

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
Área terminal: Bioquímica Clínica**



**INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL VIRUS HERPES  
SIMPLEX TIPO 2 Y DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1  
PANDÉMICO 2009 MEDIANTE EL USO DE UN COMPUESTO  
NANOPARTICULADO**

**T E S I S**

Que para obtener el título profesional de  
***Químico Farmacéutico Biólogo***

**P r e s e n t a**  
**Jesús Alberto Vargas Hernández**

Director de Tesis: Dr. Carlos Cabello Gutiérrez  
Asesor de Tesis: Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

CD, MX.

JUNIO, 2019.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICA  
FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

**ESTIMADOS MAESTROS:**

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

**VARGAS HERNÁNDEZ JESÚS ALBERTO**

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Inhibición de la replicación del Virus Herpes Simplex tipo 2 y del Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009 mediante el uso de un compuesto nanoparticulado**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE DRA. MA. TERESA CORONA ORTEGA  
VOCAL\* DR. CARLOS CABELLO GUTIÉRREZ  
SECRETARIO DR. JOSÉ LUIS ALFREDO MORA GUEVARA  
SUPLENTE DR. RAMÓN SOTO VÁZQUEZ  
SUPLENTE Q.F.B. MARTHA PATRICIA OROZCO GÓMEZ

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad de México, a 30 de Enero de 2019.

DRA. RAQUEL RETANA UGALDE  
JEFA DE LA CARRERA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA  
JEFATURA DE LA CARRERA  
DE Q. F. B.

c.c.p. Departamento de Control de Egresados  
c.c.p. Interesado

## *Agradecimientos:*

El presente trabajo fue realizado con la tecnología proporcionada por la empresa GRESMEX, SA de CV.

En primera instancia al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

A la Dra. María Eugenia Manjarrez Zavala (Q.E.P.D.) quien me abrió las puertas del Laboratorio de Virología.

A mi director de tesis el Dr. Carlos Cabello Gutiérrez por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto.

A mi asesor de tesis el Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara por su paciencia, su tiempo y ayuda en este trabajo.

Con especial cariño al equipo de trabajo del Departamento de Virología del INER, por su guía y consejos para realizar este proyecto.

*Dedicatoria:*

A mi familia, por sus palabras, sabios consejos y apoyo incondicional.

A mi abuelo que ya no se encuentra entre nosotros, pero estaría muy feliz.

A mi padre y a mi madre por todo su apoyo, su amor, comprensión y paciencia.

A Bety por todo su amor, sus regaños, su paciencia y sus interminables sugerencias.

---

---

## ÍNDICE.

<b>Índice de Cuadros</b>	<b>3</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>4</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>5</b>
<b>I. RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>III. MARCO TEÓRICO</b>	<b>9</b>
<b>III.1</b> Generalidades acerca de los virus.	9
<b>III.2</b> Virus Herpes Simplex tipo 2	11
<b>III.2.1.</b> Características del VHS-2	13
<b>III.2.2</b> Sintomatología y diagnóstico	14
<b>III.2.4</b> Tratamiento	17
<b>III.3</b> Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009	17
<b>III.3.1</b> Epidemiología del virus de la Influenza A H1N1	19
<b>III.3.2</b> Sintomatología y diagnóstico	21
<b>III.3.3</b> Tratamiento	23
<b>III.4</b> Cultivo celular.	23
<b>III.5</b> Desinfectantes, sanitizantes y antisépticos.	27
<b>III.6</b> Nanotecnología	30
<b>III.6.1</b> Nanopartículas complejas	31
<b>III.6.1.1</b> Nanopartículas de Cefalexina	32
<b>III.6.1.2</b> Nanopartículas de Cobalto	32
<b>III.6.1.3</b> Nanopartículas de Hematita	33
<b>III.6.1.4</b> Nanopartículas de Oro	34
<b>III.6.1.5</b> Nanopartículas de Platino	35
<b>III.6.1.6</b> Nanopartículas de Plata	35
<b>III.6.1.7</b> Nanopartículas de Titanio	37
<b>IV. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA</b>	<b>39</b>
<b>V. HIPÓTESIS</b>	<b>40</b>
<b>VI. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>41</b>

---

---

VI	Objetivos particulares	41
<b>VI.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>42</b>
VI.1	Material biológico	42
VI.2	Reactivos y soluciones	42
VI.3	Equipos	43
VI.4	Técnicas	44
VI.41	Cultivo celular.	44
VI.42	Cultivo de propagación	44
VI.43	Infección de células.	44
VI.44	Ensayo de MTT para la determinación de la CL50 del compuesto nanoparticulado.	45
VI.45	Titulación del VHS-2 por formación de placa lítica	45
VI.46	Titulación del Virus Influenza A H1N1 por hemaglutinación.	46
VI.47	Cinética para la inhibición del VHS-2 e Influenza A H1N1 pandémico 2009 contra el compuesto nanoparticulado.	46
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>47</b>
VII.1	Ensayo del efecto citotóxico	47
VII.2	Cálculos para la infección viral después de obtener los títulos virales	49
VII.21	Cálculos para infectar con VHS-2	49
VII.22	Cálculos para la infección del Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009	50
VII.4	Titulación por placa lítica del VHS-2	51
VII.5	Titulación del virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009 por el método de hemaglutinación	53
VII.6	Cinética del compuesto nanoparticulado contra el VHS-2.	55
VII.7	Cinética del compuesto nanoparticulado contra el virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009.	56
<b>IX</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>59</b>
<b>X</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>

---

---

<b>XI.</b>	<b>PROPUESTAS</b>	64
<b>XII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	65

---

---

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1</b>	Composición de medios de cultivo para células de mamífero	24
<b>Cuadro 2</b>	Tipo de cultivos celulares y líneas celulares	25
<b>Cuadro 3</b>	Principales agentes químicos que se utilizan como sanitizantes y antisépticos	28

---

---

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>	Estructura del VHS- 2	14
<b>Figura 2</b>	Estructura del Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009	21
<b>Figura 3</b>	Ensayo de MTT en línea celular VERO	48
<b>Figura 4</b>	Efecto citotóxico del compuesto nanoparticulado en línea celular VERO	48
<b>Figura 5</b>	Titulación por placa lítica del VHS- 2	51
<b>Figura 6</b>	Enfoque a 40x de los Controles Positivos en la titulación del VHS-2	52
<b>Figura 7</b>	Control Negativo de la titulación del VHS-2	52
<b>Figura 8</b>	Titulo Viral Obtenido del VHS-2	53
<b>Figura 9</b>	Titulación del Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009 por el método de hemaglutinación	54
<b>Figura 10</b>	Cinética del compuesto nanoparticulado contra el VHS-2	55
<b>Figura 11</b>	Cinética del compuesto nanoparticulado contra el Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009	56
<b>Figura 12</b>	Cinética del compuesto nanoparticulado contra el Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009	57
<b>Figura 13</b>	Cinética del Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009.	58

---

---

## Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
CL50	Concentración Letal 50
EOx	Estrés Oxidativo
H	Hemaglutinina
IR	Infrarrojo
M1	Proteína de Matriz 1
M2	Proteína de matriz 2
MEM	Medio mínimo Esencial de Eagle
MTT	Sal de Tetrazolio Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
N	Neuraminidasa
NP	Nucleoproteína
NPs	Nanopartículas
NS1	Proteína No estructural 1
PA	Proteína que codifica ARN
PB1	Proteína que codifica ARN polimerasa 1
PB1-F2	Proteína que induce apoptosis
PB2	Proteína que codifica ARN polimerasa 2
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SNC	Sistema Nervioso Central
VHS-2	Virus del Herpes Simplex tipo 2

---

---

## I. RESUMEN

**Antecedentes:** El uso de tecnologías ha permitido que la calidad de vida del ser humano mejore. Al respecto, la expansión de la nanotecnología se ha dirigido hacia la realización de diversos estudios entre los cuales destaca el uso de nanopartículas con aplicación en el campo de la medicina. En este contexto, se ha documentado su satisfactorio empleo contra células tumorales, además de su eficacia como antibiótico, antimicótico y antiparasitario en estudios in vitro. Sin embargo, no existe evidencia suficiente que respalde el uso de las nanopartículas contra virus que afectan al ser humano, pues no se han realizado suficientes estudios que evalúen su citotoxicidad paralelamente a su eficacia; razón por la cual surgió la presente investigación.

**Objetivo:** Evaluar el efecto inhibitorio de un compuesto nanoparticulado sobre la replicación de los Virus Herpes Simplex tipo 2 y del Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009.

**Metodología:** Tras realizar un cultivo celular, una posterior infección viral y un ensayo de MTT para viabilidad celular (empleando concentraciones no tóxicas para las células) se llevó a cabo una cinética a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30, 45 y 60 segundos) de un compuesto nanoparticulado contra dos tipos de virus, un ADN virus (VHS-2) y un ARN virus (influenza A H1N1 pandémico 2009), estos previamente activados.

**Resultados:** Se obtuvieron los títulos virales de  $10^{20}$  para el VHS-2 y de 1:256 para el virus de la influenza, se obtuvo una concentración letal 50 de  $10^{-4}$  del compuesto nanoparticulado en los cultivos celulares y después de realizar las cinéticas correspondientes se halló que este compuesto puede inhibir la replicación en ambos tipos virales.

**Conclusión:** El compuesto nanoparticulado empleado fue capaz de inhibir la replicación viral del VHS-2 y del virus de influenza A H1N1 pandémico 2009, sugiriendo su posible uso como agente virucida.

---

---

## II. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existen diferentes tipos de microorganismos, tales como: bacterias, hongos, protozoarios, además de priones y virus; siendo estos últimos de gran relevancia en el presente trabajo. De manera concreta, los virus son capaces de desencadenar infecciones a través de diversos mecanismos, que además resultan ser bastante complejos; razón por la cual erradicarlos del sistema se convierte en una ardua labor.

La literatura refiere que los virus son parásitos intracelulares cuya capacidad para replicarse dentro de la célula que infectan, les permite sobrevivir al grado de incluso acompañar a su huésped hasta la muerte; lo que, aunado a su capacidad relativa para provocar enfermedades, los convierte en uno de los principales objetivos de la medicina actual. En este sentido, se ha documentado que los virus Herpes Simplex tipo 2 (VHS-2) e Influenza AH1N1 pandémico 2009, poseen una elevada tasa de morbilidad y mortalidad tanto a nivel mundial como entre la población mexicana.

Por otro lado, se ha descrito que el VHS-2 pertenece a una familia de virus que no pueden ser erradicados una vez que logran replicarse dentro de la célula huésped. Respecto al A H1N1 pandémico 2009 cabe mencionar que, dada su constitución genómica la cual le confiere la capacidad de mutar con elevada frecuencia, tuvo un exabrupto en la tasa de infección y mortalidad, provocando una pandemia en dicho año.

---

---

Dado lo anterior, en las últimas décadas se ha trabajado arduamente para dilucidar los mecanismos de infección y con ello proponer estrategias que permitan prevenir y/o evitar las enfermedades víricas. Pese a los avances en este campo, los virucidas que existen en la actualidad son muy poco efectivos y potencialmente tóxicos. Por tal motivo el presente trabajo pretende proporcionar evidencia del efecto inhibitorio de un compuesto nanoparticulado sobre la replicación de los virus VHS-2 e Influenza A H1N1 pandémico 2009.

---

---

### **III. MARCO TEÓRICO.**

En la vida cotidiana, en los laboratorios académicos y de análisis clínicos, así como en la industria, se encuentran microorganismos nocivos para el ser humano, mismos que deben ser eliminados. De la amplia gama de microorganismos patógenos, los virus son de especial interés debido a su habilidad para mutar, lo que aunado a su capacidad de invadir células y replicarse dentro de ellas, los convierte en agentes potencialmente nocivos. Derivado de ello es esencial conocer sus características con la finalidad de encontrar estrategias para eliminarlos sin dañar, en medida de lo posible, las células que infectan.<sup>1-2</sup>

Dada la importancia de los virus en la presente investigación, a continuación, se presentan algunas de sus propiedades.

#### **III.1 Generalidades *acerca de los virus.***

Considerar a los virus como organismos vivos, es una interrogante cuya respuesta es ambigua. Si bien se puede considerar que la vida es un complejo conjunto de procesos resultantes de la acción de proteínas cuya especificidad y actividad depende de los ácidos nucleicos, los virus son inertes fuera de las células huésped, razón por la cual no se consideran organismos vivos. Sin embargo, una vez que los virus ingresan en la célula huésped sus ácidos nucleicos se activan y se produce la replicación viral; además, desde el punto de vista clínico los virus se pueden considerar organismos vivos ya que propician infecciones y enfermedades, de ahí que exista controversia en cuanto definirlos o no como seres vivos.<sup>2-3</sup>

---

---

Un virus se puede considerar un cúmulo excepcionalmente complejo de compuestos químicos sin vida o un microorganismo vivo excepcionalmente simple. Los virus se caracterizan por: a) un único tipo de ácido nucleico ya sea ADN o ARN, b) una cubierta proteica (a veces incluidos algunos lípidos e hidratos de carbono) que rodea al ácido nucleico, c) se multiplican dentro de una célula viva mediante el uso de la maquinaria de síntesis proteica propia de la célula, d) inducen la síntesis de estructuras especializadas capaces de transferir el ácido nucleico viral a otras células y e) su tamaño varía de 20 a 1000 nm.<sup>1-4</sup>

La estructura de los virus varía dependiendo de su material genético, así la primera estructura que se forma es el virión considerado una partícula infecciosa completa, totalmente desarrollada, compuesta solo por un ácido nucleico y rodeada de una cubierta proteica que sirve como protección ante el medio y que además funciona como vehículo de transmisión de una célula huésped a otra. De acuerdo a la ausencia o presencia de esta recubierta proteica, también se pueden clasificar como virus desnudos o envueltos, respectivamente.<sup>3-4</sup>

Los virus poseen un solo tipo de ácido nucleico, ADN o ARN, pero nunca ambos, este puede ser monocatenario o bicatenario y adoptar una forma lineal, circular o segmentada. El porcentaje del ácido nucleico varía entre el 1% y el 50% de su composición y puede contener desde unos cuantos miles hasta 250 000 nucleótidos. La envoltura de los virus está constituida por complejos de hidratos de carbono-proteínas que sobresalen de la superficie de la envoltura y son denominadas espículas; algunos virus se adosan al huésped mediante estas espículas, mismas que al ser altamente específicas, pueden emplearse como

---

---

herramienta de identificación. La envoltura de los virus, llamada cápside, los protege de enzimas como las nucleasas que se encuentran en los líquidos biológicos y de esta manera se favorece su fijación a la célula huésped.<sup>2-3</sup>

Todas las características mencionadas son de vital importancia para los virus puesto que les permiten infectar a la célula huésped y posteriormente replicarse dentro de ella, razón por la cual se dificulta erradicarlos del organismo, tal como sucede con el Virus Herpes Simplex tipo 2 (VHS-2) y el Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009, ambos de gran relevancia en la presente investigación.

### **III.2 *Virus Herpes Simplex tipo 2.***

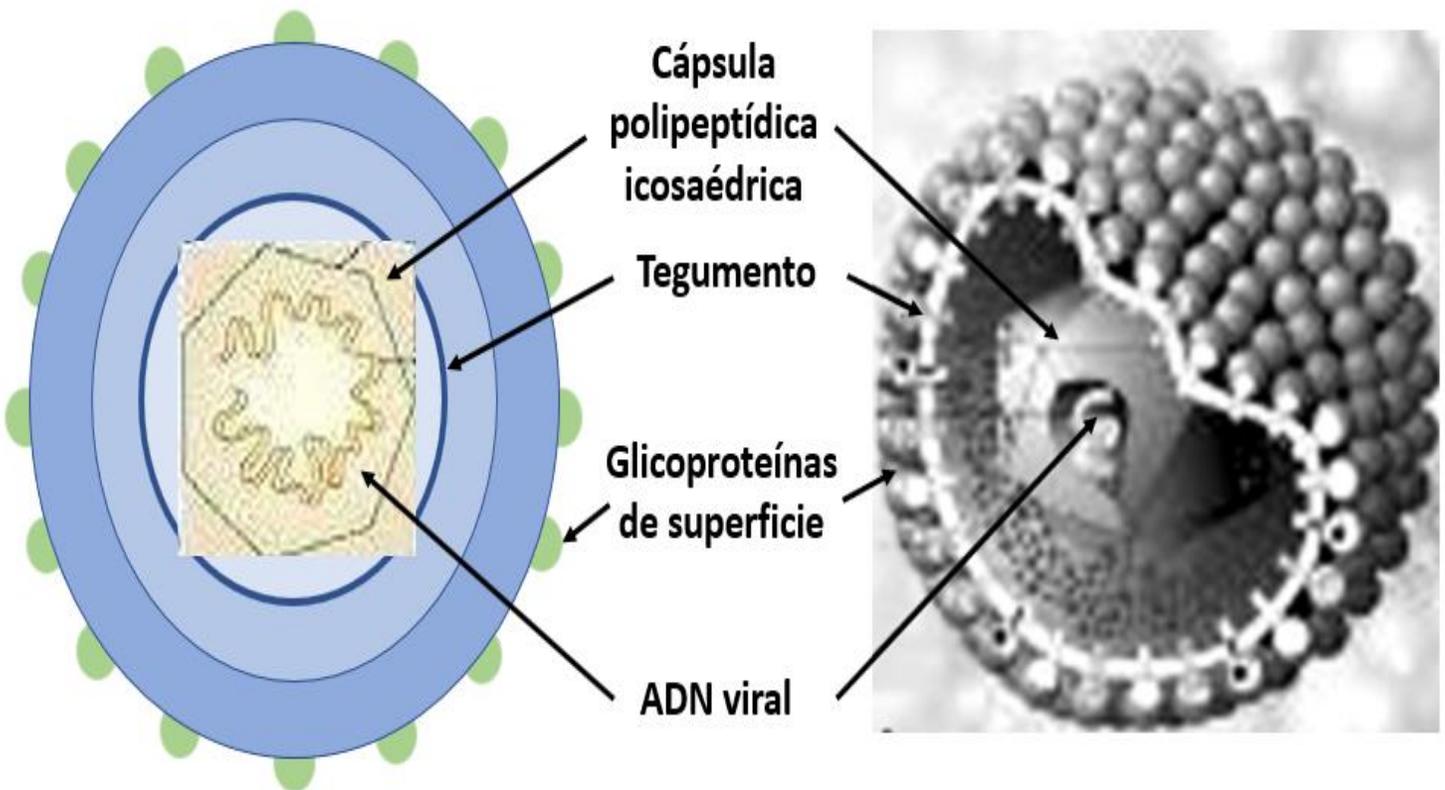
Los herpes virus humanos constituyen el tipo de virus de aislamiento más frecuente en los laboratorios, además de ser los principales agentes etiológicos de enfermedades de la piel. La Familia *Herpesviridae* constituida por los siguientes miembros: Virus Herpes Simplex tipo 1 (VHS-1), VHS-2, Citomegalovirus humano, Virus de Epstein-Barr, Virus de la varicela-zoster, Herpes virus humano 6, Herpes virus humano 7 y Herpes virus humano 8.<sup>5-7</sup>

Algunos miembros de la familia de los herpes virus pueden integrar su ADN al de la célula huésped. La mayoría causa una infección latente en células linfoides o en ganglios del sistema nervioso central (SNC) y se reactivan para producir enfermedades recidivantes. En general, las primoinfecciones producidas por los herpes virus, son más graves cuando tienen lugar durante la adolescencia y la edad adulta que cuando ocurren en la infancia.<sup>6-10</sup>

---

---

Los herpes simplex pertenecen a la subfamilia alfavirinae. Estructuralmente se identifican cuatro componentes en estos virus: en el centro se encuentra una estructura densa que contiene ADN de doble hélice de aproximadamente 152 kb, seguida de una cápside icosaédrica de 162 capsómeros, una capa amorfa de glucoproteínas que rodea la cápside y la estructura más externa corresponde a la envoltura, tal como se puede observar en la figura 1.<sup>10-12</sup>



**Figura 1.** Estructura del VHS- 2. Tomado de Avilés LCL, 2008. <sup>13</sup>

---

---

Las glicoproteínas de la superficie viral se fijan a las células del huésped y posteriormente se funden la envoltura viral y la membrana celular para facilitar el ingreso a la célula. Una vez que el virus ha penetrado en la célula, el ADN viral ingresa al núcleo celular y se da lugar a los siguientes fenómenos biológicos: transcripción, síntesis de ADN, ensamble de la cápside, encapsulación del ADN y recubrimiento con la envoltura, finalizando con la salida del virus de la célula huésped.<sup>10, 14</sup>

### ***III.21 Epidemiología del VHS-2.***

Los Virus Herpes Simplex (VHS) producen una amplia variedad de infecciones, pese a que solo dos serotipos del virus (1 y 2) infectan a los seres humanos. En este sentido, los antígenos compartidos entre los serotipos 1 y 2 complican la diferenciación serológica de antígenos y anticuerpos, aunque ya se comercializan reactivos de alta especificidad para su correcta diferenciación. En personas sanas, predominan las infecciones de la cavidad bucal y del aparato genital, siendo responsable de dichas infecciones el VHS-1; en tanto, el VHS-2 causa lesiones predominantemente genitales, aunque se ha encontrado que hasta un 30% de los aislamientos del aparato genital pertenecen a cepas del tipo 1, mientras que un porcentaje muy bajo de aislamientos de la cavidad bucal pertenecen a cepas del tipo 2. Además, el VHS-2 tiene una tasa de mortalidad del 35.78% dentro de la población mexicana.<sup>6, 10-11, 15</sup>

La tipificación de los aislamientos de herpes en la zona genital proporciona valiosa información pronóstica, ya que las infecciones causadas por el VHS-1 tienen menos tendencia a recidivar en comparación con las producidas por el VHS-2. Al

---

---

respecto, en un estudio realizado con un grupo de mujeres que habían tenido primoinfección genital (definida por la ausencia de anticuerpos contra el virus tipo 2 y un cultivo positivo de las lesiones genitales), el 89% tuvo una recidiva después de una mediana de 391 días; además, hubo al menos seis recidivas durante el primer año en el 38% de las pacientes y el 20% tuvo más de 10 recidivas. Por otro lado, un estudio secuencial de pacientes con infecciones recidivantes demostró que la infección cursaba de manera asintomática y carecía de lesiones visibles durante un tercio del periodo durante el cual se eliminaba el virus.<sup>6-7, 11, 14-15</sup>

### ***III.22 Sintomatología y diagnóstico***

Las lesiones observadas por infección con el VHS-2 son muy similares a las ocasionadas por el VHS-1, la diferencia radica en que las primeras se encuentran localizadas en las células de las mucosas genitales. En mujeres, aparecen vesículas y úlceras en la mucosa de vagina y cérvix, así como en la piel de la vulva; mientras que los hombres presentan vesículas y úlceras, tanto en la mucosa como en la piel del pene. Dichas lesiones tienen una duración de pocos días y en algunos casos semanas, posteriormente evolucionan a costras y desaparecen; meses después, o a veces incluso semanas, reaparecen las lesiones en un nuevo brote. Las lesiones se acompañan de otros síntomas, tales como disestesias o hiperestesias, es decir, que el individuo experimenta sensaciones de hormigueo, cosquilleo o hipersensibilidad al roce de la ropa en la región de los glúteos, muslos y a veces del escroto; tal reacción se presenta debido a que el virus se aloja en los ganglios sacros por lo que las fibras sensitivas se irritan.<sup>7, 15-16</sup>

---

---

Las lesiones herpéticas evolucionan como máculas, pápulas, vesículas, úlceras y costras. En mujeres se puede presentar el síndrome de retención urinaria, y pueden aparecer algunas complicaciones a largo plazo, entre ellas destacan las neuralgias, radiculomielitis sacra, así como proctitis. En pacientes con una respuesta inmune baja o durante el embarazo se puede desarrollar hepatitis, coagulopatía intravascular, encefalitis y formas cutáneas generalizadas.<sup>7-8, 11-12, 15</sup>

Las infecciones herpéticas oculares provocan queratoconjuntivitis herpética o conjuntivitis folicular herpética, caracterizadas por prurito ocular, fotofobia, edema palpebral, ardor intraocular, quemosis, crecimiento de ganglios linfáticos preauriculares, úlceras corneales, y en casos más graves, opacificación de la córnea acompañada de pérdida progresiva de la vista e incluso la ruptura del globo ocular.<sup>6-7, 11, 15</sup>

Por otra parte, durante el embarazo es muy probable que se presente una infección, siendo más frecuente aquella por vía ascendente que por vía intrauterina debido al contacto con mucosas y piel del producto. La infección después del parto se debe al contacto del neonato con personas infectadas, frecuentemente por herpes labial.<sup>7, 12, 15</sup>

Con respecto a las infecciones sistémicas del neonato, se sabe que comprometen al SNC y pueden dañar otros órganos como laringe, tráquea, pulmón, esófago, estómago, tracto gastrointestinal, bazo, riñones, páncreas, corazón, hígado, glándulas adrenales, piel, ojos y boca. Las manifestaciones que pueden observarse incluyen: fiebre, cefalea, desórdenes mentales, signos cerebrales focalizados y otros datos neurológicos de alguna zona afectada del encéfalo.<sup>6-7, 11</sup>

---

---

El diagnóstico para el VHS-2 habitualmente se realiza en forma clínica sin mayor dificultad ya que las lesiones son tan características que esta tarea se vuelve muy sencilla; no obstante, en las formas sistémicas, generalizadas o atípicas el diagnóstico se convierte en una labor muy complicada.<sup>7-8</sup>

Para el aislamiento del virus se obtienen diferentes productos biológicos entre los cuales se encuentran: líquido cefalorraquídeo, orina, exudados faríngeo y conjuntival, raspados de mucosa de cérvix, mucosa oral, de lesiones corneales y de los bordes de las lesiones, legrado de los bordes y la base de las vesículas. Al estudio de los materiales obtenidos en las lesiones cutáneas y oculares se le conoce como el frotis de Tzanck. El material obtenido se tiñe y se observa al microscopio, encontrándose células gigantes multinucleadas con cuerpos de inclusión, aunque lo más conveniente es realizar la inoculación en cultivos celulares. Bajo este contexto, se recomienda usar el cultivo de tejido de células Vero o fibroblastos de prepucio humano y estudiar el efecto citopático. Otro recurso es preparar los especímenes biológicos para estudio de microscopía electrónica.<sup>6, 11-12, 15, 17</sup>

Para el diagnóstico serológico se utilizan pruebas de inmunofluorescencia y ELISA, también existen kits de pruebas rápidas basadas en inmunocromatografía. El estudio de la reacción en cadena de la polimerasa se utiliza para la identificación de ADN y es recomendada por excelencia debido a su sensibilidad y especificidad.<sup>8, 11-12, 15, 17</sup>

---

---

### ***III.23 Tratamiento.***

Hay algunos fármacos que se utilizan en el tratamiento de las infecciones por VHS, tales como: la idoxuridina, la citosina arabinosida y el aciclovir, así como el valaciclovir y el fanciclovir.<sup>6, 11</sup>

El tratamiento tópico de las lesiones cutáneas y mucosas se puede realizar con idoxuridina oftálmica, aciclovir y vidarabina, ya que se logra disminuir las manifestaciones locales y se reduce el tiempo de las manifestaciones clínicas del brote herpético.<sup>12, 14-15</sup>

### ***III.3 Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009***

El genoma, constituido por ARN, está formado por segmentos independientes (8 segmentos) que codifican 10 proteínas y PB1-F2 (figura 2), éste último potencia la actividad proapoptótica inducida por el virus, aunque no siempre está presente. Las proteínas del virus se enumeran y presentan de la siguiente manera:

1.- Hemaglutinina (H): es el ligando del receptor viral. Define el tropismo de especie y el área del árbol respiratorio que infecta, está implicado en la eficacia de transmisión. Su ligando es un residuo de ácido siálico en la membrana celular del hospedero.

2.- Neuraminidasa (N): cliva el ácido siálico y libera el virión durante el ciclo vital del virus. Es la diana de intervención terapéutica sobre la que actúan el oseltamivir y el zanamivir (derivados sintéticos similares al ácido siálico).

---

---

3.- M1: proteína de la matriz.

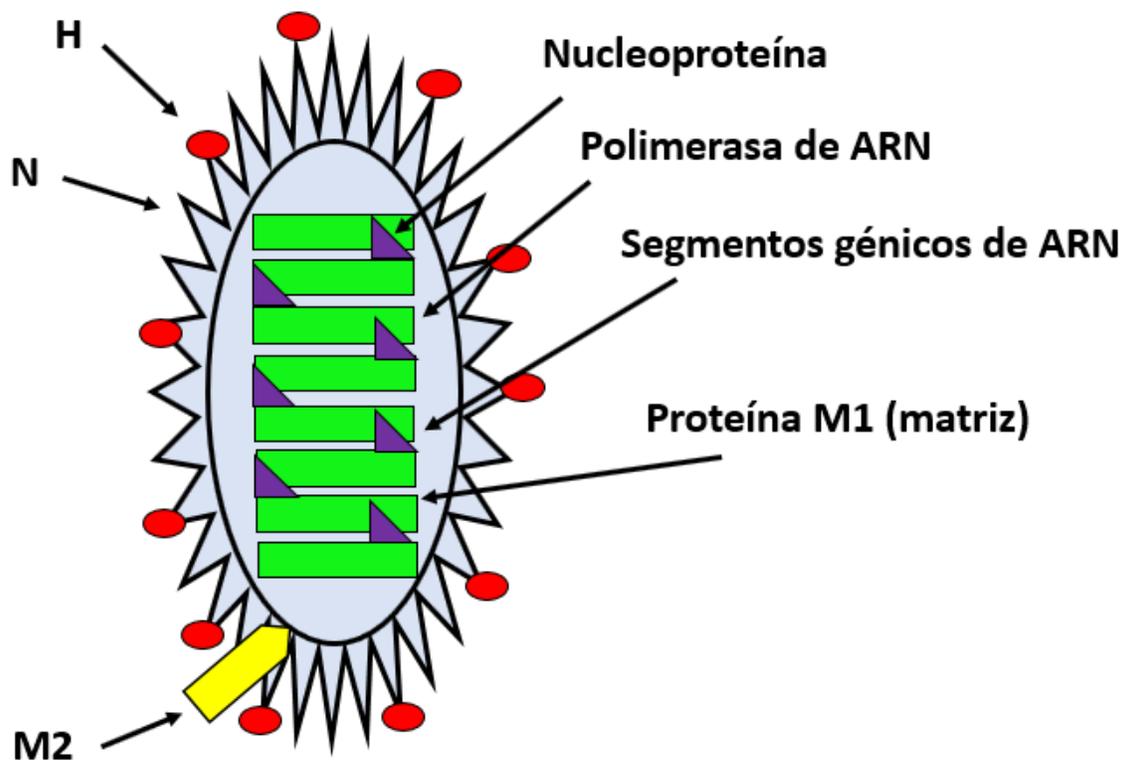
4.- Proteína M2: controla el pH en el interior del virus, en un canal iónico que permite que el genoma viral se libere durante el proceso de replicación. Es la diana de intervención terapéutica de la amantadina y la rimantadina, las cuales bloquean su acción.

5.- Proteína NS1: inhibe la respuesta inmune del hospedero.

6.- Proteína NS2: Transporta las ribonucleoproteínas (RNP) del núcleo al citoplasma.

7.- Nucleoproteína NP: se une al genoma viral.

8.- PB1, PB2, PA: actividad ARN polimerasa.<sup>18- 22</sup>



**Figura 2.** Estructura del Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009. Tomado de Noda (2010).<sup>10</sup>

---

---

### *III.31 Epidemiología del virus de la Influenza A H1N1*

Para entender más acerca de la replicación del virus se requiere conocer el mecanismo de transmisión de la Influenza A, la cual ocurre a través de microgotas de secreciones respiratorias que son muy pesadas para mantenerse suspendidas por distancias superiores a 1m. Las condiciones climáticas, relacionadas con la humedad relativa y la temperatura, repercuten en la eficiencia de esta transmisión, de tal manera que en el hemisferio norte la estación de influenza se extiende por meses de noviembre a marzo, mientras que en el sur de mayo a septiembre. También las manos contaminadas con el virus, al contactar las mucosas son otra vía de infección; el germen penetra el árbol respiratorio superior e inicia la replicación viral a nivel de las células epiteliales.<sup>18-19, 21, 23-24</sup>

El receptor reconocido por el virus, evento que realiza a través de la H, es un residuo de ácido siálico que se encuentra en la membrana de las células epiteliales. Este residuo está unido a una galactosa por un enlace que puede ser de tipo alfa 2,3 o alfa 2,6. Es de particular interés que en el cerdo existe la presencia de ambos tipos de receptores en vías superiores. Los virus aviares reconocen el enlace tipo alfa 2,3 y los humanos el alfa 2,6; y el cambio de preferencia de la H vírica de alfa 2,3 por alfa 2,6 favorece que un virus aviar se adapte a humanos. El cerdo puede ser afectado por el virus de origen humano, de origen aviar y los propios del cerdo, constituyendo el reservorio ideal para que ocurran reestructuraciones víricas. Se han descrito 16 H y 9 N; todas se encuentran presentes en los virus de influenza que colonizan el intestino de aves

---

---

marinas silvestres, por lo que estos animales son el reservorio natural de todos los virus de influenza.<sup>18-20, 24-25</sup>

Una vez que ocurre la unión entre la H y el ácido siálico, el virus penetra en la célula diana en una vesícula endosómica y posterior es encapsulado parcialmente. De manera paralela, la proteína M2, cuya función es actuar como canal iónico, induce cambios de pH intraviral y permite, durante el ciclo replicativo (formación de viriones), que el genoma viral se desprenda de la matriz y se libere hacia el citoplasma celular y posteriormente al núcleo. La maquinaria celular sintetiza las nuevas proteínas víricas y se ensambla un nuevo virión que eclosiona de la célula, no obstante, se mantiene unido a la membrana, razón por la que necesita ser liberado por la N, cuya función es degradar el ácido siálico. Este es un momento crítico del ciclo replicativo viral puesto que es cuando el virus es susceptible de intervención terapéutica. En este sentido, los agentes antivirales oseltamivir y zanamivir, que son estructuralmente semejantes al ácido siálico, se unen e inhiben la N, provocando aglomeración viral en la membrana celular y así interrumpen el ciclo de replicación.<sup>18, 20</sup>

Después de ocurrida la infección por el virus de la influenza, pueden transcurrir entre 18 y 72 horas antes del comienzo de la sintomatología clínica; sin embargo, la excreción viral ocurre antes y después del comienzo de los síntomas (0-24 horas), continuando por 2-7 días, cabe señalar que la excreción viral es más prolongada en niños pequeños e inmunocomprometidos.<sup>23-24</sup>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que durante las epidemias anuales de influenza se afecta entre el 5 y 15% de la población, de los cuales 3 a

---

---

5 millones son casos graves y de 250 000 a 500 000 llegan a provocar la muerte.<sup>23, 26</sup>

La influenza es una enfermedad febril aguda, usualmente auto limitada, que resulta de la infección por el virus de la influenza A o B; aunque existe un virus C de escasa importancia clínica y epidemiológica, ya que produce cuadros respiratorios altos de manera esporádica. El impacto de las epidemias de influenza varía año con año dependiendo de la virulencia de la cepa del virus circulante y de la presencia o ausencia de inmunidad poblacional al virus epidémico.<sup>18-19, 26</sup>

### ***III.32 Sintomatología y diagnóstico***

Las manifestaciones clínicas de la influenza dependen de la edad del paciente:

- Menores de 2 meses: las manifestaciones simulan una sepsis bacteriana y puede presentarse apnea en el neonato.
- Lactantes: se solapan los síndromes producidos por influenza y otros virus, en especial el virus sincitial respiratorio (SRV por sus siglas en inglés), el adenovirus y la parainfluenza; aparecen manifestaciones respiratorias inespecíficas, bronquiolitis, etc.
- Menores de 5 años: aparece un cuadro febril y síntomas en las vías respiratorias altas, incluido laringotraqueobronquitis (crup), aunque entre el 10 y el 50% de los pacientes presentan sintomatología de vías respiratorias bajas, generalmente bronconeumonía de evolución benigna.
- Mayores de 5 años y adultos: se caracteriza por el comienzo abrupto de fiebre acompañado de cefalea, faringe enrojecida, mialgias, anorexia y tos

---

---

seca. Cabe señalar que la combinación de tos y fiebre es el mejor predictor de influenza en adultos, con un valor predictivo positivo del 79% en etapas de circulación de influenza.<sup>19, 21, 23- 24</sup>

La enfermedad en vías respiratorias altas se caracteriza por tos seca que empeora entre el tercer o cuarto día y persiste por una o dos semanas después que el resto de los síntomas desaparecen. La faringitis es frecuente, aunque no se acompaña de exudados, también ocurre rinorrea, lagrimeo y fotofobia; sin embargo, cuando aparece crup es más grave que el asociado a virus parainfluenza y SRV. Se presenta fiebre típicamente alta en las primeras 72 horas y el compromiso de las vías aéreas, en ocasiones severo, se asocia a una super-infección bacteriana. Puede aparecer otitis media aguda entre el 3 y 5% de los pacientes de manera habitual, transcurridos de 3 a 4 días desde del comienzo de los síntomas respiratorios. En tanto, los síntomas gastrointestinales (vómitos, dolor abdominal y diarrea) son más frecuentes en niños que en adultos.<sup>21, 24</sup>

El diagnóstico se realiza generalmente, a partir de los datos clínicos sugestivos (fiebre >38.5°, tos y cefalea), además de otros síntomas como mialgias, artralgias, dolor faríngeo, náusea, vómito y diarrea; sin embargo, también se pueden realizar algunas pruebas diagnósticas, entre las que se encuentran: la prueba rápida de detección del antígeno y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar partes del genoma del virus.<sup>28</sup>

### **///3.3 Tratamiento.**

---

---

El virus pandémico A H1N1 es resistente a los inhibidores de la proteína M2 (amantadina y rimantadina) pero es sensible a los inhibidores de la N (oseltamivir y zanamivir). El tratamiento con estos inhibidores de N se debe iniciar en las primeras 48 horas del comienzo de los síntomas y continuar las dosis de acuerdo con la edad del paciente: <sup>19-21, 23-24</sup>

➤ Menores de 1 año: \* < 3 meses: 12 mg, 2 veces al día.

\* 3-5 meses: 20 mg, 2 veces al día.

\* 3-11 meses: 25 mg, 2 veces al día

➤ Mayores de 1 año: 4 mg/kg.

➤ Adultos: 75 mg, 2 veces al día

Dada la capacidad de los virus de mutar, se han desarrollado metodologías que permiten estudiarlos de una forma más completa y de esa manera lograr proponer tratamientos encaminados a erradicarlos eficientemente. Una herramienta muy útil para dicho fin es el cultivo celular de células provenientes de mamíferos, esto también permite llevar a cabo investigaciones que propicien el desarrollo en la industria y la síntesis de nuevas moléculas. <sup>19-21, 23-24</sup>

### ***III.4 Cultivo Celular.***

Por definición un cultivo celular es el resultado del crecimiento in vitro de células obtenidas a partir de organismos multicelulares. Un factor importante para el cultivo celular es el medio de cultivo, el cual es esencial para mantener a las células vivas. Un medio de cultivo es una mezcla de sustancias nutritivas en concentración específica, y existen distintos tipos de medios de cultivo; aunque, en

el presente trabajo nos enfocamos en los cultivos líquidos, definidos como aquellos medios que carecen un agente gelificante. Para el caso particular del cultivo celular, algunos de los medios más empleados son: Medio basal de Eagle, Medio mínimo esencial de Eagle (MEM), Medio MEM modificado por Dulbecco, Medio MEM modificado por Glasgow, Medio DMEM modificado por Iscove, Medio

**Cuadro 1.** Composición de medios de cultivo para células de mamífero.<sup>31-33</sup>

Aminoácidos	Vitaminas	Sales	Otros compuestos	Proteínas requeridas en medios libres de suero.
Arginina	Biotina	NaCl	Glucosa	Insulina
Cisteína	Colina	KCl	Penicilina	Transferrina
Glutamina	Folato	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Estreptomina	Factores de crecimiento específicos
Histidina	Nicotinamida	NaHCO <sub>3</sub>	Anfotericina	
Isoleucina	Pantotenato	CaCl <sub>2</sub>	Rojo fenol	
Leucina	Piridoxal	MagCl <sub>2</sub>	Suero fetal bovino	
Lisina	Tiamina		(SFB)	
Metionina	Riboflavina			
Fenilalanina				
Treonina				
Triptófano				
Tirosina				
Valina				

L-15 de Leibovitz, Medio F-10 de Ham, y RPMI 1640, ente otros.<sup>30-32</sup>

---

---

El éxito del cultivo celular depende del medio de cultivo empleado, por lo que los componentes de este último deben cubrir los requerimientos mínimos necesarios para preservar la vida de las células humanas o de otros mamíferos con requerimientos parecidos. En el cuadro 1 se muestran los componentes necesarios que deben contener los medios de cultivo adecuados para células de mamífero.<sup>31</sup>

En el presente trabajo nos enfocamos en el MEM por ser el medio empleado, en su presentación comercial sin complementos puesto que estos pueden perder algunas propiedades con el tiempo o bien debido a cambios de temperatura, así como otros factores; no obstante, el MEM puede ser complementado con suero y antibióticos. Es importante hacer hincapié en que los ejemplos antes mencionados se refieren a medios de cultivo convencionales, aunque también existen medios de cultivo especiales que se utilizan cuando el suero o bien el antibiótico, afectan el crecimiento de la línea celular y se requiere prescindir de tales componentes. Un ejemplo muy conocido es el Medio Ultra MDCK que por definición sirve para la línea celular MDCK.<sup>31-32</sup>

Como se puede apreciar en el cuadro 2, los cultivos se diferencian en: cultivos primarios, línea celular y línea celular continua. Aun cuando el empleo de los medios de cultivo celulares para el entendimiento de las características de los virus y sus mecanismos de infección ha sido una herramienta muy valiosa, en la actualidad los productos diseñados para eliminarlos son básicamente los mismos que se usan para eliminar bacterias (desinfectantes, sanitizantes, antisépticos, etc.); sin embargo, su uso no es eficiente puesto que implica daños a la salud.

**Cuadro 2.** Tipo de cultivos celulares y líneas celulares.<sup>31, 34</sup>

<b>Tipo de cultivo</b>	<b>Características</b>	<b>Ejemplos</b>	<b>Uso principal</b>
<b>Primario</b>	Diploide; tipos celulares mezclados; 1 o 2 pases	Primario de riñón de mono	Influenza; parainfluenza; algunos enterovirus
<b>Líneas celulares</b>	Diploides; fibroblastos; cantidad limitada de pases (<50 a 70)	Fibroblastos diploides humanos (WI-38, MRC-5, HELa, FS-9)	Herpes simple; citomegalovirus; varicela-zoster; rinovirus.
<b>Líneas celulares continuas</b>	Heteroploides; pasaje continuo in vitro	HeLa; HEp-2 A549 MDCK LLC-MK2 Vero, células ML Células RD Células BGM Cellules 293	Adenovirus; SRV; virus Coxsackie B Herpes simple; adenovirus; varicela-zoster; algunos enterovirus Virus influenza Virus parainfluenza Herpes simple Algunos virus Coxsackie A Virus Coxsackie B Adenovirus entéricos.
<b>Líneas celulares mixtas</b>	Combinaciones de líneas celulares continuas	MRC-5 + CV-1 Cellules ML + A549 RD + H292; BGMK + A549	Herpes simple: varicela-zoster Virus respiratorios Enterovirus
<b>Líneas celulares modificadas genéticamente</b>	Introducción de un gen para producir un cambio indicador visible después de la infección	Sistema enzimático inducible por virus (ELVIS)	Herpes simple

---

---

### ***III.5 Desinfectantes, sanitizantes y antisépticos.***

Debido a la gran cantidad de agentes patógenos causantes de infecciones y patologías con los que el hombre tiene contacto durante el desarrollo de sus tareas cotidianas, es imprescindible eliminar toda forma de vida o molécula con capacidad infecciosa. Para ello, el procedimiento que se maneja por excelencia es la esterilización, gracias a su capacidad de eliminar todas las formas microbianas. La esterilización es llevada a cabo por agentes físicos y químicos. Los agentes químicos que son utilizados para destruir todos los elementos vivos se denominan biocidas; sin embargo, cuando estos agentes son empleados durante períodos cortos de tiempo actúan como desinfectantes. Los desinfectantes que se aplican sobre tejido vivo (piel) se denominan antisépticos, mientras que los desinfectantes que se aplican sobre superficies inanimadas se denominan sanitizantes.<sup>4</sup>

En el cuadro 3 se enlistan los diferentes agentes químicos, su uso y los efectos que tienen sobre la salud. En este punto cabe destacar que la mayoría tiene efectos negativos para la salud.<sup>35</sup>

**Cuadro 3.** Principales agentes químicos que se utilizan como sanitizantes y antisépticos.<sup>35</sup>

Agente Químico	Clasificación	Usos	Efectos en la salud
Aldehídos	1. Glutaraldehído	Agente esterilizante en instrumental médico quirúrgico (caucho, plástico, acero inoxidable, aluminio)	Ataques de asma, disnea, tos y dolor opresivo en pecho, alergias, lesiones dérmicas
	2. Formaldehído	Microbicida de amplio espectro en metales o materiales plásticos, conservador en esmalte de uñas	Cáncer nasal y pulmonar, irritación en ojos, nariz y garganta, tos jadeos, reacciones alérgicas en piel
Fenoles	1. p- Cresol	Microbicida en instrumental médico quirúrgico	Toxico por todas las vías, quemaduras de piel, depresión del SNC, hemolisis, edema pulmonar
	2. m-Cresol	Microbicida en instrumental médico y quirúrgico	Toxico por todas las vías, ictericia, oliguria, uremia
	3. o-Cresol	Microbicida	Toxico por todas las vías
	4. Hexaclorofeno	Microbicida	Neurotoxicidad
	5. Fenol	Microbicida	Daño al SNC, hígado y riñones, choque, colapso, coma, convulsiones, muerte
	6. Benzoato de sodio	Conservador de alimentos	Raros casos de intoxicación
	7. Xilenol	Solvente	Daños igual que el fenol
Cuaternarios de amonio	Cloruro de benzalconio	Sanitizante	Ardor y dolor de boca, garganta y abdomen, depresión del SNC, cianosis, choque respiratorio
Halogenados	1. Hipoclorito de Sodio	Oxidante poderoso	Dolor e inflamación de la laringe, boca y estómago, hemorragia, colapso circulatorio, edema pulmonar
	2. Yodo	Desinfectante y sanitizante	Irritante de ojos, piel, mucosas de las membranas

Agente Químico	Clasificación	Usos	Efectos en la salud
Tinturas	Acridina	Antiséptico	Irritación de piel, mucosas, prurito, quemaduras, estornudos violentos, lagrimeo
Guanidinas	Clorhexidina	Antiséptico	Tolerada por la piel y mucosas
Nitrofuranos	1. Furazolidona	Antimicrobiano	Disnea, depresión respiratoria
	2. Nitrofurazona	Desinfectante	Hipersensibilidad en la piel y edema, vesículas, descamación y úlceras
Peróxidos y Permanganatos	1. Peróxidos de calcio e hidrógeno	Antisépticos y oxidantes	Irritante de ojos, nariz, garganta, piel
	2. Peróxido de estroncio	Antiséptico	Esofagitis, gastritis, irritante en la piel y mucosas
	3. Ácido peracético	Sanitizante y oxidante	Corrosión de mucosas y membranas de boca, necrosis, colapso circulatorio
Quinolonas	Etilhidrocupreína	Sanitizante y oxidante	Alteraciones gastrointestinales, síntomas neuropsiquiátricos y reacciones de hipersensibilidad.
Tensoactivos		Antimicrobianos	Nausea, vomito, daño corrosivo al estómago, hipotensión, coma y muerte.
Alcoholes	Etanol e isopropanol	Microbicidas	Irritación ocular, nasal, garganta, narcosis, bronconeumonía, edema hemorrágico pulmonar

---

---

Los agentes químicos anteriormente señalados poseen un efecto principalmente bactericida y no propiamente virucida, mientras que aquellos de amplio espectro poseen un efecto nocivo contra el ser humano. Bajo este contexto, los investigadores dedicados al desarrollo de estrategias que permitan eliminar de manera eficiente los virus se han adentrado en el campo de la nanotecnología.

### ***III.6 Nanotecnología.***

La nanotecnología se define como tecnología a nanoescala o bien, ingeniería con precisión atómica. En esencia es la habilidad para trabajar a un nivel molecular, átomo con átomo, con la finalidad de crear largas estructuras poseedoras de una nueva organización molecular; también es definida como un grupo de tecnologías emergentes, en las cuales, la estructura de la materia es controlada a una escala nanométrica (una millonésima parte de un metro) para producir materiales nuevos y dispositivos que tienen utilidad con propiedades únicas. La nanotecnología avanza a pasos agigantados y actualmente una de sus tantas aplicaciones directas *in vivo*, abarca la implantación de dispositivos para la detección de sustancias bioquímicas (marcadores fisiológicos). Cuanto menor sea el tamaño del dispositivo, puede ser implantado con mayor facilidad; además, la tecnología implicada es básicamente la misma que se está desarrollando para nano robots. Los sensores para detectar a los nano robots pueden ser simplemente nanopartículas funcionales (mediante el recubrimiento de la superficie con un ligando para un único receptor conocido que existe en las células diana), con un

---

---

núcleo de oro, que puede ser detectadas fácilmente usando varios tipos de sensores (por ejemplo, sensores super-electromagnéticos). En la actualidad, tales materiales tienen una mayor utilidad para el análisis de biopsias, de hecho, una gran variedad de dispositivos introducidos en el cuerpo son nanopartículas medicinales.<sup>36</sup>

### *III.61 Nanopartículas complejas.*

Para algunas aplicaciones técnicas, es necesaria la creación de nanopartículas (NPs) más complejas, es decir, NPs conformadas por más de un material. Dos ejemplos comunes son: las NPs con un núcleo recubierto y las NPs porosas (estas últimas conocidas más como NPs mesoporosas). Un motivo para la creación de NPs con el núcleo recubierto es la compatibilidad ambiental; en este contexto, se han propuesto NPs de compuestos magnéticos ya sea metálicos o semimetálicos, y están siendo probados como agentes terapéuticos para el tratamiento contra el cáncer, ya que pueden ser dirigidas al sitio de un tumor, posteriormente son excitadas mediante el uso de radio frecuencia electromagnética con el fin de eliminar la neoplasia. Estas NPs metálicas, sin embargo, son opsonizadas y eliminadas del cuerpo por el sistema inmune antes de que puedan llevar a cabo su acción. Cabe mencionar, que estas están recubiertas con una fina capa de un material biocompatible, tal como dióxido de titanio, pero pueden volverse sigilosas con respecto al sistema inmune y evadir la eliminación.<sup>36</sup>

A continuación, se describen algunos ejemplos de la aplicación de las NPs en el campo de la medicina y su importancia para el ser humano.

---

---

### ***III.6.1.1 Nanopartículas de cefalexina.***

Como ya se mencionó con anterioridad a las NPs se les puede recubrir con cualquier material en su superficie, de manera particular, las de cefalexina están recubiertas con dicho antibiótico. El desarrollo de nuevos antibióticos con actividad sinérgica es de gran importancia, motivo que llevó al diseño y creación de este tipo de NPs. Para el desarrollo de estas, se lleva a cabo el método conocido como molienda de esferas, con la finalidad de obtener un tamaño de partícula dentro del rango de 10-100  $\mu\text{m}$ , posteriormente las NPs son recubiertas por aspersión. Para lograr un efecto sinérgico se mezclan las NPs de cefalexina con NPs de plata, obteniéndose resultados muy favorables, ya que poseen efecto antibacterial contra una cepa de *Staphylococcus aureus*.<sup>37</sup>

### ***III.6.1.2 Nanopartículas de Cobalto.***

Las NPs de cobalto se fabrican de una manera relativamente simple, a través de un método hidrotérmico con el posterior tamponeo de ácido oleico. Dichas NPs poseen propiedades fisicoquímicas, magnéticas y estructurales que permiten su aplicación en biomedicina. Asimismo, mediante estudios de difracción de rayos X, espectrografía y estudios espectroscópicos de infrarrojo (IR) se ha demostrado su elevada calidad estructural. Los estudios de IR también han revelado que tienen pequeños ángulos de dispersión, lo que sugiere la existencia de esferas pegajosas debido a la interacción magnética, el cual presenta un carácter ferromagnético en un amplio rango de temperaturas (20-300  $^{\circ}\text{C}$ ). En cuanto a los estudios de toxicidad realizados en este tipo de NPs, se ha documentado que exhiben un

Jesús Alberto Vargas Hernández 33

---

---

---

---

carácter antiproliferativo ligero contra células cancerígenas, específicamente del cáncer ovárico resistente a cisplatino, sin consecuencias notables en las células normales. Por otra parte, el porcentaje de hemólisis en glóbulos rojos humanos es muy bajo, alrededor del 5%, lo que indica la existencia de compatibilidad entre las NPs de cobalto y los glóbulos rojos, una característica esencial para aplicaciones biomédicas *in vivo* sin crear efectos nocivos en el torrente sanguíneo.<sup>38</sup>

### ***III.6.1.3 Nanopartículas de hematita***

La hematita es un mineral que contiene óxido férrico, otro material empleado para recubrir la superficie de NPs. Las NPs de metal tienen un gran impacto e incluso cambian la composición de las comunidades microbianas del suelo, lo cual plantea el riesgo de su acumulación en el ecosistema, puesto que pueden suponer un riesgo para la salud. Esto constituye la razón más importante para el desarrollo de NPs complejas que tengan un recubrimiento en su superficie. En este sentido, el efecto de las NPs de hematita sobre el crecimiento de las bacterias del suelo se ha estudiado llevando a cabo el método de difusión de pozos en agar y las técnicas de crecimiento dinámico, encontrándose que las NPs de hematita mejoran el crecimiento de las bacterias del suelo, demostrando no ser tóxicas para las bacterias del suelo, lo que indica la posibilidad de una amplia gama de aplicaciones. De igual manera se ha determinado que la concentración citotóxica efectiva de las NPs de hematita frente a las líneas celulares MCF-7, A549, Hep3 B y Vero es de 20 758, 22 469, 19 326 y 2530 µg/ml respectivamente. Además, las NPs de hematita no causan lisis de glóbulos rojos.<sup>39</sup>

---

---

### *III.6.1.4 Nanopartículas de Oro.*

El principal objetivo de la nano biotecnología y la nano medicina es controlar el efecto nocivo de los nanomateriales que afectan a las células y usarlos como terapias contra algunas enfermedades. Al respecto, las NPs de oro, las nano barras y los nano escudos son los únicos materiales con propiedades demostradas para su uso potencial en fármacos de dosis controladas en pacientes con cáncer; sin embargo, aun cuando tales aplicaciones han sido demostradas, los efectos de estos nanomateriales en sistemas vivos no son del todo claros.<sup>40-41</sup>

Con la finalidad comprender mejor el funcionamiento y uso de las NPs, se han realizado diversos estudios que evalúan el efecto de la introducción de este tipo de NPs en el citoplasma celular, pero aún se sabe muy poco acerca de su efecto en el núcleo de la célula. En este sentido, se sabe que la función esencial del núcleo es mantener todos los procesos que se llevan a cabo dentro de la célula y cualquier interrupción dentro de dicho organelo afectaría al ADN de la célula en cuestión, perturbando así el ciclo celular altamente regulado. De tal manera que se requiere la orientación nuclear de las NPs para alterar selectivamente la división de las células cancerígenas mediante la inhibición de la citocinesis. Con respecto a ello, se ha podido observar, mediante el uso del microscopio de campo oscuro, que las NPs son capaces de inhibir la citocinesis en células vivas, lo cual se confirma cuando tiene lugar la formación de células binucleadas en las últimas etapas de la mitosis, indicando el fracaso de la división celular completa. Aunado a

---

---

ello, los análisis realizados por citometría de flujo aportan evidencia sobre el daño al ADN y la posterior apoptosis celular.<sup>53</sup>

### ***III.6.1.5 Nanopartículas de Platino.***

En años recientes, el interés en la síntesis y propiedades de las NPs de metales ha incrementado debido a sus características únicas y aplicaciones prometedoras, tales como: la catálisis, los ferrofluidos y semiconductores. La nanotecnología es el campo más prometedor para generar nuevas aplicaciones en la medicina. Sin embargo, actualmente se encuentran pocos nanoproductores usando esta tecnología para fines médicos. En estudios recientes se ha encontrado que las NPs de platino tienen efectos citotóxicos sobre las células cancerígenas de pulmón, ovario, páncreas, colon, pecho, renales e incluso de leucemia bajo condiciones *in vitro*; dicho efecto no se ha observado en células humanas normales en concentraciones de 200 µg/ml de NPs.<sup>43</sup>

### ***III.6.1.6 Nanopartículas de Plata***

Las NPs de plata se desarrollaron para emplearse como un arma contra microorganismos con resistencia a antibióticos. Sin embargo, muchas síntesis convencionales para este tipo de NPs requieren el uso de sustancias peligrosas que generan mezclas orgánicas tóxicas. Por lo tanto, en los últimos años, se ha recurrido al uso de derivados de plantas y materiales biosintéticos, los cuales han ganado mucha atención. Al respecto, se ha documentado el uso del cacao para diversas aplicaciones médicas ya que contiene un poderoso agente reductor, el

---

---

ácido oxálico, lo que le confiere la capacidad de reducir el nitrato de plata y producir NPs de plata. Este tipo de NPs tiene un rango de tamaño de partícula que va de 35-42.5nm. Poseen efectos antibacterianos contra patógenos como *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Otro dato relevante de estas NPs es que poseen efecto citotóxico contra los fibroblastos dérmicos humanos en concentraciones menores a 32  $\mu\text{m/ml}$ .<sup>44-46</sup>

Además de los usos médicos, las NPs de plata también resultan útiles en las industrias textil, alimenticia, de pinturas, de aparatos electrónicos y otros campos. A pesar de su extenso uso, aún no se tiene la información precisa concerniente a su toxicidad en humanos y su subyacente acción celular. En este sentido, algunos estudios han demostrado que estas NPs se acumulan en el hígado, lugar donde podrían inducir citotoxicidad vía daño oxidativo, debido a que propician la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Las ROS son continuamente generadas y eliminadas, por los sistemas antioxidantes, en los sistemas biológicos; sin embargo, no son del todo perjudiciales puesto que desempeñan importantes roles en una amplia variedad de funciones bioquímicas normales, por ejemplo, el estallido respiratorio llevado a cabo por las células fagocíticas del sistema inmune, por lo que cualquier alteración en su funcionalidad resulta en el desarrollo de procesos patológicos. Así, la excesiva producción de ROS en la célula induce la apoptosis. Al respecto, se ha demostrado que las NPs de plata propician la excesiva producción de ROS, lo que consecuentemente induce daño celular que culmina en apoptosis.<sup>46-48</sup>

---

---

Entre las moléculas que resultan dañadas a causa de las ROS, destacan el ADN, los lípidos y las proteínas. En el ADN surgen rupturas tanto en las hebras como en sitios lábiles, provocando mutaciones que pueden resultar letales para la célula. En las proteínas el daño oxidativo resulta en la formación de compuestos carboxílicos que comprometen la integridad celular, mientras que el daño en los lípidos compromete la integridad de la membrana. Cabe señalar que la mitocondria es un importante centro de señalización durante la apoptosis, por lo que la pérdida de la integridad mitocondrial puede inducir o inhibir la síntesis de algunos reguladores del proceso apoptótico.<sup>47</sup>

### ***III.6.1.7 Nanopartículas de Dióxido de titanio.***

Este tipo de NPs es ampliamente utilizado para la fabricación de pigmentos, cosméticos, plásticos, papel y alimentos, aunque también se usa como un agente antiapelmazante o blanqueador. A pesar de que el dióxido de titanio es inerte, se ha descubierto que provoca cáncer en el tracto respiratorio de ratones. En algunos estudios se ha intentado dilucidar los mecanismos a través de los cuales las NPs de dióxido de titanio provocan genotoxicidad, daño al ADN e inflamación en modelos murinos. A partir de dichos estudios, se descubrió que a dosis de 5mg/kg las NPs de dióxido de titanio provocan daño celular en ratones, también se encontró que en los macrófagos alveolares de los ratones el daño es dirigido a la membrana y estructuras finas de la célula. Los efectos adversos inducidos por las NPs de titanio que tienen lugar en células de mamíferos son los siguientes:

---

---

producción aumentada de ROS y de citocinas proinflamatorias, reducción en la viabilidad celular y proliferación, inducción de apoptosis y genotoxicidad.<sup>49</sup>

En otros estudios se ha descrito que las NPs no provocan daños a la salud de los seres humanos; no obstante, se encuentran dentro del rango de tamaño de partícula respirable y se han descrito efectos tóxicos severos después de su inhalación. Además, se ha documentado que este tipo de NPs afecta severamente a los astrocitos (células del SNC), lo cual fue demostrado mediante cultivo celular; asimismo, las NPs en cuestión, son capaces de generar estrés oxidante (EOx), definido como un desequilibrio bioquímico entre la formación de ROS y la capacidad antioxidante a favor de las ROS, tanto en células de ratones como en células humanas. En este contexto, el EOx se ha relacionado con la peroxidación de lípidos, el daño al ADN mitocondrial y alteraciones en la membrana mitocondrial, que en conjunto provocan daños en la expresión de las enzimas antioxidantes.<sup>50</sup>

Partiendo de toda la evidencia científica con respecto a las NPs y a la falta de virucidas eficientes y de baja toxicidad para los seres humanos, se realizó la presente investigación, cuyo objetivo fue evaluar el efecto inhibitorio de un compuesto nanoparticulado sobre la replicación de los virus VHS-2 e Influenza A H1N1 pandémico 2009.

---

---

#### **IV. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA.**

Las infecciones con VHS-2 y con el Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009 son un problema de salud pública en México; por lo que evitar la transmisión e infección se ha vuelto un reto.

Actualmente se emplean fármacos, la mayoría poco efectivos, que pueden resultar tóxicos para el ser humano. Aunado a ello, los virus como el de influenza tienden a mutar con mucha facilidad y los fármacos pierden su efectividad ante ellos. Por tal motivo, es necesario emplear tecnologías diferentes que permitan prevenir la propagación de este tipo de patógenos.

Existen distintos tipos de desinfectantes los cuales básicamente están dirigidos contra solo un tipo de microorganismos, es decir solo son bactericidas, fungicidas, virucidas; que regularmente son nocivos para el ser humano y en ocasiones cancerígenos.

En el presente trabajo se empleó una tecnología a base de nanopartículas, la cual puede cambiar la perspectiva sobre los desinfectantes que van dirigidos contra los virus; ya que, debido a su tamaño, las nanopartículas pueden interactuar con diferentes estructuras virales y modificar su función, convirtiéndolas en un prometedor agente virucida.

---

---

## **V. HIPÓTESIS.**

Considerando la evidencia científica respecto a las aplicaciones de las nanopartículas, suponemos que el compuesto nanoparticulado empleado inhibirá la replicación de los virus VHS-II y el Virus de la Influenza H1N1 pandémico 2009.

---

---

## **VI. OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el efecto inhibitorio de un compuesto nanoparticulado sobre la replicación de los Virus Herpes Simplex tipo 2 y del Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009

### ***VI.1 Objetivos particulares.***

- Obtener la Concentración Letal 50 (CL50) de un compuesto nanoparticulado a través del cultivo celular por ensayo de viabilidad MTT.
- Encontrar la concentración a la cual el compuesto nanoparticulado inhibe la replicación viral del VHS-2 y el Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009, sin ocasionar daño celular.
- Determinar si el compuesto nanoparticulado inhibe el efecto citopático generado por la infección de VHS-2.
- Determinar si el compuesto nanoparticulado inhibe la hemaglutinación

---

---

## VI. MATERIAL Y METODOS

### ***VI.1 Material biológico***

- ✓ Virus Influenza pandémico 2009
- ✓ Virus Herpes Simplex Tipo 2: cepa Long (ATCC)
- ✓ Líneas celulares: línea celular MDCK ATCC CCL-34 (aislada de riñón de perro adulto raza cocker hembra) y la línea celular VERO ATCC CCL-81 (riñón de mono verde africano1962).

### ***VI.2 Reactivos y soluciones.***

- ✓ Solución stock de MTT.
- ✓ HCl 1.0 M (MERCK)
- ✓ 200 ml Isopropanol ácido (25:1).
- ✓ MEM 10X
- ✓ Antibiótico.
- ✓ Suero Fetal Bovino.
- ✓ Tripsina 0.25m VERSENO AL 0.1 %DMSO.
- ✓ Compuesto nanoparticulado.

---

---

### ***VI.3 Equipos***

<b>Nombre del Equipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Ultracongelador	Revco	ULT2186-9A
Gabinete	Steril Gard III Advance	SG-305
Centrifuga	Beckman	TJ-6 centrifuga
Incubadora	Precisión	188
Espectrofotómetro multivol	Biotek	Epoch
Microscopio	Zeus	Primo vert
Refrigerador	Whirlpool	WT802Q
Balanza analítica	Sartorius	1601
Balanza granataria	Ohaus	Sin modelo
Campana de extracción Layit	Labconco	292411000
Esterilizador para laboratorio de Va	Turrnauer	2850EL
Agitador magnético	Sol-bat	25-01
Potenciómetro	Beckman	41

---

---

---

## **VI.4 Técnicas**

### **VI.41** *Cultivo celular.*

Se aclimataron el MEM, el suero bovino fetal (SBF), el antibiótico-antimicótico y la tripsina, además se descongeló un vial el cual contenía 1mL de medio con células en una botella para cultivo celular a la cual se agregó MEM, se adicionó SBF y se incubó por 24h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.<sup>51</sup>

### **VI.42** *Cultivo de propagación.*

Se usó una botella con confluencia entre 90-100%, a la cual, tras realizarle lavados, se le adicionó tripsina y se incubó durante 3-5 minutos. Transcurrido ese tiempo se observó al microscopio hasta percibir desprendimiento, posteriormente el contenido se dividió equitativamente en 3 botellas más y a cada una se le adicionó MEM y SBF.<sup>51</sup>

### **VI.43** *Infección de células.*

Se utilizó una botella con confluencia del 90-100%, a la cual se le realizaron los lavados previos, después se adicionó MEM y se infectó con VHS-2; de igual manera se infectó otra botella con influenza, se incubó por 24h y se observó constantemente al microscopio hasta que se manifestó el efecto citopático. Lo

---

---

anterior se realizó paralelamente en varias cajas infectadas para identificar el día en el cual estuviera más activo el virus.<sup>52</sup>

**VI.44** *Ensayo de MTT para la determinación de la CL50 del compuesto nanoparticulado.*

Para este ensayo se requirieron 2 cajas de 24 pozos previamente cultivadas con células, utilizándose estas en forma vertical para obtener 4 repeticiones. Paralelamente se realizaron diluciones sucesivas 1:10 del compuesto nanoparticulado, colocándose en 15 tubos Eppendorf. En el primer pozo, para la dilución  $10^0$ , se colocó únicamente el compuesto nanoparticulado, en el segundo pozo se agregó solo medio MEM, en el tercer pozo se agregó un blanco de reactivo a partir del cuarto pozo se agregaron las diluciones empezando por la de  $10^{-1}$ . Se incubó por 2h a 37 °C y posteriormente se almacenaron las cajas a 4°C. Al día siguiente se procedió a agregar 100 microlitros de alcohol-ácido isopropílico y se homogenizó. Se determinó espectrofotométricamente la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 570 nm.<sup>53, 54</sup>

**VI.45 Titulación** *del VHS-2 por formación de placa lítica.*

Se requirió de una botella con confluencia 90% de células Vero infectadas con VHS-2, de la cual se tomaron dos alícuotas de 1mL para las diluciones y para el control positivo. En 20 tubos Eppendorf se realizaron diluciones sucesivas 1:10. En una placa de 24 pozos con 90% confluencia se realizó la titulación viral

---

---

colocando en el primer pozo un control positivo (virus con una MOI de 1), en el segundo pozo un control negativo (solo MEM) y a partir del tercer pozo las diluciones hasta  $10^{-22}$  (este paso se realizó por duplicado). Se incubaron las 2 placas por 2h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo se lavó la placa, primero los pozos de los controles negativos, posteriormente las diluciones y por último el control positivo, al finalizar se agregó 1mL de MEM. A las 48 horas se lavó la placa, se dejó secar y se prosiguió a teñir con cristal violeta 1:100. Se observó al microscopio y el título se reportó como la dilución a la que se observaron entre 3-5 sincitios.<sup>55</sup>

#### **VI.46** *Titulación del Virus Influenza A H1N1 por hemaglutinación.*

Se tomó una muestra sanguínea con anticoagulante EDTA. Se lavaron los eritrocitos con solución buffer de fosfatos (pH 7.2-7.4) y se centrifugó a 1300 rpm por 10 minutos. Se preparó una solución de eritrocitos al 0.5% con solución de PBS (pH 7.2-7.4). En una placa de 98 pozos (de superficie cóncava) se adicionaron 25 µL de solución buffer de fosfatos, la primera fila llevo 25 microlitros del virus que se tituló, posteriormente a la segunda fila se adiciono 25 microlitros de virus y así sucesivamente hasta la penúltima fila, ya que la última fila fue nuestro control negativo y solo llevó PBS. Se agregó a cada pozo 50 microlitros de la solución al 0.5 % de eritrocitos iniciando con el control negativo hacia el control positivo. Se incubo por 1 hora a 37 °C y se leyó el título.<sup>56</sup>

---

---

**VI.47** *Cinética para la inhibición del virus VHS-2 e Influenza A H1N1 pandémico 2009 con el compuesto nanoparticulado.*

Se requirió una caja de 24 pozos confluyente al 80%. Se realizaron diluciones del compuesto nanoparticulado que se obtuvo del ensayo de MTT. Se obtuvieron dos cajas infectadas de 48 horas con las dos cepas virales con las que se trabajó. Se lavó la caja de 24 pozos, se realizó el tratamiento del compuesto nanoparticulado con los virus con los que se trabajó en diferentes tiempos a los 5, 10, 15, 30, 45 y 60 segundos y sus respectivos controles, positivo y negativo. Se incubó durante un periodo de 2 horas. Se lavaron las cajas y a continuación se incubaron hasta que se notó el efecto citopático (EFC) de los dos virus en el control positivo. En el caso del virus de la influenza A H1N1 pandémico 2009 se procedió a realizar raspados en todos los pozos y se recolectó en tubos.<sup>55, 56, 57</sup>

---

---

## VII. RESULTADOS

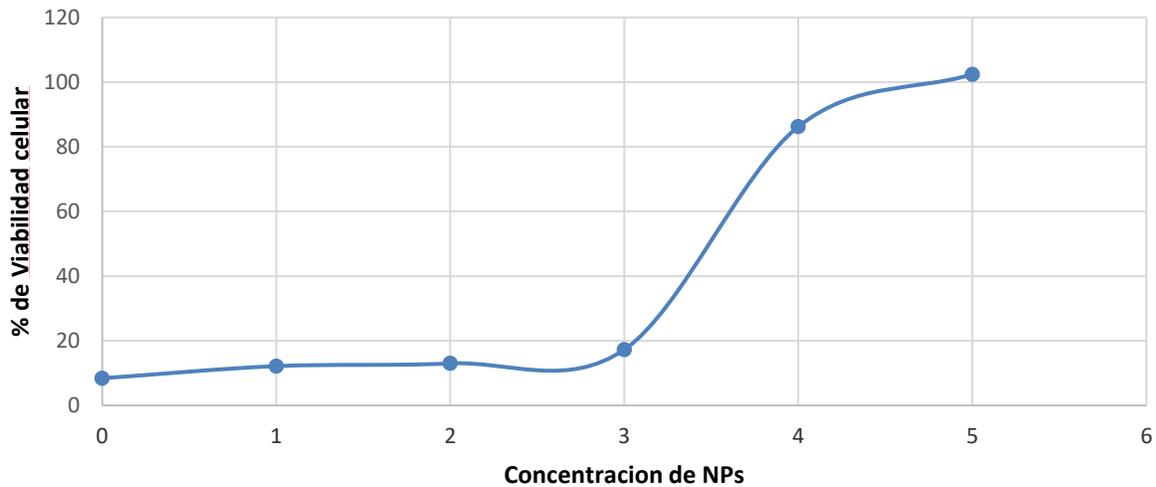
### VII.1 Ensayo de viabilidad celular

Mediante el ensayo de MTT se encontró que a la dilución  $10^{-4}$  el compuesto nanoparticulado no tiene un efecto citotóxico aparente en las líneas celulares utilizadas (figuras 3 y 4).



**Figura 3.** Ensayo de MTT en cultivo celular. La formación del compuesto Formazán (formado a partir de la degradación de una sal de tetrazolio) de color púrpura denota la viabilidad celular, mientras que la formación de un color amarillo significa la muerte celular.

## Efecto Citotóxico de NPs



**Figura 4.** Gráfica de viabilidad celular. Se aprecia que a partir de la concentración No. 5 las células son 100% viables.

## VII.2 Cálculos para infección viral después de obtener los títulos virales.

### VII.2.1 Cálculos para infectar con VHS-2

Tras obtener el título viral, se calculó la cantidad requerida para infectar diferentes placas y botellas con células, empleando un índice de multiplicidad de infección (MOI) de 1 para lograr que por cada virión se infectara solo una célula.

Cálculo para la infección de caja de 25 cm<sup>2</sup> con VHS-2 utilizando una MOI de 1:

Con un título de  $1 \times 10^{20}$   $\longrightarrow$  1000 $\mu$ L

Para una caja de 25 cm<sup>2</sup>  
(Igual a  $6 \times 10^6$  células)  $\longrightarrow$  X  **$X = 6 \times 10^{-11} \mu\text{L}$**

Utilizando una MOI de 1 se tiene que para infectar una placa de 24 pozos:

Titulación VHS-2 de  $1 \times 10^{20}$   $\longrightarrow$  1000 $\mu$ L

En una placa de 24 pozos  
(Igual a  $2 \times 10^5$  células)  $\longrightarrow$  X  **$X = 2 \times 10^{-12} \mu\text{L}$**

**VII.22 Cálculos para infectar con virus de Influenza A H1N1 pandémico 2009**

μL respecto el título viral

25 μL	1:1	
12.5 μL	1:2	
6.25 μL	1:4	
3.125 μL	1:8	
1.5625 μL	1:16	
0.78125 μL	1:32	
0.390625 μL	1:64	
0.1953125 μL	1:128	
<b>0.09765625 μL</b>	<b>1:256</b>	→ 1 UHE
0.048828125 μL	1:524	
0.0244140625 μL	1:1025	

UHE: Unidad Hemaglutinante equivalente a  $2 \times 10^5$  partículas virales infectivas.

Considerando un título de 1:256 y una MOI de 1:1 para infectar una caja de 25 cm<sup>2</sup> se obtiene:

$$0.09765625 \mu\text{L} \longrightarrow 2 \times 10^5 \text{ células}$$

$$x \longrightarrow 6 \times 10^6 \text{ células}$$

**X= 2.9296875 μL**

Considerando un título de 1:256 y una MOI de 1:1 para infectar un pozo de una placa de 24 pozos se obtiene

$$0.09765625 \mu\text{L} \longrightarrow 2 \times 10^5 \text{ células}$$

$$x \longrightarrow 2 \times 10^5 \text{ células}$$

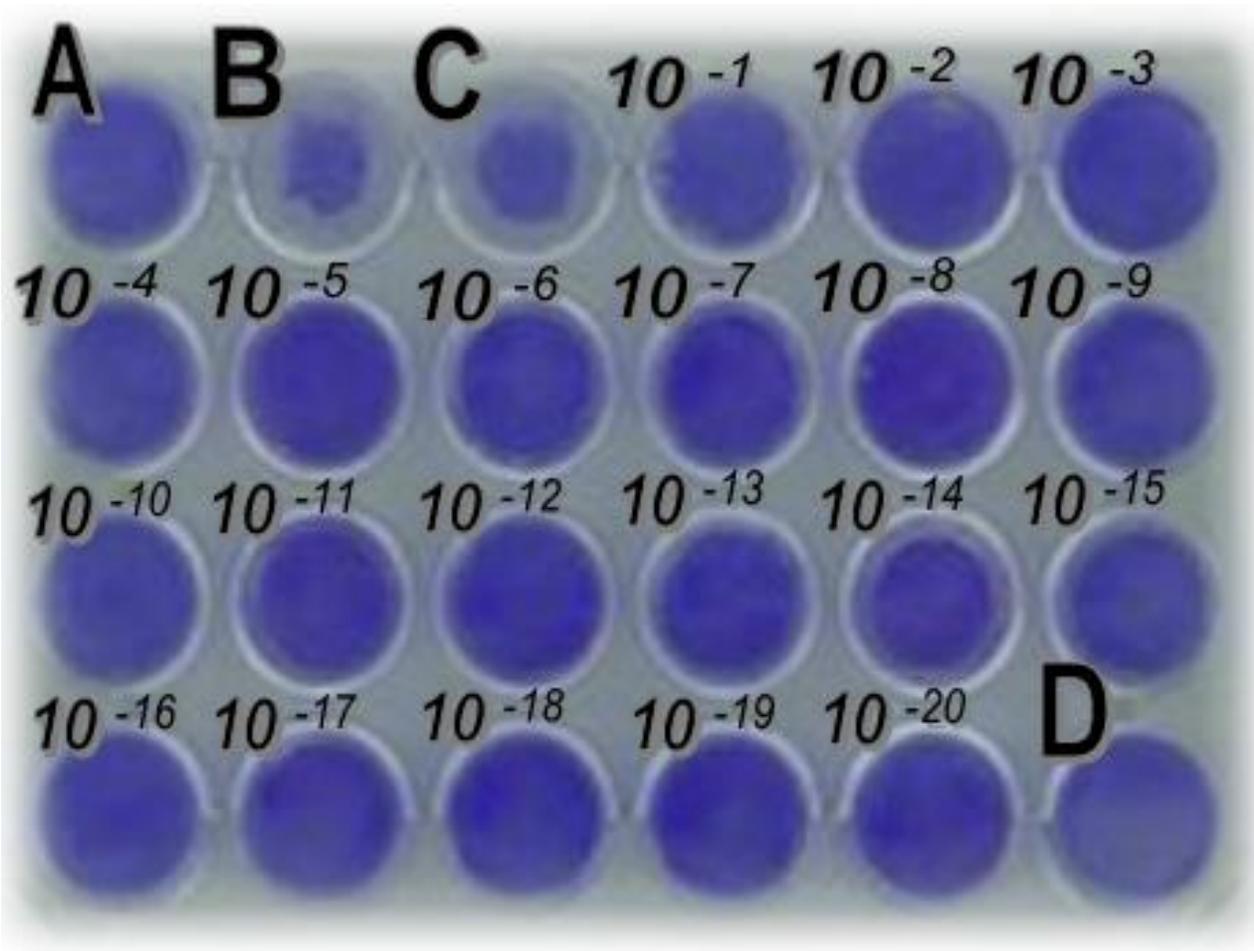
**X= 0.09765625 μL**

---

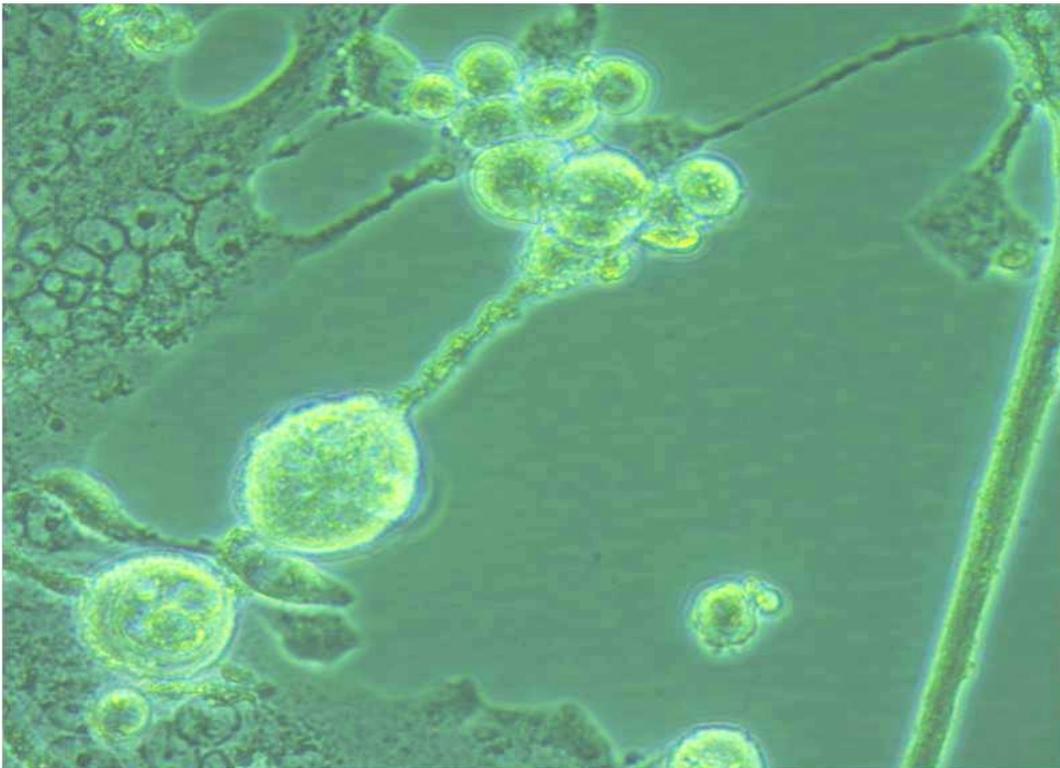
---

### VII.3 Titulación por placa lítica del VHS-2

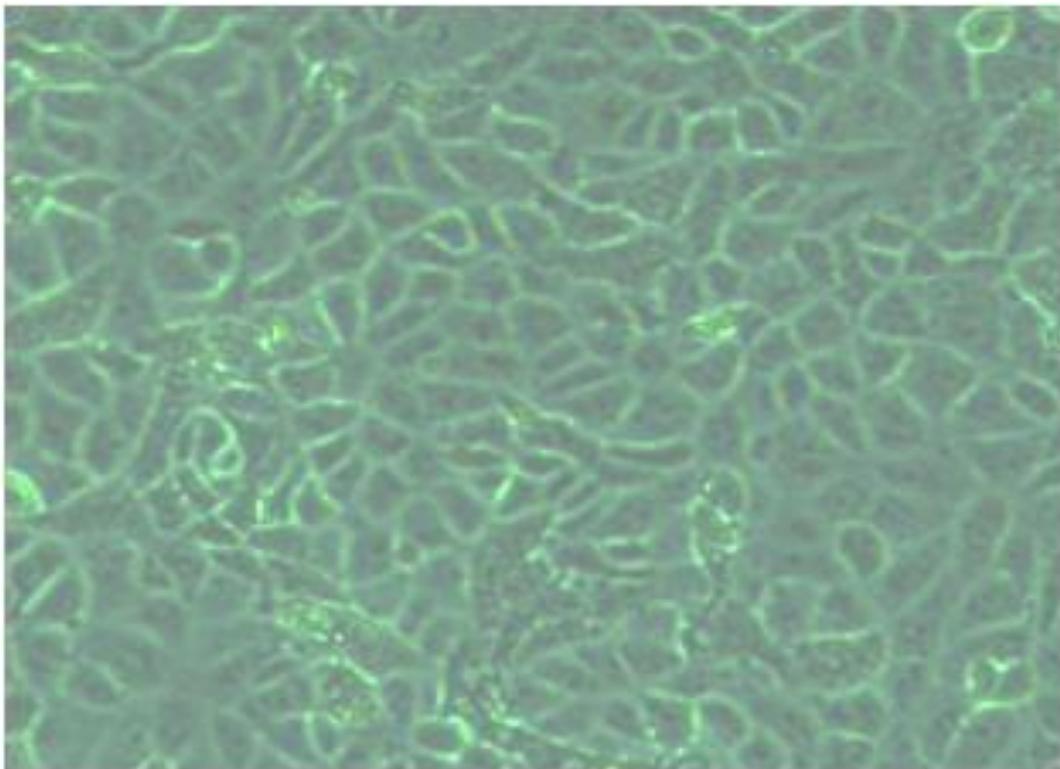
La activación y titulación del VHS-2 se llevó a cabo en una placa de 24 pozos, tal como se aprecia en la figura 5. La activación del virus se dio de manera rápida, formando sincitios (efecto citopático de VHS-2) visibles en el control positivo (figura 6), los cuales no se presentaron en el control negativo (figura 7). El título viral obtenido fue de  $10^{20}$  (figura 8).



**Figura 5.** Titulación por placa lítica del VHS-2. Los incisos A y D muestran los controles negativos mientras que los incisos B y C los controles positivos, el resto de los pozos muestran las diluciones logarítmicas realizadas.



**Figura 6.** Control positivo. Enfoque a 40x de los controles positivos de la titulación del VHS-2 (incisos B y C de la figura 5). Se observa el efecto citopático (sincitios) del VHS-2.



**Figura 7.** Control Negativo de la titulación del VHS-2 (incisos A y D de la figura 5). Se aprecia la ausencia de sincitios (efecto citopático) en las células sin estímulo viral.



**Figura 8.** Título viral obtenido del VHS-2. Nótese en el círculo en rojo la presencia de células multinucleadas (enfoque a 10x).

#### **VII.4 Titulación del virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009 por el método de hemaglutinación.**

La propagación del virus de la Influenza A se realizó en células MDCK, se requirió una cinética previa para detectar el día en que más activo se encontraba el virus. En esta prueba la formación de una malla de eritrocitos indica positividad, mientras que la formación de un punto rojo indica un resultado negativo. En el título obtenido existe una UHE, es decir, un valor de  $2 \times 10^5$  partículas virales que son necesarias para que se lleve a cabo la hemaglutinación visible. Como se presenta

---

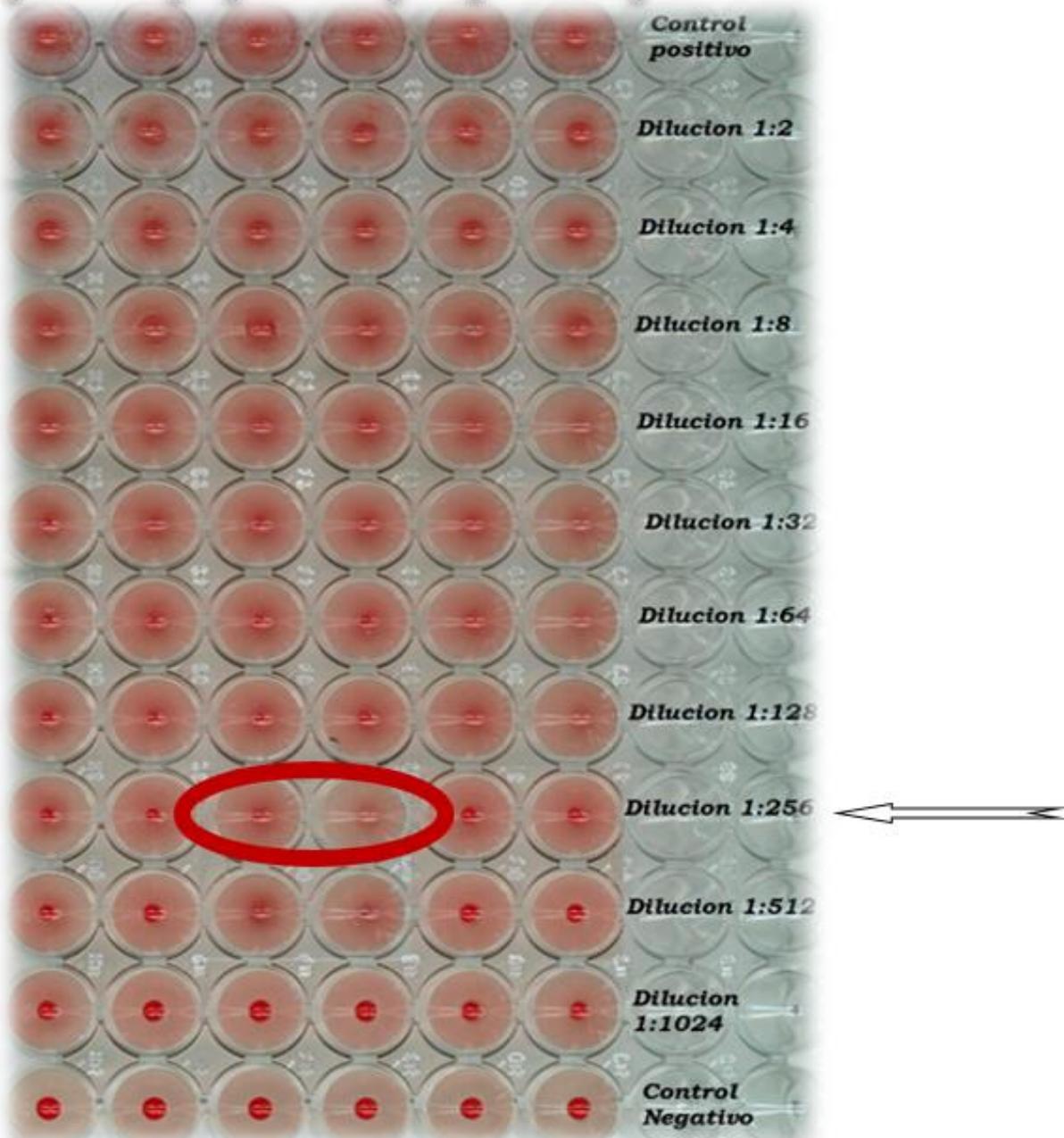
---

en la figura 9, se obtuvo un título viral de 1:256 a las 48 horas de haber infectado el cultivo celular.

---

---

# 24hrs 48hrs 72hrs



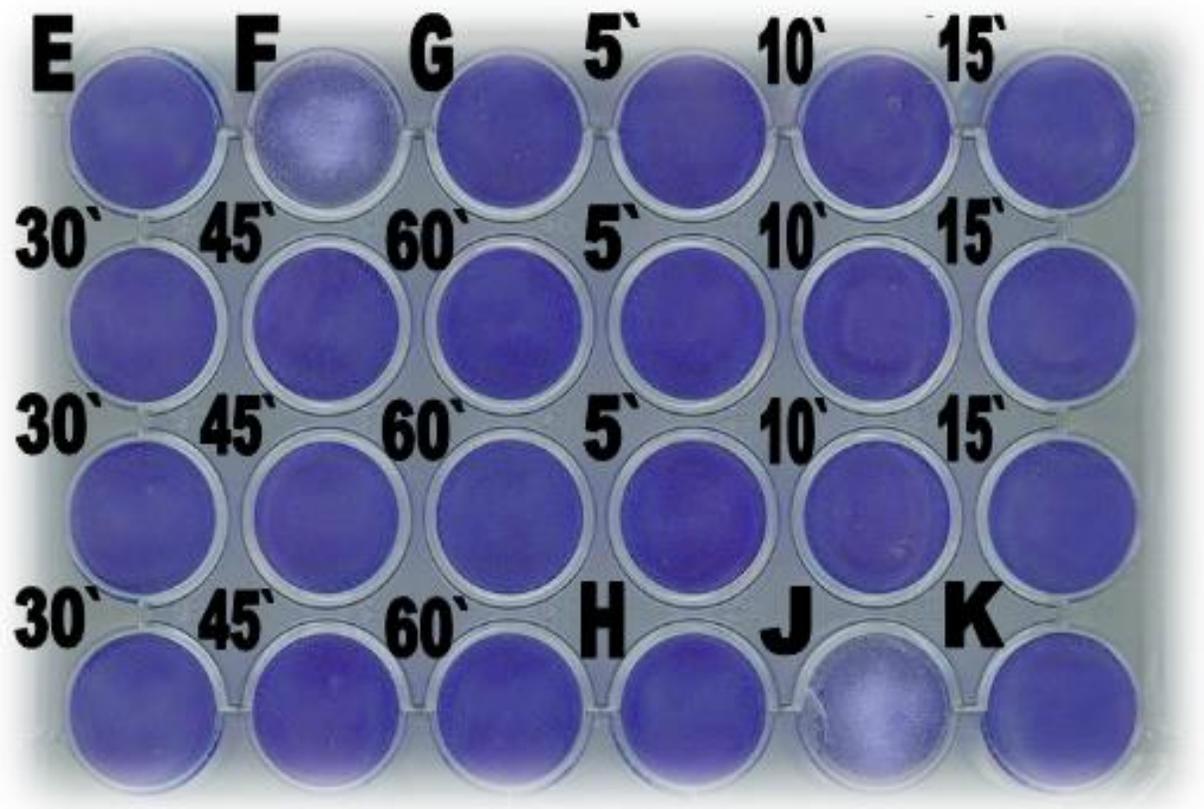
**Figura 9.** Titulación del Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009 por el método de hemaglutinación (cinética de infectividad). Se observa la presencia de una malla de eritrocitos en la dilución 1:256.

---

---

## VII.5 Cinética del compuesto nanoparticulado contra el VHS-2

La cinética del compuesto nanoparticulado se realizó en placas de 24 pozos, tal como se observa en la figura 10. Para esta cinética sólo se requiere observar al microscopio y buscar la formación de sincitios comparándose con el control positivo, mientras que la ausencia de sincitios indica que la replicación del virus fue inhibida.



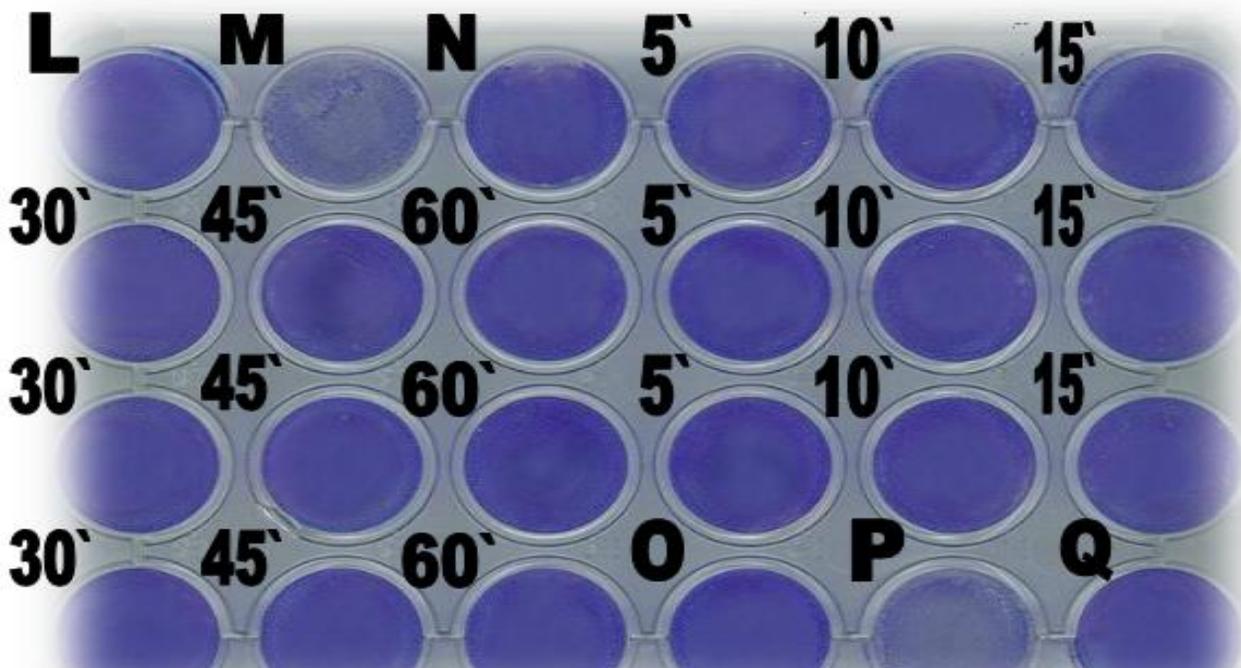
**Figura 10.** Cinética del compuesto nanoparticulado contra el VHS-2. Los incisos E y H muestran los controles con nanopartículas; en los incisos F y J se muestran los controles positivos; en los incisos G y K se muestran los controles negativos; en los demás pozos se observa la cinética hasta los 60 segundos por triplicado.

---

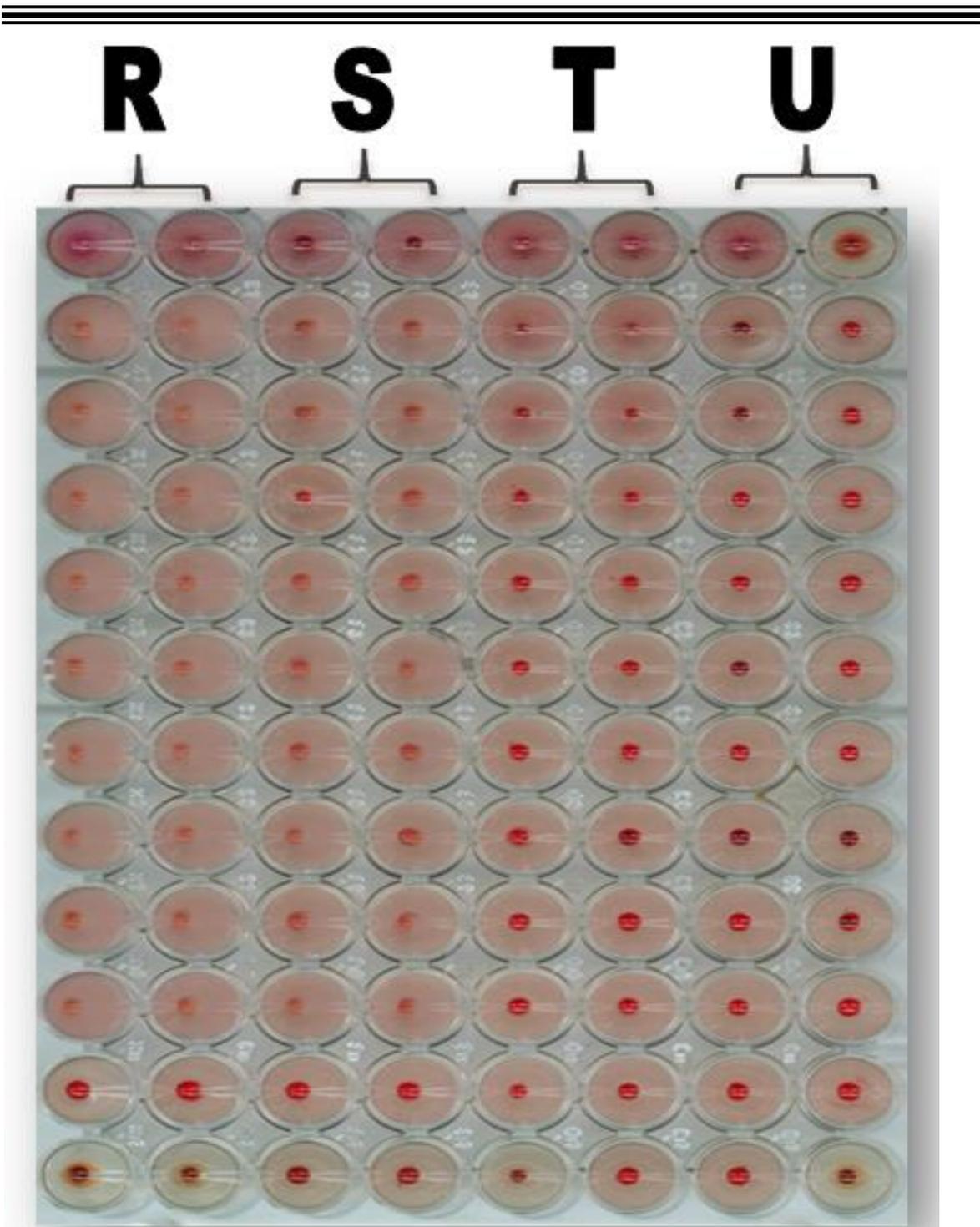
---

## VII.6 Cinética del compuesto nanoparticulado contra el virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009.

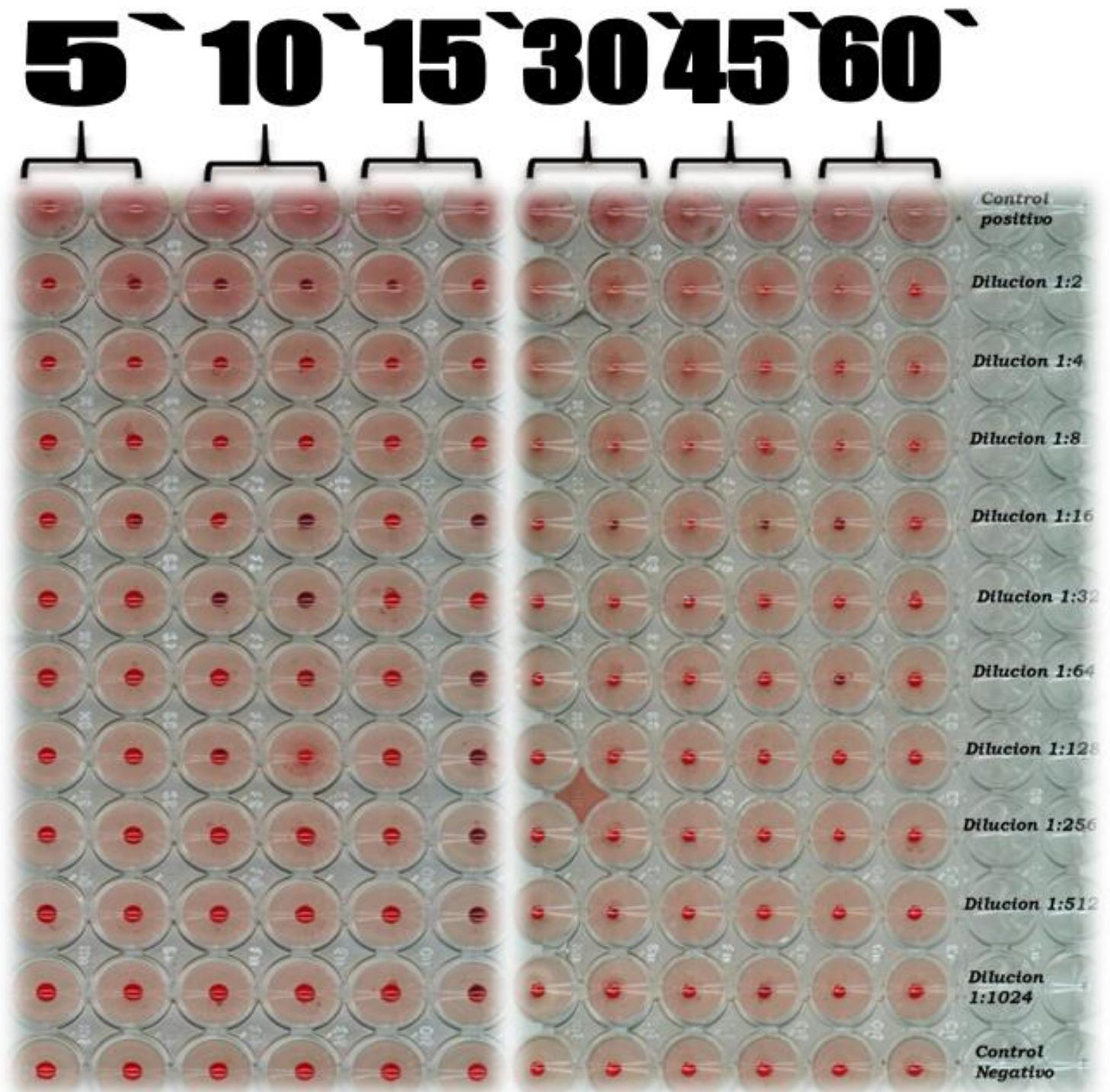
Los resultados esta cinética se presentan en la figura 11. llevó a cabo a diferentes tiempos, al utilizar en esta cinética el virus de influenza también se pudo realizar una comprobación respecto a que tan profundo fue el efecto del compuesto nanoparticulado inhibiendo la replicación por lo que tras realizar la cinética también se hizo una titulación viral mediante la técnica de hemaglutinación como se muestra en las figuras 12 y 13, obteniendo que en ningún pozo de la figura 11 había presencia de virus activado de influenza.



**Figura 11** Cinética del compuesto nanoparticulado contra el Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009. En placa de 24 pozos; en el inciso L y O se muestra los controles del compuesto nanoparticulado; en los incisos M y P se muestra el control positivo del virus; en el inciso N y Q se muestra el control negativo (los siguientes pozos muestran la cinética los diferentes tiempos nótese que estos están repetidos por triplicado).



**Figura 12** Cinética del compuesto nanoparticulado contra el Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009. Técnica de hemaglutinación sobre los controles positivos, comprobación realizada mediante la técnica de Hemaglutinación; los incisos R y S muestran los controles positivos obtenidos de los incisos M y P de la Figura No. 11; el inciso T muestra los controles negativos obtenidos de los incisos N y Q de la Figura 11; el inciso U muestra el control de nanopartículas obtenido de los incisos L y O de la Figura 11.



**Figura 13** Cinética del Virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009. Técnica de hemaglutinación sobre todos los tiempos utilizados, corroboración realizada mediante la técnica de Hemaglutinación contra el compuesto nanoparticulado a distintos tiempos obtenidos de la figura No. 6.

---

---

## **IX ANÁLISIS DE RESULTADOS.**

En 2009 cuando ocurrió la pandemia por el virus de influenza A H1N1 en México, el único desinfectante con el que se contaba era el hipoclorito de sodio (cloro), a pesar de los efectos irritantes en mucosas que este provoca durante su uso. Sin embargo, su acción virucida se vio evadida ya que se reportaron casos de personas que aún después de desinfectar las superficies con cloro se contagiaron de influenza. Ante esta situación surgió la necesidad de recurrir a la búsqueda y/o creación de otros desinfectantes que además de eficaces fueran inocuos para el ser humano.

Por otro lado, el VHS-2 tiene una elevada tasa de infección y para combatirla se recurre al uso de algunos fármacos como el aciclovir. En años recientes la familia de los herpes virus ha tenido renuencia a estos fármacos y no se cuenta con muchas alternativas terapéuticas. Además, dada la gran capacidad destructiva del VHS-2 provoca un notable efecto citopático, razón por la cual resulta imperativo desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento, así como desinfectantes y sanitizantes que eviten la infección.

Ante esta situación, algunos investigadores han incursionado en el campo de la nanotecnología, mediante el uso de NPs recubiertas con distintos extractos naturales, principalmente aceites esenciales. En este sentido, diversas investigaciones han demostrado que las NPS son eficaces contra diferentes microorganismos como bacterias, hongos, parásitos, algas e incluso algunos virus;

---

---

ejemplo de ello es el virus de la peste de los pequeños rumiantes, que, aunque no es patógeno para los humanos, es eficazmente inhibido por las NPS.<sup>41, 44, 57</sup>

La literatura refiere muy buenos resultados en cuanto a la eficacia de las NPs en estudios in vitro, sin embargo, señala la necesidad de realizar estudios de citotoxicidad puesto que los compuestos nanoparticulados pueden dañar a las células bajo ciertas condiciones, en las que influyen tanto los materiales usados para su fabricación como la cantidad de NPs.<sup>58</sup>

Dado lo anterior, la presente investigación tuvo como propósito probar la eficacia virucida de un compuesto nanoparticulado, así como aportar evidencia sobre su citotoxicidad. Para tal efecto, se realizaron ensayos de viabilidad celular, logrando encontrar concentraciones en las que el compuesto nanoparticulado no resultara tóxico para las células; además, se probó que dicha concentración tuviera un efecto inhibitorio para los virus. Con los datos obtenidos se realizó una gráfica para conocer cuál era la concentración Letal 50 y trabajar por debajo de esta, encontrando que la dilución a la cual el 50 % de la población muere (DL-50) es de  $10^{-3.69}$ , aunque para fines prácticos se trabajó con la dilución  $10^{-4}$ .

Para realizar los ensayos de inhibición de replicación viral se debe contemplar el título viral y conocer cuántos viriones se tienen por célula. En nuestro trabajo, el título viral encontrado para el VHS-2 fue de  $10^{20}$  lo que indica que este virus es sumamente mortal, es decir, no requiere de muchos viriones para infectar las células humanas. En este sentido, los resultados de la cinética a distintos tiempos fueron alentadores ya que en ningún tiempo se observó la presencia de sincitio.

---

---

Los sincitios se forman debido a las glicoproteínas específicas de este virus, por lo que la ausencia de la formación de sincitios indica que el virus no está presente. Además, el virus tiene gran facilidad para propagarse en el medio ambiente, por lo que la ausencia de sincitios confirma que las nanopartículas inhibieron totalmente a la proteína del virus. Lo anterior pudo observarse fácilmente al comparar con el control positivo, en el cual se notó claramente la presencia de sincitios, lo que demuestra la capacidad infectiva del virus. Esto sugiere que el compuesto nanoparticulado además de inhibir completamente al virus, no requiere de un tiempo prolongado para hacerlo, lo que lo convierte en un prometedor agente desinfectante.

Por otra parte, el título viral del virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009 fue de 1:256<sup>59</sup> (un título más bajo que el encontrado en 2009), convirtiéndolo en un virus mortífero. En este caso, la cinética también nos arrojó buenos resultados ya que el virus fue inhibido al estar con contacto con las NPS. A partir de nuestros resultados no solo podemos asegurar que las NPs inhiben a dos tipos de virus (ADN virus y ARN virus) sino que además la inhibición se da a un nivel que va más allá de las proteínas de la cápside, es decir, que no nada más actúa a nivel de la cápside si no que afecta a nivel genético, debido a que estas proteínas se necesitan expresar durante la replicación viral.

Un punto importante a considerar, es que en la presente investigación se utilizaron líneas celulares continuas que provienen de algún tipo de cáncer lo cual afirma que el compuesto nanoparticulado puede dirigirse contra células cancerígenas, a

---

---

altas concentraciones de estas, logrando un efecto citotóxico favorable, tal como se ha referido en la literatura, ya que diversos estudios han demostrado el efecto de otros compuestos nanoparticulados sobre células cancerígenas resistentes a cisplatino.<sup>43</sup> En este contexto, en algunas investigaciones se ha evidenciado que este efecto se da por la presencia de especies reactivas de oxígeno que alteran la membrana mitocondrial.<sup>57</sup>

Se encontró que este compuesto nanoparticulado tuvo un efecto tóxico en un cultivo celular, pero también se encontró que a bajas concentraciones no ocurre este efecto.

En cuanto a la prueba de hemaglutinación se comprobó que el compuesto nanoparticulado no afecta a los glóbulos rojos humanos, debido a que no causó hemólisis, lo cual sugiere que podrían ser utilizadas en el torrente sanguíneo.

A partir de nuestros resultados se infiere que el compuesto nanoparticulado empleado inhibe la replicación de un virus activado, ya que los virus utilizados en este trabajo se encontraban infectando células en un cultivo celular, lo que da lugar a la posibilidad de que el compuesto se pueda utilizar en virus como el VIH que afecta a miles de personas en el mundo, posibilidad que además de viable resulta muy alentadora.

Otro punto importante es que la literatura científica indica que para realizar estudios que prueban la eficacia de virucidas, el agente virucida se debe incubar junto con el cultivo celular y posteriormente realizar las pruebas de inhibición de la replicación viral.<sup>60</sup> Sin embargo, nuestro compuesto nanoparticulado no se incubó

---

---

debido a que se le quiso dar un enfoque de acción rápida. Con los resultados obtenidos podemos sugerir que el compuesto nanoparticulado tiene una acción rápida y no requiere de incubación alguna por lo que podría usarse de manera inmediata.

---

---

## X CONCLUSIONES.

- Se obtuvo la CL de un compuesto nanoparticulado a través de un cultivo celular por ensayo de viabilidad MTT.
- Se encontró la concentración a la cual el compuesto nanoparticulado inhibió la replicación de los Virus del Herpes Simplex tipo 2 y del virus de la Influenza A H1N1 pandémico 2009 sin afectar el cultivo celular.
- Nuestros resultados amplían el panorama sobre el uso de compuestos nanoparticulados in vivo y da la pauta para la realización de estudios farmacológicos más extensos.

---

---

## **XI. PROPUESTAS.**

- Realizar estudios más extensos respecto a la inhibición de los virus a través de pruebas más sofisticadas tales como PCR y RTPCR.
- Realizar estudios complementarios para evaluar el posible daño celular ejercido por el compuesto nanoparticulado.
- Realizar pruebas en células dérmicas humanas.
- Realizar estudios con citometría de flujo adyacente al estudio de viabilidad por el método de MTT.

---

---

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Montoya-Villafañe HH. Virus. En: Montoya-Villafañe HH. Microbiología básica para el área de la salud y afines, 2a Edición. Medellín: Universidad de Antioquia, 2008. p. 139-141.
- 2.- Funke BR. Virus, viroides y priones. En: Tortora GB, Funke BR, Case CL. Introducción a la microbiología, 9a Edición. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2007. p.387-391.
- 3.- Passarge E. Células procariontes y virus. En: Passarge E. Genética Texto y Atlas, 3ra Edición. Madrid: Médica Panamericana, 2009. p.102-104.
- 4.- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Métodos de laboratorio en virología básica. En: Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico, 12a Edición. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2009. p.718-721.
5. - Weinberg JM. Herpes zoster: Epidemiology, natural history, and common complications. J Am Acad Dermatol. 2007; 57(6): 130-135.
- 6.- Gutiérrez KM, Whitley RJ, Arvin AM. Herpes Simplex Virus Infections. En: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, et al. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, 7th Edition. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2010. p. 823-845.
- 7.- Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human Herpes Simplex virus infection: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. J Am Acad Dermatol. 2007; 57(5): 737, 763.
8. - Baringer JR. Herpes virus infections of the nervous system. Neurol clin 2007; 26(1): 657-674.
9. - Thorley-Lawson DA, Duca KA, Shapiro M. Review. Epstein-Barr virus: a paradigm for persistent infection - for real and in virtual reality. Trends in Immunology. 2008; 29(4): 195-201.
- 10.- Kumar SP, Chandy ML, Shanvas M, et al. Pathogenesis and life cycle of herpes simplex virus infection-stages of primary, latency and recurrence. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery Medicine and Pathology. 2016; 28(1): 350–353.
- 11.- Whitley RJ. Herpes Simplex Virus infections. En: Goldman L, Schafer AI. Cecil Medicine, 24th edition. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2011. p. 2127.

- 
- 
- 12.- Riley LE. Herpes Simplex Virus. *Seminars in Perinatology*. 1998; 22(4): 284-292.
  - 13.- Avilés LCL. Encefalitis por virus herpes simple: diagnóstico y tratamiento. *Medwave*. 2008; 8(7): 560-565.
  - 14.- Romero CR. Familia Herpesviridae. En: Romero CR. *Microbiología y parasitología humana*. 3ra Edición. México. Médica Panamericana, 2007. p.291-293.
  - 15.- Whitley RJ, Roizman B. Herpes Simplex Virus infections. *The Lancet*. 2001; 357(1): 1513-1518.
  16. - Moreira GCM, Giraldo PC, Moraes GFA, et al. Genital ulcers in women: clinical, microbiologic and histopathology characteristics. *BJID*. 2007; 11(2): 254-260.
  - 17.- Whitley RJ, Roizman B. Herpes Simplex Virus Infection. *The Lancet*. 2001; 13(1): 6-11.
  - 18.- Crisci E, Mussá T, Fraile L, et al. Review: Influenza virus in pigs. *Molecular Immunology*. 2013; 55(1): 200-211
  - 19.- Carrillo BJA, Bacca CHT, Botero GMM, et al. Manifestaciones clínicas y radiológicas por virus de influenza A H1N1. *Infection*. 2014; 18(1): 12-21.
  - 20.- Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 2009; 459(18): 931-938.
  - 21.- Rafart JV, Cuesta JG, Agulló MB. Principales características de la pandemia A (H1N1) por el nuevo virus influenza. *Med Clin*. 2009; 133(3): 513-521.
  - 22.- Liu M, Chen F, Liu T, et al. The role of oxidative stress in influenza virus infection. *Microbes and Infection*, 2017; 19(1): 580-586.
  - 23.- Girard MP, Tam JS, Assossou OM, et al. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine*. 2010; 28(1): 4895-4902.
  - 24.- Navarro-Marí JM, Mayoral-Cortés JM, Pérez-Ruiz M, et al. Infección en humanos por virus de la gripe A(H1N1): revisión al 30 de octubre de 2009. *Enferm Infecc Microbiol clin*. 2010; 28(7): 446, 452.

- 
- 
25. – Moscona A, Trowell A, Willmer. Methods. En: E. N. Willmer editor, Cells and Tissues in Culture: Methods, Biology and Physiology vol. 1. London: Academy Press, 2015. p. 19-85.
- 26.- Huerta GA, Gonzales SN, Torres MA. Influenza A (H1N1): manifestaciones clínicas e indicaciones profilácticas y terapéuticas. Arch Bronconeumol, 2010; 46(2): 19-23.
- 27.- Jeong EK, Bae JE, Kim IS. Inactivation of influenza A virus H1N1 by disinfection process. Am J Infect Control. 2010; 38(5): 354-360.
- 28.- Noda AA, Vidal TLA, Araña RM, et al. Mecanismos biológicos implicados en el comportamiento epidemiológico y patogénico de la influenza. Revista Cubana de Pediatría. 2010; 82 (2): 1561-3119
- 29.- Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de atención médica. Prevención, diagnóstico y tratamiento de la influenza A H1N1. Guía de referencia rápida. Ciudad de México, 2016.
30. - Atlas RM. Handbook of Microbiological Media. Fourth Edition. Washington, D.C.: ASM PRESS, 2010. p.1791.
31. - Freshney RI. Subculture and cell lines. En: Freshney RI. Culture of Animal cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. Sixth Edition. New Jersey: Wiley BlackWell, 2015. p. 235-258
- 32.- Lazo GE. Manual de seguridad en Laboratorios de Microbiología Molecular. D. F.: Universidad Nacional Autónoma de México. 2004. p.40
33. – Yang Z, Hai-Rong X. Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells. En: Ceccherini-Nelli L, Matteoli B. Biomedical Tissue Culture. Pisa: IntechOpen .2012. p.3-18.
- 34.- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Clasificación, estructura y replicación vírica. En: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica. 8a Ed. Barcelona: Elsevier Health Sciences. 2017. p. 358-567.
- 35.- Reyes G. E. tecnologías del cuidado en los métodos para la prevención y control de la transmisión de microorganismos. En: Reyes G. E. Fundamentos de la Enfermería, 2a Ed. Ciudad de México: Manual Moderno. 2015.

- 
- 
- 36.- Ramsden JJ. Nanocarbon Nanomaterials and their Production. En: Ramsden JJ. Nanotechnology an Introduction. Second Edition. Oxford: Project manager. 2016. p. 123-144.
- 37.- Salarian AA, Mollahale YB, Hami Z, et al. Cephalexin nanoparticles: Synthesis, cytotoxicity and their synergistic antibacterial study in combination with silver nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*. 2017; 198(1): 125-130.
- 38.- Ansari SM, Bhor RD, Pai KR, et al. Cobalt nanoparticles for biomedical applications: Facile synthesis, physiochemical characterization, cytotoxicity behavior and biocompatibility. *Applied Surface Science*. 2017; 414 (1): 171-187.
- 39.- Rajendran K, Sen S, Suja G, et al. Evaluation of cytotoxicity of hematite nanoparticles in bacteria and human cell lines. *Colloids and surfaces B. Biointerfaces*. 2017; 157(1): 101-109.
- 40.- Deng J, Yao M, Gao C. Cytotoxicity of gold nanoparticles with different structures and surface-anchored chiral polymers. *Acta Biomaterialia*. 2017; 53(1): 610-618.
- 41.- Shankar PD, Shobana S, Karuppusamy I, et al. A review on the biosynthesis of metallic nanoparticles (gold and silver) using bio-components of microalgae: Formation mechanism and applications. *Enzyme and Microbial Technology*. 2016; 95(1): 28-44.
- 42.- Kang B, Mackey MA, El-Sayed MA. Nuclear Targeting of Gold Nanoparticles in Cancer Cells Induces DNA Damage, Causing Cytokinesis Arrest and Apoptosis. *J AM. CHEM. SOC*. 2010; 132(1), 1517-1529.
- 43.- Bendale Y, Bendale V, Paul S. Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through induction of apoptosis. *INTEGR MED RES*. 2017; 6(1): 141-148.
- 44.- Roy CN, MacGregor-Ramiasa M, Zilm P, et al. 'Chocolate' silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016; 482(1): 151-158.
- 45.- Duran N, Duran M, Bispo de Jesus M, et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanobiotechnology, Biology, and Medicine*. 2016; 12(1): 789-799.
- 46.- Wei L, Lu J, Xu H, et al. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*. 2015; 20(5): 591-601.

- 
- 
- 47.- Piao MJ, Kang KA, Lee IK, et al. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters*. 2011; 201(1): 92-100.
- 48.- Ahamed M, Karns M, Goodson M, et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008; 233(1): 404-410.
- 49.- Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability In vivo in Mice. *Molecular Biology, Pathobiology, and Genetics*. 2009; 69(22): 8784-8789.
- 50.- Huerta-García E, Pérez-Arizti JA, Márquez-Ramírez SG, et al. Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells. *Free Radicals Biology and Medicine*. 2014; 73(1): 84-94.
- 51.- Vicente-Torres. Obtención de tejidos y células para desarrollo in vitro. En: Gil-Loyzaga P. *Cultivo de células de animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa*. Madrid: Visión libros, 2013. p. 65-72.
- 52.- Hematian A, Sadeghifard N, Mohebi R, et al. Traditional and modern cell culture in virus Diagnosis. *Osong Public Health Res Perspect*. 2016; 7(2): 77-82.
- 53.- Grela E, Kozławska J, Graowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria. *Acta Histochemica*. 2018; 120(1): 303-311.
- 54.- Gomez P, Fourcade L, Alexandru MM, et al. Neutral red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. *Analytical Biochemistry*. 2017; 535 (1): 43-46.
- 55.- Baer A, Kehn-Hall K. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *JOVE*. 2014; 93(1): 1-10.
- 56.- Díaz MF, Gonzales AM. La respuesta inmune. En: Córdova VJA, Valdespino GJL, Ponce de León RS. *La epidemia de influenza A/H1N1 en Mexico*. DF: Medica Panamericana, 2010. p. 47-60.
- 57.- Khezerlou A, Alizadeh-Sani M, Azizi-Lalabadi M, et al. Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. *Microbial Pathogenesis*. 2008; 123(1): 505-526.

---

---

58.- Luganini A, Nicoletto SF, Pizzuto L, et al. Inhibition of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 Infections by Peptide Derivatized Dendrimers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011; 55(7): 3231-3239.

59.- Xiang D, Chen Q, Pang L, et al. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. *Journal of Virological Methods*. 2011; 178(1): 137-142.

60.- Luganini A, Caposio P, Landolfo S, et al. Phosphorothioate-Modified Oligodeoxynucleotides Inhibit Human Cytomegalovirus Replication by Blocking Virus Entry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008; 52(3): 1111-1120.