



REVISTA

MEDICA

ORGANO OFICIAL DEL COLEGIO MEDICO DE LA PAZ

EDITORIAL INVESTIGACIÓN

- EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CRIBADO PARA EL DIAGNOSTICO RÁPIDO DE INFECCIÓN URINARIA
- TRATAMIENTO DE LA ERITROCITOSIS PATOLÓGICA DE ALTURA CON ATORVASTATINA: ESTUDIO CLÍNICO FASE II
- ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE Opuntia soehrensi SOBRE LA INFECCIÓN POR VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO, In Vitro.
- INDICES DE EFICACIA DIAGNÓSTICA DEL COLESTEROL EN DERRAMES PLEURALES PARA DETERMINACIÓN DE TRASUDADO/EXUDADO EN PACIENTES HOSPITAL LUIS URÍA DE LA OLIVA AÑOS 2003 A 2004.
- LOS BLOQUEOS SINO-ATRIALES DE SEGUNDO GRADO
- ACTIVIDAD PROTROMBINICA EN SUJETOS CON ERITROCITOSIS DE ALTURA

CASOS CLINICOS

- CALIDAD DE VIDA EN PACIENTES PORTADORES DE INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA TERMINAL EN HEMODIÁLISIS
- SEGUIMIENTO CLINICO DE UN PACIENTE CON MELANOMA COROIDEO
- CORRECCION DEL SÍNDROME DE WOLF-PARKINSON-WHITE

REVISION ACTUALIZACIÓN

- AGRESION, MALTRATO Y ABUSO, DENTRO DE LA CULTURA DE LA VIOLENCIA, COMO CONDUCTA APRENDIDA
- PARTO DOMICILIAR UNA TRADICIÓN QUE AÚN NO SE ROMPE EN EL SECTOR DE OVEJUYO JUNIO – SEPTIEMBRE DEL 2005
- TRASTORNOS DEL EQUILIBRIO DEL POTASIO

SECCIÓN CULTURAL

- SEMBLANZA MEDICA
- REGLAMENTO INTERNO DE LA REVISTA MEDICA
- REQUISITOS PARA LA PUBLICACIÓN DE TRABAJOS

Volumen 12 N° 1
Enero Abril 2006

Guarachi, C. Marina

Laboratorio de Virología e Inmunología de la Unidad de Biomedicina Experimental. Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS), Universidad Mayor de San Andrés.

Philco, R. Wendy

Laboratorio de Virología e Inmunología de la Unidad de Biomedicina Experimental. Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS), Universidad Mayor de San Andrés.

Terrazas, A. Katty

Laboratorio de Virología e Inmunología de la Unidad de Biomedicina Experimental. Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS), Universidad Mayor de San Andrés.

Carvajal, S. Roger

Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA)

ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE OPUNTIA SOEHRENSII SOBRE LA INFECCIÓN POR VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO, IN VITRO.

.....

RESUMEN

En el presente trabajo se exploró el efecto del extracto acuoso de la semilla de *Opuntia soehrensii* sobre la infección in vitro por Virus Respiratorio Sincicial (VRS). Con este fin la línea celular BHK-21 fue infectada con VRS, además, fue incorporado el extracto antes, durante y después de la infección. La evaluación se llevó a cabo por los métodos de Reducción de la sal de tetrazolio (MTT) y observación del Efecto Citopático (ECP). Dependiendo del tiempo de exposición y de la etapa de infección viral en la cual el extracto fue incorporado, el producto alcanzó la CE_{50} a concentraciones entre 31 y 0,021 mg/mL. Los resultados obtenidos sugieren que *O. soehrensii* posee importante actividad anti-VRS.

ABSTRACT

In this job we searched the effect of aqueous extract of *Opuntia soehrensii* seeds against Respiratory Syncytial virus (RSV) infection in vitro. BHK-21 cell line was infected with RSV, and the extract was incorporated before, during and after the infection. The evaluation was carried out by the Tetrazolium salt method (MTT) and Cytopathic effect (CPE). The extract reached the EC_{50} from 31 to 0,021 mg/mL; these concentrations depend on exposure time and infection viral stage when it was incorporated. The results suggest that *O. soehrensii* has antiviral activity.

PALABRAS CLAVE. Virus Respiratorio Sincicial, *Opuntia soehrensii*, BHK-21.

KEY WORDS. Respiratory Syncytial Virus, *Opuntia soehrensii*, BHK-21.

INTRODUCCIÓN

El Virus Respiratorio Sincitial (VRS), miembro de la familia Paramixoviridae es una de las principales causas de afectación infecciosa del tracto respiratorio en todo el mundo. Las manifestaciones clínicas van desde cuadros gripales hasta bronquiolitis y neumonía, principalmente en niños menores de 2 años, adultos mayores de 60 años y personas con problemas cardiopulmonares^(1,2,3,4,5). Además de la morbilidad y el costo económico derivado de la fase aguda de la enfermedad, la importancia radica en las secuelas que origina a largo plazo^(6,7,8,9,10,11).

El único agente antiviral disponible en el comercio para el tratamiento de la infección con VRS es la Ribavirina; sin embargo, su uso está limitado por aspectos concernientes a su eficacia y toxicidad^(12,13,14). Debido a esta carencia de antivirales efectivos, en la actualidad se investigan terapias alternativas. Entre los varios productos de aplicación terapéutica proveniente de la medicina tradicional quechua-aymara se encuentra la planta *Opuntia soehrensii*, que pertenece a la familia Cactaceae un componente importante de la biodiversidad andina boliviana, conocida popularmente como Ayrampo⁽¹⁵⁾.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la actividad antiviral de *O. Soehrensii* utilizando como modelo la infección in Vitro por VRS; tomando en cuenta la medicina tradicional andina, se plantea que las semillas de esta planta poseen actividad antiviral.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño de investigación es de tipo experimental, realizado in Vitro, en cultivo de líneas celulares.

VRS, línea celular.

La cepa viral fue obtenida por hisopado nasal de un paciente remitido al instituto SELADIS; la presencia del virus fue confirmada por Inmunofluorescencia Directa (ImagenTM). El

virus fue propagado en la línea celular BHK-21, mantenido en RPMI-1640 (Sigma.Co) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB, Sigma, Co.); incubado a 37°C, 5% CO₂ y saturación de humedad (Tuttnaue Knott); para luego ser conservado hasta su empleo (suspensión stock).

EXTRACTO VEGETAL.

Las semillas de *O. soehrensii* procedentes de la zona altiplánica del departamento de La Paz fueron desecadas y trituradas; 40 g del material vegetal fue suspendido en 1 litro de agua bidestilada y desionizada para su extracción por maceración; el extracto acuoso fue alícuotado y liofilizado (Liph Lock 6) dando un rendimiento de 15 mg por cada mL.

MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL

- **Ensayos de reducción de MTT.** A monocapas celulares en estudio contenidos en microplacas de 96 pozos de fondo plano (Multi-cell, labware) se adicionó 100 uL de la sal de tetrazolio (MTT), para ser incubado por 4 horas y posteriormente disolver los cristales formados con 150 uL de ácido clorhídrico: alcohol isopropílico (1:24) y se midió en espectrofotómetro a 545 nm de longitud de onda (Awareness-technology inc).

- **Efecto Citopático (ECP).** Utilizando un microscopio invertido (Olympus CK2) se realizó el análisis observacional del cambio morfológico de células infectadas con VRS: pérdida de adherencia, presencia de inclusiones, vacuolas y formación de sincicios. A estos cambios se les asignó valores porcentuales arbitrarios cuya sumatoria definen el ECP global.

Ensayo de Formación de Placas. El VRS fue infectado en células confluentes contenidas en placas de 5,5 cm de diámetro y placas de 24 pozos (Corning); luego de 2

horas (periodo de adsorción) fue añadido RPMI-1640 con 0,5% y 1% de agar. Después del periodo de incubación se fijo con formol 10% para colorear con Rojo Neutro 0,1% en RPMI y Cristal Violeta al 1% por 30 minutos para observar las placas virales.

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS INFECTIVA MEDIA EN CULTIVO CELULAR (TCID₅₀).

Diluciones de VRS (modulo 10X, volumen 100 uL) fueron adicionados a monocapas celulares; al cabo de 120 minutos los virus no adsorbidos fueron removidos con Solución de Hank para luego adicionar RPMI-1640 y ser evaluada luego de diferentes tiempos de incubación.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL

La actividad de *O. soehrensii* fue evaluada mediante la medición de la sobrevivencia celular de los cultivos infectados en presencia del producto estudiado, en comparación con controles tanto de infección (células-VRS sin *O. soehrensii*), como de células no infectadas mantenidas en las mismas condiciones y procedimientos. La medición de la actividad antiviral fue evaluada de la siguiente manera:

$$\text{Activ. Antiviral (\%)} = \frac{(\text{DOe}) \text{ VRS} - (\text{DOc}) \text{ VRS} \times 100}{(\text{DOC}) - (\text{DOC}) \text{ VRS}}$$

Donde: (DOe)/VRS = Densidad Óptica de células-VRS- *O. soehrensii*
 (DOC)VRS = DO de células-VRS
 (DOc) = DO de células sin infectar

Para la observación del ECP.

ECP = ECPe - ECPc
 Donde: ECP = Efecto Citopático inducido por acción viral;
 ECPe = ECP de células-VRS (con y sin *O. soehrensii*)
 ECPc = ECP de células sin infectar.

RESULTADOS.

DOSIS INFECTIVA MEDIA EN CULTIVO CELULAR (TCID₅₀)

La concentración a la cual el virus, a partir de una suspensión stock, es capaz de infectar al 50% de las células de un cultivo es conocida

como TCID₅₀, esta fue determinada a las 48, 72 y 96 horas postinfección. Se obtuvo datos diferenciables a las 72 horas, hallándose la TCID₅₀ a diluciones de 10⁻⁴ y 10⁻³ para ECP y MTT respectivamente. Los ensayos de actividad antiviral, fueron realizados a la concentración del virus correspondiente a la dilución de 10⁻³. Debe hacerse notar que la observación de placas de lisis no fue reproducible en ninguno de los ensayos probados.

Determinación del estadio de infección por VRS en el cual *O. soehrensii* posee actividad antiviral.

Estandarizadas las condiciones óptimas de multiplicación de VRS en cultivo celular, el extracto fue incorporado en diferentes estadios de la infección:

- EFECTO DEL EXTRACTO DE *O. SOEHRENSII* SOBRE EL VRS.

Diferentes concentraciones de *O. soehrensii* fueron incubadas con la suspensión stock de VRS por 24 horas; para luego diluir la suspensión viral hasta una concentración correspondiente a 10⁻³ y ser usada para infectar las células y ser incubadas por 72 horas. La concentración a la cual existe 50% de disminución de la acción viral con respecto al control de infección (Concentración Efectiva Media - CE₅₀) se encuentra cercana a 31 mg/mL de *O. soehrensii*. Figura 1.

- EFECTO DEL EXTRACTO DE *O. SOEHRENSII* SOBRE LA LÍNEA CELULAR BHK-21 PREVIO A LA INFECCIÓN VIRAL.

Concentraciones de *O. soehrensii* fueron adicionadas a cultivos de células BHK-21 por 24, 6 y 3 horas previas a la infección por el virus. El extracto fue removido antes de proceder a infectar con VRS e incubar hasta su evaluación. Como se aprecia en la figura 2 el pretratamiento de las células reduce la acción viral de manera directamente proporcional a la concentración y tiempo de exposición del

extracto, encontrándose la CE_{50} entre 31 y 0,21 mg/mL de *O. soehrensii*.

- CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DE ADHESIÓN VIRAL.

Para evaluar la posibilidad de que *O. soehrensii* ejerza su acción antiviral por competencia con el VRS por el sitio de unión a las células, VRS y *O. soehrensii* fueron adicionadas de modo simultáneo a células BHK-21 a 4°C. Transcurridas 2 horas los virus no adsorbidos así como también el extracto fueron removidos y se incubó por 72 horas. La figura 3 muestra que *O. soehrensii* no alcanza la actividad inhibitoria media.

- EFECTO DE *O. SOEHRENSII* EN LA REPLICACIÓN VIRAL

El extracto fue incorporado al cultivo celular después del periodo de adsorción viral, luego de 3 y 6 horas para ser mantenido hasta las 72 horas. Se realizaron los ensayos de MTT y observación del ECP. La Figura 4 muestra la existencia de un importante efecto antiviral alcanzando la CE_{50} entre 0,021 y 21 mg/mL

DISCUSIÓN.

Las variaciones propias de cada ensayo en los sistemas virus-células in Vitro, se deben a la sensibilidad de estos para evaluar diferentes parámetros tomados en cuenta con respecto a la fisiología y anatomía celular; entre estas se cita: a) alteraciones morfológicas inducidas por la abundante cantidad de productos virales resultado de varios ciclos de replicación viral, b) actividad metabólica celular redireccionada a la síntesis de productos virales en forma continua en la replicación viral activa y c) capacidad lítica del virus que en caso del VRS no da lugar⁽¹⁶⁾.

La intervención de *O. soehrensii* en la cinética de infección del VRS se condensa en la figura 5. El perfil de actividad sugiere que un componente del extracto induce modificación (es) en la célula previa a la infección, que le

otorga resistencia a alteraciones en la célula, esta actividad es dependiente del tiempo de contacto y de la concentración del producto. Se descarta que el extracto posea un efecto virucida frente a VRS. La actividad antiviral es importante cuando se lleva a cabo la replicación viral activa en la célula; posibles blancos de acción son las etapas de transcripción, traducción, glucosilación, ensamblaje o liberación de la partícula viral^(17,18,19,20).

La utilidad de estos datos es importante para correlacionarlos con su aplicación clínica, puesto que este producto podría disminuir los efectos de la infección de VRS en células del tracto respiratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avendaño LF, Palomino MA, Larrañaga C. Surveillance for respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory infection in Chile (1989 to 2000). *J Clin Microbiol* 2003; 41(10): 4879 – 4882.
2. Shay KD, Holman CR, Newman DR, et al. Bronchiolitis – associated hospitalizations among US children, 1980 – 1996. *JAMA* 1999; 282(15): 1440 – 1446.
3. Sullender WM. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev* 2000; 1: 1 – 15.
4. Hacking D, Hull J. Respiratory syncytial virus: viral biology and the host response. *J Infec* 2002; 45: 18 – 24.
5. Falsey Ra, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(3): 371 – 384.
6. Mejias A, Ramilo O. Asthma and respiratory syncytial virus: Myth or reality? *An Esp Pediat* 2002; 57(3): 199 – 204.
7. Patrick BC. Systematic review of biology and medical management of respiratory syncytial virus infection. *Resp Care* 2003; 48(3): 208 – 226.
8. Domachowske JB, Rosenberg HF. Respiratory syncytial virus infection: Inmunie response,

- immunopathogenesis and treatment. Clin Microbiol Rev 1999; 12(2): 298 – 309.
9. Breese HC. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. N Engl J Med 2001; 344(25): 1917 – 1928.
 10. Wennergren G, Kristjansson S. Relationship between respiratory syncytial virus bronchiolitis and future obstructive airway diseases. Eur Resp J 2001; 18: 1044 – 1058.
 11. Polack PF, Teng NM, Collins LP, et al. A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. J Experim Med 2002; 196(6): 859 – 865.
 12. Snell NJ. New treatments for viral respiratory tract infections—opportunities and problems. JAC 2001; 47(3): 251 – 259.
 13. Crotty S, Mac D, Arnold JJ, et al. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutage. Nat Med 2000; 8(12): 1375 – 1379.
 14. Zhang Y, Jamaluddin M, Wang S. Ribavirin treatment up-regulates antiviral gene expression via the interferon-stimulated response element in respiratory syncytial virus-infected epithelial cells. J Virol 2003; 77(10): 5933 – 5947.
 15. Graault L. Kallawaya: Cuadernos itinerantes de los ándes. Paris: ORSTOM; 1984.
 16. Florence B, Chambers T, Wiedrauk D. Virology: a laboratory manual. California: ACADEMIC PRESS; 1992.
 17. De Cerq E. Molecular targets for antiviral agents. J Pharmacol Exp Ther 2001; 297(1): 1 – 10.
 18. Budge JP, Grham SB. Inhibition of respiratory syncytial virus by RhoA-derived peptides: implications for the development of improved antiviral agents targeting heparin-binding viruses. JAC 2004; 54: 299 – 302.
 19. Domindo D, López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterápia 2003; 16(4): 385 – 393.
 20. Murphy CM. Plants products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12(4): 564 – 582.

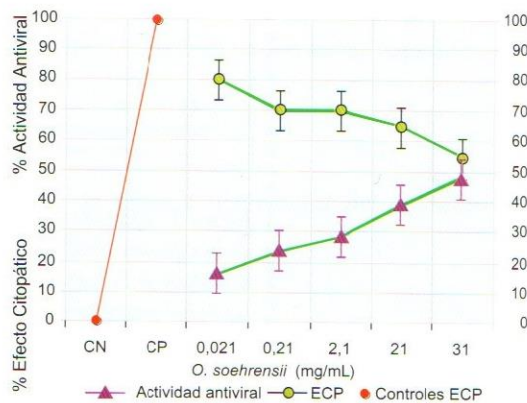


Figura 1. Efecto del extracto de *O. soehrensii* sobre el VRS antes de la infección en las células. Varias concentraciones del extracto fueron incubadas con VRS por 24 horas a 37°C previo a la infección en células. Cada valor representa la media \pm DS de 3 experimentos independientes.

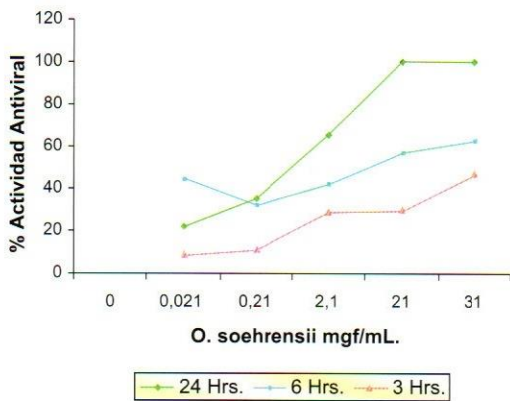


Figura 2. Efecto del pretratamiento de células BHK-21 con varias concentraciones de *O. soehrensii*, previo a la infección viral. Células cultivadas con *O. soehrensii* por 24, 6 y 3 horas fueron sometidas a la infección por VRS, los resultados se expresan en términos porcentuales.

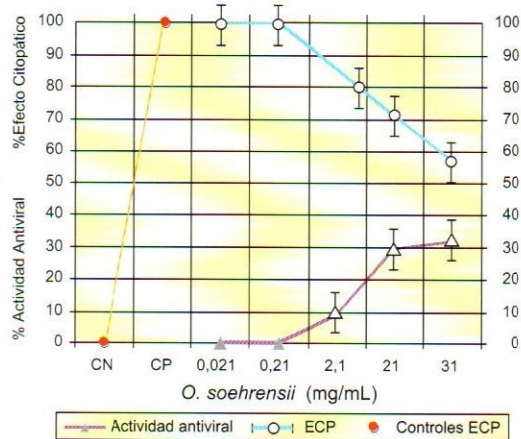


Figura 3. Efecto de la presencia de *O. soehrensii* en la adhesión de VRS en células BHK-21. VRS - *O. soehrensii* fue adicionado a diferentes concentraciones en las células en cultivo. Los resultados son la media \pm DS de 3 experimentos independientes.

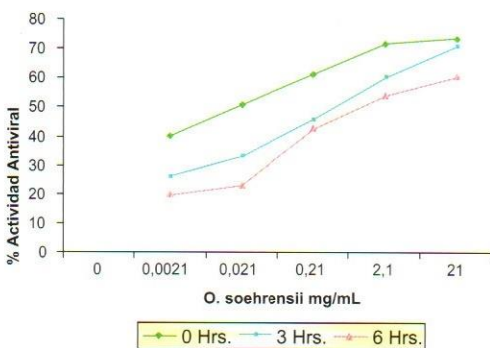


Figura 4. Actividad antiviral de *O. soehrensii* sobre la interacción virus-célula. El extracto de *O. soehrensii* se incorpora inmediatamente luego del periodo de adsorción viral, así como también luego de 3 y 6 horas para ser mantenido por 72 horas.

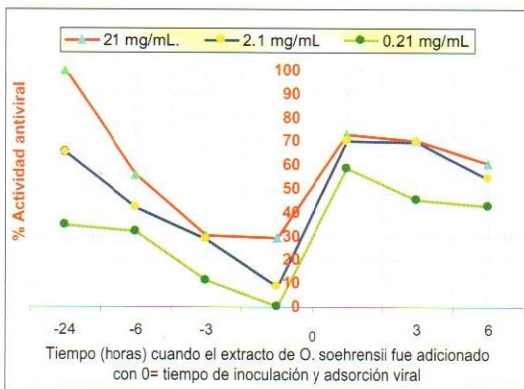


Figura 5. Efecto de *O. soehrensii* antes, durante y después de la infección viral. Porcentaje de la actividad antiviral de 3 dosis de *O. soehrensii*, a través de la evaluación de la actividad enzimática mediante el ensayo de reducción de MTT.