Figura 4.** Estructura de el dominio de tetraisomerización de la proteína P. Los colores representan las cadenas de aa (10).

### 3.1.1.3 PROTEÍNA M2-1

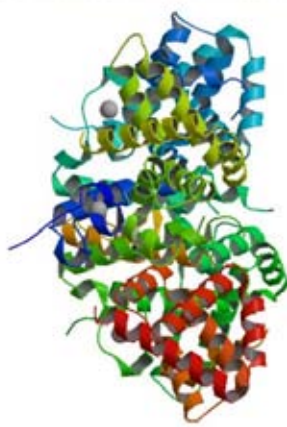
Proteína de 187 aa asociada a la nucleocápside. Aunque se conoce su función para otros Paramyxovirus, para MPV no se conoce ninguna función por lo que se considera una proteína no esencial (12), sin embargo, para otros miembros de la familia *Paramyxoviridae* su función es de factor de transcripción esencial para la viabilidad del virus (Figura 5).



**Figura 5.** Representación esquemática de la proteína M2-1. Los colores representan las cadenas de aa (10).

### 3.1.1.4 PROTEÍNA M2-2

Proteína de 184 aa que altera el balance entre la transcripción y la replicación (12) (Figura 6).



**Figura 6.** Representación esquemática de la proteína M2-2. Los colores representan las cadenas de aa (10).

### 3.1.1.5 PROTEÍNA L

Es una proteína descubierta en 2005 aa asociada a la nucleocápside. Es la polimerasa viral que contiene los dominios catalíticos de la polimerasa divididos en 2 fragmentos. (13) (Figura 7).



**Figura 7.** Representación esquemática de la proteína L. Los colores representan las cadenas de aa (10).

### 3.1.1.6 PROTEÍNA M

Proteína de 254 aa que se encuentra en la cara interior de la bicapa lipídica y la une con la nucleocápside. Se acumula en la membrana celular e interactúa con F y otros factores en la morfogénesis viral. Al haber suficientes copias del genoma del virus y una alta concentración de las proteínas M capta a las proteínas y al material genético hacia la membrana celular para que se ensamblen los viriones y puedan salir de la célula (14, 15) (Figura 8).



**Figura 8.** Representación esquemática de la proteína M. Los colores representan las cadenas de aa (10).

### 3.1.1.7 PROTEÍNA F

Glicorproteína antigénica de 539 aa que permite la entrada del virión a la célula y el paso intracelular de los viriones, formando sincitios (16, 5) (Figura 9). El precursor F0 tiene un sólo sitio de unión en los aa 56-58 ENL (17, 18) por lo que, a veces, es necesario adicionar tripsina para observar el efecto citopático, es decir, la formación de sincitios en el crecimiento *in vitro*. Las proteasas del hospedero cortan a F0 en dos subunidades para obtener la forma activa de la proteína: F1 y F2. F2 es extracelular y está unida a F1 mediante un enlace disulfuro (19). La cepa B de este virus presenta baja actividad fusogénica por lo que se requiere tratamiento con tripsina para hacer más rápido y visible el efecto citopático de este virus (16).



**Figura 9.** Representación esquemática de la proteína F. Los colores representan las cadenas de aa (10).

### 3.1.1.8 PROTEÍNA G

Glicoproteína antigénica de 219 aa que une al virión con la membrana celular (16, 5). Su receptor son los glicosaminoglicanos tales como el ácido hialurónico, el dermatán sulfato, el condroitín sulfato, el heparán sulfato y la heparina (20) (Figura 10).



**Figura 10.** Representación esquemática de la proteína G. Los colores representan las cadenas de aa (10).

### 3.1.1.9 PROTEÍNA SH

Glicoproteína que atraviesa la bicapa lipídica de 179 aa. Su función no se conoce (5) (Figura 11).



**Figura 11.** Representación esquemática de la proteína SH. Los colores representan las cadenas de aa (10).

### 3.1.2 GENOMA VIRAL

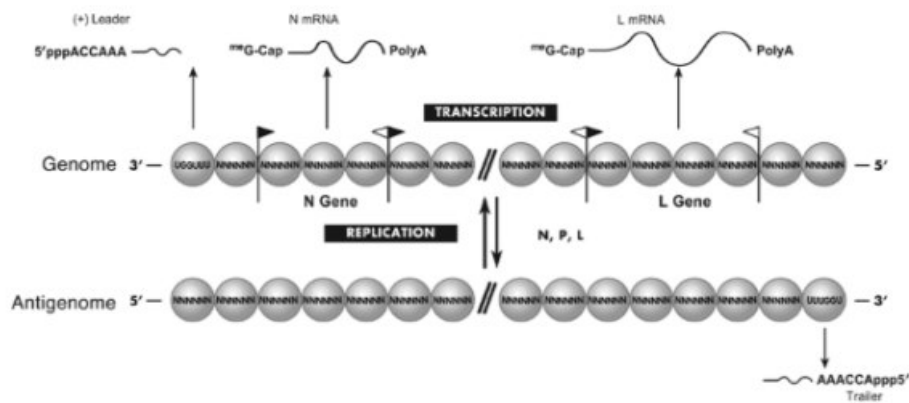
Para MPV se conocen 4 secuencias completas: CAN97-83 (13 335 nt, Gen Bank No: AY297749) y NL/00/1 (13 350 nt, Gen Bank No: AF371737) para el genotipo A y CAN98-75 (13 280 nt, Gen Bank No: AY297748) y NL/1/99 (13 293 nt, Gen Bank No: AY525843) para el genotipo B (16, 21).



El extremo 3' del genoma inicia con 41 nt antes del primer gen y el extremo 5' termina con 96 nt después del último gen. Los mRNA virales tienen una proteína Cap con guanina metilada y una cola de PoliA (22) (Figura 12) modificaciones que le confieren similitudes estructurales al mRNA celular. Con ellas, los mensajeros virales son reconocidos por los ribosomas para que se lleve a cabo el proceso de síntesis de proteínas (18).

Cada gen inicia con una secuencia de 10 nt, una señal de inicio de lectura que es altamente conservada entre todos los genes de MPV. Para terminar la síntesis de cada mRNA se encuentra una secuencia de 12 nt al final de cada gen. Las regiones intergénicas van desde 2 hasta 190 nt (23, 24). MPV no tiene genes que se traslapen (25).

La proteína L transcribe el templado del RNA 3'-5' para sintetizar el RNA de polaridad positiva junto con el Cap y la cola de PoliA (26) (Figura 12). La transición entre el proceso de transcripción y el de replicación viral implica que las concentraciones de la proteína N y L sean equimolares, lo que conlleva a la síntesis del genoma viral, el ensamblaje de los viriones y la salida de la célula.



**Figura 12.** Esquema de la transcripción y replicación de MPV (3).

### 3.1.3 CICLO REPLICATIVO

El ciclo replicativo de MPV no ha sido estudiado a detalle, sin embargo, es probable que éste sea muy similar al de otros Paramyxovirus, especialmente al del virus respiratorio sincicial. La diferencia más evidente es que la infección de MPV tiene una cinética más lenta que este virus (27). Cuando un virión entra en contacto con las integrinas celulares mediante la proteína G (28) se produce la fusión de la bicapa lipídica viral con la de la membrana celular por medio de la proteína F, donde el virus pierde su envoltura y queda sólo la nucleocápside en el citoplasma (29) (Figura 13).

Para la transcripción inicial o primaria, se producen los templados con polaridad positiva utilizando las proteínas P y L y se sintetizan todas las proteínas virales (29). Para la transcripción secundaria se replica el genoma viral en su totalidad mediante las proteínas P y L, se generan copias en sentido 3'-5' del genoma y, cuando éstas alcanzan un número elevado, se procede a la síntesis de las proteínas donde las proteínas utilizan la maquinaria celular. Las proteínas SH, F y G forman vesículas para desplazarse al exterior de la membrana celular mediante señales de migración.

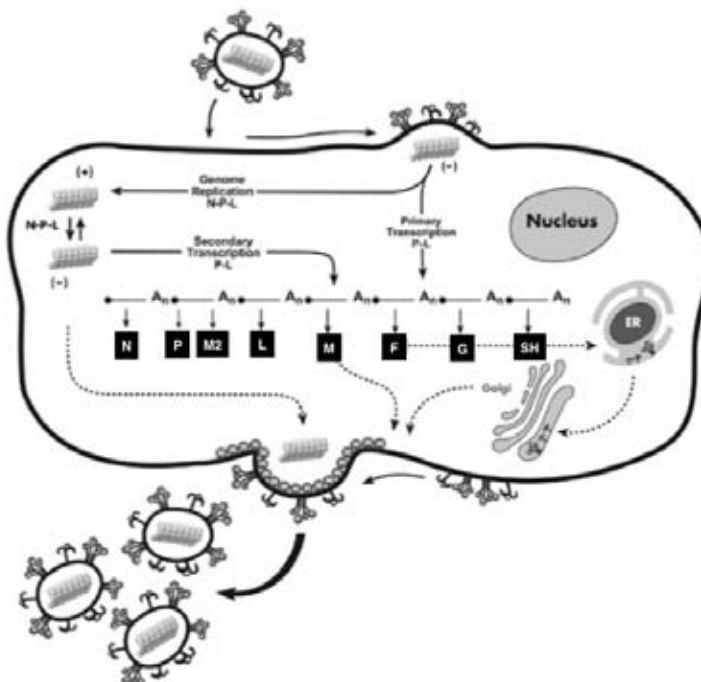


Figura 13. Esquema del ciclo replicativo de MPV (3).

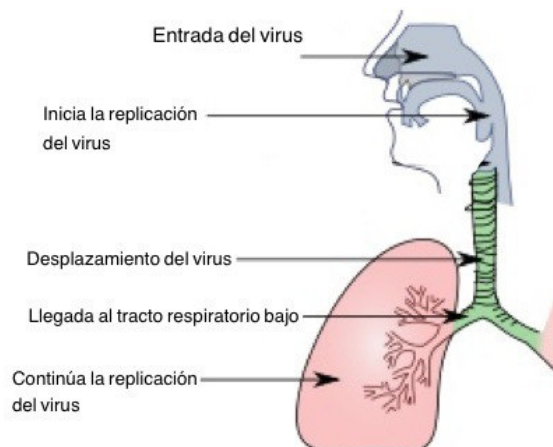
Las proteínas N, P, L y M2-1 (29) ensamblan las nucleocápsides junto con copias del genoma viral y se quedan en el citoplasma. Finalmente, la proteína M se desplaza a la parte interior de la membrana celular para atraer tanto a la nucleocápside como a las glicoproteínas hacia ella misma y promover la salida de los viriones de la célula para que se infecten otras células (30) (Figura 13).

### 3.1.4 PATOGÉNESIS

Para MPV la vía de transmisión son las secreciones humanas y la contaminación por medio de fomites. La transmisión ocurre cuando hay contacto directo de manos contaminadas con la mucosa nasal y conjuntival (31). El periodo de incubación no se conoce pero se estima que es similar al del virus respiratorio sincicial que es de 4 a 6 días (32).

#### 3.1.4.1 INFECCIÓN

MPV tiene tropismo en el epitelio respiratorio y en células dendríticas pulmonares. La replicación de MPV inicia en la nasofaringe. La transmisión del tracto respiratorio alto al bajo está relacionada con la aspiración de secreciones y la capacidad del virus de fusionar membranas celulares para irse desplazando a lo largo de las vías respiratorias (Figura 14) causando síntomas de 5 a 7 días después del periodo de incubación, sin embargo, en individuos más susceptibles y permisibles MPV se puede replicar rápidamente causando síntomas de 3 a 4 días después del periodo de incubación (33). La progresión de la infección también está relacionada con la carga viral de MPV al momento de causar la infección (34).



**Figura 14.** Esquema de entrada y desplazamiento de MPV en el tracto respiratorio.

La infección de las células dendríticas pulmonares por MPV causa una menor capacidad de inducir activación a linfocitos y, por lo tanto, una menor secreción de interferón lo que implica que las células aledañas a la célula infectada no están alerta ante una posible infección y, por lo tanto, son más permisivas (35).

### **3.1.4.2 SÍNTOMAS CLÍNICOS**

En los individuos con infección por MPV se presenta rinorrea, anorexia, tos y posible fiebre como manifestaciones clínicas en los primeros días después del periodo de incubación. Al avanzar la enfermedad se presenta una rinorrea profusa, fiebre y otitis media (36). Los pacientes que requieren hospitalización presentan bronquiolitis, asma y neumonía. Si la enfermedad avanza se puede llegar a taquipnea severa con o sin cianosis hasta llegar a falla respiratoria (37).

### **3.1.4.3 DIAGNÓSTICO**

Para un primer diagnóstico se deben considerar todas las causas posibles de enfermedades del tracto respiratorio bajo como adenovirus, virus respiratorio sincicial, parainfluenza, influenza, rinovirus y *Chlamydia trachomatis* (38). Para un diagnóstico concreto de MPV se debe recurrir al laboratorio clínico donde se realiza la identificación del virus por ELISA, inmunofluorescencia o identificación por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa) (39).

### **3.1.5 RESPUESTA INMUNOLÓGICA**

La respuesta inmunológica de un individuo tiene un papel fundamental en las infecciones. Para el caso de MPV no se ha estudiado ampliamente por ser un virus descubierto recientemente, sin embargo, se asume que es muy parecido al virus sincicial respiratorio (40).

Los estudios en modelos murinos han dado a conocer la mayor parte de información que se tiene de la respuesta inmunológica de los virus (41). En ratones BALB/c se ha observado que las células

naturales asesinas (NK) aparecen en los pulmones durante los primeros días de la infección, seguidas de linfocitos T y anticuerpos. Para eliminar a las células infectadas por el virus las células NK y los linfocitos T CD8+ inducen apoptosis y secretan quimiocinas para modular la respuesta inmunológica (42, 43). La eliminación del virus se ha asociado a linfocitos T CD8+ y a CD4+ en una infección (44).

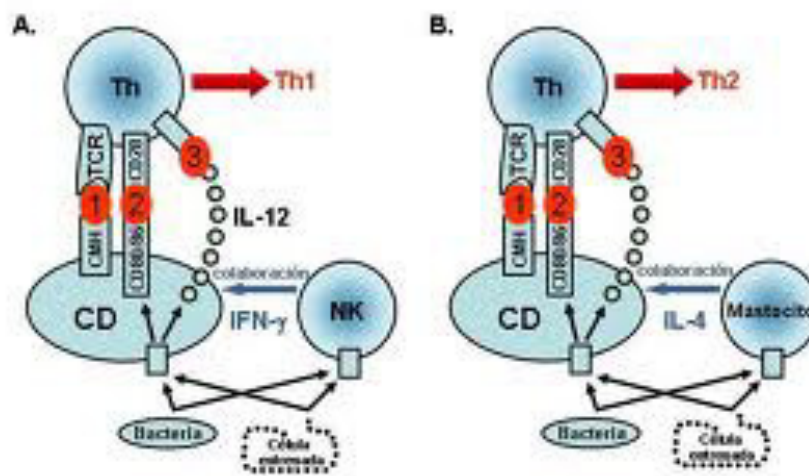
La producción o la participación de linfocitos B se ha demostrado depletándolos de los ratones (44). También se ha visto que, aunque los anticuerpos producidos son específicos para el virus, no son suficientes para la eliminación del virus tanto para una infección primaria como para una infección secundaria (44), sino que neutraliza la actividad de F y G para evitar la unión y entrada del virus (45, 46).

Los primeros anticuerpos que se producen en una infección primaria son IgM y posteriormente se producen IgG, IgA y en algunos casos IgE. La disminución del virus en el tracto respiratorio y en secreciones nasales está asociada a un aumento de IgA en la mucosa nasal (47).

Los infantes adquieren anticuerpos IgG por medio de la madre a través de la placenta y durante la lactancia, sin embargo, puede ocurrir una infección aun cuando los anticuerpos provenientes de la madre tienen un rol protector. Una cantidad significativa de anticuerpos se alcanza a las 26-32 semanas de gestación por lo que un nacimiento prematuro puede ser un factor de riesgo para una infección por virus (48). Cuando se lleva a cabo una infección secundaria se encuentra que los anticuerpos para F y G alcanzan concentraciones altas más rápido y se mantienen por más tiempo. Para una infección secundaria el anticuerpo que el mayor título tiene es del tipo IgA (49).

La regulación de la respuesta humoral o celular está mediada por los linfocitos CD4+ Th1 para la respuesta celular y Th2 para la respuesta humoral (Figura 15) (50, 51). Las vacunas que se han probado para MPV y virus respiratorio sincicial han mostrado una tendencia hacia una respuesta

tipo Th2, lo cual exagera la sintomatología como se presentó con la primer vacuna inactivada con formalina para el virus respiratorio sincicial. Es uso de esta vacuna tuvo consecuencias mortales en varios infantes a los que se les había aplicado. Actualmente existen diversas propuestas de vacunas contra estos virus respiratorios. Tal es el caso de las vacunas que utiliza partículas parecidas a virus que han demostrado tener una respuesta inmune equilibrada entre Th1 y Th2 (52, 53).



**Figura 15.** Esquema de respuestas tipo Th1 (A) y Th2 (B) con la entrada de un patógeno al organismo.

### 3.1.5.1 EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO

La estrategia de MPV para evadir al sistema inmunológico se da principalmente por su replicación en el citoplasma celular donde los anticuerpos no pueden neutralizarlos (54). La fusión de membranas intercelulares hace que los virus no salgan al intersticio y evadan el contacto con quimiocinas (55). Finalmente, hay una inhibición de la producción celular de interferón para que las células aledañas no estén alertas a una posible entrada de virus y aumente su permisibilidad (56).

### **3.1.6 EPIDEMIOLOGÍA**

MPV fue descubierto recientemente porque sus síntomas son muy parecidos a los del virus sincicial respiratorio. Aproximadamente el 12% de los pacientes a nivel mundial con infección del tracto respiratorio bajo tienen como agente etiológico a MPV, por lo que es considerado, junto con el virus sincicial respiratorio, como el mayor patógeno a nivel pediátrico causando enfermedades como bronquitis, bronquiolitis y neumonía (57, 58).

Las reinfecciones por MPV suelen ser recurrentes, especialmente en infantes y en personas inmunocomprometidas y los síntomas generalmente son más severos (59). Las personas que padecen de asma experimentan una exacerbación de esta enfermedad cuando tienen una infección por MPV lo cual se ha asociado a la formación de sincitios (60). Para las personas ancianas e inmunocomprometidas se ha reportado que el 11% de los pacientes hospitalizados por condiciones cardiopulmonares tienen infección por MPV llegando a la muerte si los síntomas se intensifican (61).

Tanto MPV como el virus sincicial respiratorio requieren tratamiento y cuidado médico similar y de 5 a 10% de los casos totales entre estos dos virus tienen una coinfección entre ellos o con otros virus respiratorios como parainfluenza tipo 3 con aumento en la severidad de los síntomas (62).

La tasas de hospitalización y de mortalidad de MPV no han sido reportadas pero algunos estudios sugieren que deben ser parecidas a las del virus sincicial respiratorio (63) que es de 20 de cada 1000 infantes en Estados Unidos (64). La tasa de mortalidad es de 4500 muertes al año en Estados Unidos (65). Para México no se conocen estas cifras.

### **3.1.7 CRECIMIENTO *IN VITRO***

MPV fue aislado en los Países Bajos y caracterizado mediante su crecimiento en células de riñón de mono verde pero el uso de estas células se ha visto disminuido por la contaminación de otros virus (6). La línea celular idónea para trabajar MPV y otros virus respiratorios es HEP-2, epitelio humano de carcinoma de laringe, porque simula las vías respiratorias y permite elucidar mecanismos inmunológicos propios de el tracto respiratorio. Algunas cepas de MPV no permiten visualizar el efecto citopático por lo que hay que adicionar tripsina para aumentar la fusión y la formación de sincitios mientras que otras cepas son independientes de ella (19). Otras líneas celulares que se utilizan son A549, células de cáncer de pulmón humano, y células Vero de mono verde africano (6). Estas células se adquieren como liofilizados y se reconstituyen en un medio con un crioprotector para almacenarse a  $-80^{\circ}\text{C}$  (66).

El medio para que todas estas células crezcan es DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) que contiene todos los nutrientes para el crecimiento de las células como aminoácidos, glucosa, bicarbonato de sodio, etc. (66). Este medio se adiciona con suero fetal bovino (SFB) a diferentes concentraciones, L-glutamina por la degradación de este aminoácido y dos antibióticos: penicilina y estreptomina. Las células crecen a  $37^{\circ}\text{C}$  con una atmósfera al 5% de dióxido de carbono (67).

El efecto citopático que se observa es la formación de sincitios o unidades formadoras de placa (UFP) por la fusión de las membranas celulares. Los sincitios se observan como células gigantes multinucleadas (Figura 16) (67). Para cosechar el virus se sonica el medio con una vibración leve a moderada para desprender los viriones adheridos a las membranas celulares, conservándose a  $-80^{\circ}\text{C}$  (68).





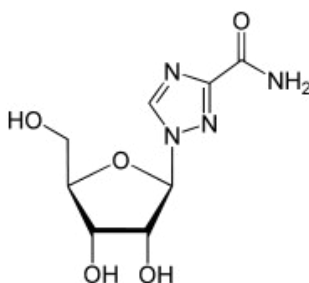
**Figura 16.** Ampliación a 1000x de células HEp-2 infectadas con MPV y teñidas con rojo neutro. El sincitio se observa al centro con los núcleos de las células adentro del sincitio.

### 3.1.8 TRATAMIENTO

La mayoría de los pacientes con una infección por MPV son tratados de manera ambulatoria, es decir, no necesitan ser hospitalizados salvo en casos donde la gravedad de los síntomas lo requiera. Se dan cuidados para aminorar las molestias de los síntomas tales como eliminación de secreciones, atmósfera humidificada, monitoreo de riesgo de apnea, administración de antihistamínicos y antiinflamatorios y, si se requiere, respiración asistida (69).

#### 3.1.8.1 RIBAVIRINA

La ribavirina (1-2-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) (Figura 17) es un nucleósido análogo que tiene actividad antiviral tanto para MPV como para el virus respiratorio sincicial (69).



**Figura 17.** Estructura molecular de la ribavirina.

Se administra como un aerosol usando un ventilador mecánico por 6-18 horas continuas diariamente de 3 a 7 días. Este tratamiento es muy costoso y alcanza una eficacia al 60% por lo que no se utiliza frecuentemente en el mundo ni en México (70).

### **3.2 ESTUDIOS CON EXTRACTOS**

En todo el mundo se utilizan plantas para aliviar algunos malestares. Estas plantas han sido estudiadas y se ha encontrado que alguno de sus compuestos tiene actividad farmacológica. En México se utilizan las plantas en conjunto con los fármacos comerciales para curar algún padecimiento y se emplean tanto plantas muy conocidas en todo el país como plantas que son de regiones específicas.

Con respecto a los compuestos antivirales, se han estudiado diferentes extractos para probar si se encuentra una actividad farmacológica en diferentes plantas para diferentes virus. Actualmente, se han evaluado extractos para una posible actividad antiviral de Paramyxovirus, principalmente en Tailandia, de plantas como canela, manzanilla y otras plantas de la región de Tailandia (71).

En estos estudios se compara la actividad antiviral del extracto con la actividad de la rivabirina y se evalúan diferentes parámetros para evaluar en qué etapa del ciclo replicativo es que se presenta la respuesta del extracto. Las etapas que generalmente se estudian son la unión del virus a la célula y la salida de los viriones de la misma (72).

En México hay dos plantas que crecen al oeste del país que son muy abundantes en esta región, estas plantas son *Calea ternifolia* y *Agave tobala*.

### 3.3 CALEA TERNIFOLIA

*Calea ternifolia* o *Calea zacatechichi* (Figura 18) llamada comúnmente "hoja de Dios" o "hierba de los sueños" es una planta de la familia *Asteraceae* con un alto contenido de alcaloides que crece en ambientes húmedos y soleados como es el oeste de México y Costa Rica (73).

Es un arbusto que mide de 1 a 1.5 m de altura, ramificado con tallos rectos. Sus hojas miden de 3 a 4 cm de largo por 2 a 3 cm de ancho y son ovaladas y serradas. Sus flores miden 4 mm, son blancas y forman pequeños racimos. Florecen en agosto y septiembre (73, 74).



Figura 18. *Calea ternifolia*.

En México se utiliza como remedio para la disentería, fiebre, asma y diarrea. También provoca alucinaciones vividas cuando se consume en infusiones concentradas por su alta concentración de alcaloides, polifenoles, flavonas (Figura 19) y germacranólidos (Figura 20) (73, 75).

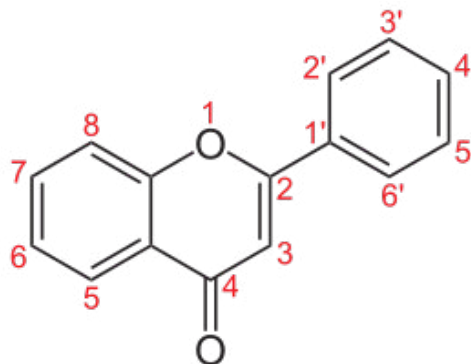
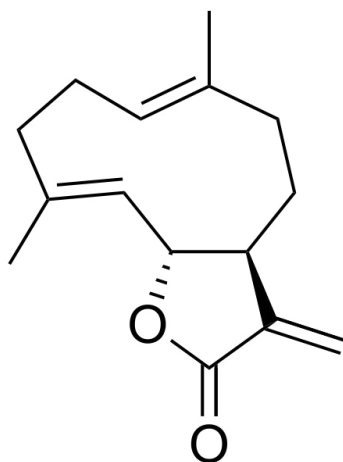


Figura 19. Estructura molecular de las flavonas.



**Figura 20.** Estructura molecular de los germacranólidos.

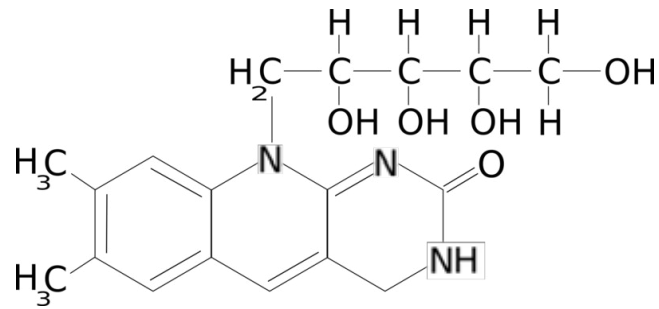
### **3.4 AGAVE TOBALA**

*Agave tobala* (Figura 21) es una planta de la familia *Asparagaceae* que tiene hojas anchas con forma de lanza de 60 a 90 cm de largo por 15 a 20 cm de ancho. Sus espinas miden 2 mm de ancho y 3 cm de largo. Sus flores son de color amarillo claro y florecen en primavera (74). Crece al noroeste de México y al sudoeste de Estados Unidos en zonas elevadas y soleadas (73).



**Figura 21.** *Agave tobala*.

En México se utiliza como tratamiento para la cefalea y la fiebre en forma de infusión de sus hojas secas. La savia se utiliza para la gastritis y las úlceras (73). En su composición química se encuentran polifenoles, celulosa, fructosa, lignina, riboflavina (Figura 22), ácido ascórbico, hierro, calcio y fósforo (75).



**Figura 22.** Estructura molecular de la riboflavina.

## 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

MPV es la segunda causa de infecciones del tracto respiratorio bajo en el mundo en población pediátrica, anciana e inmunocomprometida. Para este virus sólo se conoce un tratamiento, sin embargo, sólo es eficaz en el 60% de los casos y su tratamiento es muy caro por lo que es imperante buscar otras alternativas de tratamiento que sean más eficaces y menos costosas.

En México se tiene una gran diversidad de plantas que se utilizan para aliviar malestares sin conocer si alguno de los compuestos de la planta está proporcionando la actividad farmacológica. Tal es el caso de *Calea ternofolia* y *Agave tobala* que crecen mayoritariamente en el oeste del país.

Para estas dos plantas se conocen actividades farmacológicas que confieren alivio a diversos malestares por lo que es posible pensar que sus extractos, que contienen altas concentraciones de compuestos polifenólicos, puedan tener entre sus actividades la de antiviral, y que pueda funcionar en alguna de las etapas del ciclo replicativo de MPV: unión del virus a la membrana celular, durante la replicación del virus o a la salida de los viriones de la célula. Antes de probar si hay o no una actividad antiviral en organismos vivos, se debe contemplar un modelo *in vitro* de células de epitelio respiratorio para simular las vías respiratorias lo más posible y poder tener una aproximación de lo que se llevaría a cabo en un modelo *in vivo*.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar actividad antiviral de los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala* en un modelo de infección con MPV *in vitro*.

### **5.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la inocuidad de los extractos en células HEp-2.
- Determinar en qué etapa del ciclo replicativo de MPV se puede encontrar una actividad antiviral para cada extracto.
- Determinar sinergismo de la actividad antiviral al utilizar ambos extractos.
- Comparar la actividad antiviral de los extractos con la de la ribavirina.

## **6. METODOLOGÍAS**

### **6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS**

Los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala* fueron donados al Laboratorio de Biología de Microorganismos por la Dra. Edith González y el Dr. Vania Robles de la Universidad Tecnológica de La Mixteca en Oaxaca.

#### **6.1.1 CALEA TERNIFOLIA**

Las plantas se recolectaron del bosque de Santiago Yolomécatl en el estado de Oaxaca. Éstas se secaron durante una semana en un cuarto sin exposición a la luz. Posteriormente, las hojas fueron separadas de las ramas y se molieron. Se pesaron 50 g del polvo obtenido y se adicionaron 800 mL de metanol. Se dejó reposar sin agitación ni exposición a la luz a temperatura ambiente por 15 días. Transcurrido este tiempo, el extracto se filtró para eliminar los residuos sólidos, se concentró en un rotaevaporador a 48°C hasta sequedad y se recolectó en un frasco ámbar. Antes de utilizarse para los ensayos con células se reconstituyó en PBS para mantener un pH óptimo para las células y se filtró por una membrana de 0.22 µm para esterilizarlo.

#### **6.1.2 AGAVE TOBALA**

Se trocearon las pencas de agave y se sometieron a vapor a 120°C y 15 lb de presión durante 4 horas. Después de este tiempo se tomaron 20 mL del jugo obtenido y se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo en proporción 1:1 tres veces. A los volúmenes restantes (60 mL en total) se les adicionó sulfato de sodio anhidro hasta secar y el extracto restante se concentró en un rotaevaporador a 45°C hasta sequedad. El residuo se recuperó con etanol al 60% y se almaceno en un frasco ámbar. Antes de utilizarse para los ensayos con células se reconstituyó en



PBS para mantener un pH óptimo para las células y se filtró por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  para esterilizarlo.

## **6.2 CÉLULAS Y VIRUS**

Se utilizó la línea celular HEp-2 previamente descrita. La cepa de MPV fusogénico se obtuvo a partir de un aislamiento de una muestra clínica la cual se denominó MEX3670Fus.

### **6.2.1 PROPAGACIÓN DE CÉLULAS**

A una caja Petri con una monocapa confluyente de células se le retiró el medio y se realizaron 3 lavados de 4 mL con PBS. Se agregaron 750  $\mu\text{L}$  de EDTA y 150  $\mu\text{L}$  de tripsina y se incubaron 10 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para desprender las células. Se resuspendió en 3 mL de DMEM 5% SFB para neutralizar la acción del EDTA y la tripsina. Se retiraron 2 mL de la caja y se dio pase a otra caja Petri para propagarlas. Se adicionaron 7 mL de DMEM 5% SFB y se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

### **6.2.2 PROPAGACIÓN DE VIRUS**

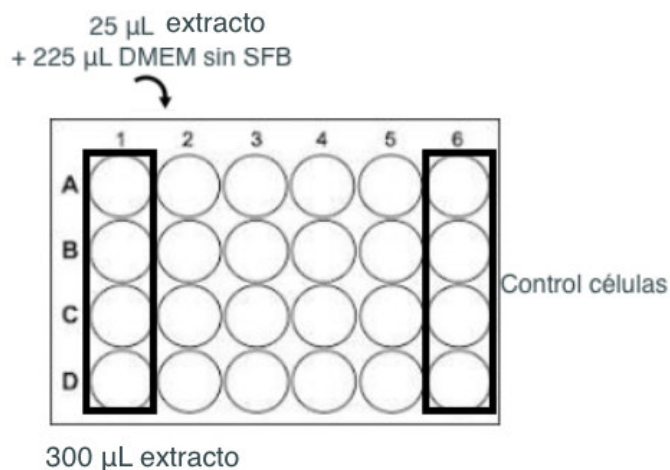
A una caja Petri con una monocapa confluyente de células se le retiró el medio y se realizaron 3 lavados de 4 mL con PBS. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de MPV y 1 mL de DMEM sin SFB, se incubó 4 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta observar los sincitios. Se retiró el medio y se adicionó a un vial plástico de 6 mL estéril. Se sonicó el medio a una vibración moderada por 10 minutos y se agregó MgSO<sub>4</sub> 2M para estabilizar la infectividad del virus y que no decaiga hasta obtener una concentración 0.1M de MgSO<sub>4</sub> en el vial. Se colocó el vial a -80°C (68, 76).

## **6.3 RIBAVIRINA**

Se utilizó ribavirina de la marca comercial "Vilona" en solución pediátrica producida por los Laboratorios Grossman en presentación de gotas a una concentración de 40 mg/mL.

## 6.4 ENSAYOS DE INOCUIDAD

Para determinar la dilución óptima no tóxica de los extractos para los ensayos *in vitro* se realizaron ensayos de citotoxicidad celular. A una caja Petri con una monocapa confluyente de células se le retiró el medio y se realizaron 3 lavados de 4 mL con PBS. Se agregaron 750  $\mu\text{L}$  de EDTA y 150  $\mu\text{L}$  de tripsina y se incubaron 10 minutos a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  para desprender las células. Se resuspendió en 3 mL de DMEM 5% SFB. Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de células en una placa de 24 pozos más 250  $\mu\text{L}$  de DMEM 5% SFB. A la placa de 24 pozos con las monocapas de células confluentes se le adicionaron diluciones seriadas del extracto. Las diluciones se prepararon de acuerdo al siguiente protocolo: en otra placa de 24 pozos se colocaron 300  $\mu\text{L}$  del extracto en el primer carril y 225  $\mu\text{L}$  de DMEM sin SFB en el resto de los carriles. Se pasaron 25  $\mu\text{L}$  del extracto al segundo carril, y así sucesivamente en diluciones seriadas 1:10 dejando el último carril como control de células (Figura 23).



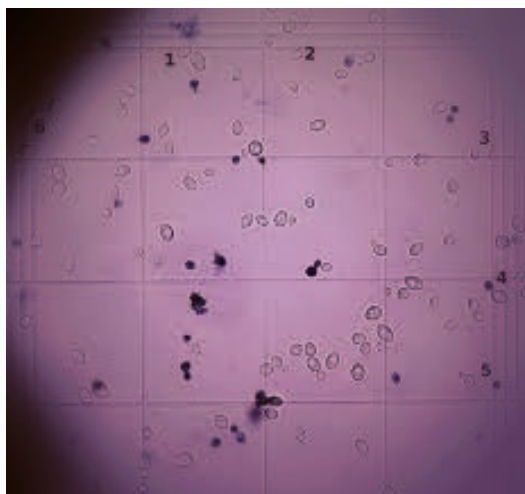
**Figura 23.** Esquema de placa de diluciones para el ensayo citotóxico.

Se retiró el medio de la placa con la monocapa confluyente de células y se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de la placa de diluciones a cada uno de los pozos correspondientes. Se realizó una cinética de viabilidad celular a las 0, 24, 48 y 72 horas. La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul tripano. A cada punto de la cinética se le realizaron tres lavados con PBS y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de tripsina por pozo para despegar a las células. Se incubaron 10 minutos a 37°C y se agregó 1 mL de DMEM 5% SFB a cada pozo para neutralizar la acción de la tripsina. Se tomaron 90  $\mu\text{L}$  de cada pozo y se agregaron a tubos Eppendorf más 10  $\mu\text{L}$  de azul tripano (77) (Figura 24).



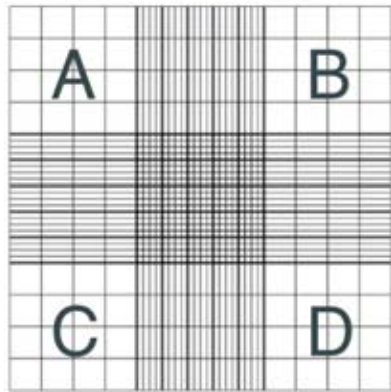
**Figura 24.** Estructura molecular del azul tripano.

Se incubó cada tubo por 3 minutos a 37°C y se realizó el conteo de las células viables en una cámara de Neubauer para cada tubo, diferenciándolas de las células muertas porque éstas se observan de color azul oscuro mientras que las células vivas se observan transparentes y brillantes (77) (Figura 25).



**Figura 25.** Imagen donde se observan las células muertas de color azul y las células vivas de color transparente.

Se calculó la media de las observaciones (Figura 26), el número de células/mL en cada pozo (Ecuación 1) y el % de células viables por tubo con respecto al control a las 0 h (Ecuación 2).



**Figura 26.** Esquema de las rejillas de la cámara de Neubauer donde A, B, C y D son los cuadros en los que se contaron las células.

$$N_{cels} / mL = \bar{x} (Fd)(Fc)$$

**Ecuación 1.** Número de células por mL donde  $\bar{x}$  es la media de las observaciones, Fd el factor de dilución (100  $\mu$ L/90  $\mu$ L) y Fc el factor de la cámara (10 000).

$$\%celvivas / mL = \frac{N_{cel_i}}{N_{cel_{cont}}} \times 100$$

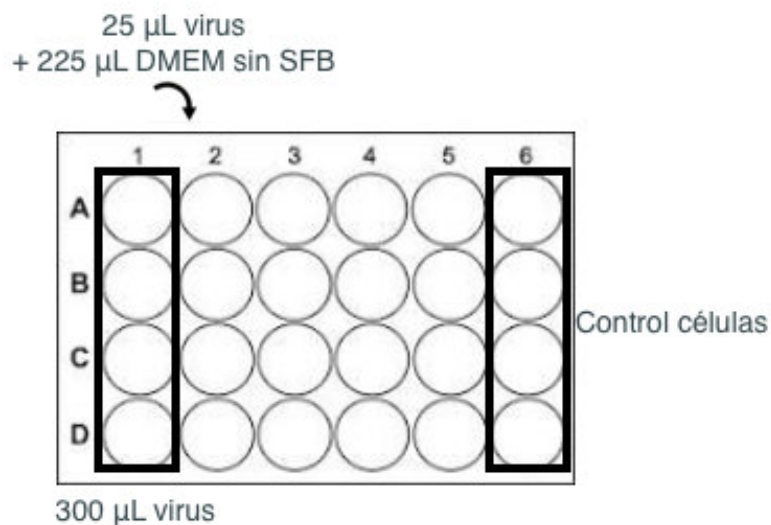
**Ecuación 2.** Porcentaje de células vivas de la medición  $i$ . Donde  $N_{cel_i}$  es el número de células de  $i$  y  $N_{cel_{cont}}$  el número de células del control a las 0 horas.

## 6.5 ENSAYO EN PLACA

Para conocer el título viral de MPV por ensayo en placa se realizó un ensayo de control de infectividad empleando al virus. A una caja Petri con una monocapa confluyente de células se le

retiró el medio y se realizaron 3 lavados de 4 mL con PBS. Se agregaron 750  $\mu$ L de EDTA y 150  $\mu$ L de tripsina y se incubaron 10 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para desprender las células. Se resuspendió en 3 mL de DMEM 5% SFB. Se colocaron 100  $\mu$ L de células por pozo en una placa de 24 pozos más 250  $\mu$ L de DMEM 5% SFB. Se incubó 2 horas a 37°C, se retiró el medio y se agregaron 750  $\mu$ L de DMEM 5% SFB.

La placa de 24 pozos con las monocapas de células confluentes se infectaron con diluciones seriadas del virus. Las diluciones se prepararon de acuerdo al siguiente protocolo: en otra placa de 24 pozos se colocaron 300  $\mu$ L de MPV en el primer carril y 225  $\mu$ L de DMEM sin SFB en el resto de los carriles. Se pasaron 25  $\mu$ L del virus al segundo carril y así sucesivamente en diluciones seriadas 1:10 dejando el último carril como control de células (Figura 27).



**Figura 27.** Esquema de placa de diluciones para el ensayo en placa.

Se adicionaron 250  $\mu$ L de la placa de diluciones a la placa de células en el pozo correspondiente y se incubó durante 4 horas a 37°C (78). Se retiró el medio, se agregaron 500  $\mu$ L de agarosa al 0.3% en DMEM sin SFB lentamente a cada pozo (80). Posteriormente, se incubó la placa por 72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se adicionaron 250  $\mu$ L de formaldehído al 1% para fijar las células y se incubó

una hora a temperatura ambiente con agitación. Se retiró la agarosa y el formaldehído y se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de rojo neutro 0.05% para teñir las células. Se incubó una hora a temperatura ambiente con agitación, se retiró y se lavó con agua corriente. Se contaron el número de sincitios por pozo y se calculó el número de UFP/mL por fila de la placa (Ecuación 3) y el porcentaje de infectividad con respecto al control del virus (81) (Ecuación 4). Se calculó el promedio de las cuatro filas para el número de UFP/mL y el porcentaje de infectividad.

$$UFP / \text{ml} = d \left( \frac{N}{n} \right) V^{-1}$$

**Ecuación 3.** UFP/mL, donde d es el factor de dilución (10), N es el número total de sincitios en una fila, n es el número de pozos por fila (6) y V es el volumen de virus inoculado en mL (0.25 mL).

$$\% \text{inf} = \frac{UFP_i}{UFP_{cont}} \times 100$$

**Ecuación 4.** Porcentaje de infectividad, Donde  $UFP_i$  es el número de UFP/mL de  $i$  y  $UFP_{cont}$  es el número de UFP/mL del control de MPV.

### 6.5.1 ENSAYO EN PLACA CON EXTRACTOS

Una vez obtenido el control de infectividad del virus se procedió a realizar los ensayos adicionando los extractos para observar su actividad durante la unión a la célula, durante la replicación del virus o a la salida de la célula. Los ensayos se realizaron de la misma manera que el ensayo en placa y se adicionó el o los extractos de la siguiente manera:

- Para probar la actividad durante la unión: se agregó el o los extractos a cada pozo hasta que quedó en la dilución no citotóxica determinada (1:10000 para *Calea ternifolia* y 1:1000 para *Agave tobala*), se incubó 2 horas a 4°C y 2 horas a 37°C.

- Para probar la actividad durante la replicación: se agregó el o los extractos a cada pozo hasta que quedó en la dilución no citotóxica determinada y se incubó 4 horas a 37°C.
- Para probar la actividad durante la salida: se incubó 2 horas a 37°C, se agregó el o los extractos a cada pozo hasta que quedó en la dilución no citotóxica determinada y se incubó 2 horas a 37°C.

### **6.5.2 ENSAYO EN PLACA CON RIBAVIRINA**

Después de realizar los ensayos con los extractos se realizaron ensayos con ribavirina como fármaco de control para observar su actividad durante la unión a la célula, durante la replicación del virus o a la salida de la célula y compararla con la actividad de los extractos. Los ensayos se realizaron de la misma manera que el ensayo en placa y se adicionó la ribavirina en una concentración no citotóxica que ya ha sido reportada (79) de la siguiente manera:

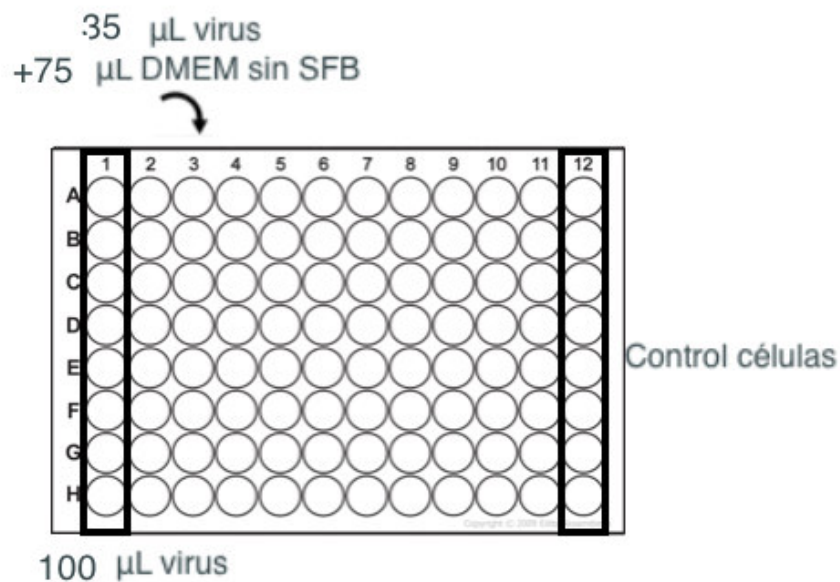
- Para probar la actividad durante la unión: se agregó la ribavirina a cada pozo hasta que quedó en la concentración de 22 µg/mL (79), se incubó 2 horas a 4°C y 2 horas a 37°C.
- Para probar la actividad durante la replicación: se agregó la ribavirina a cada pozo hasta que quedó en la concentración de 22 µg/mL y se incubó 4 horas a 37°C.
- Para probar la actividad durante la salida: se incubó 2 horas a 37°C, se agregó la ribavirina a cada pozo hasta que quedó en la concentración de 22 µg/mL y se incubó 2 horas a 37°C.

### **6.6 TCID50**

Para conocer el título viral de MPV por TCID50 se realizó un ensayo de control de infectividad empleando al virus. A una caja Petri con una monocapa confluyente de células se le retiró el medio y se realizaron 3 lavados de 4 mL con PBS. Se agregaron 750 µL de EDTA y 150 µL de tripsina y

se incubaron 10 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para desprender las células. Se resuspendió en 3 mL de DMEM 5% SFB. Se colocaron 150 µL de células por pozo en una placa de 96 pozos más 150 µL de DMEM 5% SFB. Se incubó 2 horas a 37°C, se retiró el medio y se agregaron 150 µL de DMEM 5% SFB.

La placa de 96 pozos con las monocapas de células confluentes se infectaron con diluciones seriadas del virus. Las diluciones se prepararon de acuerdo al siguiente protocolo: en otra placa de 96 pozos se colocaron 100 µL de MPV en el primer carril y 75 µL de DMEM sin SFB en el resto de los carriles. Se pasaron 35 µL del virus al segundo carril y así sucesivamente en diluciones seriadas 1:3 dejando el último carril como control de células (82) (Figura 28).



**Figura 28.** Esquema de placa de diluciones para el TCID<sub>50</sub>.

Se adicionaron 50 µL de la placa de diluciones a la placa de células en el pozo correspondiente y se incubó durante 2 horas a 37°C (83). Se retiró el medio, se agregaron 150 µL de DMEM sin SFB y se incubó 72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se retiró el medio y se adicionaron 50 µL



de metanol para fijar las células y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se retiró el metanol y se adicionaron 35  $\mu$ L de cristal violeta para teñir las células (78). Se incubó 4 minutos a temperatura ambiente con agitación, se retiró y se lavó con agua corriente. Se contaron el número de pozos con presencia de sincitios y se calculó el número de células infectadas/mL (Ecuación 5) y el porcentaje de infectividad con respecto al control del virus (80) (Ecuación 6). Este ensayo se realizó cuatro veces y se calculó el promedio de las cuatro placas para el número de células infectadas/mL y el porcentaje de infectividad.

$$TCID_{50} = 10^{-\left(-\log \Delta + \left[-\log \delta \left(S - \frac{1}{2}\right)\right]\right)}$$

**Ecuación 5.** Título de TCID50 donde se calcula el número de células infectadas/mL. Donde  $\Delta$  es la última dilución donde todas las filas presentan sincitios,  $\delta$  es el factor de dilución (3) y S es el número total de pozos que presentan sincitios entre el número de filas utilizadas.

$$\% \text{ inf} = \frac{\text{celsinf}_i}{\text{celsinf}_{cont}} \times 100$$

**Ecuación 6.** Porcentaje de infectividad, Donde  $\text{celsinf}_i$  es el número de células infectadas/mL de  $i$  y  $\text{celsinf}_{cont}$  es el número de células infectadas/mL del control de MPV.

### 6.6.1 TCID50 CON EXTRACTOS

Una vez obtenido el control de infectividad del virus se procedió a realizar los ensayos adicionando los extractos para observar su actividad durante la unión a la célula, durante la replicación del virus o a la salida de la célula. Los ensayos se realizaron de la misma manera que el TCID50 y se adicionó el o los extractos de la siguiente manera:

- Para probar la actividad durante la unión: se agregó el o los extractos a cada pozo hasta que quedó en la dilución no citotóxica determinada (1:10000 para *Calea ternifolia* y 1:1000 para *Agave tobala*), se incubó 1 hora a 4°C y 1 hora a 37°C.

- Para probar la actividad durante la replicación: se agregó el o los extractos a cada pozo hasta que quedó en la dilución no citotóxica determinada y se incubó 2 horas a 37°C.
- Para probar la actividad durante la salida: se incubó 1 hora a 37°C, se agregó el o los extractos a cada pozo hasta que quedó en la dilución no citotóxica determinada y se incubó 1 hora a 37°C.

### **6.6.2 TCID50 CON RIBAVIRINA**

Después de realizar los ensayos con los extractos se realizaron ensayos con ribavirina como fármaco de control para observar su actividad durante la unión a la célula, durante la replicación del virus o a la salida de la célula y compararla con la actividad de los extractos. Los ensayos se realizaron de la misma manera que el ensayo en placa y se adicionó la ribavirina en una concentración no citotóxica que ya ha sido reportada (79) de la siguiente manera:

- Para probar la actividad durante la unión: se agregó la ribavirina a cada pozo hasta que quedó en la concentración de 22 µg/mL (79), se incubó 1 hora a 4°C y 1 hora a 37°C.
- Para probar la actividad durante la replicación: se agregó la ribavirina a cada pozo hasta que quedó en la concentración de 22 µg/mL y se incubó 2 horas a 37°C.
- Para probar la actividad durante la salida: se incubó 1 hora a 37°C, se agregó la ribavirina a cada pozo hasta que quedó en la concentración de 22 µg/mL y se incubó 1 hora a 37°C.

### **6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para determinar si había diferencia significativa entre los grupos con respecto al control se realizó una prueba de ANOVA con el programa SigmaPlot 11.3.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 CALEA TERNIFOLIA

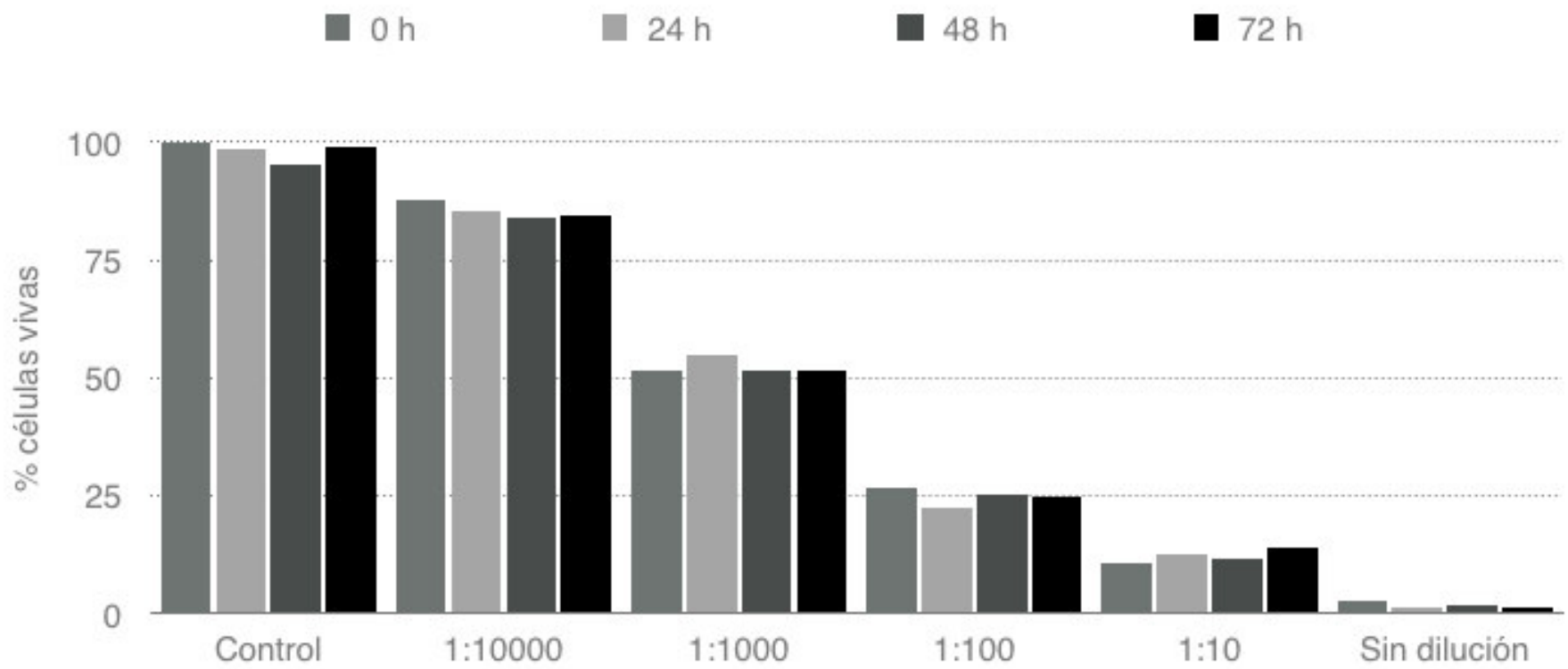
#### 7.1.1 ENSAYO DE INOCUIDAD

Al realizar el ensayo de inocuidad para el extracto de *Calea ternifolia* se encontró que el número de células no viables disminuía al aumentar la dilución del extracto. Durante el ensayo con el extracto concentrado y las 2 primeras diluciones el resultado obtenido demostró que la cuenta de células viables disminuyó significativamente (menos del 25% en promedio) (Tabla 1).

El porcentaje donde se observó que la viabilidad se mantuvo cercana al 100% fue en la dilución 1:10 000 (Figura 29) que fue de un promedio de 85.4% a lo largo de 72 horas por lo que se decidió que utilizar esta dilución del extracto en los ensayos posteriores.

% células vivas				
	0 h	24 h	48 h	72 h
<b>Control</b>	100	98.6	95	98.9
<b>1:10000</b>	87.6	85.5	84	84.4
<b>1:1000</b>	51.7	54.9	51.3	51.6
<b>1:100</b>	26.7	22.4	25.3	24.5
<b>1:10</b>	10.7	12.4	11.7	13.9
<b>Sin dilución</b>	2.5	1.4	1.8	1.1

**Tabla 1.** Resultados de los ensayos de citotoxicidad celular en HEP-2. En color gris oscuro se marca la dilución elegida para realizar los ensayos posteriores con el extracto de *Calea ternifolia*.



**Figura 29.** Resultados de los ensayos de citotoxicidad celular con el extracto de *Calea ternifolia* donde se observa que la dilución que menos citotoxicidad ocasiona es la dilución 1:10000.

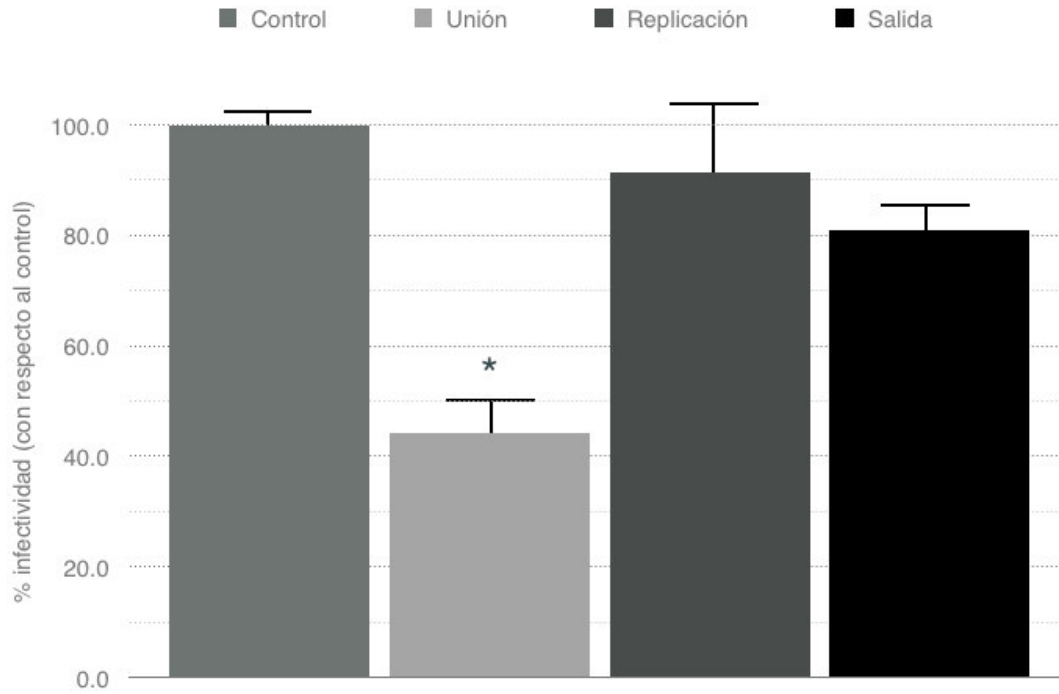
### 7.1.2 ENSAYO EN PLACA

Al comparar el porcentaje de infectividad obtenido con el control del virus con el porcentaje de infectividad del virus más el extracto de *Calea ternifolia* en tres diferentes condiciones en el ensayo en placa, se observó que el porcentaje durante la unión es bastante más bajo (44.3%) mientras que para la replicación y la salida del virus es de 91.5% y 80.8% respectivamente (Tabla 2 y Figura 30). Se encontró que la unión tiene una diferencia estadística de  $p=0.01$ .

Medición	Control	Unión	Replicación	Salida
1	8.06	3.08	7.06	6.53
2	7.93	3.68	7.93	6.25
3	7.53	3.15	6.42	5.93
4	7.73	3.93	7.16	6.53
X	7.81	3.46	7.14	6.31
% infectividad 1	103.2	39.4	90.4	83.6
% infectividad 2	101.5	47.1	101.5	80.0
% infectividad 3	96.4	40.3	82.2	75.9
% infectividad 4	99.0	50.3	91.7	83.6
% infectividad X	100.0	44.3	91.5	80.8
Desv est	2.97	5.28	7.93	3.66
F ANOVA	215.71 (1,3)	316.15*	7.02	198.46

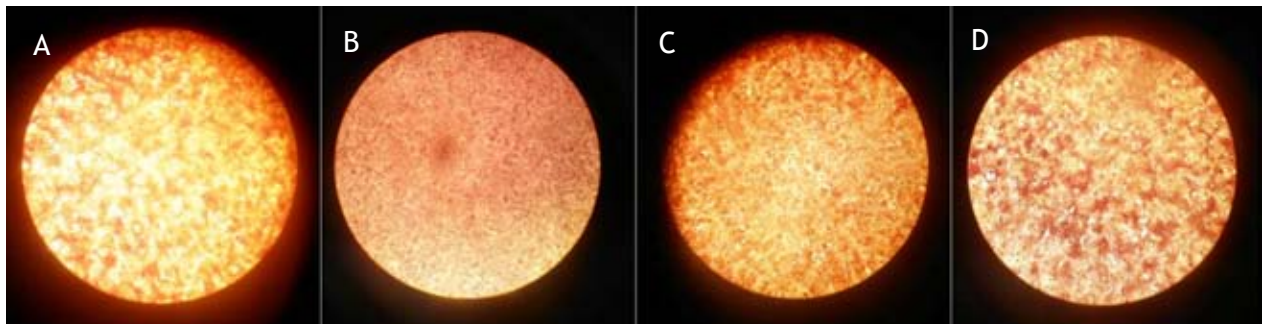
Mediciones  $\times 10^2$ . \* Diferencia estadísticamente significativa  $p=0.01$

**Tabla 2.** Resultados del ensayo en placa con el extracto de *Calea ternifolia*.



**Figura 30.** Resultados del ensayo en placa con el extracto de *Calea ternifolia*.

Se observó que la formación de sincitios (Figura 31) disminuyó con respecto al control en la unión, mientras que en la replicación y en la salida no se observó una disminución significativa de ellos. Estos resultados sugieren que el extracto de *Calea ternifolia* tiene una actividad durante la unión de la célula y el virus.



**Figura 31.** Formación de sincitios del ensayo en placa con el extracto de *Calea ternifolia* en la dilución 1:100.

A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

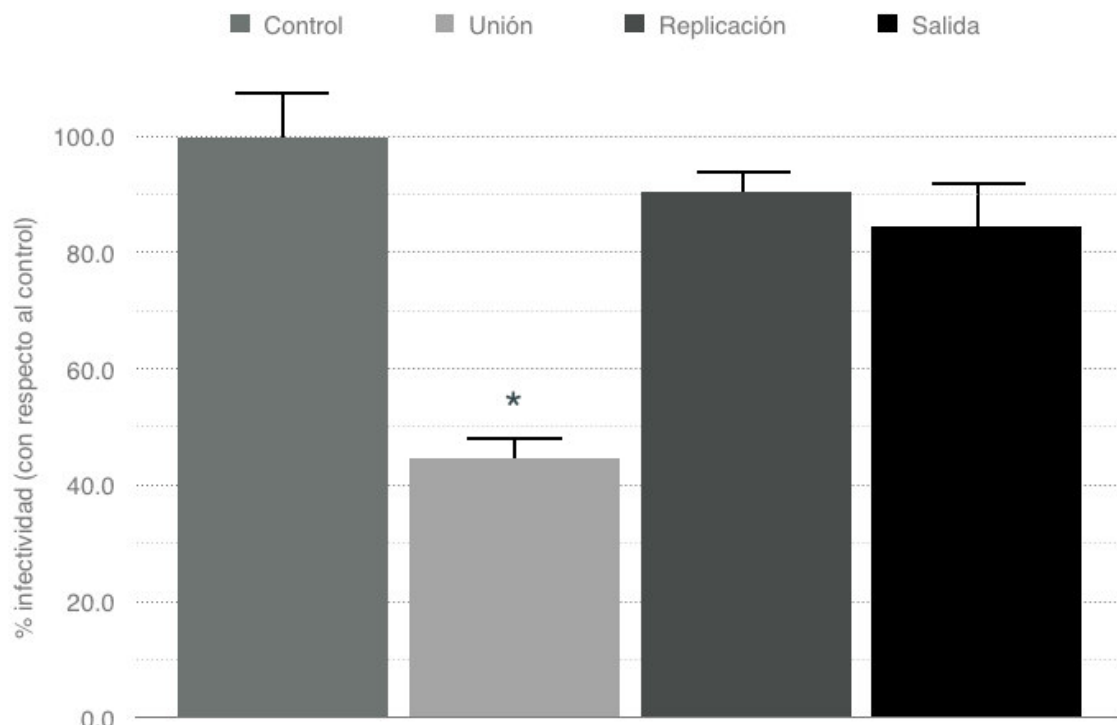
### 7.1.3 TCID50

Al comparar el porcentaje infectividad obtenido con el control del virus con el porcentaje de infectividad del virus más el extracto de *Calea ternifolia* en tres diferentes condiciones determinado por TCID50, se observó que el porcentaje durante la unión era de 44.7%, lo cual es consistente con los resultados obtenidos para el ensayo en placa mientras que para la replicación y la salida del virus es de 90.4% y 84.5% respectivamente (Tabla 3 y Figura 32). Se encontró que la unión tiene una diferencia estadística de  $p=0.01$ .

Medición	Control	Unión	Replicación	Salida
1	1.76	0.72	1.48	1.41
2	1.69	0.74	1.6	1.56
3	1.83	0.83	1.53	1.33
4	1.56	0.77	1.57	1.48
X	1.71	0.77	1.55	1.45
% infectividad 1	102.9	42.1	86.5	82.5
% infectividad 2	98.8	43.3	93.6	91.2
% infectividad 3	107.0	48.5	89.5	77.8
% infectividad 4	91.2	45.0	91.8	86.5
% infectividad X	100.0	44.7	90.4	84.5
Desv est	6.74	2.80	3.04	5.74
F ANOVA	215.71 (1,3)	290.18*	6.07	7.41

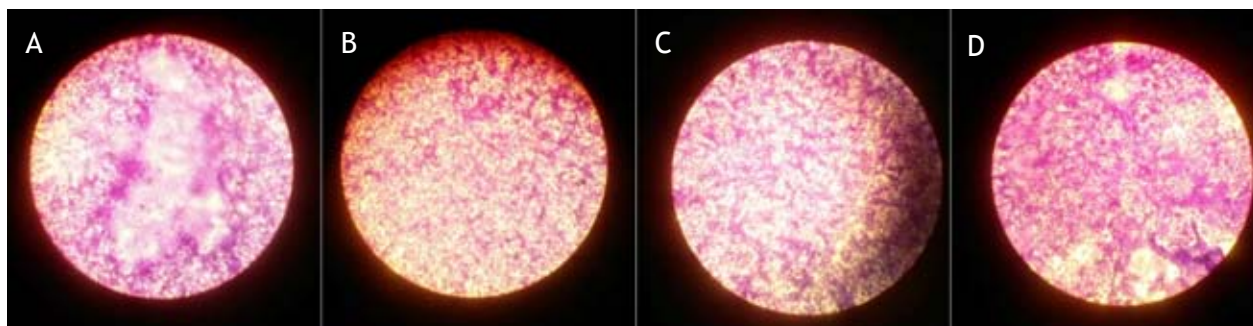
Mediciones  $\times 10^6$ . \* Diferencia estadísticamente significativa  $p=0.01$

**Tabla 3.** Resultados del TCID50 con el extracto de *Calea ternifolia*.



**Figura 32.** Resultados del ensayo en placa con el extracto de *Calea ternifolia*.

Al observar la formación de sincitios (Figura 33) se comprobó que hay una disminución en la unión con respecto al control, sin embargo en la replicación y en la salida no se observó una disminución significativa de ellos. Con estos resultados se confirma que el extracto de *Calea ternifolia* tiene una actividad durante la unión de la célula y el virus.



**Figura 33.** Formación de sincitios del TCID50 con el extracto de *Calea ternifolia* en la dilución 1:27.

A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.



## 7.2 AGAVE TOBALA

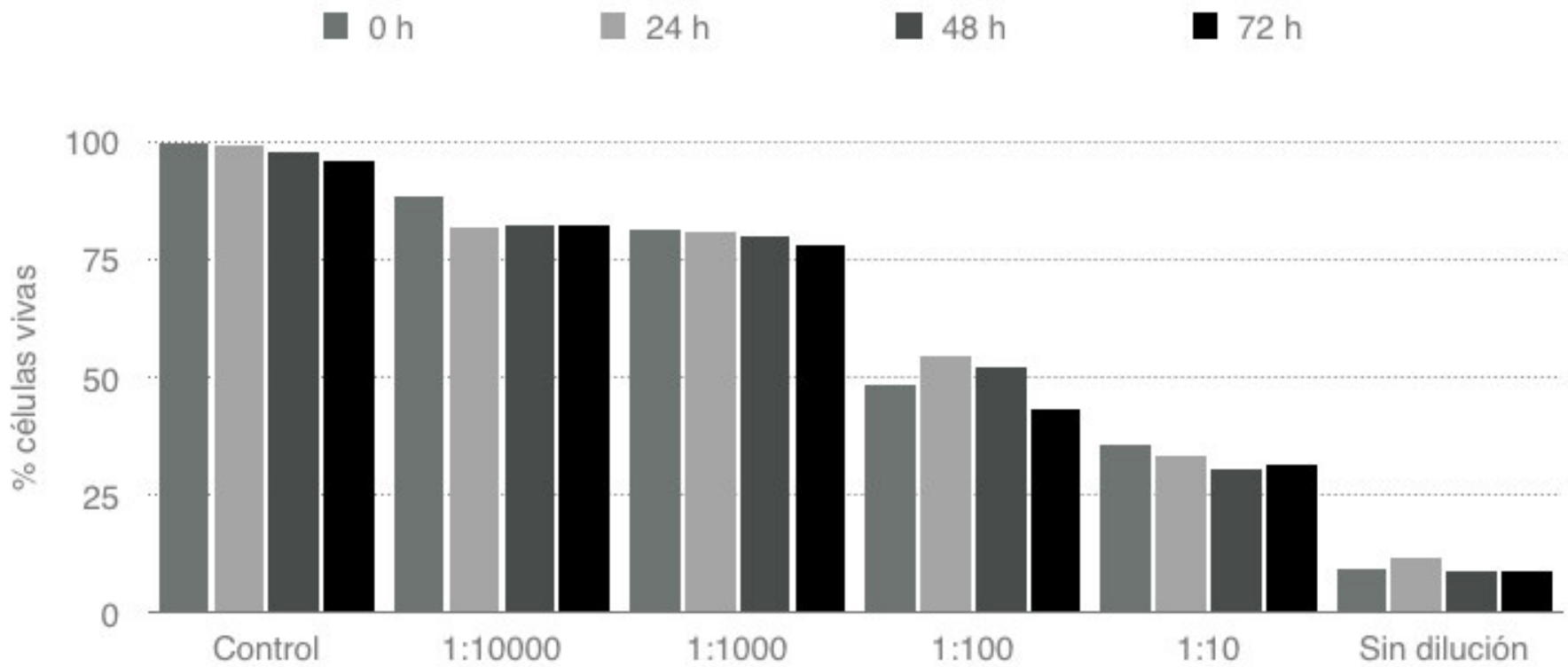
### 7.2.1 ENSAYO DE INOCUIDAD

Al realizar el ensayo de inocuidad para el extracto de *Agave tobala* se encontró que el número de células no viables disminuye conforme se aumenta la dilución del extracto. La viabilidad celular disminuye significativamente en presencia del extracto concentrado (menos del 10% en promedio) (Tabla 4).

En las diluciones 1:10 000 y 1:1 000 se encontró que el promedio de las células viables a lo largo de 72 horas era mayor al 80% (Figura 34) por lo que se decidió que la dilución 1:1000 era la dilución del extracto que se utilizaría en los ensayos posteriores por tener una concentración mayor de los compuestos polifenólicos.

% células vivas				
	0 h	24 h	48 h	72 h
Control	100	99	97.9	96
1:10000	88.4	82	82.3	82.3
1:1000	81.4	80.7	80.1	78.1
1:100	48.5	54.3	52.1	43.4
1:10	35.7	33.4	30.5	31.5
Sin dilución	9.6	11.8	8.7	9

**Tabla 4.** Resultados de los ensayos de citotoxicidad celular en HEP-2. En color gris oscuro se marca la dilución elegida para realizar los ensayos posteriores con el extracto de *Agave tobala*.



**Figura 34.** Resultados de los ensayos de citotoxicidad celular con el extracto de *Agave tobala* donde se observa que la dilución que menos citotoxicidad ocasiona es la dilución 1:1000.

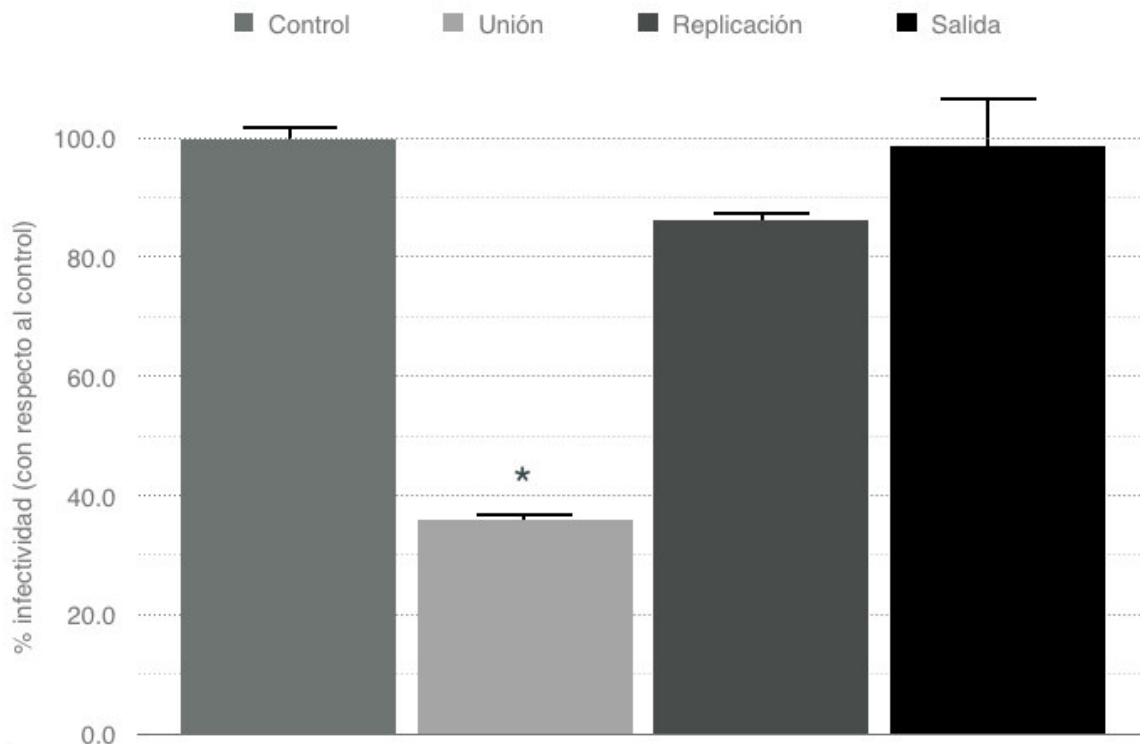
## 7.2.2 ENSAYO EN PLACA

Al comparar el porcentaje de infectividad obtenido con el control del virus con el porcentaje de infectividad del virus más el extracto de *Agave tobala* en tres diferentes condiciones en el ensayo en placa, se observó que el porcentaje de infectividad durante la unión es bastante más bajo (35.9%) mientras que para la replicación y la salida del virus es de 86.2% y 98.6% respectivamente (Tabla 5 y Figura 35). Se encontró que la unión tiene una diferencia estadística de  $p=0.01$ .

Medición	Control	Unión	Replicación	Salida
1	8.06	2.80	6.46	7.08
2	7.93	2.93	6.93	8.06
3	7.53	2.67	6.73	7.93
4	7.73	2.80	6.80	7.73
X	7.81	2.80	6.73	7.70
% infectividad 1	103.2	35.9	82.7	90.7
% infectividad 2	101.5	37.5	88.7	103.2
% infectividad 3	96.4	34.2	86.2	101.5
% infectividad 4	99.0	35.9	87.1	99.0
% infectividad X	100.0	35.9	86.2	98.6
Desv est	2.97	1.36	2.54	5.57
F ANOVA	215.71 (1,3)	3284.30*	37.20	0.14

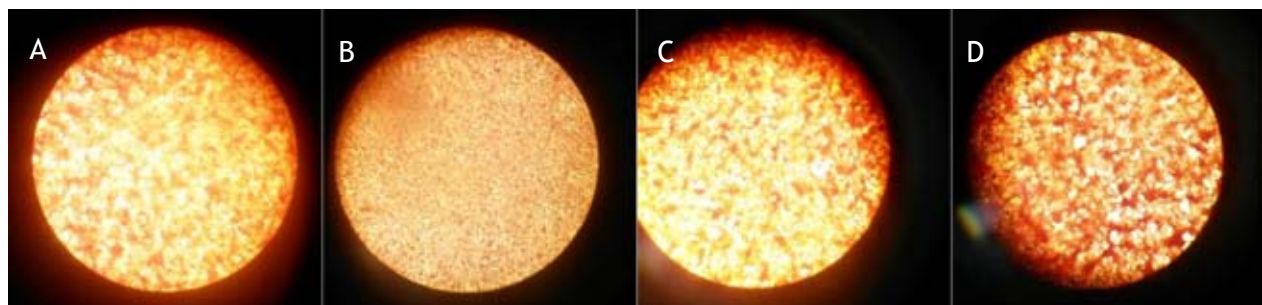
Mediciones  $\times 10^2$ . \* Diferencia estadísticamente significativa  $p=0.01$

**Tabla 5.** Resultados del ensayo en placa con el extracto de *Agave tobala*.



**Figura 35.** Resultados del ensayo en placa con el extracto de *Agave tobala*.

Respecto al efecto del tratamiento sobre la formación de sincitios (Figura 36) los resultados obtenidos mostraron una disminución en el número de éstos durante el ensayo de unión, mientras que en la replicación y en la salida no se observó una disminución significativa de ellos. Estos resultados sugieren que el extracto de *Agave tobala* tiene una actividad durante la unión de la célula y el virus



**Figura 36.** Formación de sincitios del ensayo en placa con el extracto de *Agave tobala* en la dilución 1:100.

A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

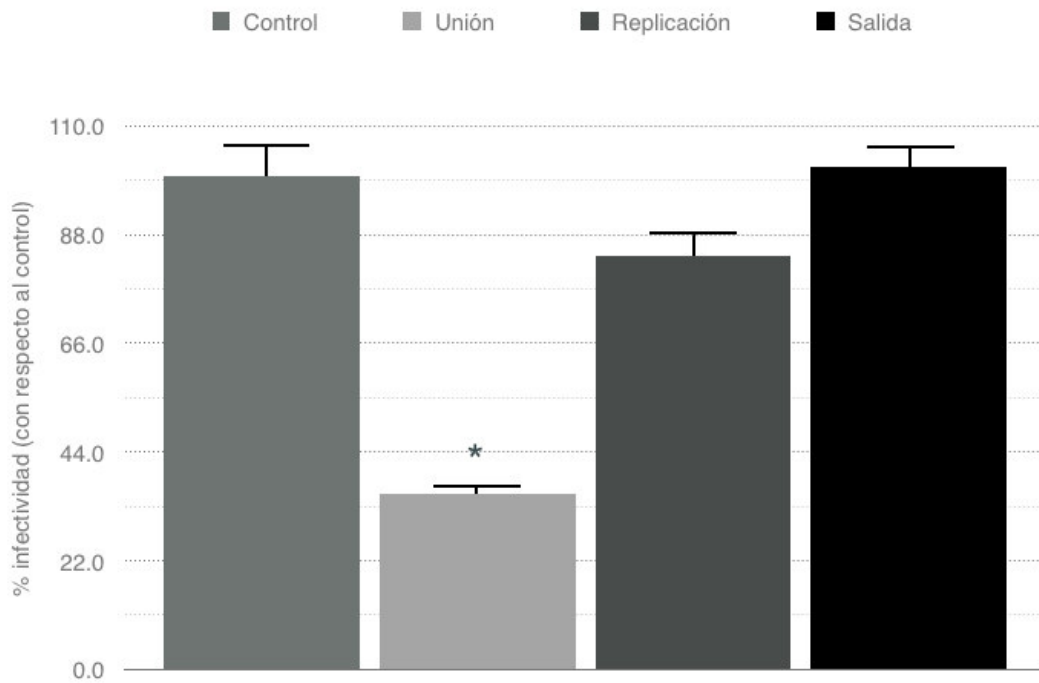
### 7.2.3 TCID50

El efecto del tratamiento con el extracto de *Agave tobala* se determinó sobre el título viral determinado por TCID50. Los resultados obtenidos mostraron que, al comparar el porcentaje de infectividad obtenido con el control del virus con el porcentaje de infectividad del virus tratado con el extracto de *Agave tobala* en tres diferentes condiciones, se obtiene que el porcentaje durante la unión disminuye a 35.5%, lo cual es consistente con los resultados obtenidos para el ensayo en placa mientras que para la replicación y la salida del virus es de 83.8% y 101.8% respectivamente (Tabla 6 y Figura 37). Se encontró que la unión tiene una diferencia estadística de  $p=0.01$ .

Medición	Control	Unión	Replicación	Salida
1	1.76	0.57	1.37	1.70
2	1.69	0.61	1.42	1.75
3	1.83	0.65	1.53	1.69
4	1.56	0.60	1.41	1.82
X	1.71	0.61	1.43	1.74
% infectividad 1	102.9	33.3	80.1	99.4
% infectividad 2	98.8	35.7	83.0	102.3
% infectividad 3	107.0	38.0	89.5	98.8
% infectividad 4	91.2	35.1	82.5	106.4
% infectividad X	100.0	35.5	83.8	101.8
Desv est	6.74	1.93	4.01	3.48
F ANOVA	215.71 (1,3)	419.14*	31.43	0.12

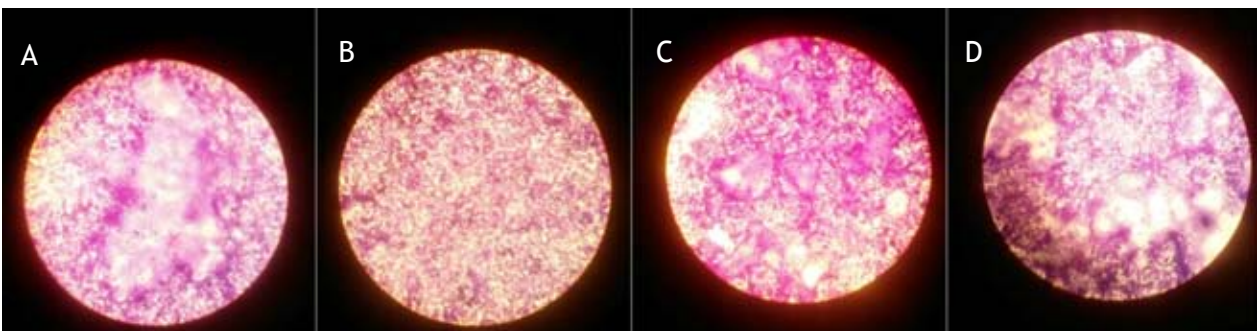
Mediciones  $\times 10^6$ . \* Diferencia estadísticamente significativa  $p=0.01$

**Tabla 6.** Resultados del TCID50 con el extracto de *Agave tobala*.



**Figura 37.** Resultados del TCID50 con el extracto de *Agave tobala*.

Al observar la formación de sincitios (Figura 38) se comprobó que hay una disminución en la unión con respecto al control, sin embargo en la replicación y en la salida no se observó una disminución significativa de ellos. Al obtener estos resultados se confirma que el extracto de *Agave tobala* tiene una actividad durante la unión de la célula y el virus.



**Figura 38.** Formación de sincitios del TCID50 con el extracto de *Agave tobala* en la dilución 1:27.

A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

Con estos estudios se demuestra que los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala* inhiben con eficacia la formación de sincitios en las células HEp-2 ocasionados por una infección de MPV fusogénico al evitar la unión y/o internalización del virus a la célula.

Esto puede ser debido a inhibición de la unión de la proteína G a la célula o evitando la internalización llevada a cabo por la proteína F. Sería necesario encontrar un mecanismo de acción para observar sobre cuál de estas etapas del ciclo viral es donde se presenta la actividad antiviral y si ésta reside en la unión a una proteína, modificando su configuración espacial, o en la unión a un receptor, en el que alguno de los compuestos de los extractos actúa como antagonista competitivo.

En otros estudios con extractos (71, 72) se ha demostrado, mediante un estudio western blot sobre la proteína F en células infectadas y tratadas con el virus, que la presencia de la proteína disminuye e incluso desaparece al aumentar la concentración de los extractos. Los extractos utilizados no fueron caracterizados pero, por su método de extracción se sabe que contienen una alta concentración de compuestos polifenólicos, los cuales también se encuentran en los extractos empleados en este trabajo, por lo que este ensayo podría servir como una guía para establecer sobre qué proteína se encuentra el efecto.

### **7.3 ENSAYOS DE SINERGISMO**

Después de comprobar que ambos extractos tienen actividad antiviral durante la unión del virus a la membrana celular se propuso evaluar la efectividad de los dos extractos utilizados al mismo tiempo sobre la infección de MPV para observar si esta actividad se veía potenciada o si se encontraba una actividad durante las otras etapas del ciclo del virus.

### 7.3.1 ENSAYO EN PLACA

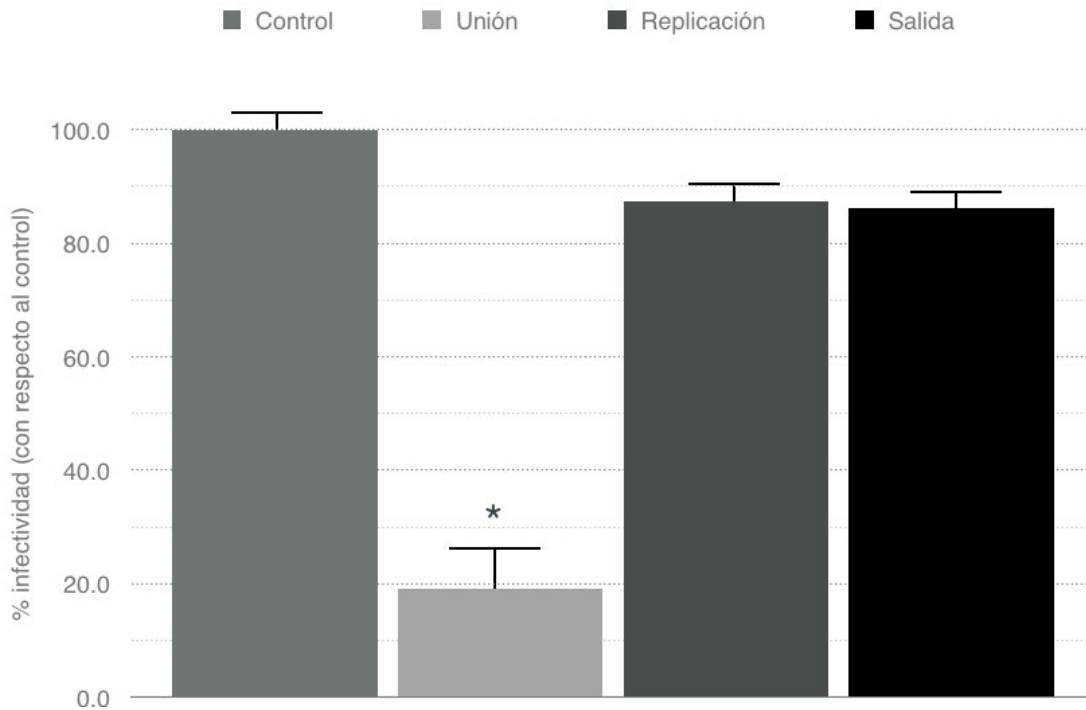
Al probar ambos extractos para evaluar un posible sinergismo se observó que el porcentaje infectividad que se obtuvo con el control del virus comparado con el porcentaje de infectividad del virus en tres diferentes condiciones en el ensayo en placa se encontró que el porcentaje durante la unión disminuye con respecto a los ensayos con cada uno de los extractos solos (19.1%). Para la replicación y la salida se observó que también disminuye, aunque no significativamente (87.4% y 86.2% respectivamente)(Tabla 7 y Figura 39). Se encontró que la unión tiene una diferencia estadística de  $p=0.01$ .

Medición	Control	Unión	Replicación	Salida
1	8.06	1.08	6.66	6.46
2	7.93	1.93	7.06	6.93
3	7.53	1.15	6.73	6.80
4	7.73	1.80	6.86	6.73
X	7.81	1.49	6.83	6.73
% infectividad 1	103.2	13.8	85.3	82.7
% infectividad 2	101.5	24.7	90.4	88.7
% infectividad 3	96.4	14.7	86.2	87.1
% infectividad 4	99.0	23.0	87.8	86.2
% infectividad X	100.0	19.1	87.4	86.2
Desv est	2.97	5.60	2.25	2.54
F ANOVA	215.71 (1,3)	4685.63*	49.48	34.06

Mediciones  $\times 10^2$ . \* Diferencia estadísticamente significativa  $p=0.01$

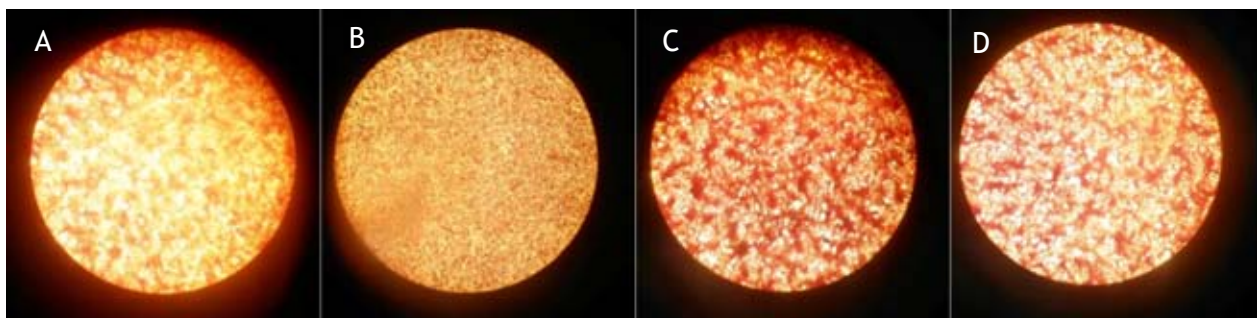
**Tabla 7.** Resultados del ensayo en placa con los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala*.





**Figura 39.** Resultados del ensayo en placa con los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala*.

Al observar la formación de sincitios (Figura 40) se comprobó que hay una disminución en la unión con respecto al control y a la unión de cada uno de los extractos, sin embargo en la replicación y en la salida no se observó una disminución significativa de ellos. Estos resultados dan un indicio que, al utilizar el extracto de *Calea ternifolia* junto con el extracto de *Agave tobala* se presenta un sinergismo de la actividad antiviral durante la unión de la célula y el virus.



**Figura 40.** Formación de sincitios del ensayo en placa con los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala* en la dilución 1:100.

A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

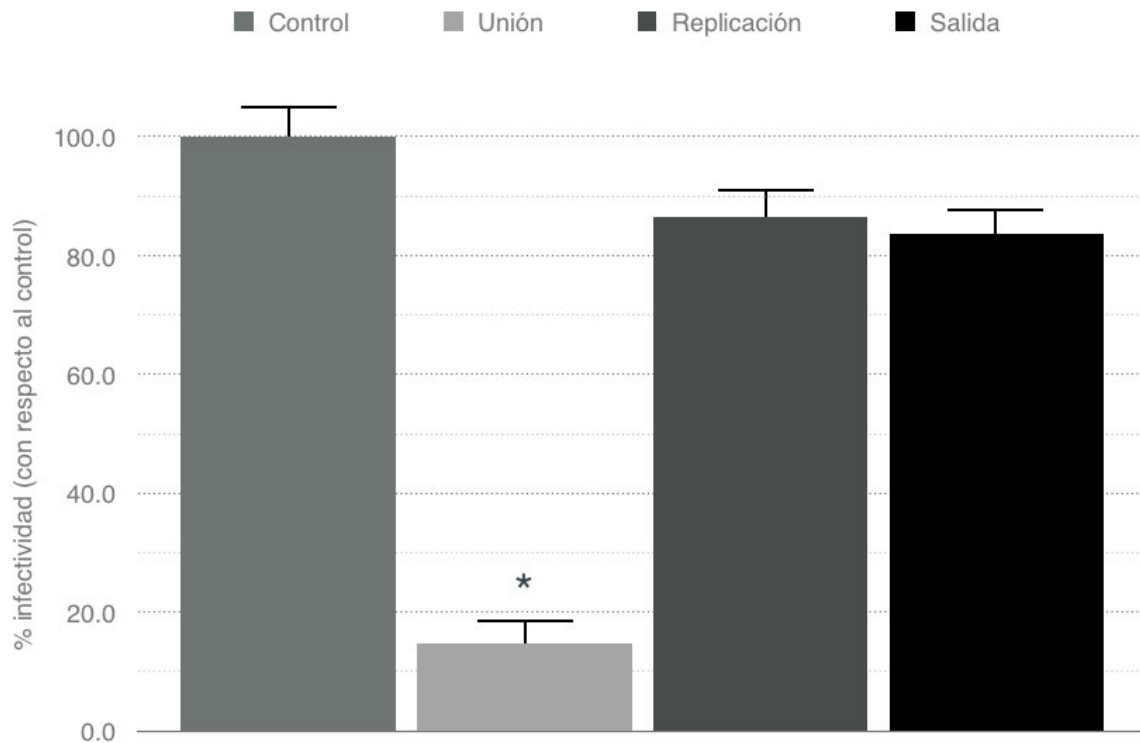
### 7.3.2 TCID50

De igual manera, se determinó el efecto sinérgico de los extractos sobre la disminución del título viral evaluado por TCID50. Al comparar el porcentaje de infectividad obtenido con el control del virus con el porcentaje de infectividad del virus más los extractos de *Calea ternifolia* y de *Agave tobala* en tres diferentes condiciones, se observó que el porcentaje de infectividad durante la unión (14.6%) es menor tanto para el control como para los porcentajes obtenidos al utilizar los extractos por separado. Para la replicación y la salida los porcentajes de infectividad fueron de 86.4% y 83.6% respectivamente, lo cual es consistente con los porcentajes obtenidos en el ensayo en placa (Tabla 8 y Figura 41). Se encontró que la unión tiene una diferencia estadística de  $p=0.01$ .

Medición	Control	Unión	Replicación	Salida
1	1.76	0.25	1.49	1.36
2	1.69	0.35	1.47	1.48
3	1.83	0.22	1.58	1.54
4	1.56	0.18	1.37	1.34
X	1.71	0.25	1.48	1.43
% infectividad 1	102.9	14.6	87.1	79.5
% infectividad 2	98.8	20.5	86.0	86.5
% infectividad 3	107.0	12.9	92.4	90.1
% infectividad 4	91.2	10.5	80.1	78.4
% infectividad X	100.0	14.6	86.4	83.6
Desv est	6.74	4.24	5.04	5.61
F ANOVA	215.71 (1,3)	575.87*	171.67	39.94

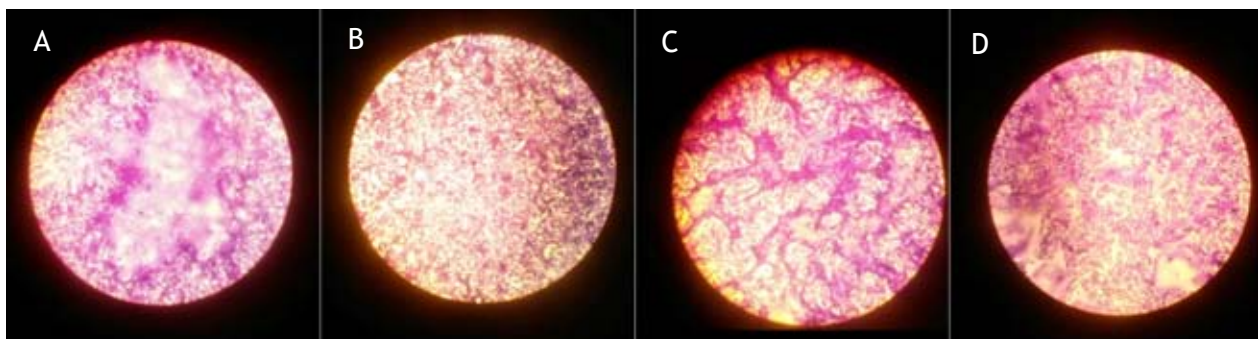
Mediciones  $\times 10^6$ . \* Diferencia estadísticamente significativa  $p=0.01$

**Tabla 8.** Resultados del TCID50 con los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala*.



**Figura 41.** Resultados del TCID50 con los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala*.

El efecto del sinergismo de los extractos sobre la infectividad puede ser observado sobre la disminución de la formación de sincitios. Al observar la formación de sincitios (Figura 42) se puede apreciar que hay una disminución en la unión del virus a la célula al utilizar ambos extractos con respecto al control y a cada uno de los extractos por separado, mas en la replicación y en la salida no se observó una disminución en la formación de ellos. Al obtener estos resultados se confirma que el uso del extracto de *Calea ternifolia* junto con el extracto de *Agave tobala* presentan una sinergismo de la actividad antiviral durante la unión de la célula y el virus.



**Figura 42.** Formación de sincitios del TCID50 con los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala* en la dilución 1:27.

A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

Al observar un aumento de la actividad antiviral sobre la infección de MPV fusogénico se puede inferir que:

- Los polifenoles extraídos de los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala* son diferentes en sus estructuras moleculares.
- Las concentraciones obtenidas de los compuestos polifenólicos son diferentes en cada extracto.

Sería interesante conocer cuáles son los compuestos presentes en cada uno de los extractos, la fórmula química de cada uno de los compuestos y el arreglo en el espacio de los compuestos para tener mayor información con respecto a su mecanismo de acción. Si los compuestos son los mismos, se puede explicar que ambos extractos tengan actividad durante la unión y/o internalización. Si los compuestos no son los mismos puede indicar que hay diferentes polifenoles capaces de alterar la unión del virus a la célula, lo cual podría beneficiar inclusive a otros virus de la misma familia que MPV, como el virus respiratorio sincial y el virus de parainfluenza humana.

## **7.4 RIBAVIRINA**

La ribavirina se utilizó como un fármaco de control interno porque se sabe que tiene una actividad antiviral en la familia de los paramyxovirus, incluido MPV, para comparar su eficacia con la de los extractos utilizados.

### **7.4.1 ENSAYO EN PLACA**

Al comparar los porcentajes de infectividad obtenidos con el control del virus con los porcentajes de infectividad del virus más la ribavirina a una concentración de 22 µg/mL en tres diferentes condiciones por ensayo en placa, se observó que el porcentaje durante la unión disminuye a 75.7% con respecto al control del virus, sin alcanzar a tener una diferencia estadísticamente

significativa con  $p=0.01$ , mientras que al comparar los porcentajes de infectividad durante la replicación y en la salida con respecto al control ambos se mantienen arriba del 90% (96.1% y 97% respectivamente) (Tabla 9 y Figura 43).

Medición	Control	Unión	Replicación	Salida
1	8.06	5.73	7.73	7.56
2	7.93	5.93	7.73	7.08
3	7.53	5.73	7.04	7.93
4	7.73	6.25	7.51	7.73
X	7.81	5.91	7.50	7.58
% infectividad 1	103.2	73.4	99.0	96.8
% infectividad 2	101.5	75.9	99.0	90.7
% infectividad 3	96.4	73.4	90.1	101.5
% infectividad 4	99.0	80.0	96.2	99.0
% infectividad X	100.0	75.7	96.1	97.0
Desv est	2.97	3.14	4.17	4.65
F ANOVA	215.71 (1,3)	113.09	19.99	0.73

Mediciones  $\times 10^2$ . \* Diferencia estadísticamente significativa  $p=0.01$

Tabla 9. Resultados del ensayo en placa con el ribavirina.

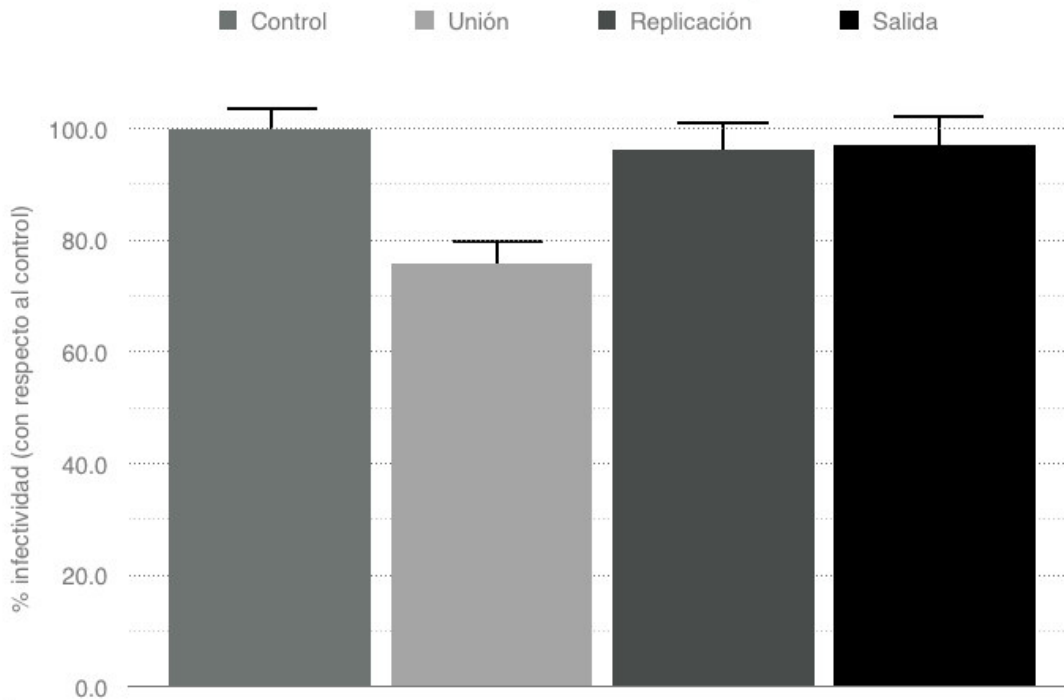
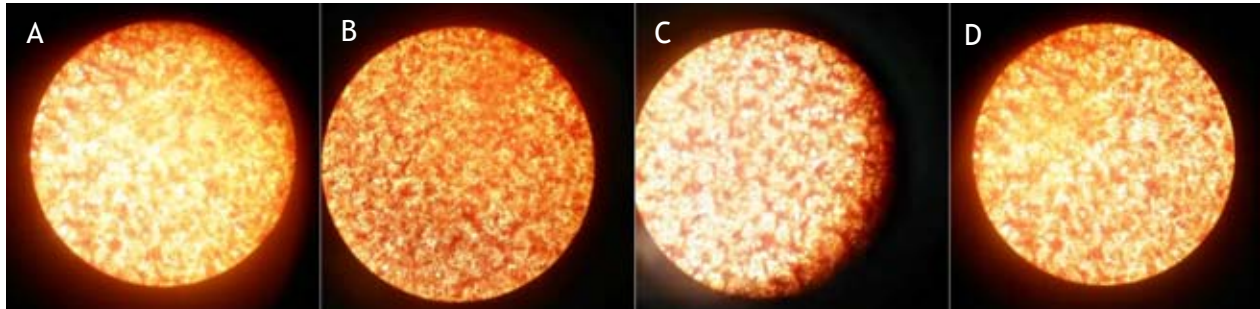


Figura 43. Resultados del ensayo en placa con ribavirina.

Se observó que la formación de sincitios al adicionar ribavirina (Figura 44) disminuyó un poco con respecto al control en la unión, mientras que en la replicación y en la salida no se observó una disminución significativa de ellos.



**Figura 44.** Formación de sincitios del ensayo en placa con ribavirina en la dilución 1:100.

A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

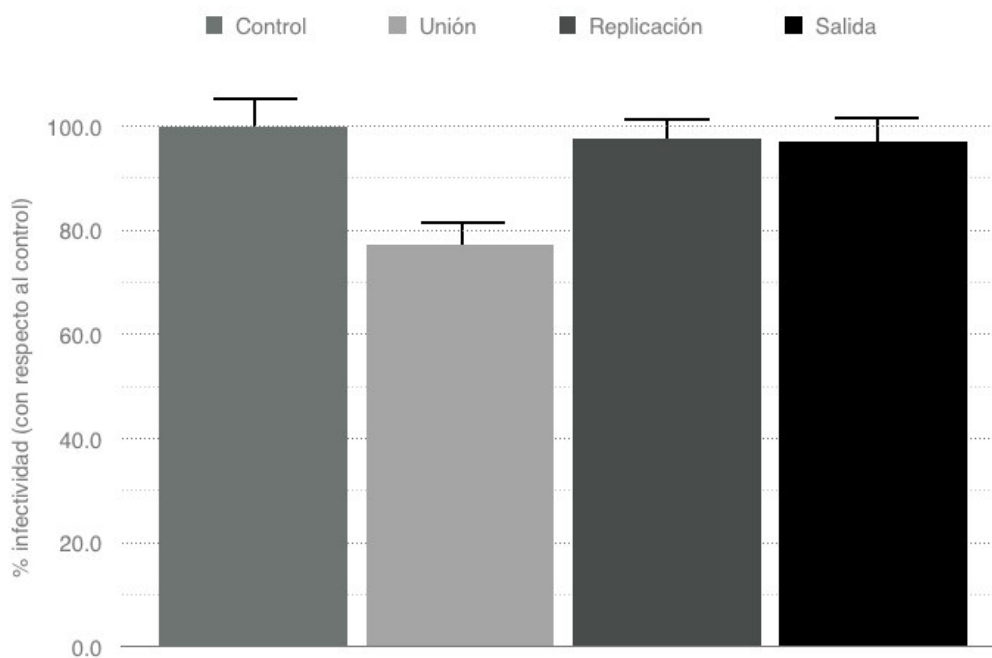
#### **7.4.2 TCID50**

Al comparar el porcentaje de infectividad obtenido con el control de MPV con el porcentaje de infectividad del virus más ribavirina en tres diferentes condiciones con la metodología de TCID50, se observó que el porcentaje durante la unión es más bajo que el control, sin embargo, no hay una diferencia estadísticamente significativa (77.2%) mientras que para la replicación y la salida del virus es de 97.5% y 97.1% respectivamente (Tabla 10 y Figura 45), lo cual es consistente con los resultados hallados en el ensayo en placa.

Medición	Control	Unión	Replicación	Salida
1	1.76	1.29	1.68	1.66
2	1.69	1.37	1.73	1.75
3	1.83	1.40	1.56	1.55
4	1.56	1.22	1.70	1.68
X	1.71	1.32	1.67	1.66
% infectividad 1	102.9	75.4	98.2	97.1
% infectividad 2	98.8	80.1	101.2	102.3
% infectividad 3	107.0	81.9	91.2	90.6
% infectividad 4	91.2	71.3	99.4	98.2
% infectividad X	100.0	77.2	97.5	97.1
Desv est	6.74	4.75	4.36	4.85
F ANOVA	215.71 (1,3)	117.35	0.22	0.34

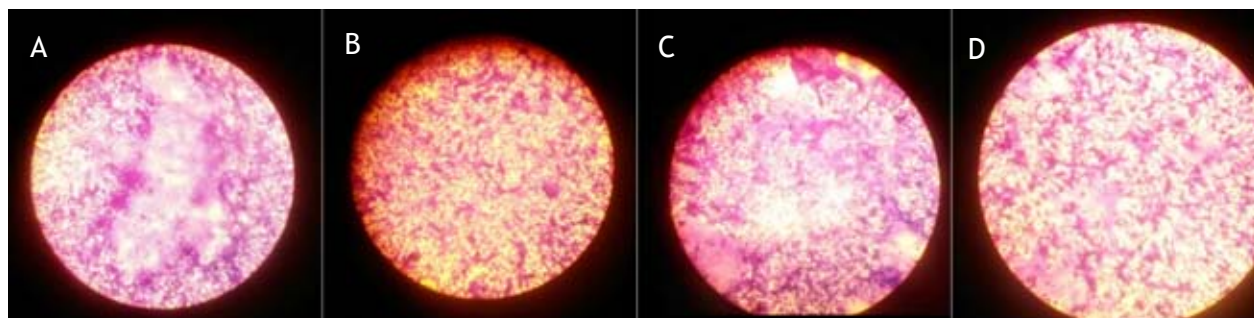
Mediciones  $\times 10^6$ . \* Diferencia estadísticamente significativa  $p=0.01$

**Tabla 10.** Resultados del TCID50 con ribavirina.



**Figura 45.** Resultados del TCID50 con ribavirina.

Al observar la formación de sincitios (Figura 46) se puede apreciar que hay una disminución en la unión con respecto al control y a la unión de del virus más la ribavirina aunque la disminución es muy baja, mientras que en la replicación y en la salida no se observó una disminución en la formación de ellos.



**Figura 46.** Formación de sincitios del TCID50 con ribavirina en la dilución 1:27.

A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

Se observa que la ribavirina tiene una disminución menor de los sincitios durante la unión del virus a la célula tanto en el ensayo en placa como en el TCID50 con respecto a los extractos utilizados. Esto nos indica que la potencia de los extractos es mucho mayor y puede ser debida a la alta concentración de polifenoles con una estructura diferente a la ribavirina. Sin embargo, se sabe que esta molécula tiene una actividad inhibitoria de varios virus respiratorios durante la replicación de ellos (84).

Esta actividad no fue observada en ninguna de las metodologías, por lo tanto, no hay que descartar que los extractos no tengan actividad durante esta etapa al no observar disminución del efecto citopático y, en consecuencia, del título viral, si no encontrar otra metodología que permita evaluar la etapa de una manera más confiable.



Una de las metodologías posibles es probar un ensayo por PCR transcriptasa reversa (85, 86) donde se analice el comportamiento de alguno de los genes de las proteínas que se sabe que tienen un papel importante durante la replicación (M2-2, N, M) mediante el uso de oligonucleótidos específicos para observar si la producción de dicha proteína se reduce y así comprobar si hay o no actividad antiviral de los extractos durante la replicación.

## 8. CONCLUSIONES

Estos resultados indican que tanto el extracto de *Calea ternifolia* como *Agave tobala* presentan una actividad antiviral sobre la infección de MPV *in vitro*. Se encontró que para ambos extractos no hay una citotoxicidad para la línea celular HEP-2, que representa el tracto respiratorio, al utilizar diluciones muy bajas de ellos, siendo menor la dilución para el extracto de *Calea ternifolia* (1:10000) y un poco mayor para el extracto de *Agave tobala* (1:1 000) , lo cual podría aumentar el riesgo de daño celular al ingerirlo, sin embargo, se encontró que a una dilución inocua se logra todavía un efecto antiviral.

Al evaluar tres de las etapas del ciclo viral (unión, replicación y salida) se observó un mayor efecto antiviral durante la unión a la célula para ambos extractos, lo cual indica que hay una interacción durante la unión y/o la entrada del virus. No se observó una disminución del efecto citopático durante la replicación o la salida.

Al evaluar los extractos al mismo tiempo se encontró un sinergismo durante la unión del virus a la célula, esto indica que hay una diferencia de compuestos polifenólicos o de concentraciones de los mismos en los extractos lo cual potencia su actividad antiviral.

Al comparar el efecto de la ribavirina con el de los extractos se observó que la ribavirina tiene un menor efecto que el de los extractos, tanto separados como juntos. Sin embargo, se sabe que la ribavirina tiene un efecto sobre la replicación del virus, por lo que, al no encontrar una actividad antiviral durante esta etapa de ninguna de las soluciones evaluadas, no se puede descartar que no haya actividad antiviral de los extractos en la replicación del virus por lo que se tendrán que realizar los ensayos pertinentes para evaluarla de una mejor manera.

## 9. PERSPECTIVAS

Para este trabajo se plantea encontrar cuál o cuáles son los compuestos que están llevando a cabo el efecto antiviral y elucidar un mecanismo de acción para determinar sobre qué proteína tienen su acción (F o G) y si es sobre la proteína o sobre su receptor en la célula.

Al no encontrar un efecto durante la replicación del virus con la ribavirina cuando se sabe que sí lo hay, no se puede descartar que no haya efecto de los extractos durante esta etapa por lo que, para determinar el efecto de los extractos sobre esta etapa es necesario llevar a cabo ensayos moleculares por PCR-RT con alguna de las proteínas que involucradas en la transcripción del virus (M2-2, N, M) para determinar si hay o no efecto antiviral durante la replicación del virus al observar cómo se afecta la expresión de los genes virales.

Es importante probar los extractos con todas las cepas posibles de MPV, incluyendo las que se encuentran a partir de muestras clínicas, así como de otros virus respiratorios para evaluar si en ellos también se presenta una actividad antiviral como en el virus respiratorio sincicial o el virus de parainfluenza humana que pertenecen a la misma familia viral y son otras de las causas más frecuentes de infecciones agudas del tracto respiratorio bajo.

## 10. REFERENCIAS

1. Williams, JV, Harris, PA, Tollefson, SJ, et al, Human Metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children, *The New England Journal of Medicine*, 2004 (350) 443-450.
2. Shwarze, J, O'Donnel, DR, Rohwedder, MA, Openshaw, PJ, Latency and persistence of respiratory tract viruses, *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 2004 (169) 800-806.
3. Knipe, David M, et al, *Fields Virology*, 5ª edición, Lippincot Williams & Wilkins, Estados Unidos, 2007, 5310-5648.
4. Peret, TC, Biovin, G, Li, Y, et al, Characterization of human Metapneumovirus isolated from patients in North America, *Journal of Infectology Diseases*, 2002 (185) 1660-1663.
5. Van den Hoogen, BG, Bestebroen, TM, Osterhaus, AD, Fouchier, RA, Analysis of genomic sequence and structure of human metapneumovirus, *Virology*, 2002 (295) 119-132.
6. Van den Hoogen, BG, de Jong, JC, Groen, J, et al, A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease, *Nature Medical*, 2001 (7) 719-724.
7. Barr, J, Chambers, P, Pringle, CR, Easton, AJ, Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparison suggests structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses, *Journal of Genomic Virology*, 1991, (72) 677-685.
8. Garcia, J, Garcia-Barrero, B, Vivo, A, Melero, JA, Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein, *Virology*, 1993 (195) 243-247.
9. Collins, PL, Hill, MG, Cristina, J, Grosfeld, H, Transcription elongation factor of respiratory viruses: non segmented negative strand RNA viruses, *National Academy of Science of United States of America*, 1996 (93) 81-85.
10. Protein Data Bank: [www.rcsb.org/pdb/home/home.do](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)
11. Dupuy, LC, Dobson, S, Bitko, V, Barik, S, Casein kinase 2 mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation

- activity of the viral polymerase: phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser(215) and is without effect, *Journal of Virology*, 1993 (73) 8384-8392.
12. Lu, B, Ma, CH, Brazas, R, Jin, H, The major phosphorylation sites of the respiratory syncytial virus phosphoprotein are dispensable for virus replication in vitro, *Journal of Virology*, 2002 (76) 10776-10784.
  13. Stec, DS, Hill, MG, Collins, PL, Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative strand viruses, *Virology*, 1991 (183) 273-287.
  14. Teng, MN, Collins, PL, Altered growth characteristics of recombinant respiratory viruses which do not produce NS2 protein, *Journal of Virology*, 1999 (73) 466-473.
  15. Henderson, G, Murray, J, Yeo, RP, Sorting of respiratory viruses matrix protein into detergent resistant structures is dependent on cell-surface expression of the glycoproteins, *Virology*, 2002 (300) 244-254.
  16. Biacchesi, S, Skiadopoulos, MH, Biovin, G, et al, Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups, *Virology*, 2003 (315) 1-9.
  17. Biacchesi, S, Skiadopoulos, MH, Yang, L, et al, Recombinant human metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate, *Journal of Virology*, 2004 (78) 12877-12887.
  18. Biacchesi, S, Pham, QN, Skiadopoulos, MH, Murphy, BR, Collins, PL, Buchholz, UJ, Infection of non-human primates with recombinant metapneumovirus lacking the SH, G or M2-1 protein categorizes each as a non essential accessory protein and identifies vaccine candidates, *Journal of Virology*, 2005 (79) 12608-12613.
  19. Schickli, JH, Kaur, J, Ulbrandt, N, Spcete, RR, Tang, RS, A S101P substitution in the putative cleavage motif of the human metapneumovirus fusion protein is a major determinant for trypsin-independent growth in vero cells and does not alter tissue tropism in hamsters, *Journal of Virology*, 2005 (79) 10678-10689.
  20. Cox, RG, Breant-Livesay, S, Johnson, M, Ohi, MD, Williams, JV, The human metapneumovirus fusion protein mediates entry via interaction with RGD-binding integrins, *Journal of Virology*, 2012 (86) 12148-12160.
  21. Herfst, S, De Graff, M, Schickli, JK, et al, Recovery of human metapneumovirus genetic lineages A and B from cloned cDNA, *Journal of Virology*, 2004 (78) 8264-8270.

22. Barik, S, The structure of the 5' terminal Cap of the respiratory syncytial virus mRNA, *Journal of Genomic Virology*, 1993 (74) 485-490.
23. Bukreyev, A, Whitehead, SS, Bukreyeva, N, Murphy, BR, Collins, PL, Interferon  $\gamma$  expressed by recombinant respiratory syncytial virus attenuates virus replication in mice without compromising immunogenicity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999 (96) 2367-2372.
24. Kochva, U, Leonov, H, Arkin, IT, Modeling the structure of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein by silent-mutation analysis of global searching molecular dynamics, *Protein Science*, 2003 (12) 2668-2674.
25. Zlateva, KT, Lemey, P, Vandamme, AM, Van Ranst, M, Molecular evolution and circulation patterns of human metapneumovirus subgroup A: positively selected sites in the attachment G glycoprotein, *Journal of Virology*, 2004 (78) 4675-4683.
26. Schwarze, J, Hamelmann, E, Bradley, KL, Takeda, K, Gelfand, EW, Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T-cell immunity, *American Journal of Critical Care Medicine*, 2004 (169) 801-805.
27. Kallewaard, NL, Bowen, AL, Crowe Jr, JE, Cooperativity of actin and microtubule elements during replication of respiratory syncytial virus, *Virology*, 2005 (331) 73-81.
28. Mastrorade, J, He, B, Monick, MM, Mukaida, N, Matsushima, K, Hunninghake, Gw, Induction of interleukin IL-8 gene expression by respiratory syncytial virus involves activation of nuclear factor (NF)-kappa B and NF-IL-6, *Journal of Infectious Diseases*, 1996 (174) 262-267.
29. Martínez, FD, Morgan, WJ, Wright, AL, Holberg, C, Taussig, CM, Initial airway function is a risk factor for recurrent wheezing respiratory illnesses during the first three years of life, *American Review of Respiratory Diseases*, 1991 (143) 312-316.
30. Mason, SW, Aberg, E, Lawetz, C, DeLong, R, Whitehead, P, Liuzzi, M, Interaction between human respiratory syncytial virus (RSV) M2-1 and zp proteins is required for reconstitution of M2-1-dependent RSV minigenome activity, *Journal of Virology*, 2003 (77) 10670-10676.
31. Hall, CB, Douglas Jr, RG, Schnabel, KC, Geiman, JM, Infectivity of respiratory syncytial virus by various routes of inoculation, *Infection and Immunity*, 1981 (33) 779-783.
32. Kapikian, AZ, Bell, JA, Mastrotta, FM, et al, An outbreak of febrile illness and pneumonia associated with respiratory infections, *American Journal of Hygiene*, 1991 (75) 243-248.

33. Teng, MN, Whitehead, SS, Bermingham, A, et al, Recombinant respiratory syncytial virus that does not express NS1 or M2-2 is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees, *Journal of Virology*, 200 (74) 9317-9321.
34. DeVincenzo, JP, El Saleeby, CM, Bush, AJ, Respiratory virus load predicts disease severity in previously healthy infants, *Journal of Infectious Diseases*, 2005 (191) 1861-1868.
35. Guerrero-Plata, A, Casola, A, Suarez, G, et al, Differential response of dendritic cells to human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2006 (34) 320-329.
36. Heikkinen, T, Waris, M, Ruuskanen, O, Putto-Laurila, A, Mertsola, J, Incidence of acute otitis media associated with group A and B respiratory syncytial virus infection, *Acta Paediatrica*, 1995 (84) 419-423.
37. Wong, DT, Rosenband, M, Hovey, K, Ogra, PL, Respiratory syncytial virus infection in immunosuppressed animals: implications in human infection, *Journal of Medical Virology*, 1985 (17) 359-370.
38. Hall, CB, Geiman, JM, Biggar, R, Kotok, DJ, Hogan, MM, Douglas Jr, GR, Respiratory syncytial virus infections within families, *The New England Journal of Medicine*, 1976 (294) 414-419.
39. Maertzdorf, J, Wang, CK, Brown, JB, et al, Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumovirus from all known genetic lineages, *Journal of Clinical Microbiology*, 2004 (42) 981-986.
40. Hall, CB, Powell, KR, MacDonald, NE, et al, Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function, *The New England Journal of Medicine*, 1986 (315) 77-81.
41. Srikiatkachorn, A, Braciale, TJ, Virus specific CD8+ T lymphocytes down regulated T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection, *Journal of Experimental Medicine*, 1997 (186) 421-432.
42. Hussell, T, Baldwin, CJ, O'Gara, A, Openshaw, PJ, CD8+ cells control Th2-driven pathology during pulmonary respiratory syncytial virus infection, *European Journal of Immunology*, 1997 (27) 3341-3349.

43. Hussell, T, Openshaw, PJ, Intracellular IFN- $\gamma$  expression in natural killer cells precedes lung CD8+ T cells recruitment during respiratory syncytial virus infection, *Journal of General Virology*, 1998 (79) 2593-2601.
44. Graham, BS, Bunton, LA, Rowland, J, Wright, PK, Karzon, DT, Respiratory syncytial virus infection in anti-mu-treated mice, *Journal of Virology*, 1991 (65) 4936-4942.
45. Crowe Jr, JE, Murphy BR, Chanock, RM, Williamson, RA, Barbas III, CF, Burton DR, Recombinant human respiratory syncytial virus infection (RSV) monoclonal antibody Fab is effective therapeutically when introduced directly into the lungs of RSV-infected mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994 (91) 1386-1390.
46. Prince, GA, Hemming, VG, Horswood, RL, Chanock, RM, Immunoprophylaxis and immunotherapy of respiratory syncytial virus infection in the cotton rat, *Virus Research*, 1985 (3) 193-206.
47. McIntosh, K, Masters, HB, Orr, I, Chao, RK, Barkin, RM, The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants, *The Journal of Infectious Diseases*, 1987 (138) 24-32.
48. Glezen, WP, Paredes, A, Allison, JE, Taber, LH, Frank, AL, Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level, *Journal of Pediatrics*, 1991 (98) 708-715.
49. Henderson, FW, Collier, AM, Clyde Jr, WA, Denny, FW, Respiratory syncytial virus infections, reinfections, and immunity. A prospective longitudinal study in young children, *The New England Journal of Medicine*, 1989 (300) 530-534.
50. Aung, S, Tang, YW, Graham, BS, Interleukin-4 diminishes CD8+ respiratory syncytial virus-specific cytotoxic T-lymphocyte activity in vivo, *Journal of Virology*, 1999 (73) 8944-8949.
51. Tang, YW, Graham, BS, Interleukin-12 treatment during immunization elicits a T helper cell type 1-like immune response in mice challenged with respiratory syncytial virus and improves vaccine immunogenicity, *Journal of Infectious Diseases*, 1995 (172) 734-738.
52. Levy, C, Aerts, L, Hamelin, M-E, Granier, C, Szecsi, J, Lavillette, D, Boivin, G, Cosset, F-L, Virus-like particle vaccine induces cross-protection against human metapneumovirus infections in mice, *Vaccine*, 2013 (31) 2778-2785.



53. Stegmann, T, Kamphuis, T, Meijerhof, T, Goud, E, De Hann, A, Wilschut, J, Lipopeptide-  
adjuvanted respiratory syncytial virus virosomes: A safe and immunogenic non-replicating  
vaccine formulation, *Vaccine*, 2010 (28) 5543-5550.
54. Chang, J, Braciale, TS, Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8+ T-cell  
effector activity and peripheral CD8+ T-cell memory in the respiratory tract, *Nature medical*,  
2002 (8) 54-60.
55. Schlender, J, Walliser, G, Fricke, J, Conzelmann, K, Respiratory syncytial virus fusion protein  
mediates inhibition of mitogen-induced T-cell proliferation by contact, *Journal of Virology*,  
2002 (76) 1163-1170.
56. Hall, CB, Kopelman, AE, Douglas Jr, RG, Geiman, JM, Meagher, MP, Neonatal respiratory  
syncytial virus infection, *The New England Journal of Medicine*, 1989 (300) 393-396.
57. Mullins, JA, Erdman, DD, Weinberg, GA, et al, Human metapneumovirus infection among  
children hospitalized with acute respiratory illness, *Emerging Infectious Diseases*, 2004 (10)  
700-705.
58. Karron, RA, Singleton, RJ, Bulkow, L, et al, Severe respiratory syncytial virus disease in  
Alaska native children, RSV Alaska study group, *Journal of Infectious Diseases*, 1999 (180)  
41-49.
59. Greensill, J, McNamara, PS, Dove, W, Flanagan, B, Smyth, RL, Hart, CA, Human  
metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis, *Emerging Infectious  
Diseases*, 2003 (9) 372-375.
60. Williams, JV, Crowe, Jr, JE, Enriquez, R, et al, Human metapneumovirus infection plays an  
etiologic role in acute asthma exacerbation requiring hospitalization in adults, *Journal of  
Infectious Diseases*, 2005 (192) 1149-1153.
61. Falsey, AR, Erdman, DD, Anderson, LJ, Walsh, EE, Human metapneumovirus infection in  
young and elderly adults, *Journal of Infectious Diseases*, 2003 (187) 785-790.
62. Van den Hoogen, BG, De Jong, JC, Groen, J, et al, A newly discovered human pneumovirus  
isolated from young children with respiratory tract disease, *Nature Medical*, 2001 (7)  
719-724.
63. Mullins, JA, Erdman, DD, Weinberg, GA, et al, Human metapneumovirus infection among  
children hospitalized with acute respiratory illness, *Emerging Infectious Diseases*, 2004 (10)  
700-705.

64. Giezen, WP, Taber, LH, Frank, AL, Kasel, JA, Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus, *American Journal of Diseases of Children*, 1986 (140) 543-546.
65. Meissen, HC, Economic impact of viral respiratory disease in children, *Journal of Pediatrics*, 1994 (124) 517-521.
66. Sigma Aldrich: [www.sigmaaldrich.com/sigma-aldrich/home.html](http://www.sigmaaldrich.com/sigma-aldrich/home.html)
67. American Type Culture Collection: [www.atcc.org](http://www.atcc.org)
68. Roberts, SR, Compans, RW, Wertz, GW, Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells, *Journal of Virology*, 1995 (69) 2667-2673.
69. Ventre, K, Randolph, A, Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2004 (CD000181).
70. Wyde, PR, Chetty, SN, Jewell, AM, Boivin, G, Piedra, PA, Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro, *Antiviral Research*, 2003 (60) 51-59.
71. Feng, CH, Chang JS, Wang, KC, Shieh, DE, Chiang, LC, Water extract of Cinnamomum cassia blume inhibited human respiratory syncytial virus by preventing viral attachment, internalization and syncytium formation, *Journal of Ethnopharmacology*, 2013 (147) 321-326.
72. Chang, JS, Wang, KC, Shieh, DE, Chiang, LC, Liu-He-Tang inhibited plaque formation by human respiratory syncytial virus infection in cell lines of the human respiratory tract, *Journal of Ethnopharmacology*, 2011 (137) 1149-1155.
73. *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*, Secretaría de Salud, 2001, 56-57, 103-105.
74. Torres Carsi, Edgar, *Herbolaria mexicana: Enciclopedia medicinal*, Grupo Editorial Tomo, México 2008, 37-38. 112-113.
75. Hoffmann, David, *Medical Herbalism: The science and practice of herbal medicine*, Bear and Company, United States of America 2003, 337-342.
76. Zhang, L, Peeples, Me, Boucher, RC, Collins, PL, Pickles, RJ, Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells and without obvious cythopathology, *Journal of Virology*, 2002 (76) 5654-5666.

77. Chiang, LC, Chiang, W, Chang, MY, Ng, LT, Lin, CC, Antiviral activity of Plantago major extracts and related compounds in vitro, *Antiviral Research*, 2002 (55) 63-62.
78. LaBarre, DD, Lowy RJ, Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID50 and plaque assays, *Journal of Virological Methods*, 2001 (96) 107-126.
79. Empey, KM, Peebles Jr, RS, Kolls, JK, Pharmacologic advances in the treatment and prevention of respiratory syncytial virus, *Clinical Infectious Diseases*, 2010 (50) 1258-1267.
80. Smither, SJ, Lear-Rooney, C, Biggins, J, Pettitt, J, Lever, MS, Olinger Jr, GG, Comparison of the plaque assay and 50% tissue culture infectious dose assay as methods for measuring filovirus infectivity, *Journal of Virological Methods*, 2013 (193) 565-571.
81. Bushar, G, Sagripanti, JL, Method improving accuracy of virus titration: Standarization of plaque assay for Tunin virus, *Journal of Virological Methods*, 1990 (30) 99-107.
82. Malenovska, H, Virus quantitation by transmission electron microscopy, TCID50 and the role of timing virus harvesting: A case study of three animal viruses, *Journal of Virological Methods*, 2013 (191) 136-140.
83. Lee, JH, Lee, GC, Kim, Ji, Yi, HA, Lee, CH, Development of a new cell culture-based method and optimized protocol for detection of enteric viruses, *Journal of Virological Methods*, 2013 (191) 16-23.
84. Banerjee, S, Keval, R, Gakkhar, S, Modeling the dynamics of Hepatitis C virus with combined antiviral drug therapy interferon and ribavirin, *Mathematical Biosciences*, 2013 (245) 235-248.
85. Stock, R, Harste, G, Madisch, I, Heim, A, A rapid quantitative PCR-based assay for testing antiviral agents against human adenoviruses demonstrates type specific differences in ribavirin activity, *Antiviral Research*, 2006 (72) 34-41.
86. Marroqui, L, Estepa, A, Perez, L, Assessment of the inhibitory effect of ribavirin on the rainbow trout rhabdovirus V HSV by real-time reverse-transcription PCR, *Veterinary Microbiology*, 2007 (122) 52-60.

# 11. ANEXOS

## 11.1 LISTADO DE FIGURAS

**Figura 1.** Diagrama del genoma de MPV cepa CAN97-83 del extremo 3' al 5' (3).

**Figura 2.** Estructura del virión de MPV (3).

**Figura 3.** Proteína N, donde se observa el RNA genómico como bandas rojas y amarillas (10).

**Figura 4.** Estructura de el dominio de tetraisomerización de la proteína P. Los colores representan las cadenas de aa (10).

**Figura 5.** Representación esquemática de la proteína M2-1. Los colores representan las cadenas de aa (10).

**Figura 6.** Representación esquemática de la proteína M2-2. Los colores representan las cadenas de aa (10).

**Figura 7.** Representación esquemática de la proteína L. Los colores representan las cadenas de aa (10).

**Figura 8.** Representación esquemática de la proteína M. Los colores representan las cadenas de aa (10).

**Figura 9.** Representación esquemática de la proteína F. Los colores representan las cadenas de aa (10).

**Figura 10.** Representación esquemática de la proteína G. Los colores representan las cadenas de aa (10).

**Figura 11.** Representación esquemática de la proteína SH. Los colores representan las cadenas de aa (10).

**Figura 12.** Esquema de la transcripción y replicación de MPV (3).

**Figura 13.** Esquema del ciclo replicativo de MPV (3).

**Figura 14.** Esquema de entrada y desplazamiento de MPV en el tracto respiratorio.

**Figura 15.** Esquema de respuestas tipo Th1 (A) y Th2 (B) con la entrada de un patógeno al organismo.

**Figura 16.** Ampliación a 1000x de células HEP-2 infectadas con MPV y teñidas con rojo neutro. El sincitio se observa al centro con los núcleos de las células adentro del sincitio.

**Figura 17.** Estructura molecular de la ribavirina.

**Figura 18.** *Calea ternifolia*.

**Figura 19.** Estructura molecular de las flavonas.

**Figura 20.** Estructura molecular de los germacranólidos.

**Figura 21.** *Agave tobala*.

**Figura 22.** Estructura molecular de la riboflavina.

**Figura 23.** Esquema de placa de diluciones para el ensayo citotóxico.

**Figura 24.** Estructura molecular del azul tripano.

**Figura 25.** Imagen donde se observan las células muertas de color azul y las células vivas de color transparente.

**Figura 26.** Esquema de las rejillas de la cámara de Neubauer donde A, B, C y D son los cuadros en los que se contaron las células

**Figura 27.** Esquema de placa de diluciones para el ensayo en placa

**Figura 28.** Esquema de placa de diluciones para el TCID50.

**Figura 29.** Resultados de los ensayos de citotoxicidad celular con el extracto de *Calea ternifolia* donde se observa que la dilución que menos citotoxicidad ocasiona es la dilución 1:10000.

**Figura 30.** Resultados del ensayo en placa con el extracto de *Calea ternifolia*.

**Figura 31.** Formación de sincitios del ensayo en placa con el extracto de *Calea ternifolia* en la dilución 1:100. A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

**Figura 32.** Resultados del ensayo en placa con el extracto de *Calea ternifolia*.

**Figura 33.** Formación de sincitios del TCID50 con el extracto de *Calea ternifolia* en la dilución 1:27. A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

**Figura 34.** Resultados de los ensayos de citotoxicidad celular con el extracto de *Agave tobala* donde se observa que la dilución que menos citotoxicidad ocasiona es la dilución 1:1000.

**Figura 35.** Resultados del ensayo en placa con el extracto de *Agave tobala*.

**Figura 36.** Formación de sincitios del ensayo en placa con el extracto de *Agave tobala* en la dilución 1:100. A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

**Figura 37.** Resultados del TCID50 con el extracto de *Agave tobala*.

**Figura 38.** Formación de sincitios del TCID50 con el extracto de *Agave tobala* en la dilución 1:27. A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

**Figura 39.** Resultados del ensayo en placa con los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala*.

**Figura 40.** Formación de sincitios del ensayo en placa con los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala* en la dilución 1:100. A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

**Figura 41.** Resultados del TCID50 con los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala*.

**Figura 42.** Formación de sincitios del TCID50 con los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala* en la dilución 1:100. A) Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

**Figura 43.** Resultados del ensayo en placa con ribavirina.

**Figura 44.** Formación de sincitios del ensayo en placa con ribavirina en la dilución 1:100. A)Control. B) Unión. C) Replicación. D) Salida.

**Figura 45.** Resultados del TCID50 con ribavirina.

**Figura 46.** Formación de sincitios del TCID50 con ribavirina en la dilución 1:27. A) Control. B)Unión. C) Replicación. D) Salida.

## 11.2 LISTADO DE ECUACIONES

**Ecuación 1.** Número de células por mL donde  $x$  es la media de las observaciones,  $F_d$  el factor de dilución ( $100 \mu\text{L}/90 \mu\text{L}$ ) y  $F_c$  el factor de la cámara (10 000).

**Ecuación 2.** Porcentaje de células vivas de la medición  $i$ . Donde  $N_{celi}$  es el número de células de  $i$  y  $N_{celcont}$  el número de células del control a las 0 horas.

**Ecuación 3.** UFP/mL, donde  $d$  es el factor de dilución (10),  $N$  es el número total de sincitios en una fila,  $n$  es el número de pozos por fila (6) y  $V$  es el volumen de virus inoculado en mL (0.25 mL).

**Ecuación 4.** Porcentaje de infectividad, Donde  $UFP_i$  es el número de UFP/mL de  $i$  y  $UFP_{cont}$  es el número de UFP/mL del control de MPV.

**Ecuación 5.** Título de TCID<sub>50</sub> donde se calcula el número de células infectadas/mL. Donde  $\Delta$  es la última dilución donde todas las filas presentan sincitios,  $\delta$  es el factor de dilución (3) y  $S$  es el número total de pozos que presentan sincitios entre el número de filas utilizadas.

**Ecuación 6.** Porcentaje de infectividad, Donde  $celsinf_i$  es el número de células infectadas/mL de  $i$  y  $celsinf_{cont}$  es el número de células infectadas/mL del control de MPV.

### 11.3 LISTADO DE TABLAS

**Tabla 1.** Resultados de los ensayos de citotoxicidad celular. En color gris oscuro se marca la dilución elegida para realizar los ensayos posteriores con el extracto de *Calea ternifolia*.

**Tabla 2.** Resultados del ensayo en placa con el extracto de *Calea ternifolia*.

**Tabla 3.** Resultados del TCID50 con el extracto de *Calea ternifolia*.

**Tabla 4.** Resultados de los ensayos de citotoxicidad celular en HEP-2. En color gris oscuro se marca la dilución elegida para realizar los ensayos posteriores con el extracto de *Agave tobala*.

**Tabla 5.** Resultados del ensayo en placa con el extracto de *Agave tobala*.

**Tabla 6.** Resultados del TCID50 con el extracto de *Agave tobala*.

**Tabla 7.** Resultados del ensayo en placa con los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala*.

**Tabla 8.** Resultados del TCID50 con los extractos de *Calea ternifolia* y *Agave tobala*.

**Tabla 9.** Resultados del ensayo en placa con el ribavirina.

**Tabla 10.** Resultados del TCID50 con ribavirina.