



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“OBTENCION DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS A PARTIR DE VINAZAS
MEZCALERAS Y SU EFECTO ANTIVIRAL EN LA INFECTIVIDAD DEL VIRUS
SINCITAL RESPIRATORIO”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

LEYRA TOBILLA LAURA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: AIDA NAVAS PEREZ**

VOCAL: **Profesor: ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ**

SECRETARIO: **Profesor: ROCIO GABRIELA TIRADO MENDOZA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO**

2º SUPLENTE: **Profesor: MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE MEDICINA UNAM Y
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA.**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Rocio Gabriela Tirado Mendoza

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. VANIA SHUHUA ROBLES GONZÁLEZ

SUSTENTANTE:

Leyra Tobilla Laura

AGRADECIMIENTOS

- **A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar este trabajo y darme conocimiento, mismo que siempre me lleva a dar la mejor versión de mí.**
- **A la Facultad de Química por su excelente y estricta educación, en ella se puede ampliar la forma en la que se ve al mundo. Gracias Facultad de Química.**
- **A la Universidad Tecnológica de la Mixteca y al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina donde se llevó a cabo el trabajo experimental.**
- **El presente estudio fue apoyado por CONACYT PDCPN2013-01
CON CLAVE: 215144**
- **A mi Comité tutorial la Dra. Rocio Gabriela Tirado Mendoza, Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz y la Química Aida Navas Pérez por su importante aporte en la mejora de esta tesis, quisiera destacar que su tiempo, paciencia y conocimiento enriqueció este trabajo.**
- **Al Dr. Vania Shuhua Robles mi supervisor técnico, gracias por tus enseñanzas en mi estancia en Oaxaca desde el inicio hasta el final te hiciste cargo de que aprendiera mucho.**
- **A la Dra. Edith González Mondragón por su apoyo en el Proyecto.**
- **A la pasante de Q.F.B. Karla Zarate Conde por enseñarme todas las técnicas en cultivo celular.**

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- A la **Doctora Rocio**, te agradezco profundamente no solo tu colaboración y guía en este proyecto sino por sembrar en mi entusiasmo y amor en el trabajo. Gracias por la confianza y tu constante paciencia, por ser amiga y maestra. Significa mucho para mi haber convivido contigo a lo largo de este tiempo. Aprender de ti es un privilegio y de lo más sincero muchas gracias.
- A mis compañeros y queridos amigos del laboratorio: Karla muchas gracias por tus enseñanzas en la parte técnica del trabajo, Viri gracias por orientarme cuando tuve dudas, Mauricio, Anahí, Dr. Daniel Isaac Fabian, Sra Chelo, Daniel Nuevo, y muy especialmente a mi gran amigo-hermanito **Norvell Perezbusta** gracias por donarme células y ayudarme siempre. Les agradezco tantos buenos momentos que pasamos juntos hacemos una gran familia que no se separa por nada.
- A **Monica Morales** muchas gracias por tu hospitalidad y buena compañía en Acatlima, eres una gran persona.
- A la **Dra. Perla Castañeda y Q.F.B Lupita Castorena** quienes fueron un apoyo indispensable en mi formación, gracias por confiar en mí y hacer que no pierda el entusiasmo. Mi más sincero agradecimiento y cariño.
- A la **Biol. Olivia Alicia Reynoso** por el préstamo de equipo para cultivo celular y su asesoría para ensayos de viabilidad celular.
- A mi querido Profesor **Benjamín Ruiz Loyola** por ser siempre solidario y un buen amigo, mi eterno cariño, gracias por siempre estar.

DEDICATORIAS

- A **Dios** por estar conmigo siempre, no soltarme y darme fuerza todo el tiempo.
- A mis padres **Jorge Leyra y Maria Elena Tobilla**:
Papi y Mami no podría estar más orgullosa de tenerlos, los amo muchísimo, son mis guías y ángeles guardianes soy la más afortunada de que estén siempre conmigo, gracias por darme todo su ser, su cariño y su paciencia. Su tenacidad, inteligencia y perseverancia son para mi ejemplos de vida que me motivan a superarme día con día y abatir el temor ante nuevos horizontes. Ustedes saben lo que este trabajo represento para mí y por eso se los dedico.
- A mis hermanas **Lidia, Erika, Claudia y Sarai**:
Mis personas favoritas, sin ustedes y sin su particular forma de ser de cada una no formaríamos el pentágono hermoso que somos, mi sentido y forma de vida sería muy diferente si no las tuviera. Siempre ayudándome, siempre haciendo momentos. Amo a mis hermanas. Clau gracias a ti tengo un gran tesoro, mi amado **Diego**.
- A **Jaime y David** chicos adoro que estén en mi familia.
- A mi prima **Pily** por ser una inspiración y ser de gran ayuda en mi carrera, animándome para que me supere y dándome mucho apoyo moral. Eres la mejor Potty.
- A **Guadalupe Roldan** eres mi hermana y mi mejor amiga hemos pasado de todo juntas, tanto cosas buenas como malas pero siempre unidas. En el momento indicado estas nunca fallas. Somos pan y mantequilla.
- Mis hermanos, **Jorge Pikon, Daniela De la Cruz** su amistad y cariño en verdad es una de los motores de mi vida, y que estén a mi lado significa mucho.
- **Cosette Ayala y Polska Miroslava** mis hermanas que me regalo la carrera invaluable y eternas.

- Mis queridos amigos **Juan Correa, Luis Tapia, Harry Bastida, Oky Káiser, Natalia Cruz, Jessika Torres y Josué Tory** gracias por ser los amigos que somos, gracias por los divertidos, felices, burlones e increíbles momentos que siempre tenemos. La vida es más divertida con mis amigos Malacopa siempre juntos y felices.
- Mis amigos de la Facultad de Química **Diana Gato, Daniela Sarabia, Kary, Edgar, Abraham Pato, Luis Reyes, Alexander, Sergio, Ángel, Raziél, Kevin, Agny, Luis Carlos, Leonardo, Yomi** gracias por compartir esta maravillosa etapa que es la universidad, juntos para estudiar, fiestear, discutir, son un gran regalo que me dio la Facultad de Química.

CONTENIDO

- 1. ABREVIATURAS**
- 2. RESUMEN**
- 3. ANTECEDENTES**
 - 3.1 ESTRUCTURA**
 - 3.2 PROTEINAS VIRALES**
 - 1. NUCLEOPROTEÍNA (N)**
 - 2. FOSFOPROTEINA (P)**
 - 3. PROTEÍNA (L)**
 - 4. PROTEÍNA MATRIZ (M)**
 - 5. PROTEINA M2**
 - 6. PROTEINA SH**
 - 7. PROTEINA DE FUSION (F)**
 - 8. GLICOPROTEINA (G)**
 - 9. PROTEINAS NO ESTRUCTURALES NS1, NS2.**
 - 3.3 CICLO REPLICATIVO**
 - 3.4 PATOGÉNESIS E INMUNIDAD**
 - 3.5 RESPUESTA INMUNE INNATA**
 - 3.6 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA**
 - 3.7 EPIDEMIOLOGÍA**
 - 3.8 INFECCIÓN**
 - 3.9 SINTOMAS CLÍNICOS**
 - 3.10 DIAGNÓSTICO**
 - 3.11 TRATAMIENTO**
 - 3.12 ESTUDIO CON EXTRACTO**
 - 3.13 VINAZAS**
 - 3.14 FENOLES**
 - 3.15 EFECTO ANTIOXIDANTE DE LOS FENOLES**
 - 3.16 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS FENOLES**

- 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O JUSTIFICACIÓN**
- 5. OBJETIVOS**
- 6. METODOLOGÍA**
 - 6.1 OBTENCION DEL EXTRACTO DE VINAZAS MEZCALERAS**
 - 6.2 CÉLULAS Y VIRUS**
 - 6.3 PROPAGACIÓN DE LAS CÉLULAS**
 - 6.4 PROPAGACIÓN DEL VIRUS**
 - 6.5 RIBAVIRINA**
 - 6.6 PRUEBAS DE INOCUIDAD: DETERMINADO POR ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.**
 - 6.7 ENSAYO EN PLACA**
 - 6.8 ENSAYO EN PLACA CON EXTRACTO DE VINAZAS MEZCALERAS.**
 - 6.9 ENSAYO EN PLACA CON RIBAVIRINA**
 - 6.10 TCID50**
 - 6.11 TCID50 CON EXTRACTO DE VINAZAS MEZCALERAS.**
 - 6.12 TCID50 CON RIBAVIRINA**
 - 6.13 ANÁLISIS ESTADISTICO.**
- 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
- 8. CONCLUSIONES.**
- 9. PERSPECTIVAS.**
- 10. BIBLIOGRAFÍA**

1. ABREVIATURAS

DMEN: Medio de cultivo celular. Por sus siglas en inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium.

DMSO: Dimetilsulfoxido.

EDTA: Acido etilendiaminotetraacetico.

EPFVM: Extractos polifenólicos obtenidos a partir de vinazas de mezcal

F: Proteína de fusión

G: Proteína de unión

HEp-2: Células de epitelio respiratorio humano provenientes de carcinoma de laringe.

L: Proteína larga.

M: Proteína de matriz

mRNA: RNA mensajero.

N: Nucleoproteína.

P: Fosfoproteína

PBS: Buffer de sales de fosfato, por sus siglas en inglés: Phosphate Buffered Saline.

RANTES: Quimiocinas tipo CC, atraen células por ejemplo células T, eosinófilos y basófilos que expresan el receptor CCR5.

RNA: Ácido ribonucleico.

RSV: Virus sincitial respiratorio.

SFB: Suero Fetal Bovino

SH: Proteína pequeña hidrofóbica.

TCID50: Dosis de infección en el cultivo de tejido en la mitad de la población por sus siglas en inglés: Tissue Culture Infective Dose.

UFP: Unidades formadoras de placa

2. RESUMEN INTRODUCCION.

En el presente trabajo se realizó una extracción de compuestos polifenólicos a partir de vinazas procedentes de la fermentación de agave (vinazas de mezcal), la cual se realizó mediante extracción con acetato de etilo. Se determinó la

concentración de fenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico (Box, 1983), obteniéndose un valor de 433.1 mg de ácido gálico/ L.

La concentración final de polifenoles (dilución 1:10000) a la cual se observó un efecto en la unión del virus a la célula fue a una concentración de 0.04331 mg de ácido gálico/ L.

Por otro lado se evaluó la potencial actividad anti-viral del extracto de las vinazas mezcaleras *in vitro* a una concentración no citotóxica del extracto para la línea celular HEP-2 y se determinó en qué punto del ciclo de infección de hRSV tenía efecto.

En México la industria de vinos y licores es una de las fuentes principales generadoras de aguas residuales. El estado de Oaxaca produce el 85% del mezcal a nivel nacional, pero al mismo tiempo produce grandes cantidades de aguas residuales denominadas vinazas Robles-González et al. (2012) reportaron que las vinazas mezcaleras contenían una alta concentración de fenoles entre 478-542 mg ácido gálico/L los cuales ya se ha reportado que poseen propiedades anti-inflamatorias, antibacterianas, antimicrobianas y antivirales. (Edziri et al., 2011).

Los estudios *in vitro*, han demostrado las propiedades farmacológicas de componentes de diversos tipos de plantas. Entre los componentes con actividad antiviral están los flavonoides, taninos, derivados de ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, terpenoides y saponinas, entre otros polifenoles. Esta actividad antiviral ha sido probada en diferentes tipos de virus tales como: Herpes humano tipo 1, Citomegalovirus humano, Virus de inmunodeficiencia humana tipo1, Virus de Pseudorabia porcino, Echovirus 11, Coxsackie B tipo 3, Adenovirus, Reovirus aviar, Metapneumovirus aviar (1-6 virus) y Virus Sincitial Respiratorio humano. (Edziri et al., 2011)

El virus sincitial respiratorio humano hRSV es conocido como el agente etiológico más importante de enfermedades respiratorias agudas en niños menores de dos años causando cuadros respiratorios desde leves hasta

enfermedades respiratorias graves. Además, constituye un factor de riesgo para personas de la tercera edad. (Bawage, Tiwari, Pillai, Dennis, & Singh, 2013).

En México las infecciones respiratorias agudas son una de las primeras causas de morbilidad en niños menores de 5 años, sin embargo no hay reportes de los patrones de circulación de los diferentes subgrupos virales de hRSV y tampoco contamos con métodos de diagnóstico rápido, específico y costeables. (Wong-Chew, 2010).

Se han realizado diversos intentos de vacunas y tratamientos desde su descubrimiento en 1956, sin embargo hasta el momento no se cuenta con una vacuna eficiente disponible en el mercado. Además los métodos profilácticos y terapéuticos son muy limitados.

Los anticuerpos monoclonales humanizados Palivizumab, son el único fármaco antiviral permitido por la FDA para profilaxis en niños de alto riesgo, mientras que la Ribavirina es utilizada para tratamiento de la infección; sin embargo el uso de la Ribavirina es restringido por los diversos efectos colaterales tales como: anemia macrocítica, alteraciones neurológicas y gastrointestinales, irritación conjuntival y erupciones cutáneas, y no se recomienda durante el embarazo por su capacidad teratogénica. Debido a la gravedad de la enfermedad y el uso limitado de los tratamientos se busca el uso alternativo de otros tratamientos (Browne, 1979).

Actualmente, existen una serie de reportes que proponen como fármacos alternos para el tratamiento de infecciones causadas por hRSV, el uso de extractos de diversas plantas como potenciales candidatos a ser utilizados por sus propiedades antivirales. (Edziri et al., 2011).

La disminución del título viral por la potencial actividad antiviral se analizó *in vitro* por dos tipos de metodologías ensayo en placa y TCID₅₀, para evaluar la probable actividad antiviral en la infectividad de hRSV a una concentración de

0.04331 mg de ácido gálico/ litro previamente definida por los ensayos de inocuidad.

La probable actividad antiviral se probó en cada etapa del ciclo de infección de hRSV: unión, replicación o salida del virus. Paralelamente se probó el efecto antiviral del control interno (Ribavirina) en las diferentes fases del ciclo de infección.

Los resultados obtenidos mostraron que el extracto de vinazas tiene potencial actividad antiviral en la unión del virus a la célula a una concentración de 0.04331 mg de ácido gálico/ litro. Los datos obtenidos en el ensayo de unión con el extracto mostraron un porcentaje de infectividad del 0.12%. Al comparar el extracto vs la Ribavirina, esta última mostro un porcentaje de infectividad de más del 80%, por lo que se sugiere que a nivel de la unión el efecto antiviral del extracto es mucho mayor.

Los resultados arrojados por estos experimentos mostraron que el extracto de vinazas mezcaleras tiene un efecto antiviral durante la fase de unión del virus a la célula.

Lo siguiente etapa será caracterizar los extractos polifenólicos obtenidos a partir de vinazas mezcaleras que podrían ser utilizados para un tratamiento alternativo en la infección por hRSV, que sea costeable y efectivo.

3. ANTECEDENTES:

El virus sincitial respiratorio está clasificado en el orden de los Mononegavirales, pertenece a la familia *Paramixoviridae*, al género *Pneumovirus*, (Bawage et al., 2013).

Dentro de los *Pneumovirus* se encuentra el virus sincitial respiratorio humano, el virus sincitial respiratorio bovino y el virus de neumonía de ratón. Los virus de esta familia se agrupan junto con los de las familias *Rhabdoviridae* y *Filoviridae*, en el mismo orden Mononegavirales.

El virus sincitial respiratorio humano (hRSV) es el agente etiológico más frecuente de las infecciones respiratorias que causan bronquitis, bronquiolitis, y complicaciones como la neumonía, afectando principalmente a la población en edad pediátrica y adultos mayores. Además es importante señalar que en el caso de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica las infecciones respiratorias de origen viral exacerban la sintomatología. (Bawage et al., 2013). Fue aislado por primera vez en 1956 de un chimpancé de laboratorio, que presentaba cuadro clínico asociado al resfriado común.

Es un virus envuelto, no segmentado, negativo, virus de genoma ARN monocatenario lineal. El genoma de hRSV es de ~ 15 kb tiene 10 genes que codifican para 11 proteínas. Dentro de las cuales se incluyen dos proteínas no estructurales NS1 y NS2 (interferón de tipo I inhibidores), las estructurales L (ARN polimerasa), N (nucleoproteína), P (fosfoproteína cofactor para L), M (proteína de matriz), M2.1 y M2.2 (necesario para transcripción) SH (pequeña proteína hidrófoba) G (glicoproteína), y F (proteína de fusión). (Fig. 1)

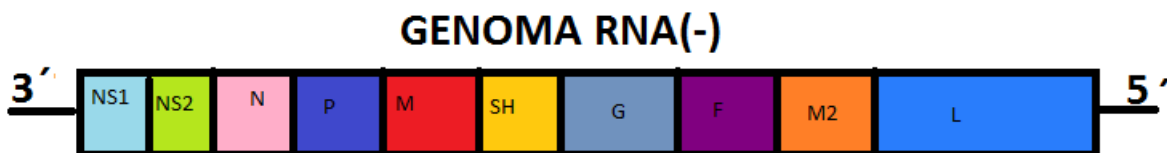


Figura1: Diagrama del genoma hRSV. Orientación 3´- 5´. Sentido negativo.

Modificado del original (Bawage et al., 2013)

3.1 ESTRUCTURA

Es un virus envuelto (bicapa lipídica) de estructura pleomórfica, de 150-300 nm de diámetro. Ancladas a la envoltura se localizan las glicoproteínas virales (F, G y SH), las cuales participan en la unión (G) y penetración (F) del virus a la célula hospedera; la función de la proteína SH aún no está clara. Este virus tiene una nucleocápside de simetría helicoidal de 12-15 nm de diámetro. En el interior de la nucleocápside se localiza el genoma viral que corresponde a una hebra sencilla de ARN no segmentada, de polaridad negativa. Asociadas al ARN viral se encuentran las proteínas virales N, P y L, que constituyen la nucleocápside. El ARN viral codifica para 11 proteínas de las cuales: 9 son estructurales y 2 no estructurales. La replicación viral se lleva a cabo en el citoplasma. (Bawage et al., 2013) (Fig. 2)

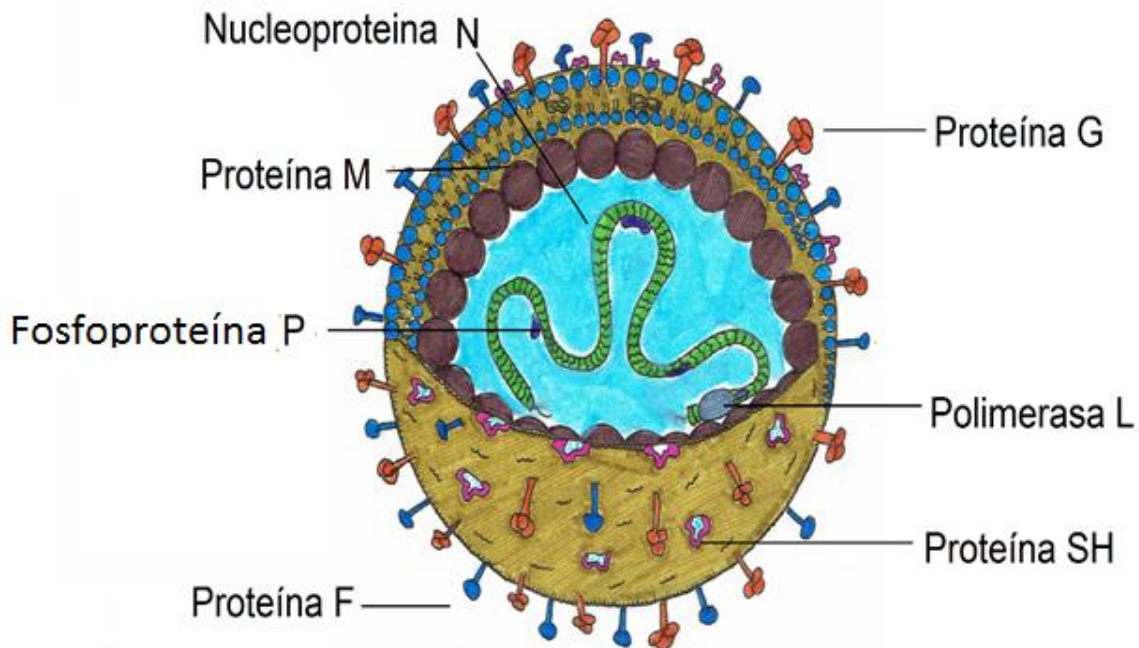


Figura 2: Estructura del hRSV. Modificada del original obtenido en (Bawage et al., 2013).

3.2 PROTEINAS VIRALES:

1. NUCLEOPROTEINA (N):

Es la única proteína que conforma la nucleocapside. El complejo N-ARN es el molde funcional para la transcriptasa y replicasa viral. Posee varias funciones en la replicación viral: Participa en la encapsulación del ARN genómico, se asocia con las proteínas P-L durante la transcripción y la replicación del virión y se considera que interactúa con la proteína M durante el ensamblaje del virus.

2. FOSFOPROTEINA (P):

La proteína P es un cofactor de la ARN polimerasa viral. Es una proteína altamente fosforilada en los residuos de serina. Forma parte del complejo de la polimerasa. Su interacción con la proteína N facilita que ésta se mantenga en su forma soluble y disponible para el ensamblaje de la nucleocapside.

3. PROTEINA L (L):

Proteína a la cual se le atribuye la actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN. Es relativamente hidrofóbica, con un gran contenido de los aminoácidos leucina (Leu) e isoleucina (Ile). Junto con las proteínas P y N forma el complejo requerido para la actividad polimerasa (Complejo Ribonucleoprotéico).

4. PROTEINA MATRIZ (M):

Proteína no glicosilada que se localiza en la cara interna de la envoltura viral. Se acumula en la membrana plasmática, interactúa con la región citoplásmica de la proteína F y otros factores durante la morfogénesis de la partícula viral, siendo esencial en su formación.

5. PROTEINA M2:

Es relativamente hidrofílica. Se localiza con las proteínas N y P en los cuerpos de inclusión citoplasmáticos presentes en las células infectadas por hRSV.

El gen M2 tiene dos marcos de lectura ORF (Open Reading Frame por sus siglas en inglés) que se solapan en 32 nucleótidos. El producto del primer marco de

lectura da lugar a la proteína M2-1 que es un anti terminador de la transcripción y es esencial para la viabilidad del virus, el segundo marco de lectura codifica para la proteína M2-2 actúa como un factor regulador implicado en el equilibrio entre la replicación y la transcripción del ARN (Bermingham & Collins, 1999).

6. PROTEINA SH:

Es una proteína que se acumula en las células infectadas de múltiples formas (SH₀), (SH_t), (SH_g) y (SH_p). Su función aun es desconocida aunque se ha podido comprobar que SH está implicada en la apoptosis dependiente de TNF α en las células infectadas.

7. PROTEINA DE FUSION (F):

Representa un factor crítico en la infección y en la patogenia de los miembros que conforman la familia *Paramyxoviridae*.

Es una glicoproteína tipo I. Se sintetiza como un precursor inactivo F₀ y para tener actividad biológica, el precursor debe escindirse por la acción de una proteasa celular formando subunidades F1 y F2 que permanecen unidas por puentes disulfuro. Esta proteína tiene la función de inducir la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula hospedera y entre las células, provocando la formación de sincitios o células gigantes multinucleadas, los cuales permiten la propagación directa del virus (Krzyzaniak, Zumstein, Gerez, Picotti, & Helenius, 2013).

8. GLICOPROTEINA (G):

Responsable de la unión del virus al receptor celular en las primeras etapas del ciclo infectivo. La proteína G se produce en dos formas diferentes en la célula infectada:

- 1) Como una proteína transmembrana de tipo II (G_m) que se incorpora en viriones.
- 2) Como una proteína soluble (G_s) que es secretada por la célula infectada

El precursor de polipéptido G_m de aproximadamente 300 residuos de aminoácidos contiene un único dominio hidrófobo que actúa como una señal combinada y un dominio de anclaje transmembranal. (Collins et al., 2001).

Esta región hidrófoba dirige la cadena nascente a través de la membrana, provocando el anclaje estable de la proteína en la bicapa lipídica.

La forma soluble (G_s) se sintetiza a partir de un segundo codón de iniciación que está en fase con el primero, situado en el aa. 48, el cual se encuentra dentro de la región hidrofóbica. Las funciones biológicas de la glicoproteína G soluble (G_s) en el ciclo de infección viral es desconocida, aunque se ha visto que dicha proteína induce una fuerte respuesta Th₂, lo que sugiere que representa una estrategia por parte del virus para modular y evadir la respuesta inmune dada por el hospedero (Karron et al., 1997).

El ectodominio de la glicoproteína G_m, presenta cuatro residuos de cisteína (posiciones 173, 176, 182 y 186) que están conservados en todas las cepas del hRSV. Estudios más recientes han demostrado que estos residuos de cisteína representan un importante papel en la respuesta de los linfocitos T citotóxicos hacia otros antígenos de este virus (Choi et al., 2012).

Diversos estudios han demostrado la homología que existe entre este dominio y el cuarto subdominio del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF_r). Aunque el significado biológico de esta homología se desconoce, se supone que de algún modo module la actividad del TNF o de otro ligando de este receptor. Esta glicoproteína contiene una secuencia similar a la quimocina CX₃C, la cual es capaz de unirse al receptor de fractalquina (CX₃CR₁) y afectar adversamente la respuesta de las células T CX₃CR₁⁺ (Karron et al., 1997).

9. PROTEINAS NO ESTRUCTURALES NS1 Y NS2

Se ha estudiado que estas proteínas están implicadas en la evasión de la respuesta inmune innata durante la infección por hRSV. Se ha reportado que dichas proteínas están implicadas en la disminución de la expresión de interferones tipo I, debido a que bloquean la activación del factor 3 regulador del IFN. Esto sugiere, que en un hospedero natural, el antagonismo de la respuesta

del IFN por estas proteínas incrementa el balance de Th2/Th1 (Spann, Tran, Chi, Rabin, & Collins, 2004)

3.3 CICLO REPLICATIVO:

La adhesión de hRSV a las células del hospedero se debe a la interacción de los dominios de unión a heparina de la proteína G con glicosaminoglicanos de la superficie celular. La proteína F puede unirse a la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y el receptor de fractalcina CX3CR1 para G de hRSV. (Choi et al., 2012).

Después de la fusión celular y la penetración mediada por la proteína F, las proteínas P, N y L forman el complejo de la polimerasa, responsable de los procesos de transcripción y replicación del genoma viral.

Durante la síntesis del mRNA viral el complejo de la polimerasa reconoce al promotor único e inicia la síntesis de los mensajeros monocistrónicos, esto con el reconocimiento de las secuencias de inicio y paro de la transcripción, la polimerasa es susceptible a disociarse del templado y reiniciar la síntesis de ARNm lo implica que la concentración de cada mensajero viral disminuye del extremo 3' hacia el extremo 5' (Varga, 2009).

Para la replicación de genoma viral, la proteína M2-2 cambia el modo operacional del complejo de la polimerasa de la transcripción a la replicación. Se inicia en el promotor del extremo 3' y la polimerasa prepara la síntesis del ARN genómico viral ignorando las señales de inicio y de paro de la transcripción de cada uno de los genes, sintetizando un antígenoma de polaridad positiva que es utilizado como templado para obtener el genoma de sentido negativo que se incorporara a los viriones (Bermingham & Collins, 1999).

Las glicoproteínas en la membrana G, F, SH sufren modificaciones postraduccionales en el complejo de Golgi para posteriormente dirigirse y anclarse a las balsas lipídicas de la célula hospedera. La proteína M se encuentra en el interior de las balsas lipídicas donde se lleva a cabo el proceso final de ensamblaje al interactuar con las proteínas de la nucleocapside y posteriormente llevar a cabo la gemación. **(Figura 3).**

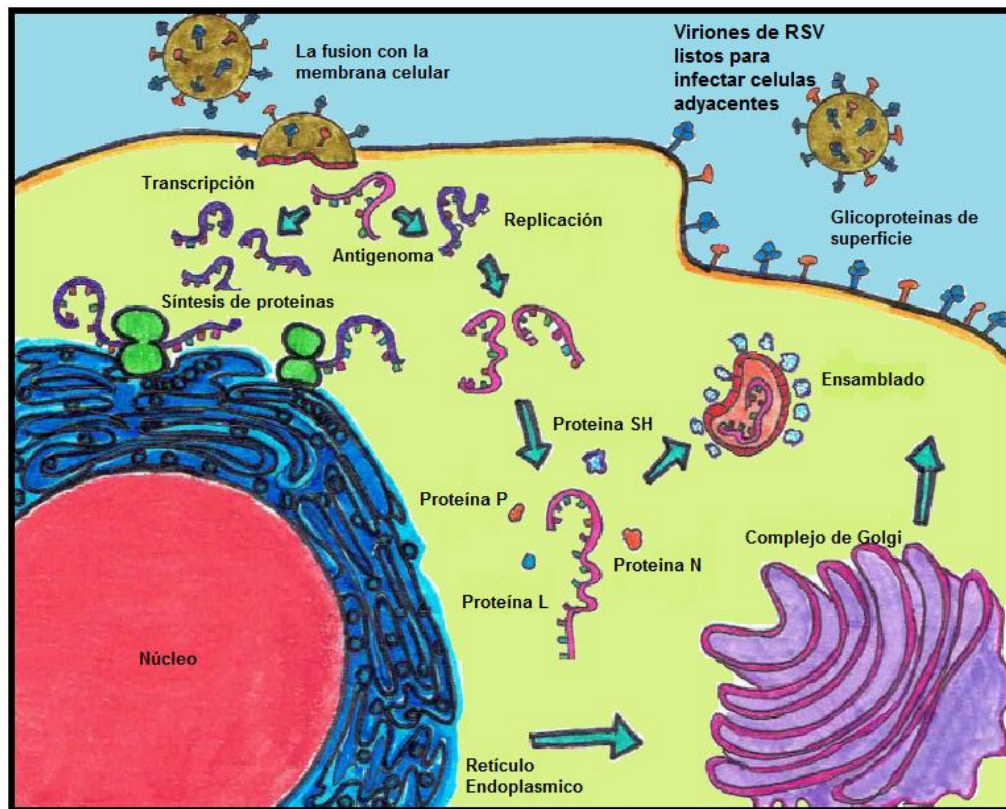


Figura 3: Representación esquemática del ciclo de replicación de hRSV. Modificado del original (Bawage et al., 2013)

3.4 PATOGENESIS E INMUNIDAD

El virus se multiplica en el epitelio de las mucosas de la nariz y la garganta; en los niños y adultos mayores puede implicar la tráquea, los bronquios, bronquiolos y alvéolos.

El período de incubación es de 4-5 días. Los casos fatales suelen mostrar extensa bronquiolitis y neumonía con áreas dispersas de atelectasia y enfisema resultantes de la obstrucción bronquial.

Sin lugar a duda las vías respiratorias de pacientes pediátricos, son más estrechas que las de los niños mayores, y son obstruidas más fácilmente por la inflamación, edema y descamación de células necróticas en el moco abundante. Sin embargo, esto no explica por qué sólo una minoría de estos llega a desarrollar bronquiolitis.

El daño ocasionado por este virus se localiza en bronquios, bronquiolos y alvéolos pulmonares. Este consiste en necrosis de células epiteliales, infiltrados inflamatorios intersticiales de células mononucleares (lo que ocasiona taponamiento de vías respiratorias pequeñas con material que contiene moco), células necróticas y fibrina. La obstrucción de vías aéreas pequeñas a causa de "tapones" de material necrótico, da lugar a la instalación de un cuadro respiratorio agudo grave (Garofalo, Kolli, & Casola, 2012).

En 1966 una vacuna experimental de hRSV inactivado con formalina fue probado en niños, cuando los niños inmunizados se encontraron con una epidemia de hRSV, se observó que en realidad sufrieron significativamente más daño en enfermedades respiratorias inferiores que los niños no inmunizados. Posteriormente, se demostró que aunque el virus inactivado con formalina indujo una buena respuesta de anticuerpos, los anticuerpos no tienen buena actividad neutralizante (Welliver, 2003).

Este hecho alarmante no sólo llevó al abandono de la vacuna inactivada sino también a la especulación sobre la base inmunológica del episodio y su posible relación con bronquiolitis por hRSV.

La primera hipótesis fue que la IgG materna, presente sólo en los niños pequeños, puede reaccionar con el virus que se multiplicó en el pulmón para producir una reacción de hipersensibilidad del tipo III. Esta idea tuvo que ser abandonada cuando una correlación negativa fue demostrada entre el título de anticuerpos maternos y la gravedad de la enfermedad inducida por el hRSV (Varga, 2009).

Anti hRSV de tipo IgE, así como histamina y leucotrienos han sido reportados en las secreciones respiratorias de los lactantes con bronquiolitis por hRSV.

La inmunidad adquirida como consecuencia de la infección por hRSV es notoriamente pobre. Por ejemplo, durante las epidemias anuales de invierno que afectan a los hogares de, la mayoría de los niños se vuelven a infectarse; la gravedad de la enfermedad es general pero disminuye la segunda vez. Esta

inmunidad parcial se basa en el hecho de que la respuesta inmune de los lactantes hacia las glicoproteínas F y G es muy débil.

Claramente, el anticuerpo materno no protege a los recién nacidos más allá de las primeras 6 semanas o menos de vida, a pesar de que se transfieren generalmente a niveles bastante altos.

3.5 RESPUESTA INMUNE INNATA:

Las células epiteliales infectadas por hRSV producen quimiocinas y citocinas que afectan el balance entre la eliminación del virus y la patogénesis de la enfermedad, inclusive en diferentes estudios se ha indicado que la expresión de citocinas y quimiocinas se correlaciona con la severidad de la enfermedad. Entre las quimiocinas secretadas durante una infección por hRSV están MIP-1 α y RANTES. Durante la etapa aguda de la infección, la secreción de citocinas inicia la respuesta inflamatoria local ya sea de manera directa o amplificando el evento inflamatorio previamente iniciado por macrófagos activados, eosinófilos y neutrófilos (Varga, 2009).

Los componentes celulares más importantes en la respuesta inmune innata contra hRSV son los macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, y las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés Natural Killer). Estas células tienen funciones importantes controlando la infección, pero durante una respuesta no balanceada pueden exacerbar la inflamación y contribuir con la patogénesis de la enfermedad. Los neutrófilos son las células predominantes en la bronquiolitis causada por hRSV. Los macrófagos y las células epiteliales son las primeras en tener contacto con el hRSV en las vías respiratorias. En la infección por este virus se secretan citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-1 β , CXCL8, TNF- α , MIP-1 α y RANTES. En la primera fase de la infección por hRSV las células NK migran de la sangre a los pulmones y son responsables en gran parte de la producción de INF- γ (Becker, Quay, & Soukup, 1991).

El INF es una molécula que se induce en respuesta a una infección viral. A su vez el interferón α/β induce señales al interior del núcleo para establecer un ambiente de alerta en células no infectadas. Hay dos tipos de sistemas de IFN. El

sistema tipo I es mediado por el IFN- α , el INF- β y el INF- γ . Estas moléculas se unen a sus receptores y a través del sistema JAK.STAT estimulan la transcripción de genes que participan en la maduración de las células dendríticas, proliferación de las células NK. Estas células eliminan y presentan antígenos a las células linfocíticas que establecen una memoria a largo plazo y se encargan de inducir una respuesta inmune (Varga, 2009).

3.6 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA:

En las vías respiratorias altas esta respuesta es mediada por IgA, sin embargo una respuesta humoral más duradera está asociada con IgM e IgG. La respuesta inmune contra hRSV esta mediada por anticuerpos maternos circulantes de tipo IgG, los cuales protegen a los niños menores de dos años de infecciones en el tracto respiratorio inferior, sugiriéndose que en los neonatos afectados, los títulos de anticuerpo son menos a los requeridos para la protección, sin embargo es a los dos meses de edad que se ve un mayor número de casos de niños hospitalizados. Las infecciones de hRSV son recurrentes a lo largo de la vida pues la inmunidad que induce es de corta duración y los anticuerpos son de baja afinidad debido a una pobre estimulación de los TLRs (Varga, 2009).

El hRSV produce una respuesta tipo Th2, el inconveniente de este tipo de respuesta es que el hospedero no produce una memoria inmunológica estable como lo que se deriva de una respuesta Th1. En diversos estudios se ha demostrado que la participación de células CD4+, (Th2) y las citosinas que producen son factores importantes en la patogénesis asociada a hRSV (Choi et al., 2012).

Durante la infección por hRSV se estimula producción de anticuerpos tipo IgE específicos que causan la sensibilización de las células cebadas con el eventual desarrollo de hiperreactividad y obstrucción de las vías respiratorias. La respuesta tipo Th2 es una estrategia de infección de hRSV para evadir el sistema inmune (Varga, 2009).

El sistema tipo Th2, es mediado por el INF- γ que es secretado por las células NK, estas se encuentran en gran proporción en los pulmones los primeros días de infección. El interferón γ influye principalmente en la diferenciación y en la proliferación de las células T tipo CD4+ que producen principalmente inmunoglobulinas del tipo IgG e IgE. (Becker et al., 1991)

3.7 EPIDEMIOLOGIA:

El hRSV es generalmente la causa más común en Infecciones del Tracto Respiratorio (ITR's) en todo el mundo. La aparición periódica de estas epidemias se relaciona en parte con los factores geográficos y climáticos, así como las variaciones estacionales con el comportamiento de la población y la inmunidad preexistente.

El hRSV es un importante patógeno respiratorio ya que es causante de bronquiolitis y representa del 5-15% de las hospitalizaciones pediátricas. De hecho la hospitalización por hRSV es más alta durante el primer año de vida, especialmente en niños menores de seis meses de edad, en los que las tasas de hospitalización han sido estimadas recientemente 17 a 18.5 por cada 1000 niños. En un estudio prospectivo de casi 1.400 hospitalizaciones de adultos para ITR durante cuatro periodos invernales consecutivos, hMPV y hRSV representaron el 8,0% y 10,5% de las enfermedades, respectivamente. La población estudiada era predominantemente de edad avanzada, con una media de edad de 75 años. La mortalidad por hRSV es particularmente alta en las personas mayores

Existen dos grupos de hRSV, el A y el B. La clasificación del virus se hace con base en la diversidad genética de la glicoproteína G. Estos dos grupos cocirculan en la población, en una misma epidemia, siendo el grupo A, el de mayor prevalencia. Sin embargo, la severidad de la enfermedad no se asocia comúnmente con alguno de los tipos virales en particular. Las epidemias por este virus se presentan anualmente, entre los meses de enero a marzo. La mayor parte de la población presenta infección del tracto respiratorio superior y sólo del 15 al 50% de la población puede presentar complicaciones severas que involucren al

tracto respiratorio inferior. La incidencia de hospitalización de acuerdo con un estudio realizado a un total de 214 niños señala 15% para niños menores de 4 años y 24% para menores de seis meses con enfermedad congénita cardiaca. La alta tasa de mortalidad (4,500 muertes/año), se presenta principalmente en pacientes con problemas congénitos, displasia broncopulmonar e inmunocomprometidos. La infección por hRSV en adultos, es común en personas mayores de 60 años; y en pacientes inmunocomprometidos llega a presentarse en forma severa. La mortalidad asociada a neumonía en estos casos puede ser de 80-90%. El hRSV afecta mayormente a niños entre 0 y 2 años. La infección primaria por este virus no induce inmunidad protectora por lo que a lo largo de la vida se presentan infecciones recurrentes (Mohapatra & Boyapalle, 2008).

3.8 INFECCION:

La infección por hRSV se inicia en la nasofaringe, por lo general se controla a ese nivel, no obstante en una gran parte de los infantes el virus pasa al tracto respiratorio inferior e infecta a los bronquiolos y los alveolos donde se presenta una respuesta inflamatoria asociado con la patología y sintomatología de la enfermedad (Cormier, You, & Honnegowda, 2010).

3.9 SINTOMAS CLINICOS:

Clínicamente puede presentarse con fiebre alta, dolor de cabeza, escalofríos, náuseas, vómitos, tos, fatiga, y otros síntomas, Es una causa líder de la hospitalización de los lactantes y los niños menores de 2 años de edad, se asocia con el desarrollo de bronquiolitis y neumonía.(Welliver, 2003)

A la edad de 1 año, 60-70% de los niños han sido infectadas por hRSV (2 - 3% de los cuales son hospitalizados), hRSV se estima que causa 33,8 millones de casos de enfermedades respiratorias agudas en niños <5 años de edad a nivel mundial, lo que resulta en 2.8-4.3 millones de hospitalizaciones y 66 000 a 199 000 muertes en 2005. La mayoría de los pacientes pediátricos infectados experimentan síntomas del tracto respiratorio superior, sin embargo del 20 -30% desarrollará bronquiolitis aguda.

Los signos y síntomas de la enfermedad incluyen taquipnea, tos, crepitaciones y sibilancias. Con frecuencia, la enfermedad está asociada con letargia, irritabilidad, y mala alimentación.

3.10 DIAGNOSTICO:

Actualmente, las técnicas utilizadas para el diagnóstico de hRSV incluyen el ensayo de ELISA, inmunofluorescencia directa, PCR, y PCR en tiempo real. El diagnóstico y el tratamiento ha cambiado de manera significativa con el advenimiento de técnicas avanzadas y el profundo conocimiento de la biología de hRSV, pero la ejecución de estos desarrollos clínicos en la práctica requiere de un amplio estudio y tiempo (Bawage et al., 2013).

3.11 TRATAMIENTO:

Hay opciones de tratamiento muy limitadas disponibles para el hRSV. Sin embargo, hay muchos fármacos para los síntomas asociados con la infección por hRSV.

El Palivizumab es un anticuerpo monoclonal producido por tecnología de ADN recombinante autorizada por la FDA utilizado para la prevención de la infección de hRSV en pacientes pediátricos de alto riesgo por prematuridad, enfermedad cardíaca congénita o displasia broncopulmonar. Este anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína F posee un alto grado de eficacia, previniendo la hospitalización de niños prematuros con enfermedad pulmonar crónica. (Bawage et al., 2013)

La Ribavirina:(1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) (**Figura 5**).Es un fármaco antiviral análogo de nucleósido que actúa a nivel de replicación aunque la evidencia de beneficio es escasa su uso se ha asociado con un mejoramiento en la oxigenación y una disminución en la inflamación asociada con sibilancias y enfermedad severa. No obstante su uso actualmente es limitado debido a que es costosa, a su potencial teratógeno y a los resultados contradictorios en el estudio de eficacia. (Browne, 1979)

La utilidad de la Ribavirina contra los virus no es sólo debido a su actividad antiviral, sino también debido a su capacidad para modular el sistema inmune. La

Ribavirina sugiere tener efectos inmuno-estimuladoras sobre las células Th.(Bawage et al., 2013)

Los derivados de Ribavirina como viramidina, merimepodib, y otras moléculas inhibidoras de IMPDH como micofenolato y mizoribina han demostrado actividad antiviral contra el virus de la hepatitis C, y por lo tanto, no hay margen para la investigación de ellos como potenciales fármacos anti-RSV (Bawage et al., 2013).

Ribavirina

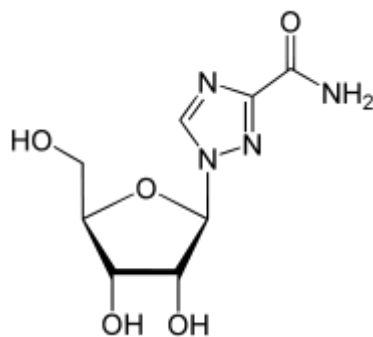


Figura 5. Estructura de la

3.12 ESTUDIO CON EXTRACTOS:

Basándonos en investigaciones etnobotánicas se considera que el mezcal se produce en México por lo menos desde el año 400 A.C. El agave o maguey es

una planta mexicana, hoy establecida en muchas otras partes del mundo. De ella según su tipo se pueden extraer fibras, aceites, aguamiel, pulque, mezcales.

El mezcal ha pasado de ser una bebida campesina, noble o mágica, a un licor de moda en los locales más prestigiosos del mundo siendo una bebida alcohólica derivada del agave. La palabra viene de la unión de dos vocablos de origen náhuatl: metl (maguey) e ixcalli (cocido o hervido). Fermentada y destilada, el alma líquida de la planta es un puente a lo sagrado. Y para elaborarla hay métodos ancestrales y conocimientos transmitida de generación a generación, ocho estados del país lo producen con derecho a denominación de origen y uno de los principales es Oaxaca.

Se han clasificado al menos 300 tipos de agave en su género. En México el mezcal se obtiene de al menos una veintena de agaves, pero especialmente de cinco: cinco: espadín (*angustifolia*), cenizo también llamado de cerro (*weberi*), tóbala, (*potatorum*) y pulquero, manso o de montaña (*salmiana*) (**Figura 6**).

El estado de Oaxaca se sostiene sobre todo del comercio y el turismo, pero muy poco de la industria. En este sentido, la industria del mezcal es la más importante y dinámica por la cantidad de empleos y divisas que genera a través de las exportaciones a algunos países de América, Europa y Asia.

Actualmente la industria mezcalera ha tenido una amplia participación dentro de la economía del estado, ya que en el año 2000 se exportaron 4 700 000 litros de mezcal, lo cual representó una derrama económica de 79 900 dólares (Ramales & Barragan, 2002), en el año 2006 se obtuvo una producción aproximada de 5.2 millones de litros, por lo que se estima que para el año 2007, los industriales obtengan recursos por el orden de los 300 millones de pesos (Velásquez, 2007).

En Oaxaca, anualmente se producen cerca de 8 millones de litros de mezcal, los cuales durante su procesamiento, en específico en la destilación producen de 6 a 15 litros de vinazas por litro de alcohol. Las vinazas presentan una composición variada que depende de la materia prima empleada para la fermentación, así como de otros aspectos del proceso de producción como: las

aguas de lavado para la limpieza de los fermentadores y destiladores y las aguas de enfriamiento o aguas de condensación (Duarte et al., 1997). Las vinazas se caracterizan por tener: altas concentraciones de materia orgánica de contaminantes expresada como demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y demandas químicas de oxígeno (DQO), que pueden tomar valores entre 35,000–50,000 mgO₂/L y 70,000–150,000 mg O₂/L, respectivamente (Robles-González et al., 2012; Madejón et al., 2001b; Nandy et al., 2002), pH ácidos de 3.5 a 4.0, presencia de compuestos fenólicos 478-541 mg equivalentes de ácido gálico (EAG) /L (Robles-González et al., 2012; Sales et al., 1987; Capasso et al., 1992); cenizas 1,550–2,000 mg/L, sólidos disueltos (el 50% de estos sólidos corresponde a azúcares reductores) (Sangave et al., 2007), compuestos no volátiles del caldo de fermentación, concentraciones altas de sales minerales (Robles-González et al., 2012), alta conductividad electrolítica (250-300 dS m⁻¹) y fuerte coloración marrón oscuro por la presencia de melanoidinas (Peña et al., 2003; Coca et al., 2005).

Figura 6: Agave Espadín



3.13 VINAZAS

Existe un número importante de pequeñas y medianas industrias que producen etanol a partir de la fermentación de distintas materias primas (caña, uva, agave). Dichas industrias producen cantidades considerables de líquidos residuales, o también denominados como vinazas. Las vinazas se definen como los residuos líquidos remanentes en la etapa de la destilación de los azúcares fermentados provenientes de melazas, caña de azúcar, jugos de uva, agave, etc. (Robles-González et al., 2012). El proceso de elaboración del mezcal se realiza en cuatro etapas, cocción, molienda, hidrólisis, fermentación y destilación. En esta última etapa se obtiene como subproducto a las vinazas. La producción de vinazas en una destilería tradicional se encuentra entre 6-15 L de vinazas por litro de etanol obtenido. Las características de las vinazas varían considerablemente de acuerdo a la materia prima empleada, la localización y el tipo de proceso de fermentación adoptado (Robles-González et al., 2012; Pant y Adholeya, 2006). En la tabla 1 se muestran de manera general las principales características de las vinazas.

Tabla 1: Características fisicoquímicas de las vinazas mezcaleras.

Parámetro	Intervalo
DQO (mg O ₂ /L)	56,230-122,860
BOD ₅ (mg O ₂ /L)	26,500-33,500
pH	3.6-3.8
Fenoles totales (mg EAG/L)	578-542
Fructosa (mg/L)	14.8-50.0
Conductividad (mS/cm)	2.6-4.2
Color (Abs _{475nm})	4.6-10.6
SSV (mg/L)	8200 ± 2970
Nitrogen Kjeldahl (mgNH ₃ -N/L)	660-5,650
Solidos totales (mg/L)	26,830-94,713
Sulfatos (mg/L)	308-842
Fosfatos (mg/L)	290-1705

Robles-González et al., 2012

Como se puede observar en la tabla 1, las vinazas mezcaleras presentan una importante cantidad de fenoles expresadas como equivalentes de ácido gálico, a los cuales se les han atribuido efectos benéficos frente al desarrollo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (como algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y arteroesclerosis. (Martinez et al., 2002)

3.14 FENOLES:

El término fenol comprende aproximadamente 8000 compuestos distribuidos en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo. **(Figura 7)**

Desde el punto de vista estructural, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides.

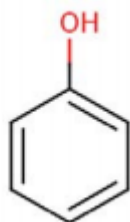


Figura 7: Fenol

3.15 EFECTO ANTIOXIDANTES DE LOS FENOLES:

Los fenoles son muy susceptibles a la oxidación, por lo tanto tienen un carácter marcadamente antioxidante, ya que experimentarán la oxidación antes que otras especies susceptibles de ser oxidadas y en consecuencia las protegerán frente a esos ataques oxidantes (p.ej., luz, radicales libres, químicas, etc.). Por otra parte, las estructuras fenólicas complejas tienen la capacidad de recuperar su estado reducido mediante un equilibrio redox favorecido por las interacciones de otros grupos funcionales de sus estructuras químicas con distintos metabolitos

presentes en el medio. Con lo cual una vez oxidadas van a recuperar su hidroxilo recuperando su capacidad antioxidante, evitando nuevamente la oxidación de otros elementos de interés del medio (p.ej., proteínas, nutrientes, azúcares, etc.)

3.16 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS FENOLES:

Los polifenoles poseen acciones molusquicidas, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarreicas, antiúlceras, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. Se ha verificado que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia Humana (HIV) y del virus simplex humano (HSV), inhiben a las enzimas glucosil transferasas del *Streptococcus mutans* (caries dental), inhiben la autooxidación del ascorbato, también inhiben algunos efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantina monoamina oxidasa. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento (Velioglu et al, 1998; Proestos et al, 2005).

Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias: dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con una mayor expectativa de vida. Estas propiedades incluyen actividad anticancerígena, antiviral, antiinflamatoria, efectos sobre la fragilidad capilar, y habilidad para inhibir la agregación plaquetaria. Estos compuestos pueden moderar la peroxidación de los lípidos involucrados en la aterogénesis, trombosis y carcinogénesis. Otras de sus propiedades incluyen la captura de radicales libres, inhibición de las enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A2, cicloxigenasa, lipoxigenasa) y acción antiinflamatoria (Siddhuraju et al, 2003).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN:

El virus sincitial respiratorio humano es considerado a nivel mundial como el principal agente causal de infecciones severas del tracto respiratorio inferior en niños hospitalizados y son la principal causa de morbilidad y mortalidad en infantes menores de dos años. Para este virus no existe una vacuna, y los métodos profilácticos son muy caros por lo que se buscan alternativas para el tratamiento que sean costeables, eficaces y seguras.

En México, la elaboración de mezcal es una de las industrias que genera altos volúmenes de residuos agroindustriales. El estado de Oaxaca produce cerca del 60% del mezcal a nivel nacional, lo cual genera al aproximadamente 14 millones de litros de vinazas, que son desechados al ambiente produciendo contaminación de suelos y cuerpos de agua. Las vinazas contienen una cantidad importante de compuestos fenólicos, los cuales ya se ha reportado que poseen propiedades anti-inflamatorias, antibacterianas, antimicrobianas y antivirales. Es por ello que resulta interesante estudiar los efectos del extractos polifenólicos obtenidos a partir de vinazas de mezcal (EPFVM) en un modelo in vitro de infección de hRSV.

5. OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la actividad del extracto polifenólico obtenido a partir de vinazas de mezcal en un modelo *in_vitro* de infección por hRSV.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Evaluar la inocuidad del extracto polifenólico obtenido a partir de vinazas de mezcal, en la línea celular HEp-2
- Determinar en que etapa del ciclo de replicación de hRSV se presenta la potencial actividad antiviral.
- Comparar la actividad antiviral de la Ribavirina como un control interno en el ciclo de infección.

6. METODOLOGIA.

6.1 OBTENCION DEL EXTRACTO POLIFENÓLICO OBTENIDOS A PARTIR DE VINAZAS DE MEZCAL (EPFVM):

El EPFVM, fue obtenido en laboratorio de Biotecnología del Instituto de Agroindustrias perteneciente a la Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca

La muestra se acondicionó previamente mediante centrifugación a 4500 rpm Posteriormente se tomaron 20 mL de vinazas y se sometieron a extracción líquido-líquido por triplicado con 20 mL de acetato de etilo (v/v) a temperatura ambiente. Se combinaron las tres fracciones orgánicas y se eliminó el agua presente en los extractos con Na_2SO_4 anhidro. El acetato de etilo se evaporó empleando un rotavapor a 60 °C. Posteriormente, la muestra se resuspendió en 20 mL de una mezcla 60:40 de metanol-agua. La curva estándar se realizó empleando ácido gálico. Para el análisis, en tubos de ensaye de 10 mL se adicionaron 50 μL de muestra (o estándar), 3mL de agua destilada y 250 μL de reactivo de Folin Ciocalteau 1 M. Las muestras se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y se agitaron por 15 segundos. Pasado el tiempo, se adicionaron 750 μL de Na_2CO_3 al 20 %, se homogeneizaron y se dejaron reposar por 40 minutos. Las muestras se leyeron a una absorbancia de 765 nm en un espectrofotómetro marca Hach modelo DR5000. El blanco se preparó mediante la sustitución de la muestra por agua desionizada. Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico/L.

Para posterior uso en los ensayos celulares se re-suspendió en PBS y se filtró en una membrana de 0.22 μm para asegurar su esterilización.

6.2 CELULAS Y VIRUS

Se utilizó la línea celular HEp-2 (ATCC CCL-23), células epiteliales de carcinoma de laringe de origen humano. La cepa de hRSV corresponde a la cepa LONG del subgrupo A.

6.3 PROPAGACION DE CELULAS

A una caja Petri con una monocapa confluyente de células HEp-2 se le retira el medio, se hicieron 3 lavados con PBS de 4 mL cada uno. En el último lavado se le retira el medio y se agregan 750 µl de EDTA y 150 µl de tripsina. Se incuba durante 10 minutos en una cámara con 5% de CO₂ y 37°C. Transcurrido este tiempo se detiene la reacción con 3 ml de DMEM con 5% de SFB y se re suspenden de tal forma que la suspensión celular sea homogénea. Se toman dos mililitros se colocan en una caja Petri y se le agregan 8 ml de DMEM al 5% de SFB.

6.4 PROPAGACIÓN DEL VIRUS

En una placa de 24 pozos con una monocapa de células HEp-2 confluyente se retira el medio, y se realizaron 3 lavados de 4 ml de PBS. Se le adicionaron 50 µl de hRSV LONG Subgrupo A y se deja incubar por 4 horas (tiempo en el que alcanza su nivel máximo de absorción) a 37°C con 5% de CO₂. Al termino de ese tiempo se retira el inoculo y se añaden 500 µl de DMEM sin SFB.

Aproximadamente a las 72 horas post-infección se observa el efecto citopatico, se retira el medio y se coloca en un tubo cónico de 15 ml se agrega MgSO₄ a una concentración de 0.1 M. Se resguarda en el ultracongelador a -80°C.

6.5 RIBAVIRINA

Se utilizó Ribavirina como control interno de la marca comercial "Vilona" en solución pediátrica a una concentración de 40 mg/ ml. Para los ensayos realizados

se evaluaron diferentes concentraciones de Ribavirina hasta obtener la concentración óptima de 200µg/ml.

6.6 PRUEBAS DE INOCUIDAD: DETERMINADO POR ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

En una caja Petri confluyente de células HEP2 se retira el medio y se hace un lavado de 4ml con PBS, para desprender la monocapa de células se agregan 750 µl de EDTA y 150 µl de tripsina, se incubaron durante 10 minutos a 37°C , 5% de CO₂ . Se resuspenden en 5 ml de DMEM al 5% de SFB y se colocan 200 µl de células en una placa de 24 pozos agregando 1 ml de medio MEM al 5% de SFB.

Las diluciones del extracto se prepararon en otra placa de 24 pozos en la cual en el primer carril se colocaron 300 µl del extracto crudo y 225 µl de DMEM sin suero fetal bovino (SFB) en los demás carriles. Se toma una alícuota de 25 µL del extracto de vinazas y se pasa al segundo carril y así sucesivamente en diluciones seriadas 1:10 dejando el último como control de células normales como se muestra en la **Figura 8**.

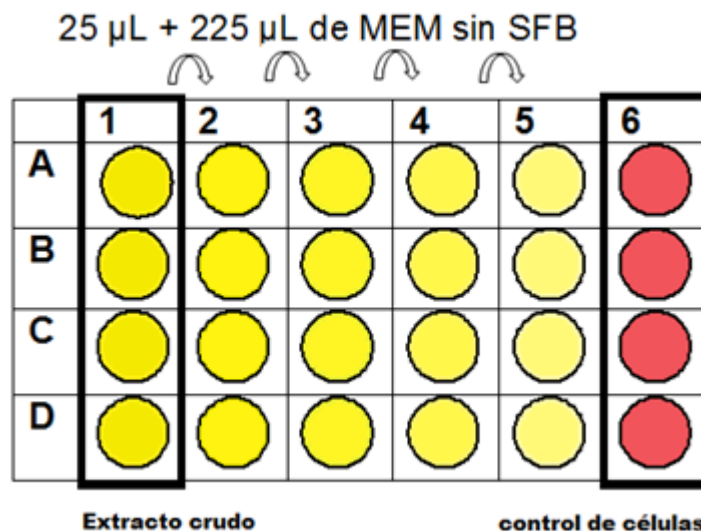


Figura 8: Esquema de las diluciones seriadas utilizadas para el ensayo de inocuidad.

Se le retira el medio a la placa con células y se le agrega la dilución correspondiente. Posteriormente se efectúa una cinética de viabilidad celular a las 18, 24 y 36 horas en cada punto de esta se mide la viabilidad por exclusión de azul de tripano. Se realizan tres lavados de PBS, se adicionan 150 μL de tripsina se incuban por 10 minutos 37°C , 5% de CO_2 a cada pozo se le agrega 1 ml de DMEM al 5% de SFB. Se toman 90 μL de cada pozo y se colocan en tubos Eppendorf debidamente etiquetados y 10 μL de azul de tripano.

Se incuban 5 minutos cada tubo a 37°C y se procede a hacer un conteo de células vivas en una cámara de Neubauer para cada tubo.

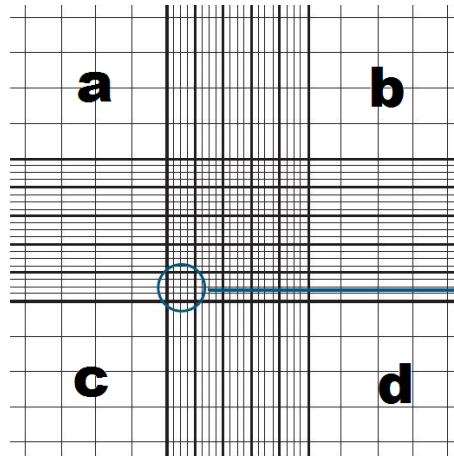


Figura 9. Representación de la cámara de Neubauer donde a,b,c,d son los cuadrantes utilizadas para contar a las células vivas.

$$\frac{N_{cels}}{ml} = \hat{x}(Fd)(Fc)$$

Ecuación 1: Numero de células por ml donde \hat{x} es el promedio de las células vivas contadas Fd es el factor de dilución utilizado ($\frac{100\mu l}{90\mu l}$) y Fc el factor de la Camara (10000)

$$\% \text{ de células vivas/ml} = \frac{N_{cel}}{N_{cel (0horas)}} \times 100$$

Ecuación 2: Porcentaje de células vivas. Donde N_{cel} son las células vivas contadas. $N_{cel (0horas)}$ Número de células control a las 0 horas.

6.7 ENSAYO EN PLACA

Para conocer el título de hRSV se realizó un ensayo de control de infectividad.

Sembrando en una caja de 6 pozos células HEp-2 en 3 ml de medio de crecimiento DMEM con 5% de SFB hasta que la caja este confluyente (McKimm-Breschkin, 2004).

En otra placa de seis pozos estéril realizar diluciones seriadas de la siguiente manera: en el pozo uno adicionar 100 μ l de hRSV LONG subgrupo A, en los pozos 2 a 6 adicionar 450 μ l de DMEM sin SFB y hacer diluciones seriadas 1:10 dejando el pozo 6 como control de células.

Retirar el sobrenadante de la caja con células confluentes, lavar los pozos tres veces con 4 ml de PBS. Inocular con la dilución correspondiente y se incuba por un periodo de 4 horas. Al término de este tiempo se retira el inoculo y se adicionan 3 ml de agarosa al 0.3% en DMEM sin SFB. Posteriormente se incuba la placa a 37°C con 5% de CO₂ durante 72 horas.

Para fijar las células se adiciona 2 ml de formaldehido al 1% se deja toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Se retira la agarosa con el formaldehido y se le agrega de 2 a 3 ml de rojo neutro al 0.05% para teñir las células. Se deja una hora con agitación y al finalizar se lava con agua. Se cuentan

el número de sincitios por pozo y se calcula el título viral a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{UFP}{ml} = (d)(N)(v^{-1})$$

Ecuación 3: Donde d es el factor de dilución; N el número total de sincitios contados en un pozo y V es el volumen inoculado en ml.

6.8 ENSAYO EN PLACA CON EL EXTRACTO POLIFENÓLICO OBTENIDO A PARTIR DE VINAZAS DE MEZCAL:

Una vez obtenido el título viral se toma este resultado como el 100% de infectividad y se procede a realizar el ensayo en placa con el EPFVM, para determinar en qué punto del ciclo de replicación de hRSV tiene actividad antiviral.

En una placa de 24 pozos con una monocapa de células confluentes se infectaron con diluciones seriadas del virus de la siguiente manera: en una placa de 24 pozos estéril se adicionan 300 µl de hRSV en el primer carril y 225 µl de DMEM en los carriles 2 a 6. Se toma una alícuota de 25 µl de virus y se van haciendo diluciones seriadas 1/10 en el resto de la placa dejando el último carril como control de células. Como se muestra en el **Figura 10**.

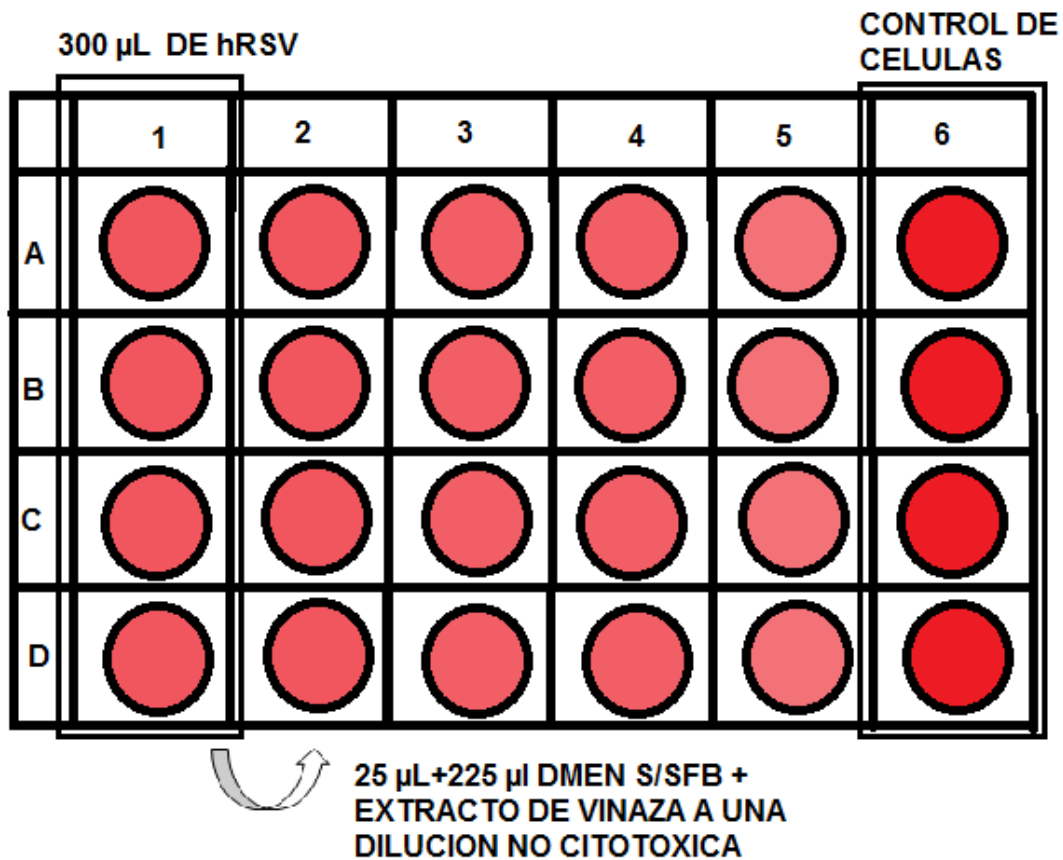


Figura 10: Esquema de diluciones seriadas realizadas para el Ensayo en placa

- Unión: Se agregó el EPFVM, a una dilución no citotóxica y deja incubar 2 horas a 4°C y dos horas a 37°C y 5% de CO₂.
- Replicación: se agrega el EPFVM y se deja durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂.
- Salida: Se inocula el virus durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ posteriormente se agrega el EPFVM incuba de nuevo 2 horas 37°C y 5% de CO₂ en presencia del extracto.

6.9 ENSAYO EN PLACA CON RIBAVIRINA

Como control interno del experimento, una vez que realizamos el ensayo en placa con el EPFVM, procedemos a corroborar con Ribavirina para comparar su actividad en la unión, replicación y salida el virus.

La metodología a seguir fue la misma que con el EPFVM, se adiciono la Ribavirina a una concentración de 200 µl/ ml:

- Unión: Se agrega la Ribavirina y se deja incubar 2 horas a 4°C y dos horas a 37°C y 5% de CO₂.
- Replicación: se agrega la Ribavirina y se deja durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂.
- Salida: Se inocula el virus durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ posteriormente se agrega la Ribavirina y incuba de nuevo 2 horas 37°C y 5% de CO₂

6.10 TCID₅₀

Para conocer el título viral de hRSV se utilizó el método de TCID₅₀ para conocer el 100% de infectividad del virus. Este ensayo se realizó de la siguiente manera:

En una caja Petri confluyente de células HEp2 se retira el medio y se hace un lavado de 4ml con PBS, para desprender la monocapa de células se agregan 750 µl de EDTA y 150 µl de tripsina, se incubaron durante 10 minutos a 37°C , 5% de CO₂ . Se resuspenden en 5 ml de Medio Mínimo Esencial (MEM) al 5% de SFB y se colocan 150 µl de células en una placa de 96 pozos.

La placa de 96 pozos con células confluentes se infectó con las diluciones seriadas de la suspensión. Las diluciones se realizaron en otra placa de 96 pozos de la siguiente manera: En el primer colocamos 100 µl de hRSV y en el resto de la placa colocamos 70 µl de medio MEM sin SFB. Tomamos una alícuota de 35 µl del primer pozo y la pasamos al segundo carril y así sucesivamente en diluciones seriadas 1:3 hasta el pozo 11, dejando el carril 12 como control de células.

Colocamos las diluciones en el pozo que corresponde a la placa con células confluentes. Procedemos a incubar durante 4 horas a 37°C, 5% CO₂. Después retiramos el inoculo y colocamos medio fresco MEM sin SFB. Se incuba hasta observar efecto citopatico y posteriormente se fijan las células con metanol incubamos durante 10 minutos en agitación, se retiró el metanol y se adicionaron 100 µl de cristal violeta durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se retira el cristal violeta y se procede a observar al microscopio el número de pozos con efecto citopatico para calcular el título viral y el porcentaje de infectividad de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

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

Ecuacion 4 Donde: Δ : \log_{10} Ultima dilucion donde se presenta efecto citopatico:

δ \log_{10} del factor de dilucion; s : es el número total de pozos que presentan sincitios entre el numero de filas utilizadas.

6.11 TCID₅₀ CON EXTRACTOS PILIFENÓLICOS OBTENIDOS A PARTIR DE VINAZAS DE MEZCAL

Una vez obtenido el título viral se toma este resultado como el 100% de infectividad y se procede a realizar el ensayo TCID₅₀ con el EPFVM para determinar en qué punto del ciclo de replicación de hRSV tiene actividad antiviral.

- Unión: Se agregó el EPFVM a una dilución no citotóxica y deja incubar 2 horas a 4°C y dos horas a 37°C y 5% de CO₂.
- Replicación: se agrega el EPFVM y se deja durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂.

- Salida: Se inocula el virus durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ posteriormente se agrega el EPFVM y se incuba de nuevo 2 horas 37°C y 5% de CO₂ en presencia del extracto.

Para calcular el porcentaje de infectividad de los ensayos de unión, replicación y salida tomamos el resultado del título viral de hRSV como el 100% de infectividad y calculamos el por ciento de infectividad con base a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de infectividad} = \frac{TCID_{50} \text{ RSV} + \text{extracto vinaza}}{TCID_{50} \text{ RSV}} \times 100$$

Ecuación 5: Donde **TCID₅₀ + EPFVM:** título viral calculado en presencia del extracto de vinazas mezcaleras. **TCID₅₀ hRSV:** Título viral calculado de hRSV

6.12 TCID₅₀ CON RIBAVIRINA:

Como control interno del experimento, una vez que realizamos el ensayo TCID₅₀ con el EPFVM, procedemos a confirmar con Ribavirina para comparar su actividad en la unión, replicación y salida el virus.

La metodología a seguir fue la misma que con el EPFVM, se adiciono la Ribavirina a una concentración de 200 µl/ ml:

- Unión: Se agrega la Ribavirina y se deja incubar 2 horas a 4°C y dos horas a 37°C y 5% de CO₂.
- Replicación: se agrega la Ribavirina y se deja durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂.
- Salida: Se inocula el virus durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ posteriormente se agrega la Ribavirina y se incuba de nuevo 2 horas 37°C y 5% de CO₂.

6.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para determinar si había diferencia significativa entre los grupos, el análisis estadístico que se incluyó una prueba de ANOVA en el programa Excel 2013.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

7.1 Ensayo de inocuidad:

Los resultados arrojados en el ensayo de inocuidad mostraron que el porcentaje de células viables aumenta con el incremento de la dilución del EPFVM.

Se realizó una cinética de inocuidad en el tiempo (18, 24 y 36 horas), los datos obtenidos mostraron que el extracto crudo como en la primera dilución (1:10) hay una disminución de viabilidad considerable a las 36 horas. Por lo que utilizamos la dilución 1:10 000 que corresponde a una concentración de 0.04331 mg de ácido gálico/ L, concentración a la cual las células presentaron una viabilidad del 85%. (Gráfica 1).

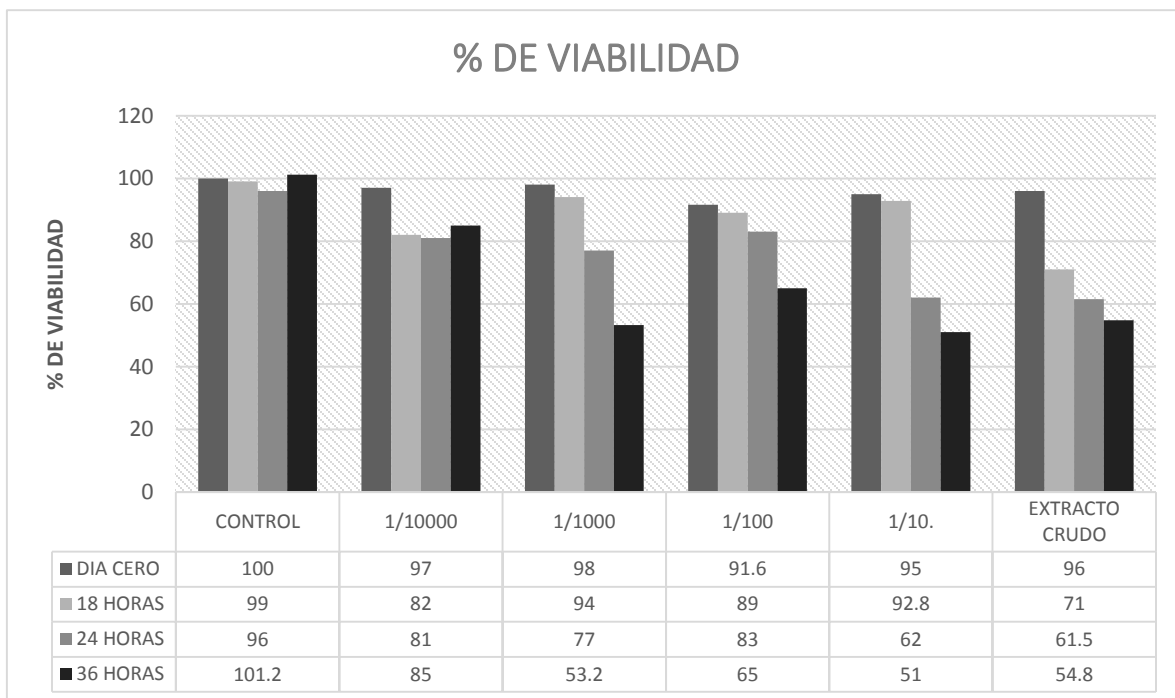


Gráfico1. Ensayo de inocuidad. Cinética de viabilidad a las 18, 24 y 36 horas. La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul tripano

Para evaluar el efecto antiviral del extracto de vinazas mezcaleras fue necesario propagar y titular la cepa de referencia de hRSV (cepa Long subgrupo A). El título viral se determinó por: Ensayo en placa y TCID₅₀.

El título viral determinado por Ensayo en placa y TCID₅₀ se realizó por triplicado y correspondió a una concentración de 4.5×10^4 el primero y 3.83×10^6 para el segundo. La suspensión viral con este título se utilizó para realizar los ensayos de actividad antiviral.

Los ensayos de actividad antiviral se determinaron por disminución del título viral medido por TCID₅₀ y ensayo en placa expresado en función al porcentaje de infectividad. El efecto se determinó en tres fases del ciclo de replicación: UNION, REPLICACION Y SALIDA

El porcentaje de infectividad se calculó tomando como control de infectividad los ensayos de título viral siendo este nuestro 100% de infectividad y posteriormente comparando este con los ensayos de unión, replicación y salida del hRSV.

7.2 ENSAYO EN PLACA:

Al analizar los resultados obtenidos en el ensayo en placa del control del virus con el EPFVM a una concentración de 0.04331 mg equivalentes de ácido gálico/L se obtuvo que el porcentaje de infectividad en la fase de unión fue de 0.81% (**Figura 1**) lo que representa una diferencia estadística de $p= 2.34 \times 10^{-9}$, respecto al control de infectividad de hRSV. En tanto que los ensayos de replicación y salida no presentan una diferencia estadística significativa entre ellos presentando una disminución de infectividad de 15.08% y 19.5% respectivamente (**Tabla 3, Gráfica 2**).

Tabla 3: Resultados del ensayo en placa de hRSV con el EPFVM.

	CONTROL	UNIÓN	REPLICACIÓN	SALIDA
1	480	3.60	65	97
2	420	4.40	71	87
3	470	3.10	68	85
Promedio	456.66	3.7	68	89.6
% de infectividad	100	0.8	14.44	20.4
% de infectividad	100	0.97	15.7	19.3
% de infectividad	100	0.68	15.11	18.8
Promedio	100	0.81	15.08	19.50

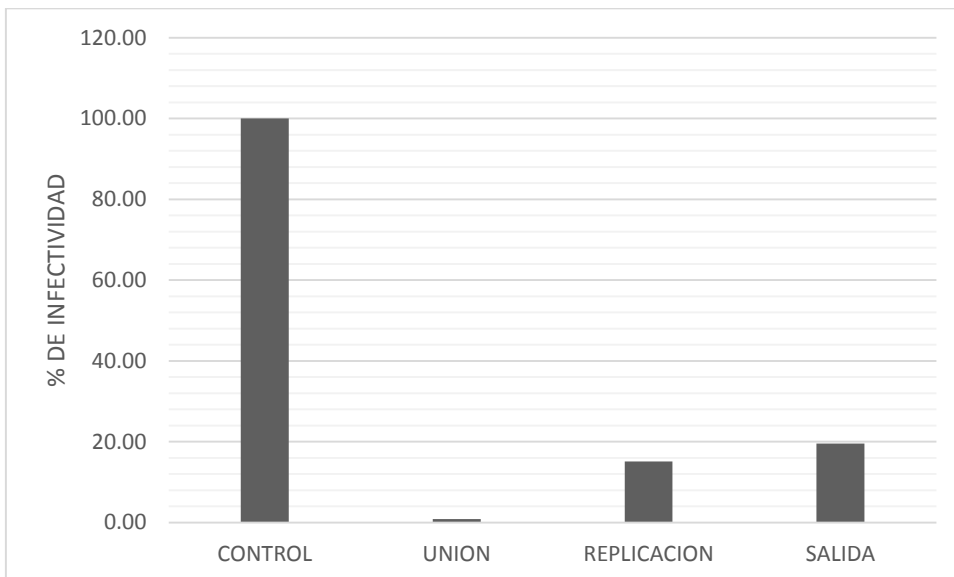


Gráfico 2: Resultados del Ensayo en placa del EPFVM.

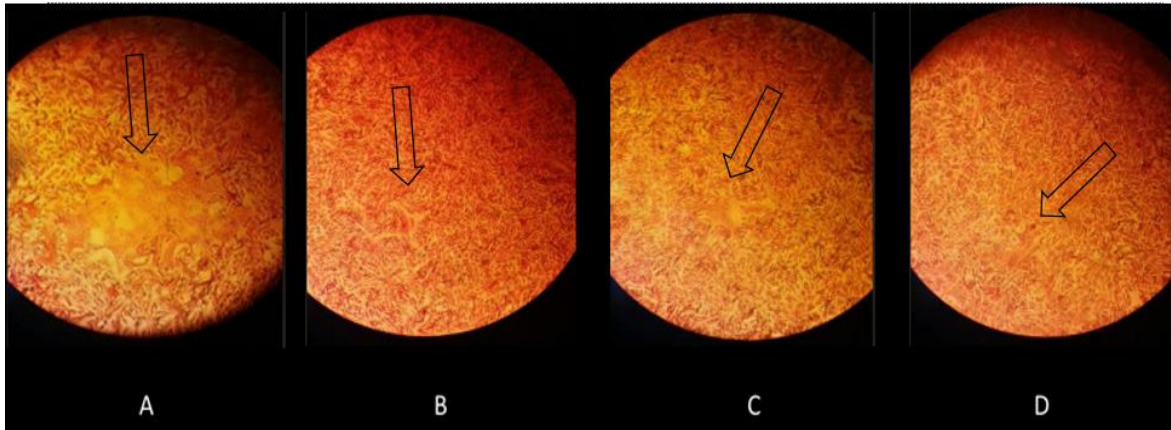


Figura 11: Formación de sincitios en el ensayo en placa del Virus más el EPFVM.

A) Control del Virus; B) Unión; C) Replicación; D) Salida

Al analizar la formación de sincitios en tres diferentes condiciones se observa que en el ensayo de unión disminuyen significativamente su tamaño comparado con el ensayo de Replicación y Salida.

7.3 TCID₅₀

Al comparar los resultados del porcentaje de infectividad del EPFVM a una concentración de 0.04331 mg equivalentes de ácido gálico/L con el control del virus por ensayo TCID₅₀ se observa que el porcentaje en la fase de unión es de 0.12% presenta una diferencia estadística de 9.25×10^{-10} con respecto al control de infectividad, en tanto que los ensayos de replicación y salida no presentan diferencia estadística entre ellos y presentando una disminución en el porcentaje de infectividad de 6.80% y 8.40% respectivamente (Tabla 4, Gráfica 3).

Tabla 4: Resultados del TCID₅₀ del EPFVM.

	CONTROL	UNIÓN	REPLICACIÓN	SALIDA
1	4100	6.50	290	340
2	3600	3.50	260	270
3	3800	4.20	240	360
Promedio	3833.33	4.8	263.33	323.33
% de infectividad	100	0.16	7.57	9
% de infectividad	100	0.10	6.80	7
% de infectividad	100	0.11	6.20	9.30
Promedio	100	0.12	6.80	8.40

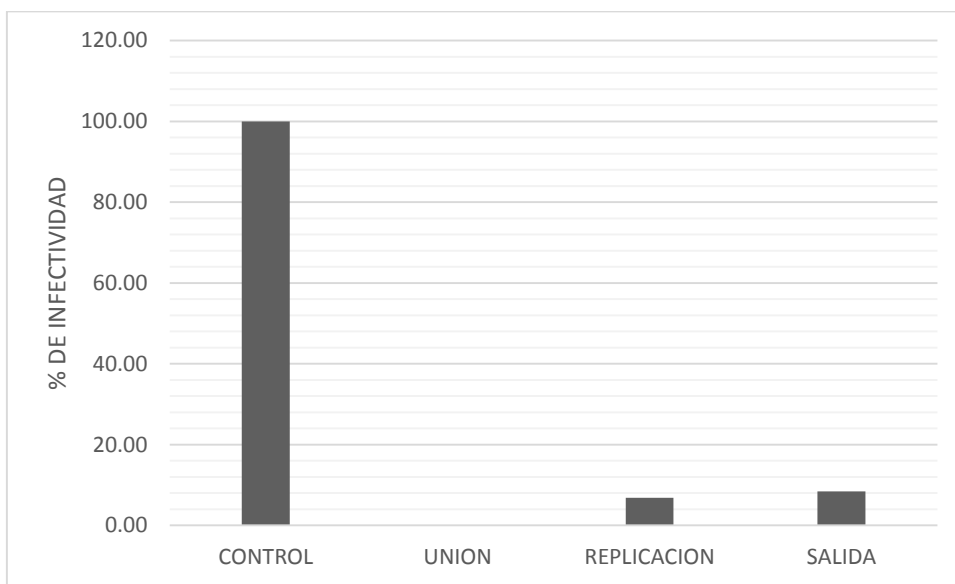


Gráfico 3: Resultados de TCID₅₀ con el EPFVM.

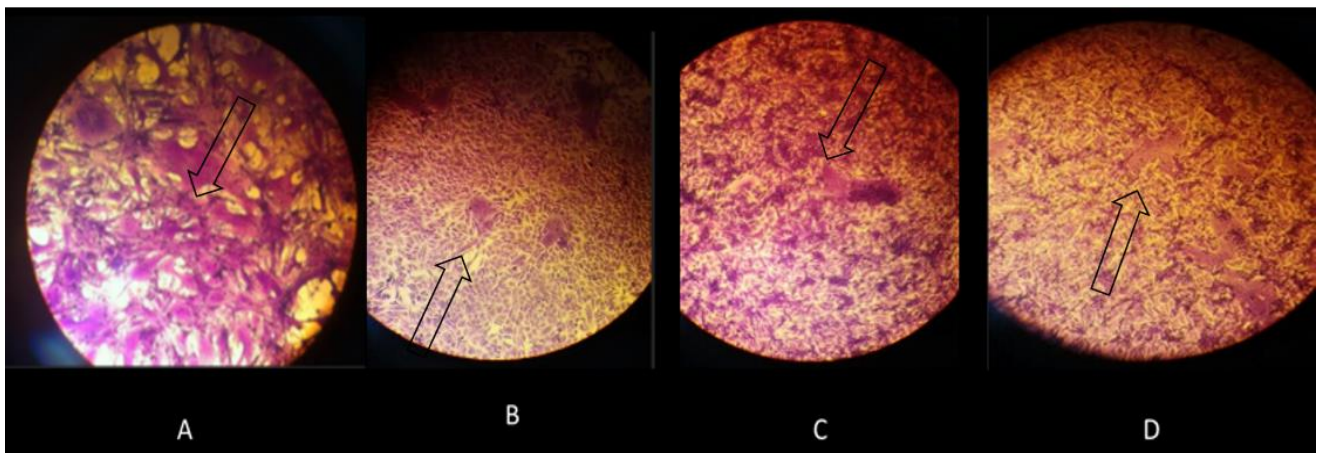


Figura 12: Formación de sincitios en el Ensayo TCID₅₀ de hRSV mas el EPFVM.

A) Control del virus; B) Unión; C) Replicación; D) Salida

Al analizar la formación de sincitios en tres diferentes condiciones (**Figura 12**) se observa que en el ensayo de unión disminuyen significativamente su tamaño comparado con el ensayo de Replicación y Salida confirmando los resultados obtenidos en el Ensayo en Placa.

7.4 RIBAVIRINA: ENSAYO EN PLACA

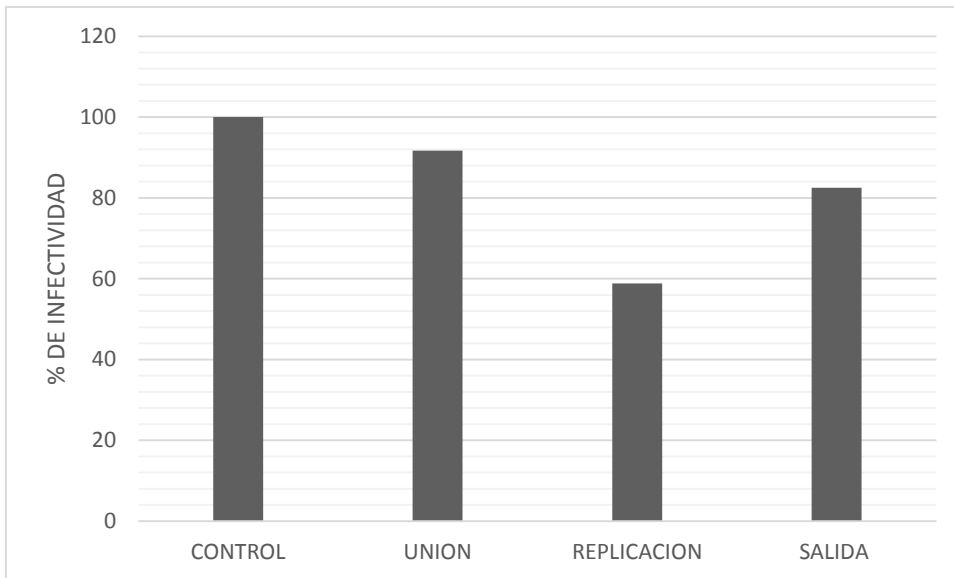
La Ribavirina se utilizó como control interno a una concentración de 200 µg/ml en ya que es reconocido por su efecto antiviral en el hRSV. Se probó en tres diferentes condiciones: unión, replicación y salida. Se observó que a nivel de replicación disminuye 58.8% su actividad comparando con el control de hRSV y presenta una diferencia estadística de 1.60×10^{-5} (**Figura 3**). Tanto en los ensayos de unión y salida disminuyeron su porcentaje de infectividad con respecto al control del virus sin presentar diferencia significativa entre ellos (**Tabla 5, Gráfica 4**).

Tabla 5. Resultados de la Ribavirina en Ensayo en placa.

	CONTROL	UNIÓN	REPLICACIÓN	SALIDA
1	4.8	3.71	2.75	3.76
2	4.2	3.53	2.53	3.59
3	4.7	3.66	2.66	3.83
Promedio	4.5	2.96	2.64	3.72
% de infectividad	100	82.4	61.11	83.5
% de infectividad	100	78.4	56.22	79.7

% de infectividad	100	81.3	59.1	85.1
Promedio	100	80.7	58.8	82.7

Mediciones $\times 10^4$



Gráfica 4: Resultados de la Ribavirina en el Ensayo en Placa.

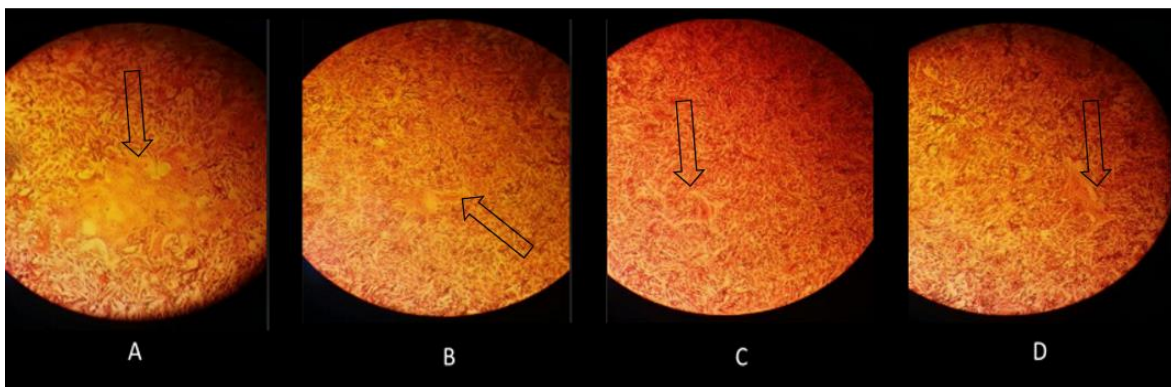


Figura 13: Formación de sincitios en el Ensayo en placa del virus más la Ribavirina

A) Control del virus; B) Unión; C) Replicación; D) Salida

7.5 TCID₅₀

Al comparar el porcentaje de infectividad obtenido con el control del virus hRSV con los ensayos corridos del virus más la Ribavirina se observó que la Ribavirina disminuye su infectividad al 61.7% lo cual es congruente con el ensayo en placa en el que observamos una disminución significativa en el porcentaje de infectividad a nivel de la replicación. En tanto que los ensayos de unión y salida presentaron un porcentaje de infectividad de 100.5% y 86.1% respectivamente sin presentar diferencia estadística significativa entre ellos (Tabla 6, Gráfica 5).

Tabla 6: Resultados de la Ribavirina en el ensayo TCID₅₀

	CONTROL	UNIÓN	REPLICACIÓN	SALIDA
1	4.10	3.90	2.40	3.70
2	3.60	4.20	2.10	3.30
3	3.80	3.40	2.60	2.90
Promedio	3.83	3.83	2.36	3.3
% de infectividad	100	101.8	62.6	96.6
% de infectividad	100	109.6	54.8	86.1
% de infectividad	100	88.77	67.8	75.7
Promedio	100	100.05	61.7	86.1

Mediciones 10⁶

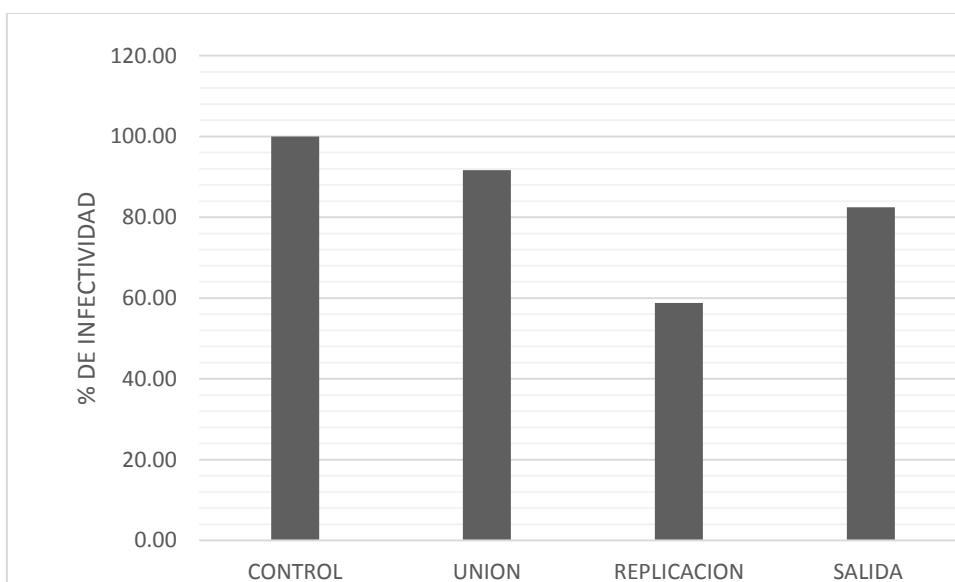


Gráfico 5: Resultados de Ribavirina en el Ensayo TCID₅₀.

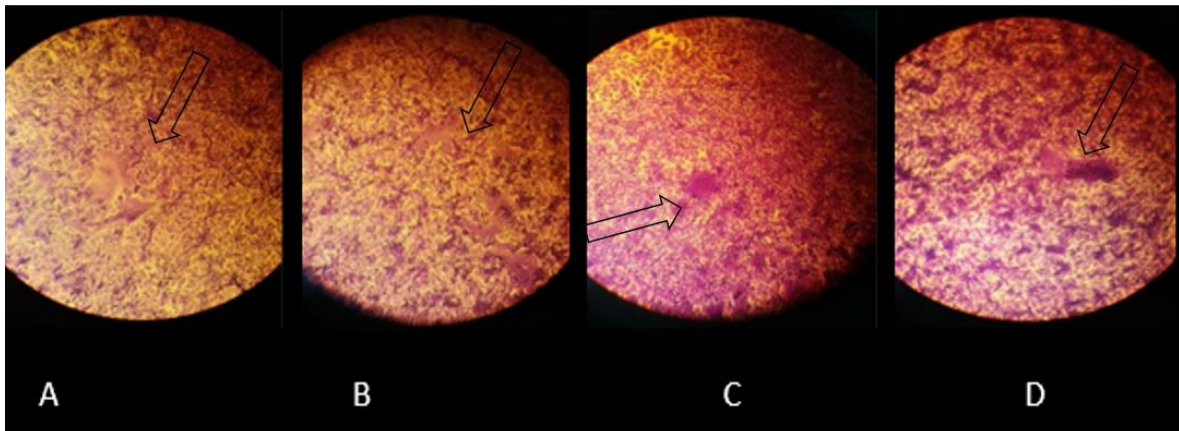


Figura 14: Formación de sincitios en el ensayo TCID₅₀ del virus más la Ribavirina.

A) Control de hRSV; B) Unión; C) Replicación; D) Salida

Se observa que la Ribavirina tiene un efecto a nivel de la replicación ya que en ambos ensayos: TCID₅₀ y en el Ensayo en placa disminuye significativamente su porcentaje de infectividad y al comparar los datos obtenidos con el EPFVM notamos que el porcentaje de infectividad es mucho menor.

En el caso de EPFVM se observó que tiene efecto a nivel de la unión, esto se puede deber a que algún componente del extracto puede estar presentando actividad antiviral y puede ser atribuida a la gran cantidad de polifenoles que contiene, por lo que es necesario caracterizar cada uno de los compuestos fenólicos y así determinar cuál de estos es el responsable de interferir con la unión del virus a la célula.

8. CONCLUSIONES:

1. Los ensayos de inocuidad demostraron que el extracto obtenido a partir de vinazas de mezcal es inocuo a una dilución 1:10000 lo que corresponde a una concentración de 0.04331 mg de equivalentes de ácido gálico/ L a un tiempo no mayor a 36 horas.
2. Al realizar ensayos en tres diferentes condiciones del hRSV con el extracto de vinaza de mezcal a una concentración constante de 0.04331 mg de ácido gálico/L: unión, replicación y salida se observó un efecto antiviral a nivel de la unión ya que su porcentaje de infectividad disminuyó significativamente (0.81% en el ensayo en placa y 0.12% en TCID₅₀) en comparación con los ensayos de replicación (15.08% en el Ensayo en placa y 6.80% en TCID₅₀) y salida (19.50% en el ensayo en placa y 8.40% en el TCID₅₀). Esta actividad antiviral puede ser atribuida a la gran cantidad de polifenoles que tiene el extracto.
3. Si comparamos la actividad antiviral del extracto con el de la Ribavirina observamos que es potencialmente mayor la disminución del porcentaje de infectividad (80.7% en el ensayo en placa y 100.5% en TCID₅₀) lo que nos permite concluir que este extracto fenólico puede coadyuvar al efecto farmacológico además de tener una actividad antioxidante comparado con la Ribavirina y así tener una fuente natural como alternativa al tratamiento.

9. PERSPECTIVAS:

- Para la continuidad de este trabajo es necesario determinar cuáles son los polifenoles que contiene el extracto de vinazas de mezcal, por lo que es necesario implementar métodos analíticos que puedan esclarecer a que se debe esta actividad antiviral y si es posible y sustentable un método de separación de estos fenoles para así poder plantear un posible mecanismo de acción.
- Una vez caracterizados determinar cuál de estos polifenoles es el que presenta o presentan actividad farmacológica, y cuál de ellos es el que interviene en la unión del virus a la célula.
- Es importante probar los extractos con muestras clínicas para evaluar las potenciales propiedades antivirales del extracto sobre virus que están en circulación en la población y si es factible su aplicación funcional en enfermedades infecciosas respiratorias causadas por agentes virales en la población susceptible.

10. BIBLIOGRAFÍA:

- Bawage, S. S., Tiwari, P. M., Pillai, S., Dennis, V., & Singh, S. R. (2013). Recent advances in diagnosis, prevention, and treatment of human respiratory syncytial virus. *Advances in Virology*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/595768>
- Becker, S., Quay, J., & Soukup, J. (1991). Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 147(12), 4307–4312.
- Bermingham, a, & Collins, P. L. (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(September), 11259–11264. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11259>
- Browne, M. J. (1979). Mechanism and specificity of action of ribavirin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(6), 747–753. <http://doi.org/10.1128/AAC.15.6.747>
- Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., Scognamiglio, (1992). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable. *Wastewaters.Phytochemistry*. 31: 4125–4128.
- Choi, Y., Mason, C. S., Jones, L. P., Crabtree, J., Jorquera, P. a, & Tripp, R. a. (2012). Antibodies to the central conserved region of respiratory syncytial virus (RSV) G protein block RSV G protein CX3C-CX3CR1 binding and cross-neutralize RSV A and B strains. *Viral Immunology*, 25(3), 193–203. <http://doi.org/10.1089/vim.2011.0094>
- Coca, M., Peña, M., González, G., (2005). Variables affecting efficiency of molasses fermentation wastewater ozonation. *Chemosphere*. 60:1408–1415.
- Cormier, S. a, You, D., & Honnegowda, S. (2010). The use of a neonatal mouse model to study respiratory syncytial virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 8(12), 1371–1380. <http://doi.org/10.1586/eri.10.125>.The
- Del, D. E. F., & Un, C. D. E. (2005). Universidad tecnologica de la mixteca.
- Duarte, E., Martins, M., Carvalho, E., Costa, S., Spranger, I. (1997). An integrated approach for overcoming the environmental impacts of wineries wastewaters a Portuguese case study. In: *Proceedings of International Symposium of the vine and wine*, 07–10 October, 1997. Yangling, China: 1–5.

- Edziri, H. L., Smach, M. a., Ammar, S., Mahjoub, M. a., Mighri, Z., Aouni, M., & Mastouri, M. (2011). Antioxidant, antibacterial, and antiviral effects of *Lactuca sativa* extracts. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1182–1185. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.003>
- Garofalo, R. P., Kolli, D., & Casola, A. (2012). Respiratory Syncytial Virus Infection: Mechanisms of Redox Control and Novel Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(2), 120907062254009. <http://doi.org/10.1089/ars.2011.4307>
- Karron, R. a, Buonagurio, D. a, Georgiu, a F., Whitehead, S. S., Adamus, J. E., Clements-Mann, M. L., ... Sidhu, M. S. (1997). Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), 13961–13966. <http://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13961>
- Krzyzaniak, M. A., Zumstein, M. T., Gerez, J. A., Picotti, P., & Helenius, A. (2013). Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS Pathogens*, 9(4), e1003309. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003309>
- Madejón, E., Díaz, M. J., López, R., Cabrera, F., (2001). Co-composting of sugar beet vinasse: influence of the organic matter nature of the bulking agents used. *Bioresource Technology*. 76: 275–278.
- McKimm-Breschkin, J. L. (2004). A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus—direct visualization of plaques without immunostaining. *Journal of Virological Methods*, 120(1), 113–117. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.02.020>
- Nandy, T., Shastry, S., Kaul, S. N., (2002). Wastewater management in a cane molasses distillery involving bioresource recovery. *Journal of Environmental Management*. 65(1): 25–38
- Mohapatra, S. S., & Boyapalle, S. (2008). Epidemiologic, experimental, and clinical links between respiratory syncytial virus infection and asthma. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 495–504. <http://doi.org/10.1128/CMR.00054-07>
- Robles -González, V., Galíndez- Mayer, J., Rinderknecht- Seijas, N., Poggi-Varaldo, H. (2012). Treatment of mezcal vinasses: A Review. *Journal of Biotechnology*. 157: 524-546.

Sales, D., Valcárcel, M., Martínez de la Osa, E., Pérez, L. (1987). A depurative process for wine distilleries wastes. *Process of Biochemistry*. 22, 85– 99

Sangave, P. C., Gogatea, P. R., Pandit, A. B., (2007). Ultrasound and ozone assisted biological degradation of thermally pre- treated and anaerobically pretreated distillery wastewater. *Chemosphere*. 68(1): 42–50.

S, R. V., & Fidel, V. (2008). Vinazas Mezcaleras : Un problema de contaminación ambiental. *Universidad Tecnológica de La Mixteca*, 20.

Spann, K. M., Tran, K.-C., Chi, B., Rabin, R. L., & Collins, P. L. (2004). Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *Journal of Virology*, 78(8), 4363–4369. <http://doi.org/10.1128/JVI.78.8.4363>

Peña, M., Coca, M., González, G., Rioja, R., García, M.T. (2003). *Chemical oxidation of wastewater from molasses fermentation with ozone*. *Chemosphere*.51: 893- 900.

Varga, S. M. (2009). NIH Public Access. *Science*, 7(8), 1239–1255. <http://doi.org/10.1586/14760584.7.8.1239>. Pulmonary

Welliver, R. C. (2003). Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *The Journal of Pediatrics*, 143(5 Suppl), S112–S117. [http://doi.org/10.1067/S0022-3476\(03\)00508-0](http://doi.org/10.1067/S0022-3476(03)00508-0)