

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE
Opuntia soehrensii UTILIZANDO COMO MODELO LA
INFECCIÓN *In Vitro* EN CULTIVO DE LÍNEAS
CELULARES POR *VIRUS RESPIRATORIO
SINCITAL.***

Postulante: MARINA GUARACHI CONDORI

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

La Paz – Bolivia

2005

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL
DE *Opuntia soehrensii*. UTILIZANDO COMO
MODELO LA INFECCIÓN *In Vitro* EN CULTIVO DE
LÍNEAS CELULARES POR *VIRUS RESPIRATORIO
SINCITIAL*.**

Postulante: MARINA GUARACHI CONDORI

Asesores: KATTY TERRAZAS ARANDA, M. Sc.
ROGER CARVAJAL SARAVIA, Ph. D.

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

La Paz – Bolivia

2005

Autoridades Facultativas:

Dra. Wilma Strauss Z.
Decana

Dr. Arturo Mallea A.
Vicedecano

Dra. Katiuska Gonzales
Jefe de carrera Bioquímica

Tribunales de la presente tesis:

Dr. Rolando Sanchez
Dr. Fernando Sosa
Dra. Heidi Garcia

Ambiente de investigación:

Instituto de Servicio de Laboratorio y Diagnóstico en Salud, SELADIS
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.
Universidad Mayor de San Andrés
La Paz - Bolivia

Dedicatoria:

*A Dios por la existencia y a mi familia
quienes me apoyaron y siempre me
apoyaran.*

Marina.

MIS SINCEROS AGRADECIMIENTOS:

De manera especial a la Dra. Katty Terrazas y al Dr. Roger Carvajal, por haberme dado la oportunidad de conocer el mundo de la investigación, quienes con su entusiasmo contagian la pasión por el trabajo y con los que siempre se puede contar.

Son varias personas las que ayudaron de alguna forma u otra durante la realización de esta tesis, por lo que aprovecho este espacio para manifestar mi agradecimiento con el ánimo de no olvidar a nadie.

A los doctores Jacques Gardon y Erick Benefice por las ideas, propuestas, consejos científicos y colaboración desinteresada.

A todo el personal docente y administrativo del instituto SELADIS, por la cooperación prestada.

A Wendy por la paciencia, la orientación informática y por estar siempre pendiente de los demás, a Karla por la simpatía y entusiasmo, a Patricia por los consejos y por saber escuchar.

A Silvia, Marisol, Sara, Deyni, Jimena, Nelly, Gabriela, Miguel, Alvaro, Daniel, por hacer que el ambiente de trabajo sea tan especial.

Y como olvidar a Verónica y Yanet mis hermanas favoritas.

Marina.

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	2
I. Justificación	3
II. Antecedentes	5
1. El virus.....	5
1.1 Estructura viral.....	5
1.2 Replicación viral.....	8
1.3 Replicación y características de crecimiento viral <i>in vitro</i>	11
2. La infección viral.....	11
2.1 Manifestaciones clínicas.....	11
2.2 Patogénesis.....	12
2.3 Complicaciones.....	14
3. La inmunidad.....	14
3.1 Inmunidad celular.....	14
3.2 Inmunidad humoral.....	16
4. Diagnostico.....	18
4.1 Diagnóstico laboratorial.....	18
4.1.1 Técnicas directas para la detección del VRS en muestras Biológicas.....	18
4.1.2 Pruebas para la demostración directa del antígeno.....	20
4.1.3 Pruebas indirectas para la demostración del virus.....	21
5. Tratamiento.....	21
5.1 Terapia de soporte o de mantenimiento.....	21
5.1.1 Administración de O ₂ humidificado o mezcla de gas oxígeno-helio.....	21
5.1.2 β_2 agonistas.....	22
5.1.3 Corticosteroide sistémico e inhalado.....	22
5.1.4 Epinefrina racémica.....	22
5.1.5 Remoción mecánica de las secreciones.....	22
5.1.5 Remoción mecánica de las secreciones.....	22
5.2 Antivirales.....	22
5.2.1 Anticuerpos.....	23
5.2.2 Ribavirina.....	23
6. Fitoterapia.....	25

6.1 Grupos químicos aislados de plantas con potencial acción antiviral.	26
6.1.1 Compuestos fenolicos simples, heterosidos fenolicos.....	26
6.1.2 Quinonas.....	27
6.1.3 Cumarinas.....	27
6.1.4 Flavonas.....	27
6.1.5 Taninos.....	28
6.1.6 Terpenoides.....	28
6.1.7 Alcaloides.....	28
6.1.8 Polipéptidos.....	28
6.2 Opuntia.....	29
7. Procedimientos para la detección de actividad antiviral.....	31
7.1 Métodos de extracción.....	31
7.2 Ensayos <i>in vitro</i>	33
7.3 Ensayos <i>in vivo</i>	34
III. Planteamiento del problema.....	35
1. La infección por VRS.....	35
2. Epidemiología.....	37
2.1 Perfil epidemiológico de VRS en Bolivia.....	38
3. Factores de riesgo.....	40
4. Transmisión.....	41
5. Profilaxis.....	42
IV. Objetivos.....	43
1. Objetivo general.....	43
2. Objetivos específicos.....	43
V. Hipótesis.....	44
1. Hipótesis general.....	44
2. Hipótesis específicas.....	44
VI. Diseño Metodológico.....	45
VII. Material y Métodos.....	46
1. Extracto vegetal.....	46
2. Procedimientos de evaluación y detección de la actividad antiviral.	47
2.1 Medios y soluciones para el trabajo en cultivo de células y virus.	47
2.1.1 Sales inorgánicas.....	47
2.1.2 Sales para el sistema buffer.....	48
2.1.3 Carbohidratos.....	49
2.1.4 Vitaminas.....	49
2.1.5 Aminoácidos.....	50

2.1.6	Proteínas y péptidos.....	50
2.1.7	Lípidos y ácidos grasos.....	50
2.1.8	Suero.....	50
2.1.9	Antibióticos.....	51
3.	Cultivo de células: línea celular continua BHK – 21.....	53
3.1	Disociación celular.....	54
3.2	Determinación de la viabilidad y ajuste de la densidad celular.....	55
3.3	Preparación de cultivos celulares.....	56
4.	Cultivo de virus.....	56
4.1	Cepas nativas de Virus Respiratorio Sincitial (<i>VRS</i>).....	56
4.2	Transporte de las muestras.....	57
4.3	Aislamiento viral.....	57
4.4	Detección de <i>VRS</i>	58
5.	Optimización de monitores para la cuantificación viral y evaluación del efecto antiviral.....	59
5.1	Evaluación por Efecto Citopático.....	59
5.2	Evaluación de la actividad enzimática por el ensayo espectrofotométrico de MTT.....	61
5.3	Evaluación por el ensayo de formación de placas virales.....	62
6.	Cuantificación del virus: Determinación de la Dosis Infecciosa Media en Cultivo Celular. (TCID ₅₀).....	63
7.	Evaluación de la actividad antiviral de <i>O. soehrensii</i> sobre la infección por <i>Virus Respiratorio Sincitial</i>	66
7.1	Evaluación de la actividad antiviral de <i>O. soehrensii</i> sobre las células en cultivo antes de la infección celular.....	66
7.2	Evaluación de la actividad de antiviral de <i>O. soehrensii</i> sobre el <i>VRS</i> antes de la infección.....	67
7.3	Evaluación de la actividad de antiviral de <i>O. soehrensii</i> sobre la infección viral activa.....	67
VIII.	Resultados	69
1.	Extracto vegetal.....	69
2.	Establecimiento del cultivo celular.....	69
3.	Cultivo del virus.....	70
3.1	Aislamiento viral.....	70
3.2	Detección de <i>VRS</i>	70
4.	Optimización de ensayos para la cuantificación de la infección viral.....	72
4.1	Evaluación por Efecto Citopático.....	72
4.2	Evaluación por determinación de la actividad enzimática por el ensayo espectrofotométrico de MTT.....	75
4.3	Evaluación de la infección viral por el ensayo de formación de placas.....	75

5. Determinación de la dosis infectiva media viral en cultivo celular (TCID ₅₀).....	75
6. Actividad antiviral de <i>O. soehrensii in vitro</i> , sobre la infección por <i>VRS</i>	82
6.1 Efecto del extracto <i>O. soehrensii</i> sobre las células BHK-21, antes de la infección viral.....	82
6.2 Efecto del extracto sobre el <i>Virus Respiratorio Sincitial</i>	86
6.3 Actividad del extracto de <i>O. soehrensii</i> sobre la replicación viral activa: ensayos sobre la cinética de infección.....	88
6.4 Actividad antiviral de <i>O. soehrensii</i> en relación al tiempo de inoculación viral.....	94
IX. Discusión	96
X. Conclusiones	112
1. Conclusión general.....	112
2. Conclusiones específicas.....	112
XI. Bibliografía	114
Anexos	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del <i>Virus Respiratorio Sincitial</i>	5
Figura 2. Genoma de <i>Virus Respiratorio Sincital</i>	6
Figura 3. Representación esquemática del ciclo de replicación de <i>Virus Respiratorio Sincital</i>	9
Figura 4. Proceso de síntesis, glicosilación de proteínas virales, para su posterior inserción en la membrana plasmática de la célula huésped.....	10
Figura 5. Vías respiratorias.....	13
Figura 6. Formula estructural de la ribavirina.....	23
Figura 7. Diferentes especies de <i>Opuntia</i>	30
Figura 8. Bolivia: Relación de tasas de captación de tratamiento de neumonías en niños menores de 5 años por SEDES de Enero a Agosto del 2003.....	39
Figura 9. Bolivia: Relación de Tasas de neumonías de niños menores de 5 años por SEDES de Enero a Mayo del 2004.....	40
Figura 10. <i>O. soehrensii</i>	69
Figura 11. Células BHK-21 en cultivo.....	70
Figura 12. Expresión de Antígenos de <i>Virus Respiratorio Sincitial</i> en la membrana celular.....	71
Figura 13. Estudio comparativo de la expresión de antígenos virales...	72
Figura 14. Análisis morfológico de células <i>BHK-2</i> infectadas con <i>VRS</i> .	73
Figura 15. Análisis morfológico de células <i>BHK-21</i> infectadas con <i>VRS</i>	73
Figura 16. Ensayo de reducción de MTT.....	74
Figura 17. Actividad biológica de <i>VRS</i> a 48 horas de cultivo.....	76
Figura 18. Actividad biológica de <i>VRS</i> a 72 horas de cultivo.....	77
Figura 19. Actividad biológica de <i>VRS</i> a 96 horas de cultivo.....	78
Figura 20. Correlación de la Sobrevivencia Celular con el Efecto Citopático	79
Figura 21. Determinación de la TCID ₅₀ por el método de Reed y Muench	81

Figura 22. Efecto del pretratamiento de células BHK-21 con varias concentraciones de <i>Osp</i> durante 24 horas antes de la infección viral.....	83
Figura 23. Efecto del pretratamiento de células BHK-21 con varias concentraciones de <i>O. soehrensii</i> durante 6 horas antes de la infección viral.....	84
Figura 24. Efecto del pretratamiento de células BHK-21 con varias concentraciones de <i>O. soehrensii</i> durante 3 horas antes de la infección viral.....	85
Figura 25. Efecto del pretratamiento de células BHK-21 con varias concentraciones de <i>O. soehrensii</i> , previo a la infección viral...	86
Figura 26. Efecto de la incubación del extracto de <i>O. soehrensii</i> con <i>VRS</i> antes de la infección en las células.....	87
Figura 27. Efecto de la adhesión de <i>VRS</i> a células BHK-21 en presencia de <i>O. soehrensii</i>	89
Figura 28. Efecto del extracto de <i>O. soehrensii</i> adicionado inmediatamente después del periodo de adsorción viral.....	90
Figura 29. Efecto del extracto de <i>O. soehrensii</i> inmediatamente luego del periodo de adsorción viral.....	91
Figura 30. Efecto de <i>O. soehrensii</i> sobre la infección viral activa de <i>VRS</i> en células BHK-21.....	92
Figura 31. Actividad antiviral de <i>O. soehrensii</i> sobre la interacción virus-célula, incorporado luego de 6 horas del periodo de adsorción viral.....	93
Figura 32. Actividad biológica de <i>Osp</i> sobre la interacción virus-célula.....	94
Figura 33. Efecto de <i>O. soehrensii</i> antes, durante y después de la infección viral.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas codificadas por <i>VRS</i> y sus características.....	8
Tabla 2. Solventes empleados para la extracción del componente activo.....	33
Tabla 3. <i>Virus Respiratorio Sincitial</i> como agente causal de Neumonías en varias regiones en el mundo.....	38
Tabla 4. Evaluación del Efecto Citopático inducido por la Infección viral por <i>VRS</i>	61
Tabla 5. Determinación de la TCID ₅₀ empleando el método de Reed y Muench.....	80

RESUMEN

El *Virus Respiratorio Sincitial Humano (VRS)* es la principal causa de infecciones virales del tracto respiratorio en todo el mundo, las manifestaciones clínicas son desde infecciones asintomáticas hasta bronquiolitis y neumonía principalmente en niños menores de 2 años, adultos mayores de 60 años y personas con problemas cardiopulmonares; la importancia además de la elevada morbilidad son las secuelas que deja a largo plazo. Actualmente se investigan terapias alternativas para el tratamiento de infecciones por *VRS* debido a la carencia de antivirales efectivos disponibles.

En el presente trabajo se estudió el extracto acuoso de la semilla de *Opuntia soehrensii* un miembro de la familia *Cactaceae* para evaluar su actividad antiviral determinando la Concentración Efectiva Media (CE_{50}) frente al virus. Para esto se emplearon sistemas *in vitro*, infectando *VRS* en la línea celular *BHK-21*, la evaluación se llevo a cabo por el método de reducción de la sal de Tetrazolium (MTT) y el análisis observacional del efecto citopático (ECP), estos ensayos fueron realizados de manera posterior a la determinación de la Dosis Infecciosa Media en Cultivo Celular ($TCID_{50}$).

Los resultados obtenidos muestran que *O. soehrensii* posee potente actividad antiviral cuando se adiciona tanto en cultivo de células a ser infectados como a células ya infectadas. El extracto alcanzo la CE_{50} a concentraciones de 21; 2,1 y 0,21 mg/mL dependiendo del tiempo de exposición y de la etapa de infección viral al cual es incorporado. El extracto de *O. soehrensii* se presenta como un producto promisorio en la resolución de infecciones por *VRS*. Los aspectos relacionados a su mecanismo de acción deben ser estudiados para proponer el uso de este extracto como fitoterapéutico.

SUMMARY

Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the major cause of respiratory tract infectious worldwide. Its clinical manifestations range from asymptomatic infection to bronchiolitis and pneumonia, mainly in children under two years old, elderly adults and people with cardiopulmonary illnesses. The importance in addition to the high morbidity is the sequels that leave in the long term. Nowadays alternative therapies are investigated to abolish *VRS* infections due to lack of antiviral effective available treatments.

In this work we studied the aqueous extract obtained from the seeds of *Opuntia soehrensii* a member of *Cactaceae* family. We determined that *O. soehrensii* has a potent antiviral activity when it is added to cell culture, previously and after the infection with *RSV*. Such conditions were obtained through the determination about 50% Effective Concentration (EC_{50}) against the virus. For this reason, we used in vitro system infecting *RSV* at *BHK-21* cell line. The evaluation carried out by the tetrazolium salt method and the Cytopathic Effect (CPE) observational analysis, these tests were made of later way to the determination of 50% Tissue Culture Infectious Doses (TCID₅₀).

The results obtained show that *O. soehrensii* has antiviral activity, it has a relation with its traditional use, the extract reached the EC_{50} in concentrations of 21; 2,1; and 0,21 mg/mL. The antiviral activity depends of the concentrations, the exposure time and the infection stage when the virus was incorporated. *O. soehrensii* extract appears as a promissory product in the resolution of infections for *VRS*. However, aspects related to its mechanism of action must be studied to propose the use of this extract as phytotherapeutic.

I. JUSTIFICACIÓN

La limitada disponibilidad de antivirales ortodoxos, el costo de drogas antivirales que van más allá de las posibilidades económicas de la mayoría de la población de los países en desarrollo, la creciente presencia de procesos de resistencia viral a los antivirales actualmente disponibles, además de la emergencia y reemergencia de otros virus de insidiosa naturaleza, incrementan la necesidad de buscar nuevos componentes efectivos contra las infecciones virales. Por esto, en la actualidad se amplían investigaciones en nuevas áreas para encontrar blancos virales vulnerables para su posible aplicación en terapia clínica de manera eficaz ⁽¹⁾.

La medicina tradicional local ó “plantas medicinales”, son apreciadas por las virtudes que se les reconoce, los conocimientos de sus virtudes fueron transmitiéndose de generación en generación. Nadie buscaba el saber porqué o como actuaban pero era un hecho incontestable su eficacia y su valor práctico, pero carente de argumentos científicos que respalden su uso en la terapia de distintas patologías. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el contexto de la 29 Asamblea Mundial, reconoció por primera vez la importancia de la medicina tradicional y natural ya que son fuente de recursos disponibles importantes para la consecución de la meta salud para todos en el año 2000 ⁽²⁾. A través de este trabajo se plantea explorar la herbolaria medicinal nativa como fuente de recursos terapéuticos en infecciones por *VRS* que son de importancia en salud pública y carecen de recursos antivirales efectivos para su manejo.

Entre los varios productos que se aplican localmente para el manejo de procesos respiratorios se encuentra la *Opuntia soehrensii*, que es un componente importante de la biodiversidad andina de Bolivia conocida popularmente como *Ayrampu* en poblaciones *Aymaras* y *Quechuas*. En otras regiones también se la conoce como *figueres de palo*, *liga palera*, *nopalera*, *higos chumbros*, *cholla*, *penca*, *chumbera*, etc ^(3,4,5). Sus aplicaciones terapéuticas tradicionales reportan su uso como cataplasma, infusiones o inhalación de vapores en afecciones del tracto respiratorio. Dadas estas aplicaciones y considerando las características fisiopatológicas de las entidades tratadas, es posible considerar que se trata de un agente antiviral, y que además tiene uso en otras afecciones ^(4,6,7,8).

Ante esto emerge la necesidad evidente de iniciar la evaluación de la actividad antiviral de este producto particularmente en sus propiedades antivirales lo que permitirá la validación científica de su uso; así como valoración de su seguridad para su aplicación terapéutica. Si bien los productos fitoterápicos tienen márgenes terapéuticos más amplios y suelen generar menos efectos secundarios que los fármacos sintéticos, debe quedar claro que natural no es sinónimo de inocuo, sobre todo si no se maneja adecuadamente; esto debe ser un acicate para procurar un mejor conocimiento puesto que la riqueza de un país en plantas medicinales solo alcanza su verdadero valor cuando se da una correcta utilización de las mismas ^(9,10,11).

En la actualidad los procedimientos de cultivos celulares son muy empleados en la investigación de diversos procesos biológicos particularmente los que exploran efectos antivirales. Esto se debe a la posibilidad de control de su propagación, así como a las ventajas en la cuantificación, caracterización y repetibilidad de los ensayos de esta forma se plantea su empleo para la comprobación de los efectos de *la Opuntia soehrensii* en sistemas *in vitro*. Con lo que se puede reducir el número de pruebas que se requiere realizar cuando la experimentación es sobre animales por lo que su costo se convierte en un beneficio adicional ya que filtra previamente una gran cantidad de materiales a usar antes de su evaluación *in vivo* ⁽¹²⁾. De esta manera es posible abordar en forma rápida y económica investigaciones sobre antivirales en nuestro medio.

II. ANTECEDENTES

1. EL VIRUS

1.1 ESTRUCTURA VIRAL

El *Virus Respiratorio Sincitial (VRS)* es un virus pleomórfico, de 150 a 300 nm de diámetro, miembro de la familia *Paramixoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, clasificado dentro del género *Pneumovirus*.^(13,14)

El virión presenta bicapa lipídica obtenida de la membrana de la célula hospedera, dentro de esta se encuentran glicoproteínas transmembranales. La membrana encierra la nucleocápside helicoidal, que está formado por unidades repetitivas de un número pequeño de polipéptidos que se unen al genoma viral, juntos representan el mayor porcentaje en la masa de la partícula viral⁽¹⁵⁾.

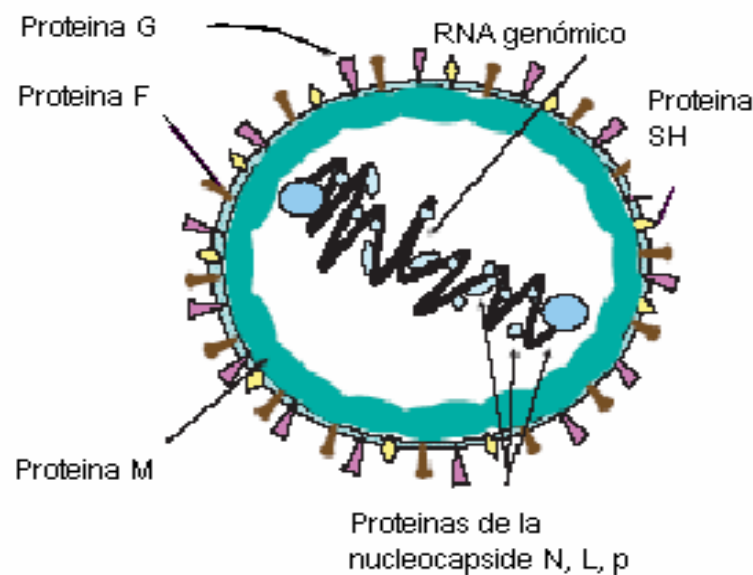


Figura 1. Estructura del *Virus Respiratorio Sincitial*. El virión de *VRS* presenta un diámetro de 150 a 300 nm, consiste en una envoltura lipídica que deriva de la membrana plasmática de la célula huésped, la nucleocápside es de tipo helicoidal.

Fuente: Hacking, D. Hull, J., *Respiratory Syncytial Virus*⁽¹⁶⁾.

El genoma es RNA, de cadena simple, de polaridad o sentido negativo, no segmentado, compuesto aproximadamente de 15222 nucleótidos que forman 10 genes, los cuales codifican 11 proteínas, 2 funcionales y 9 estructurales^(16,17).

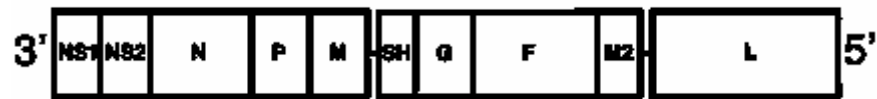


Figura. 2. Genoma de *Virus Respiratorio Sincital*. RNA de cadena simple de sentido negativo no segmentado compuesto aproximadamente de 15222 nucleótidos.

Fuente: Domachowske, D., Respiratory Syncytial Virus Infection⁽¹⁸⁾.

La estructura proteínica de *VRS* incluyen los siguientes componentes:

- Proteína de adhesión G, responsable de la adhesión del virus a la célula, posee características particulares que la diferencian de las glicoproteínas de otros *Paramixovirus*. Se presenta en 2 formas: la primera unida a la membrana y otra forma soluble la cual es secretada en el medio⁽¹⁷⁾, se sintetiza inicialmente como un precursor de 36 KDa, el cual es modificado por la adición de azúcares que forman un intermediario de 45 KDa, la molécula madura consta de 90 KDa, la variabilidad en la glicosilación durante la propagación de *VRS* en la célula huésped contribuye a la heterogeneidad antigénica, especialmente en el dominio extracelular, por lo que se diferencian 2 grupos principales A y B, además de otros subgrupos. La capacidad de drásticos cambios en la estructura de la proteína G se debe a: *i*) mutación de la estructura que altera el extremo C-terminal, *ii*) prematura detención de la lectura de codones que dan lugar a longitudes más cortas del polipéptido G entre los aminoácidos 1 al 42, *iii*) hipermutación, que origina cambio de aminoácidos. También contiene 13 regiones de aminoácidos que son altamente conservadas, por su elevado contenido de serina, treonina y prolina, se describen semejantes a la mucina secretada por células epiteliales (13,19,20,21).
- Proteína de fusión E, proteína de superficie sintetizada como un precursor de 67 KDa, el cual es clivado en el aparato de Golgi para dar lugar a 2 polipéptidos nombrados F₁ del extremo C-terminal y F₂ del extremo N-terminal. Posee 5 a 6 sitios potenciales de N-glicosilación, uno de los cuales se encuentra en la región F₁ que es responsable de la fusión celular; su

estructura altamente conservada permite que los anticuerpos sean efectivos contra todas las cepas ^(16,22,23,24,25).

- Proteína SH, pequeña proteína hidrofóbica, que se presenta en forma no glicosilada y/o con grados variables de glicosilación, cuya función no está totalmente esclarecida; no obstante, es responsable de magnificar el proceso de fusión cuando es coexpresada con las glicoproteínas F y G; esto se demostró por la obtención del *VRS* sin la proteína SH que evidenció que es dispensable para el proceso de fusión ⁽¹⁶⁾.
- Proteína de matriz M, no glicosilada, ubicada en la capa interna de la envoltura viral, media la asociación entre la nucleocápside y la envoltura ⁽²⁶⁾.
- Proteína de matriz M2, el RNA mensajero contiene 2 fragmentos solapados para: M2 ORF-1 que históricamente se consideró la segunda proteína de matriz, posteriormente se reconoció que está relacionada con las proteínas de la nucleocápside N y P con función en la replicación viral que asegura la eficiente producción del total de longitud de mRNA; la proteína M2 ORF-2 es un factor de regulación negativo ⁽²⁶⁾.
- Nucleoproteína N, Fosfoproteína P, RNA polimerasa L, actúan en la replicación, y están relacionadas con el genoma; forman la nucleocápside ^(27,28).
- Proteínas funcionales NS1 y NS2, importantes en el proceso de replicación viral una vez que se lleva a cabo la infección de la célula hospedera en la cual puede llegar a acumularse ^(14,29). La tabla 1 resume la estructura y función de las proteínas del *VRS*.

TABLA 1. Proteínas codificadas por VRS y sus características.

Proteína	Características
<u>Proteínas de superficie</u>	
F	Mediador de la formación de sincicios.
G	Mediador de la adhesión viral, altamente glicosilado
SH	Función desconocida, no es imprescindible para la replicación viral ni para la formación de sincicios.
<u>Proteínas asociadas a la nucleocápside.</u>	
N	Proteína de la nucleocápside principal.
P	Fosfoproteína, replicación viral
L	RNA polimerasa
M2 (dos transcritos)	M2 ORF-1 complejo con N, P y L; asegura la eficiente producción de la longitud total del mRNA; M2 ORF-2 tiene función reguladora negativa.
<u>Proteínas de la matriz</u>	
M	Puede mediar la asociación entre la nucleocápside y la envoltura
<u>Proteínas no estructurales</u>	
NS1	Importante en la replicación viral.
NS2	Importante en la replicación viral.

Fuente: Domachowske J. Respiratory Syncytial Virus Infection ⁽¹⁸⁾.

1.2 REPLICACIÓN VIRAL.

La infección es iniciada cuando la proteína G se une al receptor de la célula hospedera, el cual posiblemente es un glucosaminoglicano semejante a la heparina-sulfato y condroitin sulfato B. Luego de la adhesión, existe un cambio conformacional que expone el péptido de la proteína F que permite la fusión del virus con la membrana celular para la penetración de la nucleocapside dentro del citoplasma ^(30,31,32).

Como el RNA es de polaridad o sentido negativo (tiene la secuencia genómica complementaria al mRNA viral), el primer evento de síntesis es la transcripción primaria, es decir, síntesis de los mRNA virales a partir del genoma infectante. Gracias a que en su genoma el virión lleva asociado una RNA polimerasa RNA dependiente (transcriptasa), que efectúa la transcripción del mRNA, se producen mRNA monocistrónicos obtenidos cada uno a partir del genoma policistrónico (con promotores internos que tienen secuencias señal para la iniciación de la transcripción). Una vez sintetizadas las proteínas, se inicia la replicación de ácido

nucleico, donde el genoma infectante es totalmente copiado a una cadena complementaria de sentido positivo, que a su vez sirve de templado para la producción de cadenas de RNA viral negativo. Este RNA de sentido negativo es utilizado como molde para:

- La síntesis de nuevos mRNAs en el proceso denominado transcripción secundaria.
- Como templado para la síntesis de RNA positivo de longitud genómica.
- Puede ensamblarse para formar nuevos viriones.

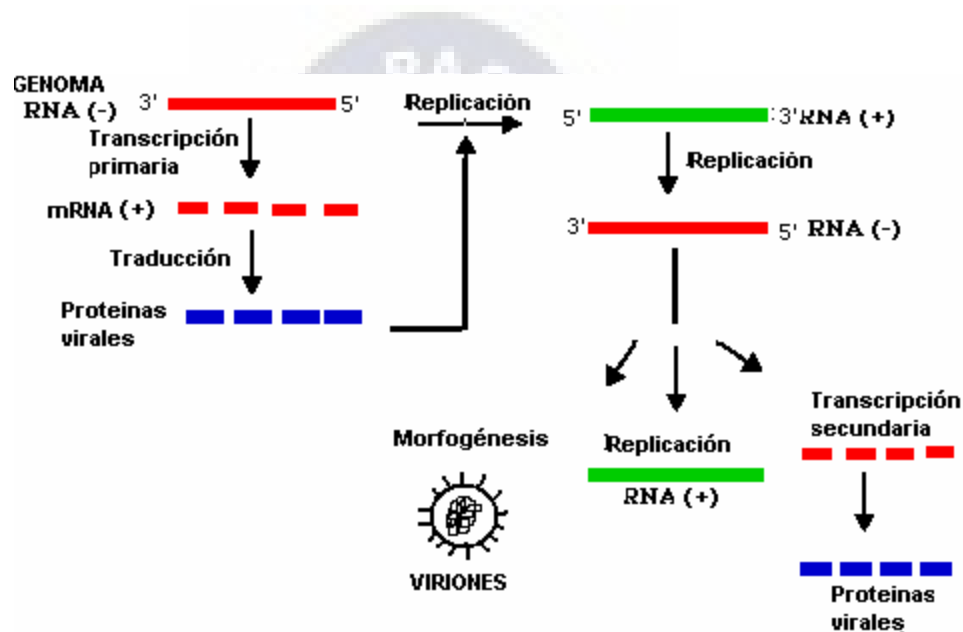


Figura 3.- Representación esquemática del ciclo de replicación de *Virus Respiratorio Sincitial*.

Fuente: Marina Guarachi C.

Una característica es que tanto para la replicación como para la transcripción los templados son las nucleocápsides o ribonucleoproteínas virales, es decir el genoma asociado a las enzimas necesarias para la síntesis y encapsidación del ácido nucleico; por el contrario los mRNAs no están encapsidados.

El factor de regulación que decide si sobre un templado RNA negativo va a ocurrir replicación (síntesis de RNA positivo de longitud total), estaría dado aparentemente por la abundancia en la célula infectada de la proteína N de la nucleocápside; cuando existe exceso de N, ésta se asocia al ácido nucleico que se sintetiza y predomina el proceso de replicación, al agotarse los niveles de N, tiene preeminencia la transcripción⁽¹⁴⁾.

Las nucleocápsides helicoidales se van ensamblando a medida que se va replicando el ácido nucleico, que constituye el eje central de las mismas.

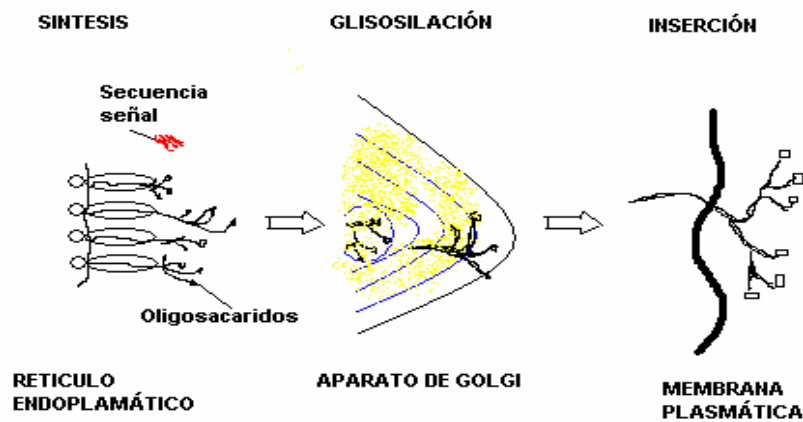


Figura 4. – Proceso de síntesis, glicosilación de proteínas virales, para su posterior inserción en la membrana plasmática de la célula huésped.

Fuente: Basualdo, Microbiología Biomédica. ⁽¹⁴⁾

La envoltura viral contiene glicoproteínas sintetizadas a partir de la información contenida en el genoma viral utilizando la maquinaria de glicosilación de la célula huésped. La cadena polipeptídica de la glicoproteína contiene inicialmente una secuencia de 15 a 30 aminoácidos, denominada secuencia señal, esta es removida por una proteasa celular, la glicoproteína es transportada del retículo endoplásmico al Aparato de Golgi, y simultáneamente los residuos hidrocarbonados son procesados por glicosidasas celulares que remueven algunos azúcares (como manosa y glucosa) y adicionan otras (manosa, N-acetilglucosamino, fucosa, galactosa ó ácido sialico), hasta obtener la glicoproteína madura. Esta glicoproteína madura es transportada a la membrana plasmática, hacia esas zonas migra la nucleocápside, que se pone en contacto con la glicoproteína directamente o a través de la proteína de matriz M, es rodeada por la membrana y mediante una forma de exocitosis se produce la brotación de la partícula viral ⁽¹⁴⁾.

1.3 REPLICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO VIRAL

In Vitro.

El *VRS* replica en una extensa variedad de células humanas y animales; para el aislamiento a partir de muestras clínicas las células más susceptibles son *Hep-2*,

Hela, Vero, fibroblastos diploides humanos, además de HFF, A549, RMK, MRC-5 (28,33).

Al infectar una línea celular sensible, el 90% del inóculo es adsorbido dentro de las 2 horas, luego hay un periodo de eclipse de 12 horas a partir de los cuales aparece la progenie viral, la subsecuente fase de replicación dura aproximadamente 10 horas. El antígeno viral puede ser detectado por inmunofluorescencia en el citoplasma 7 a 10 horas postinfección: posteriormente se detecta virus libre en el sobrenadante, aunque la mayoría aparece asociada a las células⁽¹⁴⁾.

El *VRS* tiene importantes características que pueden hacer dificultosa su propagación en cultivo celular: el efecto citopático de formación de sincicios y el título viral varía considerablemente dependiendo de la cepa viral y las condiciones de las células; títulos mayores a 10^7 UFP/mL son difíciles de obtener⁽²⁸⁾.

El *VRS* es rápidamente inactivado a temperaturas elevadas, disminuye su título a temperatura ambiente, es bastante labil a pH ácido, solventes orgánicos, alcoholes y diferentes detergentes^(13,33,34).

2. LA INFECCIÓN VIRAL

2.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

Dentro de unos pocos días de exposición y transmisión del virus al epitelio nasal u ocular los pacientes pueden cursar una infección asintomática o exhibir congestión nasal moderada y bajo grado de fiebre que frecuentemente desaparece en 1 a 2 días particularmente en pacientes que cursaron una infección previa. Estos síntomas, añadidos con rinorrea, disminución del apetito, tos y aparición de sibilancias pueden persistir en la infección del tracto respiratorio superior por semanas y luego resolverse sin incidentes adicionales^(14,35).

En niños es más común que desarrollen infecciones del tracto respiratorio inferior con aparición de signos y síntomas en 2 a 3 días después del comienzo de la rinorrea, este sería el tiempo necesario para que el virus alcance bronquios y bronquiolos; comúnmente la tos se agrava, las secreciones son más copiosas y espesas, el paciente puede exhibir alteración de la función respiratoria como taquipnea, disnea, apnea, fase de expiración prolongada, hipoxia, las sibilancias progresan finalmente el vomito ocurre en la mitad de los pacientes infectados, aparece infiltración intersticial

generalmente en el lóbulo derecho superior o medio del pulmón, la obstrucción del bronquiolo simula la clínica del asma, con imágenes radiológicas de tórax con atelectasia alternando con zonas de atrapamiento de aire, con diafragma descendido. En la neumonía se describen células gigantes con abundantes inclusiones virales, en niños inmunosuprimidos y adultos moribundos con infección de *VRS* abrumadora (13,15).

2.2 PATOGÉNESIS.

Una vez iniciada la infección por *VRS* la fusión del virus con la membrana de la célula del epitelio nasal y la inyección de RNA viral dentro de las células causa fusión de células infectadas con células no infectadas adyacentes, esto permite la transmisión directa sin separarse de la membrana celular, resultando en la aparición de “células epiteliales sincitiales” (formación de células grandes, multinucleadas), es entonces que ocurre la destrucción extensiva de las células epiteliales superficiales inicialmente en vías aéreas superiores (14). En individuos primoinfectados y personas inmunocomprometidas la infección frecuentemente desciende a vías aéreas inferiores por aspiración de secreciones infectadas por transferencia viral célula-célula o, posiblemente por infección a macrófagos que migran a vías respiratorias inferiores (18,33).

La reducción de diámetro y obstrucción de vías aéreas es producido por : *i*) incremento de secreciones y quimiocinas (RANTES, MIP-1 α) que atraen células proinflamatorias como macrófagos, neutrofilos, eosinófilos (18,36,37), *ii*) daño del epitelio superficial, además del detrito celular, que inicia señales para la producción y liberación de mediadores que incrementan la permeabilidad capilar, *iii*) edema intersticial y mucoso por el compromiso mucociliar, *iiii*) posiblemente mediadores humorales y neurogénicos con efecto broncoconstrictor que exacerban el proceso obstructivo (22,38). Experimentos en animales demuestran que el *VRS* altera el control neuronal, con incremento de la respuesta contráctil de músculo liso de vías aéreas, que disminuyen el diámetro del lumen respiratorio produciendo croup(22), el incremento de la permeabilidad vascular por menor afinidad de receptores de la sustancia P resulta en el incremento de niveles de proteínas plasmáticas dentro del área intersticial, alveolo y pequeñas vías aéreas, esto causa la inflamación

generalizada que inhibe la función surfactante pulmonar, siendo este un factor importante para producir bronquiolitis ^(29,39,40).

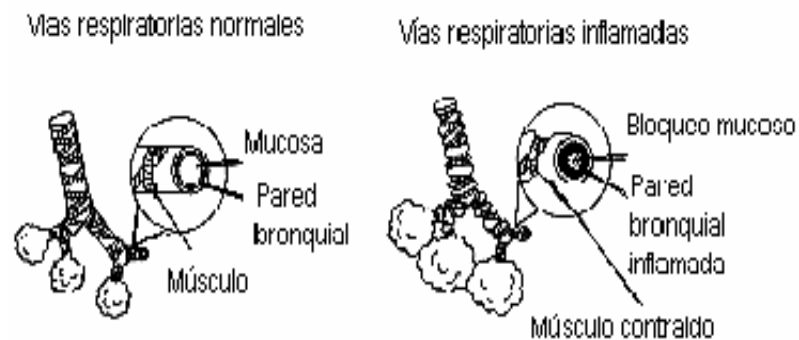


Figura 5.- Vías respiratorias. Comparación de vías respiratorias normales con vías respiratorias inflamadas que conducen a la obstrucción de vías aéreas.

Fuente: Pagina de Internet ⁽⁴¹⁾.

La patogénesis se atribuye a la combinación de mecanismos inmunológicos que incluyen la producción de citocinas inflamatorias; algunos autores plantean que los niños con bronquiolitis son más susceptibles por tener anticuerpos específicos maternos ⁽²²⁾, en cambio otros presumen que la enfermedad en ancianos se establece por disminución de la funcionalidad del sistema inmune. Alternativamente, la infección severa puede ser explicada sin involucrar mecanismos inmunológicos; la exposición a grandes dosis de virus juntamente con un estado vulnerable de las vías aéreas de un niño, podría ser suficiente para producir la enfermedad ^(13,15).

Breese, *et.al.* Plantean que el incremento de la patogenicidad se podría explicar, en parte, por la inhibición de apoptosis (demostrada *in vitro*), que contribuiría a la diseminación de la infección ⁽⁴²⁾.

2.3 COMPLICACIONES.

Pacientes que cursaron con bronquiolitis y/o neumonía tienen un pronóstico a largo plazo de presentar un número de secuelas de la infección, anormalidades sintomáticas durante años, tales como función pulmonar disminuida, tos recurrente, sibilancias, asma atópica, croup, incremento de la hiperreactividad de vías aéreas ^(14,22,30,36,40,42).

Se aisló *VRS* de alrededor de $\frac{3}{4}$ partes de niños con otitis media aguda ^(43,44). Existen reportes de encefalopatía desarrollado en 1,8% de pacientes hospitalizados luego de

4 años de haber cursado la enfermedad, también se reporta que existe distribución viral en riñón e hígado en individuos inmunocomprometidos con infecciones repetidas^(15,18).

El *VRS* es particularmente devastador en pacientes con fibrosis quística, alteraciones cardíacas congénitas, inmunocomprometidos y pacientes con otras enfermedades pulmonares. En los casos fatales el examen histológico de pulmón muestra bronquiolitis linfomonocitaria con material necrótico en la luz y daño del epitelio alveolar de grado variable, pueden encontrarse sincicios de células gigantes epiteliales tapizando las paredes alveolares. En otros casos existe una disposición irregular del epitelio bronquiolar, con aspecto regenerativo y microproyecciones poliploideas intraluminales^(14,45).

3. LA INMUNIDAD

Varias investigaciones otorgan roles a los componentes de la inmunidad humoral y celular como contribuyentes tanto en la protección como en la patogénesis. Datos experimentales elucidan la importancia del equilibrio de los mecanismos inmunológicos en la protección y recuperación de la infección⁽⁴⁶⁾.

3.1 INMUNIDAD CELULAR

La primera barrera defensiva frente al virus es la integridad de las superficies corporales, una vez atravesadas se activan los primeros mecanismos de defensa de la inmunidad innata como Interferón (IFN), células NK y macrófagos.

El principal mecanismo de inmunidad específica frente a infecciones virales, son los Linfocitos T citotóxicos $CD8^+$. Estos reconocen antígenos virales citosólicos asociados a moléculas de restricción MHC I en la superficie de la célula blanco, la citotoxicidad ocurre a través de perforinas y granzimas, además de la producción de IFN gamma y TNF alfa que median la lisis celular de células infectadas por contacto célula-célula. Otro mecanismo esta dado por la interacción de Fas (CD95) en la superficie de la célula blanco y Fas ligando (CD95L) de LTC efectores. Ambas vías inducen apoptosis, pero se diferencian en que en contraste con la vía de perforina/granzima, la interacción Fas-FasL induce apoptosis de manera Ca^{++}

independiente además de que la vía Fas-FasL es antígeno específica aunque también puede destruir de manera no específica ^(47,48,49).

Las células agresoras naturales (NK) poseen la misma maquinaria citolítica que los LTC CD8⁺. La función de los LT CD8⁺ requiere la producción de citocinas por los LT helper CD4⁺ y/o coestimuladores expresados sobre las células infectadas ⁽⁵⁰⁾.

La explicación más aceptada de que el sistema inmune media la complicación, es el desbalance de la respuesta de linfocitos Th1 y Th2. Publicaciones recientes indican que la respuesta a la infección en lactantes depende de la madurez del sistema inmune y tiempo de infección. Durante el desarrollo fetal y el periodo neonatal predomina Th2 (la respuesta Th1 no llega a madurar hasta los 6 meses de edad); ello postula que en la infección de *VRS* la principal respuesta es efectuada por la acción de Th2, a saber proliferación de eosinófilos, liberación de IL-4, leucotrienos, histamina, IgE, todos asociados con la respuesta inflamatoria. El desbalance de respuesta Th1/Th2 en la primoinfección a temprana edad es el patrón de la memoria de respuesta inmune viral que puede perdurar de por vida ^(22,30,42). Por otro lado si la infección ocurre luego de la maduración de la población celular Th1, ocurre una respuesta balanceada de Th1/Th2. la respuesta Th1, resulta en la producción de IFN y otras citocinas de regulación, que suprimen la actividad de Th2 y viceversa ^(16,22,40). La importancia de la inmunidad celular en la infección es demostrada en modelos animales, el *VRS* infeccioso induce a una respuesta tipo CD4⁺ Th-1 caracterizado por la producción de citocinas (IFN gamma, IL-2, IL-12) y citotoxicidad de LTC. En contraste, la inmunización con virus inactivados o subunidades de proteínas virales producen un patrón de expresión CD4⁺ tipo Th-2 con las citocinas correspondientes (IL-4, IL-5, e IL-6) y no LTC ^(7,18,22,40,51). En modelos murinos los LTC CD8⁺ son capaces de disminuir los títulos de *VRS* pero puede inducir una respuesta inflamatoria incrementada ^(18,48,52).

Niños inmunocompetentes infectados con *VRS* detienen la diseminación viral dentro de 21 días luego de la infección inicial, por el contrario niños con deficiencia de inmunidad celular pero que tienen el sistema inmune humoral en buenas condiciones presentan morbilidad grave y prolongada infección con *VRS*, indicando que la porción celular juega un rol importante para eliminar la infección ^(14,22).

3.2 INMUNIDAD HUMORAL

Los anticuerpos antivirales constituyen una de las principales barreras para evitar la transmisión del virus entre las células en las primeras etapas del ciclo de replicación viral. La defensa frente a las partículas virales libres depende de la neutralización, lo cual se puede realizar solo a través del anticuerpo, o bien por la interacción anticuerpo-complemento; en el primer caso el anticuerpo produce el bloqueo de la unión del virus a la célula y la consiguiente penetración en la misma; en el segundo caso se producen lesiones en la cubierta vírica y bloqueo de receptores del virus ⁽⁵³⁾.

Cuando las células se encuentran ya infectadas los anticuerpos y el complemento producen lisis de las células y opsonización para la fagocitosis. El anticuerpo solo unido a las células infectadas induce citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), por parte de células NK, macrófagos y neutrófilos ⁽⁴⁷⁾.

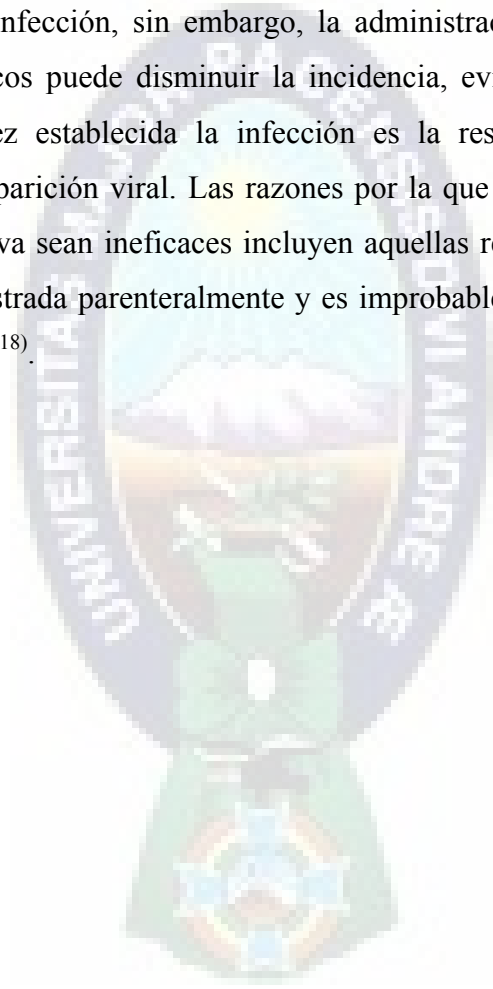
Los anticuerpos que se producen en la infección son específicos contra la proteína G de cada cepa. Los anticuerpos dirigidos hacia la glicoproteína F se unen a una de las 3 regiones denominadas epítomos A, B, C; de los tres epítomos el A y C son los mejor conservados en todas las cepas de *VRS* ^(17,22,53,54).

Tres evidencias sostienen la importancia de la presencia de los anticuerpos: a) ellos participan en la protección de la infección del tracto respiratorio bajo, pero no necesariamente protegen contra subsecuentes infecciones, aunque la presencia de anticuerpos séricos probablemente disminuye la gravedad y frecuencia de reinfecciones, b) niños recién nacidos poseen anticuerpos anti-*VRS* maternos, los cuales disminuyen significativamente la infección en el primer mes de vida, c) la administración de suero conteniendo altos títulos de *VRS*-IGIV obtenido de donantes adultos, son efectivos en reducir la incidencia y gravedad de infección en niños de alto riesgo ⁽²²⁾.

Los anticuerpos que se producen son IgG, IgM, IgE, IgA, los cuales pueden ser encontrados en suero y secreciones de vías aéreas; la presencia de IgA secretoria específica puede relacionarse con la disminución del título viral ^(14,22). Sin embargo, la formación efectiva de estos anticuerpos es un tópico altamente complejo. Estudios recientes relacionan títulos elevados de IgE (promueve la degranulación celular) con posterior desarrollo de alergia, asma y bronquiolitis ^(16,22,30,42). Esto está actualmente en revisión e incluso algunos autores sugieren que la existencia de un nivel de anticuerpos séricos no es predictivo del riesgo de infección, gravedad de la enfermedad o recuperación ^(29,31,42).

A partir de la observación de que la infección severa de *VRS* es frecuente en niños de 2 a 6 meses de vida, cuando los anticuerpos maternos persisten en altos títulos apuntan a la participación de anticuerpos en la inmunopatología de bronquiolitis por *VRS*, mediante activación de la cascada del complemento por vía clásica, promoción de la actividad de LT, incremento de niveles de citocinas proinflamatorias, las anafilotoxinas C3a, C4a, C5a como efectores de alergias, bronconstricción y secreción de mucus, además de promover la degranulación celular ^(18,51).

En ratones, los anticuerpos anti-*VRS* aparentemente no tienen un rol importante en la resolución de la infección, sin embargo, la administración de anticuerpos durante periodos epidémicos puede disminuir la incidencia, evidenciando la protección de infección; una vez establecida la infección es la respuesta inmune celular que promueve la desaparición viral. Las razones por la que los ensayos de vacuna para inmunización activa sean ineficaces incluyen aquellas referentes al hecho de que la vacuna es administrada parenteralmente y es improbable que induzca la producción de IgA secretoria ⁽¹⁸⁾.



4. DIAGNOSTICO

4.1 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.

El diagnóstico presuntivo de la infección puede ser realizado basado en la sintomatología clínica, asociada a la época del año y datos epidemiológicos. El diagnóstico laboratorial se vuelve imprescindible para diferenciar de otras causas de IRAs bajas; así será importante, distinguir de las neumonías bacterianas. Un resultado positivo reduce el uso de antibióticos, para un apropiado control de la infección en la fase más temprana ⁽⁵⁵⁾.

Para obtener una muestra clínica óptima es necesario tener en cuenta factores adicionales que garanticen la conservación de las partículas virales activas o la detección de antígenos o anticuerpos anti-virus. El VRS se confina en células epiteliales del tracto respiratorio, sin embargo, también se detectó antígeno de VRS en células mononucleares de la circulación sanguínea (*in vitro* los virus replican en macrófagos, pero en bajos títulos); a pesar de esto, la viremia nunca fue descrita es pacientes inmunocomprometidos ^(18,56).

4.1.1 TÉCNICAS DIRECTAS PARA LA DETECCIÓN DEL VRS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

- Microscopia electrónica, debido a la gran resolución del microscopio electrónico esta técnica permite visualizar la partícula viral; para esto, en lugar de colorantes se emplean sales de metales pesados como el uranio y el tungsteno ⁽³⁹⁾.
- Microscopia óptica, que permite visualizar inclusiones virales y los cambios en la morfología celular lo que muestra de manera directa las características de algunas infecciones virales ⁽³⁹⁾.
- Aislamiento viral en cultivo celular, el mayor avance en el diagnóstico viral ha sido el desarrollo de la biotecnología de cultivo celular para la detección del virus.

Teóricamente, un solo virión infectivo puede ser detectado y en función de la amplificación efectuada aumenta la sensibilidad sin afectar la especificidad.

Adicionalmente este método permite la recuperación y preservación del virus para posteriores estudios ^(34,57).

Los sistemas de cultivo celular son aislados *in vitro* y se distinguen:

- Cultivos primarios, caracterizados por utilizar diferentes tipos de células provenientes de tejidos o de células sueltas de órganos, la mayoría son de crecimiento limitado *in vitro*. Generalmente soportan de 5 a 10 subcultivos y son permisivas para un amplio rango de virus.
- Cultivo de células diploides ó cultivo secundario, derivadas de tejidos normales, se emplean en el proceso de producción de vacunas, aislamiento viral y como sustrato para evaluar materiales tóxicos potenciales. Esta constituido por un tipo de células que mantienen el número cromosómico diploide original. La expectativa de vida de las células diploides normales es aproximadamente 50 pases de duplicación *in vitro*.
- Líneas celulares, son células inmortalizadas en laboratorio, resisten un número indefinido de pases y se caracterizan por derivarse de tejidos normales o de tumores malignos que se han subcultivado por lo menos 70 veces *in vitro*, p.e., células *Vero* (riñón de mono verde africano), *LLC-MK 2* (riñón mono rhesus), *BSC-1* (tejido normal de riñón de mono), *Hela*, *Hep-2* derivados de células malignas humanas, *BHK-21* (fibroblastos de Hamster) y otras. Poseen un número variable de cromosomas, por lo que son denominadas líneas celulares heteroploides ^(55,58).

La termolabilidad de *VRS* dificulta el cultivo, por esto la muestra debe ser recolectada en medio de transporte adecuado, manteniendo a 4°C para inocular lo más pronto posible en un sustrato adecuado, puesto que se requiere partículas virales viables que deben multiplicarse en cultivo celular ^(14,59).

Técnicas de diagnóstico molecular, estas ponen en evidencia la presencia del material genético viral específico conservado o replicado; estas técnicas son más rápidas que las tradicionales, permiten realizar estudios en tejidos almacenados. Entre las más importantes se cuentan con las técnicas para la amplificación del ácido nucleico, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), mediante esta técnica se detectan cantidades mínimas de un agente infeccioso en una muestra clínica gracias a la amplificación selectiva y repetitiva de una secuencia de nucleótidos de un microorganismo. Una de las

modificaciones de la PCR permite encontrar ARN con un paso previo de síntesis de un ADN o cADN a partir del ARN blanco, mediante la enzima transcriptasa reversa ^(55,59).

4.1.2 PRUEBAS PARA LA DEMOSTRACIÓN DIRECTA DEL ANTÍGENO.

Estas pruebas permiten una demostración rápida y son prácticas para el diagnóstico, de esta manera iniciar terapia temprana que en algunos casos suele ser fundamental.

- Aglutinación de látex, las partículas de látex se unen al fragmento cristalizante (Fc) de moléculas de IgG o IgM dirigida contra antígenos virales. Los fragmentos de unión (FAb) quedan expuestos y son capaces de unirse al antígeno que se encuentra en la muestra produciendo un entramado que da como resultado aglutinación visible (en la actualidad no es empleado, por presentar reacciones cruzadas).
- Inmunofluorescencia Directa (IFD), la demostración de presencia del antígeno se realiza mediante el empleo de anticuerpos específicos marcados con fluorocromo para el antígeno a descubrir. Particularmente para *VRS* esta técnica tiene una sensibilidad mayor al cultivo viral. La IFD también es útil para confirmar los hallazgos de cultivo viral y la combinación de estos optimiza el diagnóstico; comercialmente se dispone de kits con Anticuerpos Monoclonales que tienen alta especificidad y sensibilidad ⁽⁶⁰⁾.
- Otros Inmunoensayos, los ensayos de captura del antígeno (sándwich), y la inmunocromatografía, donde se fijan los anticuerpos específicos para el virus en fase sólida, para añadir la muestra o suero que contiene el antígeno, luego se agrega un anticuerpo marcado dependiendo del tipo de marcador el ensayo se denomina Radioinmunoensayo (RIA) si es con isótopos radioactivos, o ensayo Inmunoenzimático si está ligado a una enzima (ELISA o EIA), que provocan la aparición de color al actuar sobre sustratos en reacción de oxidoreducción ⁽⁶¹⁾.

4.1.3 PRUEBAS INDIRECTAS PARA LA DEMOSTRACIÓN DEL VIRUS

Con base en la cuantificación de la reacción Antígeno - Anticuerpo se clasifican en:

- Los que dependen de la capacidad del anticuerpo que se une al antígeno para ejercer una función o efecto demostrable *i.e.*, Fijación del Complemento (FC), Hemaglutinación Indirecta (HI), Aglutinación por látex indirecta.
- Los que miden la capacidad de los anticuerpos para bloquear la función viral específica como la Neutralización Viral.
- Los que miden directamente la presencia del anticuerpo específico a través de la interacción antígeno-anticuerpo *i.e.*, Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Radioinmunoanálisis, ELISA, Western blott ^(59,62).

Los niveles de anticuerpo sérico no otorgan datos de una infección reciente, debido a que en niños menores de 3 meses no se detecta una respuesta de anticuerpos propia y los ancianos con infección a repetición no presentan conversiones serológicas significativas ^(33,59).

5. TRATAMIENTO

Dependiendo de las circunstancias, se podría considerar una terapia de soporte y/o antivirales específicos en la infección de *VRS*.

5.1 TERAPIA DE SOPORTE O DE MANTENIMIENTO.

Es útil en enfermedad grave del tracto respiratorio inferior y estas incluyen:

5.1.1 Administración de O₂ humidificado o mezcla de gas Oxígeno-helio.

Para individuos con bajo aporte de O₂, la administración suplementaria de O₂ es para mantener la saturación de oxígeno mayor a 92%.

La mezcla de Oxígeno-helio (heliox) mejora el trabajo de respiración y el intercambio de gases en obstrucciones similares al croup y enfermedad pulmonar crónica obstructiva (EPOC). Existen casos que reportan tratamiento exitoso con inhalación de óxido nítrico en niños con neumonía por *VRS* y displasia broncopulmonar ⁽²²⁾.

5.1.2 β_2 Agonistas

Dada la frecuencia de ruidos en la infección por *VRS*, los β_2 agonistas se usan hace más de 35 años, los broncodilatadores intentan liberar el aire atrapado y aumentan la resistencia de vías aéreas, causada por la contracción de músculo liso bronquiolar. Sin embargo a pesar de numerosos ensayos clínicos, su efectividad aun queda en duda, la poca penetración de aerosoles en vías terminales limitan su efectividad ⁽⁴⁰⁾.

5.1.3 Corticosteroide sistémico e inhalado.

La fisiopatología de *VRS* sugiere que la acción antiinflamatoria de corticosteroides (prednisolona, budesonide), provee una efectiva terapia en las infecciones, sin embargo, la eficacia de los esteroides no está del todo clara. Se recomienda la inhalación de corticosteroides para disminuir efectos adversos; el uso sistemático solo se recomienda para pacientes hospitalizados con sintomatología grave y es altamente efectivo en pacientes que requieren ventilación mecánica ^(13,22,40).

5.1.4 Epinefrina racémica.

La epinefrina administrada en nebulizador o por vía parenteral, es usada principalmente para aminorar los síntomas de infección por *VRS*, sin embargo no todos los pacientes responden positivamente a la administración de epinefrina racémica ⁽²²⁾.

5.1.5 Remoción mecánica de las secreciones.

La aspiración nasofaríngea con un catéter provee el espacio libre para que las secreciones sean excretadas y procurar una disminución de la sintomatología, este procedimiento es combinado con aerosoles de albuterol ⁽²²⁾.

5.2 ANTIVIRALES

Entre los antivirales aprobados para su empleo se cuenta solamente con:

5.2.1 Anticuerpos.

Se tiene un anticuerpo monoclonal humano (Palivizumab) que es específico contra el epítipo A de la glicoproteína F del *VRS*, se administra profilácticamente durante las

estaciones donde la infecciones por *VRS* se incrementa; la administración muestra significativa disminución de hospitalizaciones ^(53,63).

Una segunda preparación de anticuerpos *VRS*-IGIV (Respigam), obtenidos de sueros de adultos humanos, es una preparación policlonal desarrollada a principios de los 1990s, evaluado en recién nacidos de alto riesgo quienes tuvieron una disminución del tiempo de hospitalización ⁽⁶⁴⁾.

A causa del alto costo de Palivizumab y *VRS*-IGIV se analiza su costo beneficio, en los bebés prematuros con o sin enfermedad pulmonar ⁽¹⁾.

5.2.2 Ribavirina.

El medicamento utilizado en el manejo de *VRS* es la ribavirina (Virázole), *1-β-D-ribofuranosil-1, 2, 4-triazol-3-carboxamida* este un análogo de guanosina aplicado en forma de aerosoles en infecciones por *VRS* ^(14,22,65).

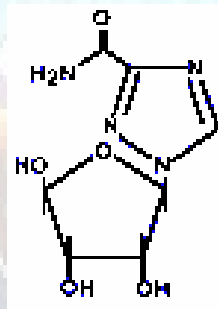


Figura 6.- Formula estructural de la ribavirina. La ribavirina es un análogo de nucleosido de origen sintético con formula empírica de $C_8H_{12}N_4O_5$.

Fuente: Crotty Shoane, Ribavirin's antiviral mechanism of action ⁽⁶⁵⁾.

Mecanismo de acción antiviral.

La ribavirina al ser un análogo de nucleosido penetra por difusión pasiva al interior de la célula y debe ser fosforilada por quinasas celulares. El mecanismo de acción es controvertido, desde un principio se ha reconocido a la IMP deshidrogenasa, la enzima que cataliza la conversión de IMP a XMP y por lo tanto la biosíntesis de GMP, GDP y GTP, es el sitio blanco de la ribavirina; esta inhibición es dependiente de la conversión intracelular de la droga a la forma 5'-monofosfato; sin embargo, la ribavirina al ser fosforilada también a la forma 5'-trifosfato puede adicionalmente interferir directamente con la síntesis de RNA viral, con la formación del "cap" en el

extremo 5' del mRNA inhibiendo así la síntesis de proteínas estructurales y de ese modo hacer más lenta la replicación viral ^(14,22,66,67,68).

Estudios adicionales sugieren que la actividad antiviral podría ser explicada por mecanismos inmunomoduladores ⁽⁶⁹⁾.

In vitro, este fármaco inhibe la replicación de los *virus Influenza A y B, Sarampión, Parainfluenza, Herpes simplex, Togavirus, Bunyavirus, Adenovirus, Coxsackie* y otros. La eficacia clínica es reportada en infecciones por *Influenza A, B y C, VRS*, además se emplea en combinación con IFN gamma por vía subcutánea para el tratamiento de hepatitis C crónica. Se emplea por vía IV para el tratamiento de la infección por *Virus del Hanta y Fiebre de Lassa* ^(64,69,70,71,72).

Reacciones adversas.

En 1996 la Academia Americana de Pediatría emitió recomendaciones que indican la terapia con ribavirina específicamente en niños de alto riesgo o con infección excepcionalmente aguda de *VRS* que requieran ventilación mecánica ^(1,14,22).

Los resultados de estudios de la efectividad son inconsistentes y contradictorios, ya que controles placebo demuestran que no siempre es eficaz, añadiendo que la administración es laboriosa, presenta riesgo y es cuestionada por la carencia de total seguridad y elevado costo económico ⁽¹³⁾.

La ribavirina es teratogénico, mutagénico, embriotóxico y gonadotóxico en mamíferos pequeños, por lo que su uso es contraindicado durante el embarazo. Además, mujeres y hombres deben abstenerse de la reproducción hasta 6 meses luego de recibir dicho antiviral. Con el uso prolongado por vía intravenosa se produce anemia de manera dosis dependiente, supresión de la médula ósea (ambos reversibles). Por vía oral se asocia con elevación de la bilirrubina y ácido úrico, además de hiperamonemia, hipocalcemia, hipomagnesemia añadiendo que produce náuseas, cefalea y letargia. En forma de aerosol es bien tolerado y aparentemente no produce toxicidad, aunque se han reportado brotes cutáneos y conjuntivitis ⁽⁷¹⁾.

Farmacocinética.

Su biodisponibilidad oral es de un 40%, la administración oral o en aerosol ocasiona concentraciones séricas similares, en forma de aerosol se concentra bien en las secreciones bronquiales. Por vía IV se alcanzan concentraciones 10 veces superiores, se acumula en los hematíes donde logra concentraciones 100 veces superior al

plasma con un tiempo de vida media de 40 días. Se elimina por metabolismo intracelular y por excreción renal de un 30 a 50% ⁽⁷⁰⁾.

6. FITOTERAPIA.

La flora medicinal se presenta como una interesante alternativa ya que se ha reportado efectos antivirales en muchas especies usadas para los procesos febriles pediátricos. Planta medicinal, es cualquier planta que en uno o más de sus órganos contienen sustancias que pueden ser utilizadas con finalidades terapéuticas o que son precursores para la hemisíntesis químico-farmacéutica. Droga vegetal es la parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica, en busca de los principios activos, que son las sustancias responsables de la acción farmacológica. La fitoterapia utiliza, por tanto, plantas medicinales, extractos de dichas plantas o principios activos aislados de las mismas. Se estima que en la parte aérea de las plantas, la filosfera y especialmente en las hojas, existen microorganismos que forman parte de la ecología vegetal, estableciéndose un equilibrio que se fragmenta por diversos motivos ⁽⁹⁾.

Las plantas tienen casi ilimitada habilidad para sintetizar sustancias aromáticas, globalmente producen más de 100000 productos naturales de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios, que se diferencian de los primarios en que no son esenciales para la vida de la planta. Estas sustancias se dividen básicamente en 2 grandes grupos: las fitoanticipias, presentes de forma constitutiva en las plantas, y las fitoalexinas, cuya presencia aumenta de forma considerable en respuesta a la invasión microbiana, estas sustancias sirven como mecanismo de defensa de las plantas de la predación por microorganismo, insectos y herbívoros.

6.1 GRUPOS QUÍMICOS AISLADOS DE PLANTAS CON POTENCIAL ACCIÓN ANTIVIRAL.

Se aislaron alrededor de 1200 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen el 10% de metabolitos secundarios. Un porcentaje importante posee una actividad frente a los microorganismos ⁽⁷³⁾. Los principales grupos de compuestos generados por plantas se resumen a continuación:

6.1.1 Compuestos fenólicos simples, heterosidos fenólicos.

Son los compuestos fitoquímicos más simples y consiste en un anillo fenolico sustituido como el catecol, pirogalol, ácido cinámico, ácido cafeico. Plantas productoras de compuestos de estas características son el tornillo (*Thymus vulgaris*), la manzanilla (*Matriarca chamomilla*) y la gayuba (*Aretostaphylos uvaurisi*) cuyo principio activo la *arbutina*, ha sido utilizada a lo largo de los años en el tratamiento de infecciones urinarias. La posición y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo, parece que están relacionados directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, de forma que un incremento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad, el mecanismo se relaciona con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupo sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas ^(6,74). Cedman sugiere que el extracto de polifenoles de la hoja de *Rubus blacus* se une a partículas virales formando complejos que no son infectivos, también se explica su actividad en la unión a proteínas virales y/o a las proteínas de unión en la membrana de la célula huésped con lo que disminuye la adsorción viral; también se plantea la inhibición de enzimas de replicación (como la RT para el *HIV* y la RNA polimerasa para *Virus de la influenza*) ⁽⁷⁵⁾.

Dentro de este grupo cabe destacar los aceites esenciales, compuestos causantes del olor de algunas plantas y algunos con poder antimicrobiano como el *mentol* obtenido de la menta (*Menta piperita*) y la *capsaicina* del pimiento rojo o chile. ⁽⁸⁾ La esencia del aceite de *Melaleuca alternofilia* y el aceite de eucalipto exhiben un elevado nivel de actividad antiviral contra *HSV-1* y *HSV-2* ⁽⁷⁵⁾.

6.1.2 Quinonas.

Las quinonas son anillos aromáticos con 2 funciones ceto, son ubicuos en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en frutas y vegetales dañados; poseen alta reactividad, formando complejos irreversibles con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, anulando su función, debido a esto el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio. Probablemente el blanco son las adhesinas de superficie polipeptídica. Así las quinonas pueden hacer que los sustratos no sean disponibles para los microorganismos, un ejemplo es la hipericina, una antraquinona aislada de la planta de San Juan (*Hypericum perforatum*) ⁽⁶⁾.

6.1.3 Cumarinas.

Son compuestos derivados de la benzo-alfa-pirona, como la cumarina, la esculetina, la umbeliferona y la escopoletina. Tienen propiedades antiinflamatorias, antitromboticas, y vasodilatadoras. La *warfarina* un anticoagulante clásico pertenece a este grupo que también puede tener un efecto antiviral. Un grupo de cumarinas estimula a los macrófagos, lo cual constituiría en una actividad indirecta contra la infección; de ahí que específicamente se usa para prevenir infecciones recurrentes de *HSV-1* en humanos ^(6,74).

6.1.4 Flavonas.

Los bioflavonoides y flavonas comprenden una gran familia de compuestos de derivados polifenolicos de bajo peso molecular, los cuales ejercen diversas actividades biológicas; su actividad frente a microorganismos probablemente se debe a la habilidad de formar complejos con las proteínas solubles extracelulares y con los componentes de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas. Poseen en general actividad antiviral, como la *glicirrina*, sintetizada por el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), otros flavonoides exhiben potente actividad inhibitoria de múltiples virus como *VIH*, *VRS*, *HSV-1*, *Poliovirus tipo I*, *Parainfluenza tipo 3* ⁽⁷⁴⁾. El flavonoide del té negro (teoflavin) es un antioxidante bien conocido que neutraliza Rotavirus bovino e infecciones de Coronavirus bovino. Flavonoides glucosilados de *Barleria prionitia* y de las raíces de *Maulelancia lutea* tienen potente actividad anti *VRS in vitro*. Otro estudio aisló 5 flavonoides de *Markhamia lutea* y *Garcinia multiflora* que exhiben varios efectos antivirales en contra de numerosos virus incluyendo virus respiratorios (*Influenza A y B*, *Parainfluenza tipo 3*, *VRS*, *adenovirus tipo 5* y *sarampión*) y *herpes virus* (*HSV-1*, *HSV-2*, *HCMV* y *VZV*).

Un estado de la replicación viral puede ser inhibido por flavonoides en la síntesis de DNA viral o relacionarse con la actividad de reverso transcriptasa (RT), DNA o RNA polimerasa. El que la RT juegue un papel importante controlando la replicación de *VIH* hace que sea uno de los más atractivos blancos en el desarrollo de drogas anti-*VIH* ⁽⁷⁵⁾.

6.1.5 Taninos.

Estas moléculas son conocidas por su propiedad astringente. Su actividad se magnifica con la activación por radiación UV (320 a 400 nm a w/m² por 2 horas), estudios muestran que ciertos taninos inhiben la reverso transcriptasa viral ⁽⁷⁴⁾.

6.1.6 Terpenoides.

Existen terpenos y terpenoides activos contra bacterias, hongos y virus como el VIH, el mecanismo de acción no está totalmente entendido pero se especula que implica la ruptura de membrana ⁽⁷⁴⁾.

6.1.7 Alcaloides.

Los alcaloides son compuestos nitrogenados heterocíclicos, el primer alcaloide usado en medicina fue la morfina aislado de *Papaver somniferum*. Un alcaloide glucosilado del grano de *Solanum khasianum* y otros alcaloides son empleados contra la infección por VIH o para afecciones intestinales asociada a SIDA ⁽⁷⁴⁾.

6.1.8 Polipéptidos

Los péptidos frecuentemente tienen carga positiva y contienen enlaces disulfuro, su mecanismo de acción puede ser la formación de canales iónicos en la membrana microbiana o inhibición competitiva de proteínas de adhesión microbiana a receptores de polisacáridos. Muchas plantas contienen proteínas que inactivan la función ribosomal (RIPs) en las células infectadas y así inhiben la síntesis de proteínas virales o tienen como blanco los rRNAs ⁽⁷⁵⁾.

Algunas plantas medicinales con actividad antiviral se presentan en anexo nro. 1

6.2 OPUNTIA.

La *Opuntia* es el grupo más grande de la subfamilia *Opuntioide* perteneciente a la familia *Cactaceae* con más de 360 especies. Todas las *Opuntias* son originarias de América, viven silvestres desde Uta y Nebraska, en el norte de EEUU, hasta el extremo sur del continente. Viven desde el nivel del mar hasta en alturas de 4500 m.s.n.m. Su hábitat suele ser árido desértico, montes, bosques tropicales y altas montañas semiáridas ^(76,77,78).

Los nombres vernaculares provienen de su forma de crecimiento i.e., *cholla*, *pera espinosa*, *higos chumbros*, *tuna*, *nopal*, *nopalito*, *prickly pears*, *figueres de palo*, *figa palera*, *penca*, *chumbera*, *cacto* ^(3,5).

La *Opuntia* se clasifica en 2 grupos: el primer grupo es *Platyopuntia*, a este grupo pertenecen las especies que poseen hojas aplanadas, con frutos comestibles, los brotes recientes de algunas especies se usan para ensaladas o también cocidos

eliminandoles la cubierta y espinas. El segundo grupo es la *Cylindropuntia* con hojas cilíndricas ⁽⁷⁶⁾.

Una característica interesante es el segmento llamado cladiolo, el cual aunque posee apariencia de hoja carnosa, es realmente un tallo con plena capacidad de emitir ramas, hojas y flores ⁽⁷⁹⁾.

Las flores suelen ser espectaculares, muy abiertas con pétalos satinados y de colores que pueden ser de tonos amarillo, anaranjado, rojo y hasta púrpuro, nacen de las areolas de los bordes de los segmentos e incluso de las del fruto formándose así en algunas especies un rosario de varias frutas. La fruta madura presenta colores que fluctúan entre amarillo, verde, rojo claro o púrpuros con pulpa jugosa que contiene semillas. Las semillas tienen una cubierta muy dura que causa una demora de hasta un mes en la germinación ^(79,80).

La *Opuntia* es ampliamente usada para comidas y otros fines tanto por humanos como por animales; la fruta carnosa de la tuna de algunas especies es un sabroso comestible. Millones de personas cocinan y comen los frutos recientemente cosechados de muchas especies de *Opuntia*, cuanto más tierno menos niveles de ácido oxálico posee, el cual puede ser tóxico cuando se consume en grandes cantidades y obstaculizar la fisiología renal. Los mucilágenos son útiles para espesar caldos, en la industria se emplea como colorante de dulces, bebidas, lápiz para labios ya que las cantidades de colorante no son tóxicas, excepto por reacciones alérgicas ocasionales (el cual es causado por cualquier sustancia) ^(81,82).

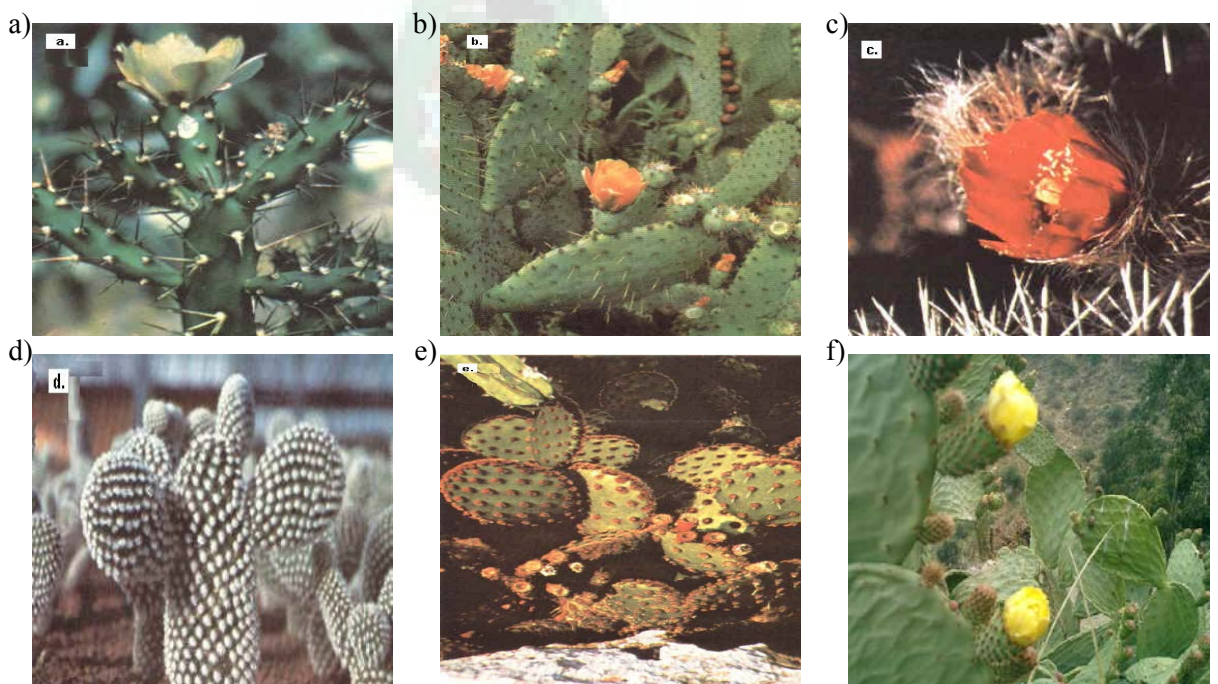


Figura 7.- Diferentes especies de *Opuntia*. a) *O. pestifer*, b) *O. linguiformis*, c) *O. pillifera*, d) *O. microdays v. albispina*, e) *O. aciculata* y f) *O. soehrensii*.

Fuente: Pagina de Internet ⁽⁷⁶⁾

Entre las propiedades atribuidas a la *Opuntia* se tiene:

En la diabetes, posee un notable efecto hipoglicémante, que ayuda al control de azúcar en pacientes sanos, como en aquellas que presentan *Diabetes Mellitus tipo II* ^(83,84).

En el nivel de colesterol, por su alto contenido de fibra, ayuda a eliminar el exceso de grasa, disminuye significativamente los niveles de colesterol en sangre ^(84,85).

En la obesidad, debido a la gran cantidad y calidad de fibra orgánica natural, proteínas, minerales, conduce a la disminución del apetito significativamente. ⁽⁸⁶⁾

En la gastritis, reduce la acidez gástrica, aliviando inflamaciones y así evita que se forme la úlcera péptica ^(87,88).

Estreñimiento, debido a su alto contenido de fibra ayuda a mantener el funcionamiento del sistema gastrointestinal, con lo que evita las hemorroides.

Antiviral, inhibe la replicación viral intracelular e inactiva a los virus extracelularmente, además de *VRS* inhibe a *Virus Herpes simplex*, *Herpes virus equino*, *Virus de la pseudorrabia*, *Influenza virus*, para VIH se identificó una proteína de *Opuntia streptacantha* que actúa sobre la transcripción inversa ^(3,4,5,7,89,90).

7. PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL.

Los procedimientos para determinar la actividad antiviral incluyen ensayos de múltiples disciplinas, con diseños predeterminados cruzados y al azar.

Se evalúa los sistemas de la medicina tradicional, al realizar estudios (preclínico y clínico) de las plantas medicinales que se utilizan popularmente, al implementar líneas de investigación que determinen la relación eficacia/efecto secundario satisfactorio con el propósito de incluir en los formularios o farmacopeas nacionales.

El análisis científico de componentes de plantas sigue una vía lógica: las plantas son colectadas en forma fortuita o siguiendo una dirección local del área geográfica

donde existe la planta. El proceso de suministro del producto debe comprender la recolección, cultivo, elaboración local, producción, y preservación de la flora nacional.

Al realizar la investigación debe considerarse, como regla general, la experiencia tradicional en la preparación respectiva, que incluye el uso de larga data así como los antecedentes médicos, históricos y etnológicos ⁽¹¹⁾.

7.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

Solo alguna parte de la planta puede contener el componente activo, por ejemplo las raíces de la planta de *Ginseng*, las hojas de eucaliptos que se recoge por sus aceites esenciales y taninos, sustancias de la corteza y hojas del álamo.

Existen publicaciones sobre como preparar componentes de plantas y hierbas con fines terapéuticos. El agua es el solvente universal usado para extraer el o los componentes activos; preparados caseros son elaborados para la ingestión (infusión en agua caliente) o raramente en tintura (plantas en solución alcohólica), inhalación de vapores (por ebullición), o partes de la planta seca adicionada al aceite, jalea de petróleo y otros vehículos oleosos para aplicación externa.

El tamizaje de plantas con posible actividad antimicrobiana se inicia usando el extracto acuoso y/o alcohólico y puede ser seguido de varios métodos de extracción orgánico específico.

Para la extracción alcohólica, la parte de la planta es secada triturada y luego remojada en metanol o etanol por extensos periodos, luego el extracto es filtrado y puede ser secado a presión reducida, para determinar la concentración se puede volver a redissolver en medios adecuados.

Cuando se usa agua para la extracción, las plantas generalmente son remojadas en agua destilada, con agitación continua, para luego ser filtrado o tamizado. El filtrado puede ser centrifugado (aproximadamente a 20000 G por 30 min.) o tiempos variables para separar fracciones, ocasionalmente los taninos y terpenoides podrían encontrarse en la fase acuosa.

Muchos estudios evitan el fraccionamiento acuoso completo, los compuestos solubles en agua como polisacáridos (i.e., fécula), polipéptidos y varias lectinas, son más efectivos como inhibidores virales, aunque no siempre son identificados por

técnicas de búsqueda comúnmente ensayadas. La tabla 2 muestra ejemplos de solventes para la extracción de la fracción activa.

Los productos químicos naturales pueden ser purificados a partir del extracto crudo por una variedad de métodos para posterior análisis de la estructura química (i.e., cromatografía, radioinmunoensayo, espectrofotometría de masa, cromatografía líquida de alta resolución, electroforesis de zona capilar, resonancia magnética nuclear, cromatografía de rayos X).

TABLA 2. Solventes empleados para la extracción del componente activo de plantas.

<u>Agua</u>	<u>Etañol</u>	<u>Metanol</u>	<u>Cloroform</u> <u>o</u>	<u>Diclorometa</u> <u>no</u>	<u>Eter</u>	<u>Aceton</u> <u>a</u>
Antocianina	Taninos	Antocianina	Flavonoides	Terpenoides	Alcaloides	Flavonol
Taninos	Polifenoles	Saponinas	Terpenoides		Terpenoides	
Saponinas	Poliacetona	Terpenoides			Cumarinas	
Terpenoides	Flavonol	Taninos			Ác. Grasos	
Polipéptidos	Terpenoides	Lactonas				
Lectinas	Esteroles	Fenonas				
	Alcaloides	Polifenoles				
	Propóleos					

Fuente: JASSIM S, Novel antiviral agents⁽⁷⁵⁾.

7.2 ENSAYOS *In Vitro*.

Existen varios métodos para detectar la actividad virucida o inhibitoria viral de las plantas; para las pruebas de susceptibilidad es necesario realizar primero el aislamiento viral, a partir de este, se pueden realizar diferentes ensayos, a saber: Efecto Citopático, Formación de Placas, incorporación de colorante, coloración vital

(citotoxicidad), detección de alteraciones del metabolismo celular, efectos de transformación o proliferación en líneas celulares. La replicación puede ser medida por la detección de productos virales ya sea DNA, RNA o polipéptidos, existe la posibilidad de descubrir mutaciones por PCR.

Los resultados dependen de múltiples factores como el tipo de prueba, la línea celular utilizada, el inóculo viral, las concentraciones variables del producto a investigar y el laboratorio donde se llevan a cabo las pruebas ⁽⁵⁵⁾.

7.3 ENSAYOS *In Vivo*.

Se evalúa la actividad del extracto cuando un animal está infectado con un microorganismo, el cual es susceptible a desarrollar la enfermedad (para *VRS* ratones *BALB/c*). En un sistema *in vivo* se puede observar también la actividad indirecta, midiendo el incremento de la respuesta inmunológica contra el agente a destruir.

Los ensayos clínicos en humanos son menos riesgosos, los datos del uso del producto por centurias para tratar infecciones y enfermedades humanas en grupos aborígenes nos otorga cierta garantía de su inocuidad, posibilitando emplear un amplio rango de dosis sin efectos tóxicos y/o efectos secundarios, sin embargo estos deben ser adecuadamente controlados.

Entre los posibles riesgos figuran reacciones alérgicas a los constituyentes del extracto en personas sensibles, alteraciones gastrointestinales e incluso no se descarta efectos carcinogénicos en un reducido número de casos ⁽⁹¹⁾.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

1. LA INFECCIÓN POR VRS

El *Virus Respiratorio Sincitial* es considerado mundialmente como el principal agente de infecciones virales del tracto respiratorio mayormente en lactantes, niños pequeños y personas mayores de 60 años. Es actualmente uno de los mayores problemas de salud pública: anualmente más de un millón de niños menores a 5 años mueren en el mundo, la infección puede ser devastadora para bebés prematuros y para quienes sufren enfermedad crónica pulmonar, el hecho de que las personas más susceptibles a infecciones graves sean las menos hábiles para convivir con este virus hace que sea más difícil de tratar la enfermedad. Se estima que en EEUU unos 120000 lactantes requieren hospitalización anualmente por bronquitis secundaria a VRS, con un costo aproximado de 300 millones de dólares ⁽⁹²⁾.

Además de la morbilidad y el costo económico derivado de la enfermedad en la fase aguda, la importancia de la infección por VRS radica en las secuelas que origina a largo plazo; existen evidencias que sugieren que la infección predispone al desarrollo ulterior de hiperreactividad bronquial e hipersensibilidad a los alérgenos comunes, con lo que prospera el terreno para la presentación de asma y disminución de la función pulmonar ^(54,92,93).

A pesar de más de 40 años de investigación en humanos, modelos animales y modelos *in vitro* para aclarar la patogénesis de la enfermedad (intentar esclarecer la relación entre el VRS y el posterior desarrollo de alteraciones a nivel respiratorio), aún no se conoce completamente la relación huésped-virus. Esto ha condicionado el desarrollo de vacunas. Diversos estudios han tratado de desarrollar vacunas vivas atenuadas a lo largo de muchos años; estas han sido evaluadas en animales con cierto éxito, pero los ensayos en adultos humanos, muestran ya sea demasiada virulencia, demasiada atenuación o inestabilidad. Actualmente se trabaja con cepas atenuadas por ingeniería genética recombinante que hacen posible desarrollar la modificación del genoma viral y sus copias ^(19,42,54,94,95,96,97).

El control de este proceso patológico mediante la aplicación de antivirales solo considera su uso durante los primeros días de la infección y el único agente aprobado para su uso es la ribavirina. La evidencia clínica actual no apoya el uso sistemático de antivirales debido a su alto costo y la ausencia de estudios que traten temas

controversiales referentes a las indicaciones, exposición ambiental de los trabajadores en salud, efectos secundarios potenciales e incluso su eficacia, que aún siguen siendo un problema ^(66,98,99).

La dificultad de obtener nuevos antivirales para su evaluación como recurso terapéutico con utilidad clínica, paradójicamente está relacionada con la simplicidad de los virus. Las bacterias son organismos más complejos que los virus y presentan diferencias funcionales y metabólicas con las células eucarióticas, lo que le permite actuar sobre vías metabólicas que le son propias. Por el contrario, los virus son parásitos intracelulares estrictos y pueden replicar solo cuando infectan células, apropiándose de la maquinaria metabólica celular para producir nuevas partículas virales ^(13,98). Esto hace que interferir en cualquier proceso en la síntesis de algún componente viral altere la función celular, por esto es necesario encontrar blancos vulnerables particulares de la replicación viral que permita un ataque selectivo ^(98,100).

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades incluidas las de etiología infecciosa, constituyen en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente en aquellas dolencias para las que no existen remedios adecuados.

El retorno hacia el uso de los productos de origen natural en terapéutica, como efecto de una nueva visión de relación hombre-naturaleza que se ha dado de forma general en la sociedad en los últimos decenios ⁽¹⁰¹⁾, además se ha visto favorecido por: el descubrimiento de graves efectos secundarios en los fármacos de síntesis, por un mayor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales y sus productos derivados, por el desarrollo de nuevas formas de preparación y de administración de las drogas vegetales y sus extractos, y por el desarrollo de métodos analíticos que garantizan un mejor control de calidad. Asimismo se puede considerar como otro factor la tendencia generalizada a la automedicación, que en el caso de los productos fitoterápicos por ser en general menos peligrosos se hacen más aptos para esta práctica (que no por esto es recomendable) ⁽¹⁰²⁾.

2. EPIDEMIOLOGÍA.

El *VRS* es un patógeno ubicuo en toda la población humana, es comúnmente identificado en enfermedades respiratorias, afecta aproximadamente al 50 a 60 % de los niños durante el primer año de vida y a los 3 años de edad se estima que el 100 % ha tenido contacto con el *VRS* en algún momento. Entre el 25 – 40 % de niños

infectados por *VRS* desarrolla infección del tracto respiratorio inferior, aunque las tasas de mortalidad son bajas ($\leq 1\%$) en ciertas poblaciones de riesgo alcanzan hasta el 3 % ^(14,42,99,103).

El *VRS* se relaciona como causa de epidemias que afectan el tracto respiratorio en todo el mundo particularmente durante invierno y en estaciones lluviosas en áreas tropicales. Se identifican dos cepas diferentes de virus: A y B; una cepa tiende a dominar durante cada epidemia, no obstante, ambas cepas pueden ser aisladas de pacientes de una misma área. Además de las 2 cepas, existen muchos tipos de cada cepa; la mayor parte de la variabilidad entre las cepas de *VRS* y subtipos es debida a la estructura de la proteína G ^(17,29,104,105,106,107). Algunos estudios han establecido que la enfermedad en niños es más grave con *VRS* del grupo A que con la infección del virus del grupo B, pero esta relación no ha sido evaluada en adultos ⁽¹⁰⁸⁾.

Los aislamientos del grupo A son más comunes en Estados Unidos donde las epidemias ocurren de Noviembre a Abril, mientras que en Argentina y Uruguay prevalece el subgrupo B, igual que en Europa ^(13,14,103). En Chile estudios muestran epidemias por ambas cepas, con variaciones anuales en intensidad y duración, aunque la predominancia de la cepa B fue asociada con epidemias notables ^(109,110).

Estudios de 7 años muestran que en Brasil, los 2 grupos de *VRS* circulan simultáneamente cada año, sin embargo la proporción relativa puede variar cada año. Los ataques son dependientes de la temperatura y no asociados con la lluvia, similar a otros países de Sur América ^(111,112). La infección es particularmente importante en países tropicales y en vías de desarrollo.

Una infección de *VRS* no produce protección inmunológica para infecciones posteriores; sin embargo a pesar de que las reinfecciones son comunes, la gravedad de la enfermedad generalmente disminuye en subsecuentes infecciones ⁽⁴²⁾.

2.1 Perfil Epidemiológico de VRS en Bolivia.

En general cuando se produce alta incidencia de enfermedades respiratorias en los casos de afecciones virales el *VRS* se identifica como único agente; no obstante, puede existir superposición de actividad de *VRS* con *Influenza*, *Parainfluenza*, *Adenovirus* además de entidades bacterianas, lo que posibilita que un mismo paciente pueda ser infectado por más de uno de estos agentes al mismo tiempo.

De acuerdo a la afluencia de pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de *VRS* remitidos al instituto SELADIS para confirmación laboratorial, el *VRS*, presenta mayor incidencia en la estación invernal; no existen datos epidemiológicos de *VRS* como agente causal de enfermedad en nuestro país.

Uno de los principales cuadros clínicos de la infección por *VRS* es la neumonía, además de bronquiolitis, estudios relacionan un porcentaje significativo de *VRS* con neumonías (tabla 3)

Tabla 3. Virus Respiratorio Sincitial como agente causal de Neumonías en varias regiones del mundo.

Casos de Neumonía	Porcentaje	Fuente
Hospitalización por Neumonías causada por <i>VRS</i>	25 %	(113)
Hospitalización por Neumonías causada por <i>VRS</i>	30-60 %	(103)
Manifestaciones Clínicas de Neumonía causada por <i>VRS</i>	59%	(109)
Neumonía viral en adultos	63%	(13)

Con base a esta relación se hace referencia al estudio epidemiológico de neumonía a nivel nacional. Esta patología -de interés nacional- es monitoreada por el programa de Atención de las Enfermedades Prevalentes de la Infancia, AEPI⁽¹¹⁴⁾.

En las figuras 8 y 9 se traduce esta información como indicadores de captación y tratamiento por mil niños menores de 5 años correspondientes a los años 2003 y 2004 respectivamente.

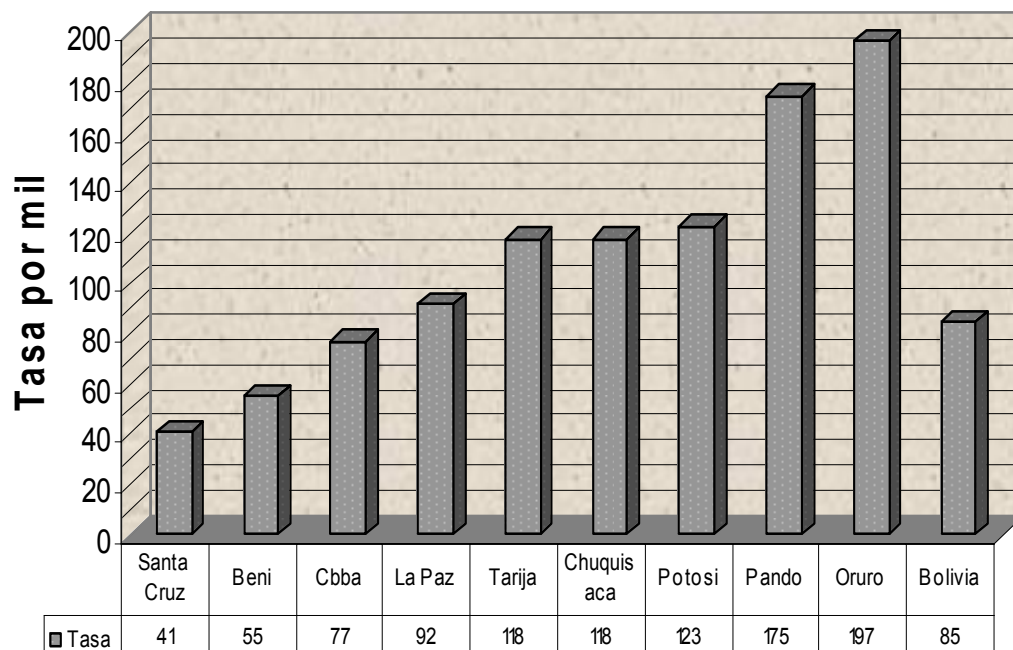


Figura 8.- Bolivia: Relación de tasas de captación de tratamiento de neumonías en niños menores de 5 años por SEDES de Enero a Agosto del 2003.

Fuente: PROSIN ⁽¹¹⁴⁾

La tasa de captación y tratamiento de casos de neumonías a nivel nacional es de 85 por mil niños menores de 5 años, por SEDES de Enero a Agosto del 2003.

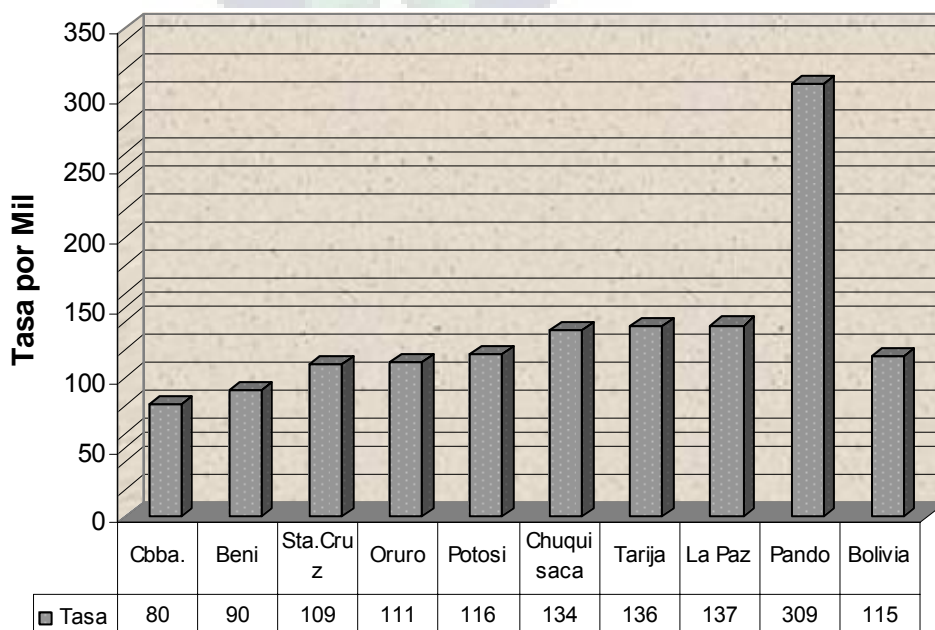


Figura 9.- Bolivia: Relación de Tasas de neumonías de niños menores de 5 años

por SEDES de Enero a Mayo del 2004.

Fuente: PROSIN ⁽¹¹⁴⁾

Los departamentos que registran una mayor captación son Pando con 309 casos por cada 1000 niños menores de 5 años, La Paz con 137 casos por cada 1000 menores de 5 años, Tarija y Sucre con 136 y 134 casos captados por mil niños menores de 5 años respectivamente.

3. FACTORES DE RIESGO.

No solo es cierto que los niños tienen alto riesgo de contraer VRS, un elevado número de factores están estadísticamente asociados con un alto riesgo de infecciones graves; el más importante de estos es la prematuridad (nacimiento con gestación menor a 36 semanas) y la presencia de enfermedad pulmonar crónica (EPC). Otras condiciones que incrementan el riesgo son la fibrosis quística, aspiraciones recurrentes con neumonitis, fístula traqueoesofágica, trastornos neurológicos y genéticos que dificultan una buena secreción.

Los niños con enfermedades cardíacas tienen el más alto riesgo de infección grave por VRS, al igual que niños inmunocomprometidos, esto incluye niños que reciben quimioterapia para leucemia o trasplantes de médula ósea, infecciones con VIH, o con síndrome de inmunodeficiencia combinada ⁽²²⁾.

La frecuencia de hospitalización de niños es 2 veces mayor que de niñas, lo que indica que la enfermedad puede ser más severa en niños.

Los niños de familias de bajo ingreso económico presentan afecciones más graves, en parte porque ellos se contagian a más temprana edad por los altos niveles de partículas en aire contaminado propio de los hábitats de las poblaciones de menor ingreso, también tienen infecciones graves los niños expuestos a humo de cigarro. En países en desarrollo la malnutrición y la deficiencia de micronutrientes son asociadas con incremento de la incidencia y severidad de las infecciones agudas del tracto respiratorio ^(15,115).

Uno de los grandes riesgos para contraer VRS es la hospitalización en sección pediátrica, entre pacientes hospitalizados por otras causas, los factores asociados con alto riesgo de infección nosocomial incluyen, la edad, enfermedades crónicas,

hospitalización por periodos de tiempo prolongado, condiciones del hospital, trabajadores del hospital ^(15,22).

4. TRANSMISIÓN.

Una vez transcurrido el periodo de incubación que es de 2 a 8 días, frecuentemente 4 a 6 días luego del contacto inicial, cuando aparecen los síntomas, se inicia la diseminación del virus que es altamente variable en magnitud y en sus características. Existen evidencias sobre una correlación entre la edad de la persona infectada con la gravedad de la infección; también con el hecho de que la persona infectada esté inmunocomprometida. Generalmente los adultos diseminan el virus por 3 a 12 días después de la infección, los niños diseminan de 2 a 3 semanas. Individuos inmunocomprometidos pueden diseminan muchos meses luego de la infección ^(13,33,116).

La principal ruta de transmisión son las partículas grandes de aerosol (i.e., estornudos) a corta distancia y contacto mano-ojo ó mano-epitelio nasal infectado, las secreciones infectadas pueden pasar de la mano de individuos infectados a otros o por autoinoculación. Las partículas pequeñas de aerosol aparentemente no son un modo común de transmisión puesto que el virus no es estable cuando se aeroliza ⁽¹³⁾.

La secreción nasal en guantes y pañuelos son infecciosas hasta los 30 minutos; otros estudios indican que los fómites son particularmente problemáticos ya que quedan partículas infecciosas hasta 10 a 12 horas, mientras que superficies duras como mostradores, estetoscopios, vajillas o cunas, son infecciosas por al menos 6 a 12 horas ^(13,22).

5. PROFILAXIS.

Una profilaxis efectiva requiere múltiples maniobras; la clave para prevenir la infección se basa en la educación de familiares cercanos acerca de la gravedad de la enfermedad en lactantes y niños y en evitar ambientes contagiosos (i.e., guarderías). Se requiere cuidadoso lavado de manos, uso de protectores para ojos, nariz y el aislamiento de la ropa usada en contacto con el paciente. Los niños infectados deben ser separados del resto de la población en edad pediátrica y el personal con infección

respiratoria no debe hacerse cargo de aquellos niños con riesgo de complicaciones (14,22,116)

Existen dos formas de inmunoprofilaxis pasiva con capacidad preventiva: a) La administración de gammaglobulina hiperinmune policlonal (respigam) y b) la administración de anticuerpos monoclonales (palvizumab). Los anticuerpos séricos efectivos para impedir o atenuar la enfermedad deben alcanzar títulos entre 1:200 y 1:400; la administración IV de gammaglobulina estándar no logra nunca títulos superiores a 1:90 descartándose su utilidad. Sin embargo la administración de anticuerpos en pacientes inmunocomprometidos sugieren que otorga un beneficio profiláctico, el cual puede ser aumentado si se combina con ribavirina. La inmunización materna en el tercer trimestre de embarazo o inmediatamente luego de nacer es también una posible alternativa (29,53,54)

IV. OBJETIVOS.

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiviral de *Opuntia soehrensii* utilizando como modelo la infección *in vitro* en cultivo de líneas celulares por *Virus Respiratorio Sincitial*.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Optimizar monitores biológicos para la evaluación de la actividad antiviral de *Opuntia soehrensii* en infecciones por *Virus Respiratorio Sincitial*.
 - Optimizar el ensayo de Reducción Enzimática de la sal MTT para la evaluación de la actividad antiviral de *Opuntia soehrensii*.
 - Establecer parámetros de evaluación del Efecto Citopático inducido por la infección por *Virus Respiratorio Sincitial* en la línea celular BHK-21.

- Determinar la actividad antiviral de *Opuntia soehrensii*, mediante el Ensayo de Formación de Placas por *Virus Respiratorio Sincitial*.
- Determinar la actividad antiviral del extracto acuoso de *Opuntia soehrensii* en diferentes etapas de la infección por *Virus Respiratorio Sincitial* sobre cultivos *in vitro*.

V. HIPÓTESIS.

1. HIPÓTESIS GENERAL.

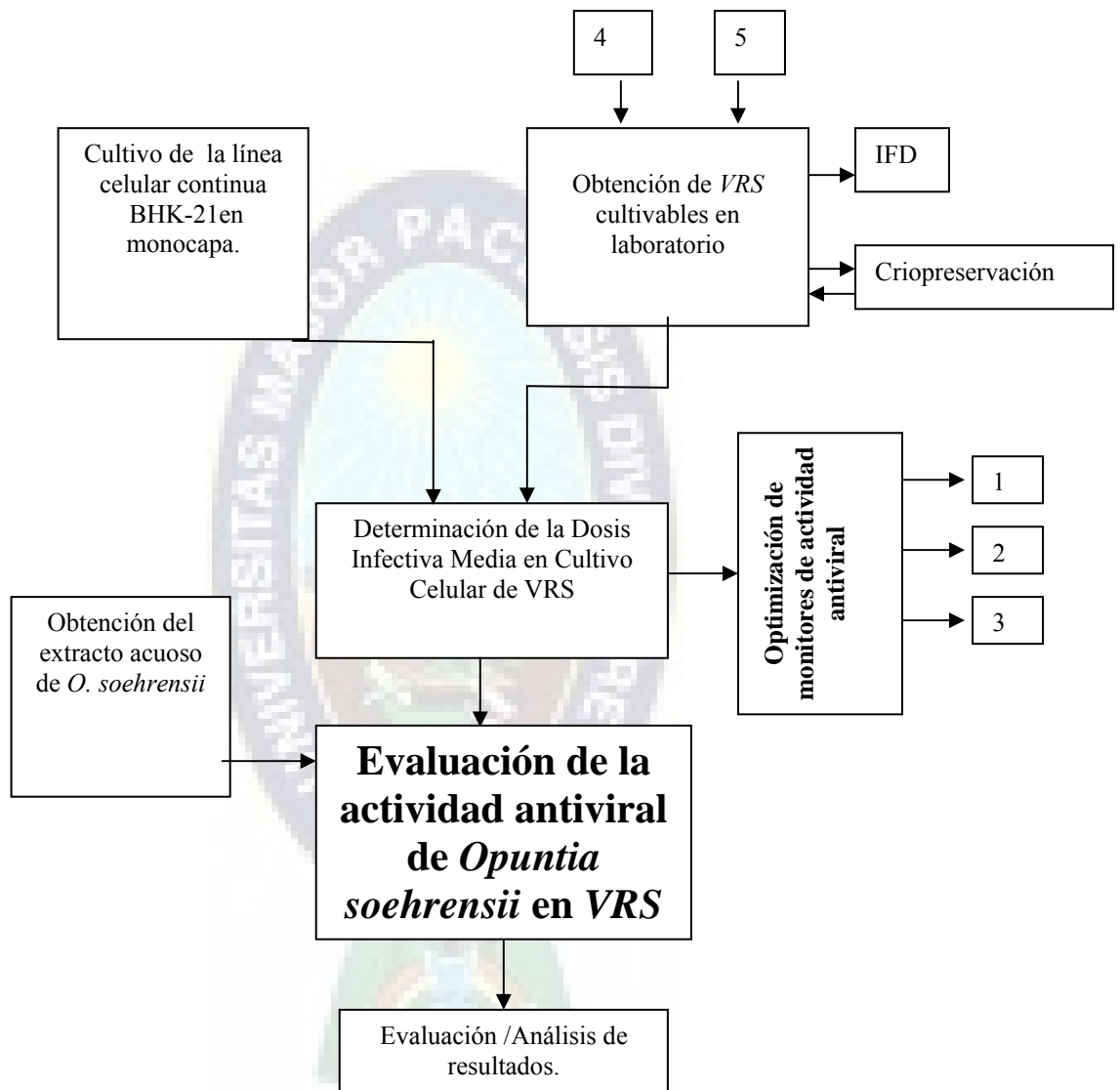
El extracto acuoso de las semillas de *Opuntia soehrensii* posee actividad antiviral en procesos de infección *in vitro* en cultivo de líneas celulares por *Virus Respiratorio Sincitial*.

2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS.

- Los monitores biológicos sensibles a la actividad de *Virus Respiratorio Sincitial* en la célula hospedera permite evaluar la actividad antiviral *in vitro* de *Opuntia soehrensii*.
- La actividad antiviral de *Opuntia soehrensii* está dirigida contra una etapa de la replicación activa de *Virus Respiratorio Sincitial* posterior a la infección.

VI. DISEÑO METODOLÓGICO.

El presente estudio corresponde a un diseño experimental, que fue realizado *in vitro* utilizando la línea celular *BHK-21*, con infección de *Virus Respiratorio Sincitial*.



- 1.- MTT (Actividad metabólica/ enzimática)
- 2.- ECP (Actividad viral activa temprana)
- 3.- PRA (producción de viriones)
- 4.- Muestras Clínicas
- 5.- Cepas Aisladas.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. EXTRACTO VEGETAL.

El cacto *Opuntia soehrensii* está formado por varios tallos de 30-40 cm de altura, los tallos son aplanados de color verde pardusco y tienen espinas amarillo-blanquecinas de 3-5 cm de largo; la flor es amarilla o anaranjada que emergen de los frutos que son verdes al madurar, los frutos contienen semillas cubiertas de una pulpa de color rojo-morado intenso de aproximadamente 4 mm de diámetro^(8,117,118).

Para este trabajo se emplearon semillas de *Opuntia soehrensii*, procedentes de la provincia Murillo del departamento de La Paz, la recolección de los frutos se realizó en horas de la mañana e inmediatamente separadas las semillas fueron desecadas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz por 14 días para luego proceder a su trituración en mortero. Es de gran importancia la forma de recolección y conservación de las plantas, puesto que, las células vegetales, desde el mismo momento de la recolección, sufren un cierto número de transformaciones biológicas. Así, al separar la parte aérea de la raíz, se provoca la interrupción del flujo alimenticio y de transpiración vegetal. Las enzimas que contiene y que antes favorecían la formación de materias activas, empiezan ahora a descomponerla. En el organismo vegetal las anteriores reacciones de síntesis orgánica comienzan a ser suplantadas por reacciones de degradación y el producto se transforma desde el punto de vista químico, una incorrecta recolección y desecación, por lo tanto, incrementa la cantidad de productos de degradación, perdiendo la planta parte de su calidad⁽¹¹⁹⁾.

De los varios parámetros considerados en la evaluación de la actividad de las plantas medicinales destacan los métodos de extracción usados para obtener el componente con actividad antiviral; tanto el extracto acuoso como el orgánico pueden poseer componentes con actividad antiviral, así, es factible determinar el método óptimo de extracción para cada planta^(120,121). Para la selección del solvente y la preparación del extracto se tomaron en cuenta anteriores trabajos del laboratorio además del uso tradicional.^(4,8,122) De acuerdo con esto, 40 g del material vegetal fue suspendido en 1 litro de agua bidestilada y desionizada, esta suspensión se agitó por 2 horas a 50°C en shaker magnético de platina caliente y se conservó 48 horas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz, el sobrenadante fue filtrado utilizando papel filtro Whatman No. 52 triple capa, para eliminar residuos que no se disolvieron. El extracto fue alicuotado en volúmenes de 5-10 mL y liofilizado a -40°C con un vacío de 10⁻³ MBar de presión (Freeze Dry Sistem LIPH LOCK6 de LABCOBCONCO), para su

uso en los diferentes ensayos, el liofilizado fue reconstituido con medios de cultivo celular adecuado y esterilizado por filtración a presión positiva a través de una membrana de nitrocelulosa (Millipore) de 0,22 μm de diámetro de poro.

Todos los ensayos se realizaron con el mismo lote del extracto para evitar posibles variaciones de repetibilidad y reproducibilidad de resultados debido a diferencias en los preparados (*i.e.*, época de recolección, edad de la planta, agotamiento de la materia vegetal, condiciones ambientales, etc.)⁽¹²³⁾.

2. PROCEDIMIENTOS DE EVALUACIÓN Y DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL.

Todos los ensayos empleados en el presente trabajo fueron realizados en sistemas de cultivo celular y de virus que, a diferencia de los sistemas *in vivo*, permiten controlar y definir los factores que intervienen en el cultivo, como ser las condiciones fisicoquímicas (*i.e.*, pH, temperatura, presión osmótica, niveles de oxígeno, CO_2 , tensión superficial, viscosidad), el tipo de células a utilizarse (*i.e.*, células primarias, células de crecimiento constante) y el virus^(57,58).

2.1 Medios y soluciones para el trabajo en cultivo de células y virus.

Todos los constituyentes presentes en los medios de cultivo y soluciones tienen funciones específicas.

2.1.1 Sales Inorgánicas.

La inclusión de sales inorgánicas en el medio tiene varias finalidades, entre ellas coadyuvar a mantener el equilibrio osmótico de las células⁽⁵⁸⁾. Muchos tipos celulares en cultivo tienen tolerancia frente a la osmolaridad del medio y crecen bien en el rango de 260 a 320 mOsm/Kg. La osmolaridad está dada esencialmente por el catión Na^+ , aniones cloruro y el bicarbonato; el K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , aniones sulfato y fosfato contribuyen en menor grado. Estos componentes también, son requeridos en la matriz celular para su adhesión y como cofactores en numerosas reacciones enzimáticas intracelulares.

Para el mantenimiento y proliferación de células, *in vitro*, también se reporta requerimiento de oligoelementos como hierro, zinc, selenio, cobre, manganeso, molibdeno, vanadio, etc.

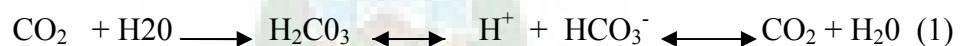
2.1.2 Sales para el sistema Buffer.

El control de pH es esencial para un óptimo desarrollo de células en cultivo y la replicación del virus. El rango de pH necesario depende del tipo de células en cultivo; aunque la mayoría requieren un pH de 7,2 a 7,4 existen algunas líneas normales de fibroblastos que crecen mejor entre 7,4 a 7,7.

La regulación del pH, en los medios utilizados en este trabajo, fue realizado por sistemas CO₂– Bicarbonato y HEPES:

- La relación CO₂ - Bicarbonato, un sistema buffer fisiológico “natural”, el CO₂ gaseoso es balanceado con el CO₂/HCO₃ contenido en el medio de cultivo. En un sistema cerrado, la fuente de CO₂ son las células metabólicamente activas presentes en el tubo o frasco de cultivo, en un sistema abierto debe aportarse una atmósfera de 5-10% de CO₂, de manera que la concentración esté en equilibrio con el bicarbonato en el medio, esto se requiere principalmente en los casos en que la densidad celular sea elevada, con mucha producción de ácido, por la elevada producción de CO₂ endógeno, por lo tanto se hace necesario mantener abierto el recipiente de modo que se pueda eliminar el exceso.

La tensión atmosférica del dióxido de carbono regula directamente la concentración de CO₂ disuelto en función a la temperatura, pH y la cantidad de ácido carbónico que se disocia en bicarbonato y protones:



El incremento de la concentración del ion bicarbonato desplaza la ecuación (1) hacia la izquierda de modo que el pH se establezca en 7,4.

El uso de bicarbonato de Na presenta una desventaja ya que posee un pKa de 6,3 a 37°C el cual resulta por debajo del nivel de rango de pH óptimo, sin embargo el beneficio químico para las células es no ser tóxico^(58,123).

- La inclusión de HEPES, un buffer químico usado como zwitterion (N-2, hidroxietil piperazina N`-2 ácido etano sulfonato), permite una mayor

capacidad buffer del cultivo en el rango de pH 7,2-7,4. Sin embargo, puede ser tóxico para algunos tipos de células a elevadas concentraciones. El buffer HEPES no requiere control de gas atmosférico, por lo que puede usarse en sistemas abiertos si no se dispone de incubadora de CO₂ ⁽¹²⁴⁾.

2.1.3 Carbohidratos.

La concentración de azúcar varía desde un medio basal que contiene 1g/L hasta 4,5 g/L en medios más complejos. Son la mayor fuente de energía y los más utilizados son glucosa, galactosa, maltosa y fructosa.

La glucosa es la fuente de energía en muchos medios, metabolizado preferentemente vía glucólisis hacia piruvato puede ser convertido en lactato o acetato que entra en el ciclo de Krebs y genera CO₂ ⁽¹²⁵⁾.

2.1.4 Vitaminas.

Las vitaminas son precursores de numerosos cofactores y son constituyentes de medios enriquecidos. Las del grupo B (tiamina, riboflavina) son necesarias para el crecimiento y proliferación celular; algunos medios también tienen niveles elevados de vitamina A y E además de biotina. La limitación de vitaminas se manifiesta en la supervivencia celular y en la reducción de la tasa de crecimiento más que en la densidad celular ⁽⁵⁸⁾.

2.1.5 Aminoácidos.

Los medios de cultivo contienen aminoácidos que no pueden ser sintetizados por las células (aminoácidos esenciales) además de cisteína y tirosina. De acuerdo a la complejidad del medio de cultivo, algunos incorporan en su composición aminoácidos no esenciales con el propósito de suministrar nutrientes adecuados a aquellos tipos celulares que son incapaces de sintetizar, o se encuentran en cantidades insuficientes para sustentar su crecimiento. Los requerimientos de aminoácidos esenciales incrementan cuando el medio de cultivo carece de aminoácidos no esenciales, en tal caso, los aminoácidos esenciales se constituye en fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos no esenciales ⁽¹²³⁾.

Un suplemento común es el de la glutamina a 0,3 g/L, aunque hay algunas líneas celulares que pueden usar el glutamato.

2.1.6 Proteínas y Péptidos.

Las proteínas y péptidos generalmente son provistas por el suero i.e., albúmina, transferrina, fibronectina, etc. Estos además de los efectos propios de cada proteína otorgan la presión oncótica necesaria para el medio de cultivo ⁽¹²⁶⁾.

2.1.7 Lípidos y Ácidos grasos.

Normalmente están presentes en el suero e.i., Colesterol y esteroides esenciales para células especializadas.

2.1.8 Suero.

El suero es el componente más importante de los medios de cultivo; contribuye, entre otras actividades a mantener el pH del medio; esto es importante en células de desarrollo lento o cuando se observa baja densidad celular, también protege contra mecanismos de daño los cuales pueden ocurrir cuando los medios son agitados o cuando las células son removidas. El suero provee al cultivo a) proteínas y factores de adhesión tales como la fibronectina; b) péptidos reguladores del crecimiento y diferenciación como la insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento β asociado a tumores, factor de crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento epidérmico, factores inhibidores de crecimiento. c) hormonas y reguladores del transporte de membrana y de la constitución de la superficie celular como la insulina, hidrocortisona, estrógenos, triyodotirosina, hormona de crecimiento, FSH, dexametasona, etc. d) nutrientes esenciales tales como minerales, vitaminas, ácidos grasos y metabolitos intermediarios, e) inhibidores de proteasas, fundamentales luego de la exposición a la tripsina en un cultivo para inhibir el exceso de actividad enzimática ^(58,123).

Para su uso el suero debe estar libre de agentes infecciosos, incluidos micoplasmas y no contener anticuerpos contra el virus incluido en los ensayos, por esto se utilizó suero fetal bovino o de ternera recién nacida.

2.1.9 Antibióticos.

El crecimiento de las células animales es mucho más lento que el de los contaminantes microbianos habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas)

los cuales encuentran todos los nutrientes en el medio de cultivo, por esto se debe mantener las condiciones de asepsia en todo momento ⁽¹²⁷⁾.

Para esto, los antibióticos utilizados deben ser: a) compuestos bactericidas más que bacteriostáticos b) no deben inhibir el crecimiento ni el metabolismo de células animales en cultivo c) al permanecer durante todo el periodo experimental no deben afectar los propósitos fundamentales por los que se trabaja con cultivos celulares d) deben ser compatibles con otros compuestos del medio de cultivo y f) no deben contener excipientes ⁽¹²³⁾.

Los antibióticos utilizados en este trabajo fueron:

- Penicilina sodica, un antibiótico efectivo contra bacterias G+, especialmente Streptococcus cuando se trabaja a una concentración de 100000 U/L, se unen a proteínas fijadoras de penicilina (PBPs), que intervienen en las reacciones de transpeptidación bloqueando la síntesis de peptidoglicanos y la transpeptidación final.
- Streptomina sulfato, un antibiótico activo contra bacterias G+ y G-, inhibe la iniciación de la traslocación y causan lectura equivocada del código genético.
- Anfotericina B, es un antifúngico efectivo contra levaduras y hongos, interfiere con la permeabilidad de la membrana celular causando la pérdida de componentes de bajo peso molecular desde las células.

De acuerdo con lo anterior, se utilizaron las siguientes soluciones y medios:

a) Soluciones salinas tamponadas.

- Buffer Fosfato Salino (PBS: NaCl, KH₂PO₄, KCl, Na₂HPO₄), para el lavado de células.
- Solución de Versene (0,02 % EDTA en PBS), para la disgregación de monocapas celulares; carece de iones Ca⁺² y Mg⁺².
- Solución Balanceada Salina de Hank (HBSS), es una mezcla de sales inorgánicas que incluye bicarbonato sodico suplementada con glucosa. Fue utilizado para diluir medios más completos, para incubaciones cortas que requieren un medio isotónico no completo nutricionalmente y para lavado de células.

b) Medio basal.

- Medio Mínimo Esencial de Eagle (E-MEM) sin Ca^{2+} que reduce la agregación celular y la adherencia, fue utilizado para el cultivo en suspensión o de células en monocapa y el transporte de cepas de virus nativos.

c) Medios complejos.

El RPMI-1640, es un medio muy versátil, que tiene una amplia aplicabilidad y la capacidad de proveer los requerimientos nutricionales a muchas líneas celulares para su desarrollo, existen variantes en cuanto a los suplementos, que se adicionan ⁽¹²⁸⁾. En el presente trabajo se emplearon los siguientes:

- RPMI-1640 con 5% de Suero Fetal Bovino. (SFB)
- RPMI-1640 con 3% de Suero de Bovino Recién Nacido. (SBRN)
- RPMI-1640 sin suplementar suero.
- RPMI-1640 sin rojo fenol
- RPMI-1640 con DMSO (Dimetilsulfoxido), para criopreservar células.

Los aspectos procedimentales de la preparación de materiales y medios de cultivo son detallados en anexo 2.

3. CULTIVO DE CÉLULAS: LINEA CELULAR CONTINUA *BHK - 21*.

El cultivo de células es considerado como una tecnología valiosa y fuente de material biológico para el diagnóstico, producción de material biológico, sistemas de monitoreo *in vitro* de actividad biológica, etc. Permite profundizar en el conocimiento de la biología celular y molecular, además de detectar variaciones de la función celular en un entorno libre de las variaciones sistémicas que es propio de modelos *in vivo*. Sin embargo, estos son útiles cuando los mismos están bien organizados, caracterizados y manipulados ^(35,57).

La línea celular *BHK-21* se derivó en 1961 del riñón de 5 hamsters sirios recién nacidos. Como características fundamentales esta línea posee rápido crecimiento, tiempo de duplicación menor en comparación con otras líneas celulares, pases ilimitados y alta eficiencia de plaqueo. Esta constituida por células pseudofibroblásticas y es una línea pseudodiploide con tetraploidia ⁽¹²⁹⁾. Son células

que crecen en monocapa susceptibles de infección por *Virus Respiratorio Sincitial* (19,23,130,131).

Células *BHK-21* en RPMI-DMSO conservadas a -196°C en Nitrógeno líquido en el laboratorio SELADIS descongelado de la citoteca de Biomedicina experimental provenientes de la American Type Culture Collection (ATCC) fueron cultivadas en frascos de Roux, 25 cm^2 de superficie, adicionando medios de cultivo de mantenimiento (RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 3%) de acuerdo a requerimiento.

Los cultivos fueron incubados en estufa (incubador Tuttnaue KNOTT), bajo “condiciones de cultivo celular”:

- Temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, las células en cultivo son capaces de sobrevivir sin daños importantes ante variaciones de temperatura, siempre que sean debajo de la temperatura corporal del animal del que proceden.
- Humedad, 99%, para reducir la evaporación de agua del medio de cultivo.
- Atmósfera de 5% CO_2 . 95% aire (78,09% N_2 , 20,95% O_2), para mantener el equilibrio carbonato-bicarbonato en el medio de cultivo ⁽¹³²⁾.

El desarrollo del cultivo celular fue evaluado diariamente a través de un microscopio invertido (Olympus CK 2). El momento en el que se observó la detención en su crecimiento y división, fenómeno conocido como “inhibición por contacto”, se realizaron los subcultivos o cosecha de las células para llevar a cabo los diferentes ensayos.

3.1 DISOCIACIÓN CELULAR.

Para la disociación del cultivo de células es necesario separar las células entre sí y del soporte al que se encuentran adheridas, manteniendo la viabilidad celular. Para esto, se toma en cuenta la composición de la matriz celular que es una compleja mezcla de glucoproteínas, glicolípidos, lípidos, mucopolisacáridos y proteínas; Para la disociación es necesario romper la malla de proteínas que forma la matriz extracelular y que mantiene las células unidas; para la obtención de células en suspensión se utilizaron los siguientes procedimientos:

- Enzimático, mediante la digestión controlada con preparaciones crudas de enzimas proteolíticas como la tripsina a 0,25% de concentración, puesto en contacto con las células por 30 segundos ⁽¹³³⁾.
- Químico, basado en el secuestro de los iones Ca^{2+} que median la unión de las células al sustrato de cultivo; para esto, se utilizó el Acido Etilendiamino Tetraacético (EDTA) ⁽¹²⁴⁾, que como parte de su efecto quelante reduce la concentración de iones divalentes que estabilizan las uniones proteicas. La solución de Versene se adiciono por 10 minutos para luego obtener las células.
- Mecánico, mediante el raspado (scraping) de la monocapa celular para obtener las células.

La elección de uno u otro procedimiento depende de la naturaleza del ensayo y del uso previsto de las células obtenidas para requerimientos experimentales específicos.

3.2 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD Y AJUSTE DE LA DENSIDAD CELULAR.

La manipulación de cultivos celulares requiere la cuantificación del número de células presentes en una muestra así como determinar la proporción de células viables de manera previa a su uso en cualquier ensayo. Con un número adecuado de células se puede trabajar con crecimiento óptimo celular, estandarizar el procedimiento de evaluación y obtener resultados reproducibles.

Para determinar la densidad celular se emplean diferentes técnicas, desde la relativamente simple cámara de contaje celular, de la que existen numerosas variantes, hasta equipos automáticos de contaje celular como el “*Cell counter*” ⁽¹³⁴⁾.

Para la determinación de la viabilidad celular se emplea diferentes métodos, entre ellos el de incorporación y retención de colorante vital por células viables como la diacetil fluoresceína, la eosina; incorporación de isótopos radioactivos como el ^{51}Cr ; la exclusión por células vivas de colorantes vitales como el azul tripan, eritrosina o nigrosina. El método de exclusión de colorante utilizado en el presente trabajo, se basa en la propiedad de semipermeabilidad selectiva de la membrana plasmática; la pérdida de esta propiedad por las células muertas permite la difusión del colorante, en este caso Azul tripan, al citoplasma observándose claramente de color azul, esto

facilita la diferenciación de las células vivas que por mantener la integridad de la membrana se observan incoloras, translucidas y refringentes ⁽¹³⁴⁾, Para realizar esto, luego de obtener una suspensión celular homogénea en condiciones de esterilidad, se alicuotó 50 uL de la misma y se incubó con 50 uL de Azul tripan 0,4% en PBS (factor de dilución ½). Luego de 5 minutos a temperatura ambiente, se procedió al recuento de células en cámara de Neubauer en los 4 retículos de células blancas, con objetivo 10X de microscopio óptico (Olympus CH-2), se contaron células vivas y células muertas.

Para determinar el porcentaje de viabilidad se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{No de células vivas}}{\text{No de células totales}} \times 100$$

Asimismo, con estos datos se determinó el número de células.

$$\text{No. Cel/mL} = \frac{\text{No de células vivas}}{\text{No cuadrantes contados}} \times \text{factor de dilución} \times 10^4$$

3.3 PREPARACIÓN DE CULTIVOS CELULARES.

Luego del cálculo de la densidad celular, se realizó el ajuste del número de células a $1,5 \times 10^5$ cel/mL, $1,8 \times 10^5$ cel/mL y 2×10^5 cel/mL de manera que al colocar 100 uL de esta suspensión en policubetas de 96 pozos (linbro) en 24 horas de cultivo se obtenga una monocapa de 80-90% de confluencia celular, necesarias para realizar cualquier ensayo biológico en este trabajo.

4. CULTIVO DE VIRUS.

El mantener en cultivo un virus en particular es un prerrequisito esencial para su estudio. Generalmente no se usa el huésped natural sino se recurre ya sea a cultivo de células o en menor grado a cultivos de órganos y huevos embrionados; los animales de laboratorio son usados en ocasiones especiales ⁽³⁵⁾.

La multiplicación de los virus en cultivos celulares permite el desarrollo de parámetros para el estudio de diferentes aspectos virológicos tales como: aislamiento, identificación, multiplicación, cuantificación de virus y el estudio de las propiedades biológicas o bioquímicas de productos sobre el virus en replicación activa; asimismo, son excelentes monitores de respuesta fisiológica antiviral (i.e., eficacia de vacunas) y de productos con actividad directa en cualquiera de los eventos del proceso de infección viral.

4.1 CEPAS NATIVAS DE *VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL (VRS)*

Cepas de *VRS* nativas que circulan en nuestro medio fueron obtenidas a partir de muestras clínicas. Para esto las muestras se obtuvieron lo más precozmente posible durante el curso de la infección aguda (la eliminación viral depende del virus y de las características sistémicas que pueda tener la infección); se ha reportado que en el caso de infecciones por *VRS* la eliminación del virus es usualmente de 3 a 7 días de iniciada la infección y en las infecciones del tracto respiratorio bajo de 1 a 36 días (33,116).

Las muestras fueron colectadas por hisopado nasal. Aunque los lavados nasales y faríngeos, comparados con los hisopados, habitualmente son más productivos en cuanto a la recuperación del material viral ⁽⁵⁹⁾; la facilidad de realización y la cooperación que brinda el paciente (niños pequeños) son factores por los que se prefirieron los hisopados nasales.

La cepa viral con que se realizó este trabajo fue obtenida por hisopado nasal de un paciente remitido al laboratorio desde el Hospital del Niño para confirmar diagnóstico clínico de infección respiratoria por *VRS*. La confirmación fue realizada por IFD (ver página 58).

4.2 TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS.

Para mantener la viabilidad de virus en las muestras colectadas es necesario considerar el medio y condiciones en que se mantendrá al material biológico, hasta su procesamiento. Tomando en cuenta que los virus envueltos, como es el caso de *VRS*, son relativamente más lábiles comparados con los no envueltos, las muestras fueron colectadas para ser transportadas e inmediatamente ser conservadas a 4°C en

medio mínimo esencial de Eagle (E-MEM) que contiene nutrientes, fuente proteica, sales y antibióticos para minimizar la posible contaminación bacteriana. Bajo estas condiciones las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su procesamiento. En concordancia con la recomendación de Bromberg y col. la infección de las células fue siempre en tiempos menores a 24 horas de colectada la muestra ^(55,56).

4.3 AISLAMIENTO VIRAL.

El aislamiento viral es de la más alta sensibilidad y tiene, asimismo, una alta especificidad ⁽¹³⁰⁾. Teóricamente el ensayo puede detectar la presencia de un solo virión infectivo y, en función de la replicación viral *in vitro* se puede aumentar la sensibilidad sin afectar la especificidad. Adicionalmente, permite la identificación del agente etiológico así como su recuperación y preservación para estudios posteriores, por ejemplo de epidemiología molecular, resistencia a antivirales, desarrollo de ensayos diagnósticos, etc.

Para aislar el virus, la muestra fue resuspendida en el medio de transporte y pasada por filtros de nitrocelulosa con poro 0,45 μ m de diámetro para eliminar células, detritos celulares y agentes acompañantes (bacterias, levaduras, hongos). Cultivos de células *BHK-21* en policubetas de 24 pozos y en tubos Vacutainer con una confluencia celular de 80% fueron infectadas con 2 mL de la muestra para permitir la adsorción viral, las células fueron incubadas por 2 horas a 37°C y 99% de humedad, luego de este tiempo el medio fue reemplazado por medio de cultivo (RPMI-1640 con 5% suero fetal bovino) e incubado por 5 días. Al quinto día de infección, el sobrenadante fue sometido a pases de cultivo sucesivos, utilizando para eso células recientemente tratadas con Solución de Versene, hasta obtener una cepa viral con efecto homogéneo de lisis en toda la monocapa celular. Cuando esto se produjo, alícuotas virales fueron dispuestas en criotubos y congeladas a -196°C hasta su uso en los experimentos ⁽³³⁾.

4.4 DETECCIÓN DE VRS

Los componentes virales detectables en cultivo o en muestras directas incluyen ácidos nucleicos, antígenos estructurales y enzimas inducidas por virus. En el laboratorio la replicación activa del virus fue detectada mediante

Inmunofluorescencia Directa utilizando Ac monoclonales anti *VRS* (*IMAGEN*TM-k6102).

Estas técnicas, entre otros procedimientos inmunológicos son de amplia aplicación y fundamentales en Virología para la identificación, clasificación y cuantificación de agentes virales ya sea con fines de investigación, de diagnóstico o de estudios epidemiológicos⁽⁶⁰⁾.

Para el ensayo se prepararon células (de hisopado nasal o de cultivo celular infectado) en portaobjetos perfectamente limpios, las placas fueron fijadas, para conservar la morfología y estructura celular existente con acetona fresca a 15 – 30°C por 10 minutos y fueron conservadas a – 4 °C por 24 horas o a -20°C por tiempo prolongado hasta su posterior procesamiento. Para determinar la expresión de antígenos virales, las muestras celulares (citospin) fueron incubadas con 25 uL de anticuerpo monoclonal anti-proteína de fusión y antinucleoproteína del virus conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC). Luego de una incubación por quince minutos a 37°C en cámara húmeda, se eliminó el exceso de antisuero por lavados con buffer fosfato salino (PBS); posteriormente se adicionó 20 uL de glicerina tamponada en el centro de cada “citospin” y se colocó el cubreobjetos evitando la formación de burbujas. Las placas se examinaron con microscopio de Epifluorescencia (Olympus CH-4) con 200X y 400X de magnificación. Las células infectadas con *VRS* se observaron con gránulos citoplasmáticos de fluorescencia color verde – manzana. Las células no infectadas se observaron de coloración roja, por el Azul de Evans (colorante de contraste).

5. OPTIMIZACIÓN DE MONITORES PARA LA CUANTIFICACIÓN VIRAL Y EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL.

5.1 EVALUACIÓN POR EFECTO CITOPÁTICO.

Como se trata de muestras vivas y con poco contraste para el control morfológico del cultivo de células se empleó el microscopio que posee la fuente de iluminación y los objetivos invertidos con respecto a la platina de un microscopio convencional., el microscopio se equipa con el dispositivo de contraste de fases (diafragmas similares a nivel del condensador y placa de fases entre las lentes de los objetivos) que permiten observar las formas celulares sin colorante al aumentar el contraste de la

imagen por lo que la calidad obtenida es superior. Esto permite detectar las alteraciones morfológicas que algunos virus producen en las células donde se multiplican, de modo tal que los cultivos infectados desarrollan en el transcurso del tiempo cambios celulares, que ponen en evidencia la acción ejercida por el virus sobre la célula. Dichas alteraciones se conocen con el nombre de acción citopática (ACP) ó efecto citopático (ECP), siendo características de cada sistema virus-célula (135).

Inicialmente, el efecto de los virus sobre las células es sutil y no se logra observar cambios. Aunque la cuantificación del inóculo en función de la magnitud de la acción citopatogénica no es estrictamente correlativa, se realizaron estimaciones semicuantitativas con fines comparativos. La estimación permitió documentar el progreso de la acción citopatogénica y establecer la presencia del agente que la despliega (50,136).

Las alteraciones que se observaron en la infección por *VRS* fueron:

- a) Destrucción de la monocapa con redondeamiento y desprendimiento de las células debido a la muerte provocada por el virus; este efecto se observa a 5 días de cultivo.
- b) Inducción de la formación de células multinucleadas llamadas policariocitos o sincicios, por la fusión de las membranas de varias células vecinas.
- c) Desarrollo de cuerpos de inclusión, el *VRS* es estructurado en el citoplasma y madura en la membrana celular, por esta razón pueden observarse inclusiones (eosinófilas/basófilas) en el citoplasma con halos muy prominentes, asimismo vacuolas (34,35,56).

Los parámetros tomados en cuenta para la evaluación realizada y el reporte de infección por el desarrollo de efectos citopáticos (ECP) fueron los que se detallan en la tabla 4.

Para la valoración total del Efecto Citopático en porcentaje a cada parámetro se le asignó un porcentaje con respecto al total de células de acuerdo a la importancia de la acción directa del virus sobre la célula. Esta caracterización fue realizada por comparación con células control no infectadas, lo cual permite diferenciar los cambios morfológicos inducidos por virus con los cambios que se visualizan a medida que las células envejecen.

Para mejor visualización del Efecto Citopático se incluyó además la tinción de cultivos; para esto células fueron fijadas con acetona por 10 minutos para posteriormente ser teñidas con Cristal Violeta y Giemsa por 5 minutos con el fin observar con mayor detalle los cuerpos de inclusión y sincicios.

Tabla 4.- Evaluación del Efecto Citopático inducido por la Infección viral por VRS

Parámetro Evaluado	Afectación con respecto al total de células	Valor relativo (*)	Valor arbitrario asignado en %
Aspecto celular, opalescencia, redondeamiento	1 – 50 %	+/-	10 %
	+ 51 %	+	
	1- 30 %	+	
Pérdida de adherencia celular	31 – 60 %	++	30 %
	+ 61 %	+++	
	1 – 30 %	+	
Cuerpos de inclusión	31 – 60 %	++	30 %
	+ 61 %	+++	
	1 – 30 %	+	
Vacuolas	31 – 60 %	++	30 %
	+ 61 %	+++	
	1 – 30 %	+	
Efecto Citopático			100 %
Total			

(*) Cada + corresponde a 10 % del valor arbitrario asignado para cada parámetro

5.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR EL ENSAYO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE MTT.

En 1983 Mosmann y Cols, desarrollaron un ensayo colorimétrico rápido para evaluar el crecimiento y sobrevivencia celular. Posteriormente se reportaron varias modificaciones de tal manera que en la actualidad muchos laboratorios de cultivo celular han adoptado este ensayo para la aplicación de una variedad de ensayos

biológicos que incluyen: localización intracelular de oxidoreductasas, test de la viabilidad celular, estimación del crecimiento celular, estudios de citotoxicidad, actividad de parásitos, bacterias y virus, etc ^(137,138,139,140,141,142,143).

Asimismo, el ensayo por su bajo costo, el uso de policubetas de cultivo, pipetas automáticas multicanal, y la lectura de varios pozos en breve tiempo con el espectrofotómetro lector de ELISA, permite trabajar con numerosas variables a la vez.

Este método está basado en la reducción de la sal de tetrazolio 3-(4,5 dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) ó MTS, XTT, CTC, por células activas metabolitamente ^(144,145). La reducción produce la ruptura del anillo de tetrazolio; la reacción es principalmente atribuida a la catálisis producida por deshidrogenasas mitocondriales, como la succinato deshidrogenasa y a transportadores electrónicos, razones por lo cual es considerado como un indicador de “actividad redox celular”. Existen evidencias de que la biorreducción del MTT en células mamíferas también puede ser catalizada por enzimas no mitocondriales ubicadas en el retículo endoplasmico, citoplasma y membrana plasmática ^(146,147). Sin embargo, independientemente de la fuente de oxidoreducción, en todo caso esta es un bioindicador de actividad celular.

El producto, es la formación de cristales de formazan azul intracelular la magnitud del conjunto de cristales está en directa proporción a la cantidad de células metabolitamente activas, insoluble en medio acuoso ⁽¹⁴⁸⁾.

Para el ensayo, 100 µL de solución de MTT (1 mg/mL en RPMI sin rojo fenol) fue adicionado a los cultivos en estudio, las placas fueron incubadas a 37°C por 4 horas para permitir la actividad enzimática y la formación de los cristales de formazan. Estos fueron disueltos con 150 µL de ácido clorhídrico-ácido isopropílico (1:24). Las placas fueron agitadas a temperatura ambiente por 15 minutos hasta su completa disolución; la intensidad del color de cada pozo fue medida en el lector de ELISA (AWARENESS. Technology inc) a una longitud de onda de 545 nm y a 630 nm de referencia ⁽¹⁴⁹⁾.

Una vez medida la Densidad Óptica, los datos fueron empleados para: determinar el porcentaje de sobrevivencia celular y así determinar la actividad biológica del producto estudiado.

5.3 EVALUACIÓN POR EL ENSAYO DE FORMACIÓN DE PLACAS VIRALES.

El ensayo de reducción de placas (PRA) fue incorporado por Dulbeco en 1952; se fundamenta en que cada partícula infecciosa en contacto con un monoestrato confluyente da lugar a un foco de desarrollo denominado “placa”, este representa un área focal del efecto citopático viral después de un periodo de incubación producto de la replicación viral e infección a células adyacentes, esta placa se observa como un espacio de lisis. El número de placas esta relacionada con la actividad viral (136,150,151,152).

Diluciones seriadas modulo 10x de la suspensión stock viral fueron inoculadas en volúmenes de 0,6 y 1 mL en monocapas celulares con 80, 90, 100 % de confluencia contenidas en cajas Petri de vidrio de 5,5 mm de diámetro y en policubetas de 24 pozos (Corning); se incubaron 2 horas a 37 ° C para permitir la adsorción del virus se agitó suavemente cada 15 minutos con el fin de incrementar el contacto virus-célula, además de evitar el desecamiento de las células. Luego de las 2 horas de incubación se retiró el inóculo, mediante el lavado de células con HBSS, para luego cubrir la monocapa con 5 mL de RPMI 5% SFB conteniendo 1% y otro con 0,5% de agar a 45°C, para que una vez gelificada la mezcla limite el área de diseminación de la infección y se de lugar a la formación de placas. Posteriormente se invirtieron las placas y se incubó por diferentes tiempos bajo condiciones de cultivo celular.

Transcurrido el periodo de incubación, se procedió a fijar las células con formol al 10% en PBS; el revelado se hizo coloreando las células con Rojo Neutro 0,1% en RPMI sin suplementar por 1 hora a temperatura ambiente, Otra variante ensayada fue con la tinción cristal violeta (1% cristal violeta, 5% ácido acético, 60% metanol, 25% agua) por 30 minutos a temperatura ambiente, el exceso de colorante fue lavado adicionando agua y agitando suavemente. Posteriormente se realizó el recuento del número de placas virales.

6. CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS: DETERMINACIÓN DE LA DOSIS INFECTIVA MEDIA EN CULTIVO CELULAR. (TCID₅₀).

En el análisis cuantitativo de virus se aplican diferentes métodos para determinar el número de partículas víricas en una muestra. Algunos métodos determinan el número

de partículas directamente (microscopía electrónica, hemoaglutinación de Glóbulos Rojos), mientras que otros realizan la determinación cuantitativa de la infectividad, a través de procedimientos de titulación. El título se expresa como el número de unidades infecciosas de una suspensión viral por unidad de volumen. Estos dos métodos no dan el mismo resultado, ya que no todas las partículas virales que se observan por microscopía electrónica son necesariamente infectivas. Por lo anterior, la determinación cuantitativa de la infectividad es la más apropiada para los propósitos que se buscan en este trabajo.

Para lograr lo anterior se realizaron diluciones seriadas, modulo 10x desde 10^{-1} a 10^{-7} en HBSS, de la suspensión viral sotck para infectar, en un volumen de 100 uL fue adicionado a monocapas celulares de 80% de confluencia contenidas en policubetas de cultivo de 96 pozos de fondo plano. Una hilera de pozos fue destinada para el control negativo: HBSS sin suspensión viral. Las placas se cultivaron por 2 horas, el sobrenadante fue desechado, las células se lavaron con HBSS y luego cultivadas con RPMI-5% SFB bajo condiciones de cultivo celular por diferentes tiempos. La determinación de la TCID₅₀ se realizó por evaluación del Efecto Citopático (ECP) y por la reducción de sales de Tetrazolio (MTT).

Cada ensayo se realizó 3 veces, y cada ensayo tenía tres replicados.

Para evaluar el Efecto Citopático, inducido exclusivamente por virus, se comparó la morfología celular de células infectadas con células no infectadas.

$$ECP = ECP_t - ECP_c$$

Donde: ECP: Efecto Citopático inducido por acción viral

ECP_t: Efecto Citopático en células con infección viral

ECP_c: Efecto Citopático en células sin infección viral.

Además la determinación de la TCID₅₀ se calculó por el Método de Reed y Muench⁽¹³⁶⁾. Este método toma en cuenta el Efecto Citopático que exhibe cada pozo (de una placa de 96 pozos) buscando el 50% del total de pozos. Cada dilución contó con cuatro unidades (replicados) en los que se registro el desarrollo gradual del ECP en cada pozo tomando en cuenta lo siguiente:

- 0: No ECP
- 1: ECP parcial (menos del 50% exhiben ECP)
- 2: Cerca del 50% de las células exhiben ECP
- 3: Cerca del 75% de las células exhiben ECP
- 4: La monocapa está totalmente destruida.

Se consideró como positivo 1-4 para ECP. La acumulación en columnas de unidades infectadas y no infectadas con respecto al total nos permitió hallar el porcentaje de infección. Para hallar la dilución correspondiente al 50% de ECP se tomó en cuenta los valores cercanos (superior e inferior). La distancia proporcional entre las dos diluciones fue calculada tomando en cuenta:

$$\text{Distancia proporcional} = \frac{(\% \text{ arriba } 50\% - 50\%)}{(\% \text{ arriba } 50\% - \% \text{ abajo } 50\%)}$$

La TCID₅₀ fue calculada de la siguiente manera:

$$\text{TCID}_{50} = (\log. \text{ Dilución arriba del } 50\%) + (\text{distancia proporcional} \times \log. \text{ factor de dilución})$$

El Porcentaje de sobrevivencia celular para el Ensayo de Reducción Enzimática de MTT se calculo de la siguiente manera:

$$\% \text{ sobrevivencia celular} = \frac{\text{DO}_t}{\text{DO}_c} \times 100$$

Donde: DO_t = Densidad Óptica de cultivo celular infectado

DO_c = Densidad Óptica de cultivo celular no infectado

7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE *Opuntia soehrensii* SOBRE LA INFECCIÓN POR VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL.

Para evidenciar la posible actividad biológica del extracto de *O. soehrensii* sobre la infección viral se evaluó el efecto del producto vegetal sobre cada uno de los componentes que forman parte de la infección viral: la célula por un lado y el virus por otro, tanto así como también sobre la infección viral activa.

La actividad antiviral de *O. soehrensii* se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula para el ensayo de reducción enzimática de MTT.

$$\text{Actividad antiviral (\%)} = \frac{(\text{DO}_T)_{\text{VRS}} - (\text{DO}_C)_{\text{VRS}}}{(\text{DO}_C) - (\text{DO}_C)_{\text{VRS}}} \times 100$$

Donde: $(\text{DO}_T)_{\text{VRS}}$ = Densidad Óptica de células - *VRS* - *O. soehrensii*

$(\text{DO}_C)_{\text{VRS}}$ = Densidad Óptica de células - *VRS*

(DO_C) = Densidad Óptica de células sin infectar.

La mínima concentración de *O. soehrensii* requerida para inhibir el desarrollo de *VRS* en un 50% denominada Concentración Efectiva Media (CE_{50}), fue evaluada de acuerdo con lo propuesto por Weislow *et. al.* ⁽¹⁵³⁾.

Para los resultados del análisis observacional del Efecto Citopático se tomo en cuenta la fórmula descrita en el acápite correspondiente a cuantificación viral.

7.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE *O. soehrensii* SOBRE LAS CÉLULAS EN CULTIVO ANTES DE LA INFECCIÓN.

Para evaluar el efecto del extracto vegetal en las células, este fue adicionado sobre cultivos en policubetas de 96 pozos con 80% de confluencia celular a diferentes concentraciones. Para esto el extracto fue resuspendido en RPMI con 3% de SFB a una concentración de 31 mg/mL a partir de las cuales se hicieron diluciones seriadas. Los pozos destinados a controles negativos y controles de infección se cultivaron con medio suplementado libre del extracto. Luego de diferentes tiempos de incubación, los extractos y medios fueron descartados por lavado con HBBS 3 veces. Después se procedió a la infección inoculando con 100 uL de suspensión de *VRS* diluida 10000 veces de la suspensión stock en HBSS.

Transcurridas 2 horas de adsorción viral en condiciones de cultivo celular el sobrenadante fue removido y el exceso de virus fue descartado por lavado con HBSS. Todas las células fueron cultivadas con 200 uL de RPMI 5% SFB por 72 horas, al cabo del cual se evaluó el Efecto Citopático y se realizó el ensayo de MTT.

7.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE *O. soehrensii* SOBRE EL VRS ANTES DE LA INFECCIÓN CELULAR.

Se pusieron en contacto diferentes concentraciones del extracto acuoso con el VRS (dilución 1/200 de la suspensión stock viral) en RPMI sin suplementar (en ausencia de células), se incubaron por 24 horas bajo condiciones de cultivo celular. Al cabo de este tiempo, este fue diluido en RPMI sin suplementar 1/50; 100 µl de esta suspensión fue inoculada a monocapas celulares con una confluencia de 80%. Se permitió la adsorción viral por 2 horas a 4°C, se eliminó el virus no adsorbido por lavados de la monocapa celular con HBSS y se adicionó 200 uL de RPMI 5% SFB a todos los pozos. Las células se cultivaron por 72 horas bajo condiciones de cultivo celular, para luego evaluar el Efecto Citopático y realizar el ensayo de MTT.

7.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE *O. soehrensii* SOBRE LA INFECCIÓN VIRAL ACTIVA.

En forma simultanea cada dilución de *O. soehrensii* fue mezclada con VRS (suspensión viral final correspondiente a una dilución 1/10000 de la muestra stock) en HBSS e inmediatamente fue inoculada en monocapas celulares con 80 % de confluencia.

Se permitió la adsorción viral a 37°C por 2 horas; se eliminó el sobrenadante por lavados con HBSS y, posteriormente se adicionó 200 uL de RPMI 5% SFB para incubar bajo condiciones de cultivo celular por 72 horas; la evaluación se realizó por Efecto Citopático y ensayo de MTT.

En posteriores ensayos las células fueron infectadas con VRS por 2 horas, luego se removió el exceso del virus y se adiciono diferentes concentraciones del extracto disuelto en RPMI 5% SFB) a diferentes tiempos después de la infección. Los cultivos se mantuvieron por 72 horas, hasta la evaluación del Efecto Citopático y la realización del ensayo de reducción de la sal de MTT.

VIII. RESULTADOS.

1. EXTRACTO VEGETAL

Por cada mililitro de extracto acuoso de *O. soehrensii* al 4 % se obtuvieron 15 mg de producto liofilizado. Para los ensayos el extracto fue resuspendido con medio de cultivo a una concentración de 84 mg/mL; a partir de esta solución (solución madre) se realizaron las diluciones necesarias para llegar a las concentraciones requeridas en todos los ensayos.

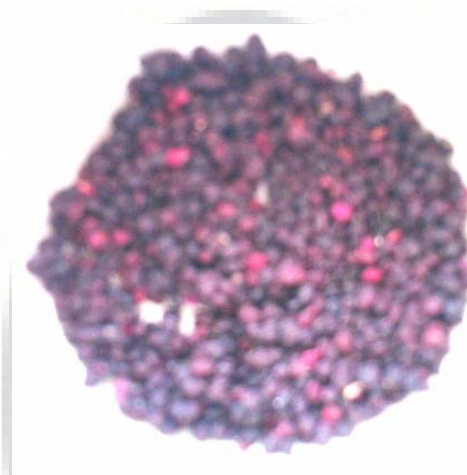


Figura 10.- *O. soehrensii*. Las semillas de *O. soehrensii* fueron trituradas para extraer los componentes hidrosolubles y posterior liofilización.

2. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

Se realizaron varios ensayos hasta lograr las características descritas en el capítulo correspondiente a material y métodos. En cada ocasión, se introdujeron variaciones experimentales con la finalidad de obtener practicidad y alto rendimiento con respecto a la utilización de los diferentes materiales y reactivos necesarios para el cultivo; así como también el conocimiento y las habilidades necesarias para el manejo de células y virus bajo condiciones estándar de trabajo en laboratorio.

Así, se comprobó que la viabilidad y densidad celular homogéneas a lo largo de todos los ensayos realizados son fundamentales para obtener resultados reproducibles. De acuerdo con esto solamente se realizaron los ensayos con aquellas poblaciones celulares que tenían por lo mínimo 95% de viabilidad celular. En relación a la densidad celular se testaron concentraciones de $1,5 \times 10^5$ cel/mL, $1,8 \times 10^5$ cel/mL y 2×10^5 cel/mL. La concentración celular con la que se obtuvo un

80% de confluencia celular a las 24 horas de cultivo fue la correspondiente a $1,8 \times 10^5$ cel/mL. Para fines experimentales posteriores se mantuvieron dichas condiciones. La figura 11 muestra células de 24 horas de cultivo en crecimiento exponencial.

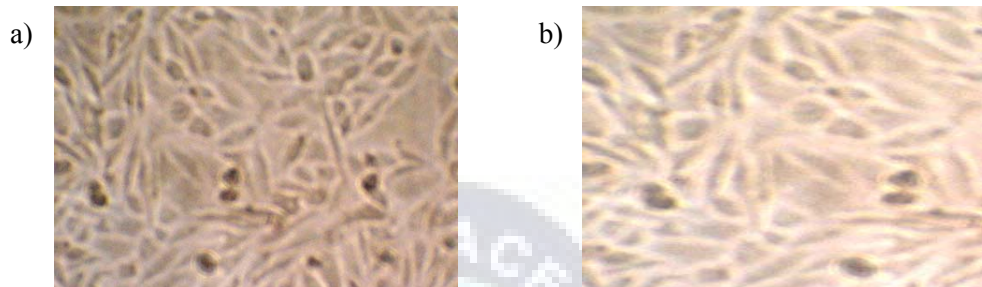


Figura 11. – Células BHK-21 en cultivo. Células con 80% de confluencia obtenidas luego de 24 horas de incubación con inóculo inicial de 100 μ L de suspensión celular a una concentración de $1,8 \times 10^5$ cel/mL. a) Aumento 100X, b) Aumento 200X.

3. CULTIVO DEL VIRUS

3.1 AISLAMIENTO VIRAL

El VRS fue aislado a partir de muestras clínicas. La infección primaria llevo 8 días en provocar lisis del 100% de la monocapa de células *BHK-21*. Se realizaron 6 “pases” de cultivo sucesivos para obtener una cepa viral con Efecto Citopático visible a los 3 - 4 días, evidenciable por la presencia de inclusiones, vacuolas diferenciadas. El cultivo fue cosechado y alícuotado en tubos de criopreservación para su conservación; este cultivo fue denominado: suspensión viral stock y con este se realizaron todos los ensayos posteriores.

3.2 DETECCIÓN DE VRS.

Para confirmar la presencia de VRS en las muestras clínicas, en el aislamiento viral, así como en el cultivo de virus se detectaron antígenos virales en las células infectadas por

Inmunofluorescencia Directa con Anticuerpos Monoclonales Anti-VRS (figura 12). La figura 12a muestra células epiteliales de la muestra directa con fluorescencia positiva color verde “manzana” como patrón citoplasmático, la figura 12b muestra células BHK-21 con 3 días de infección correspondiente al sexto ‘pase’; las células

infectadas aparecen fluorescentes, mientras que las células no infectadas del control negativo (figura 12c) se observan de color rojo pálido por el colorante de contraste Azul de Evans.

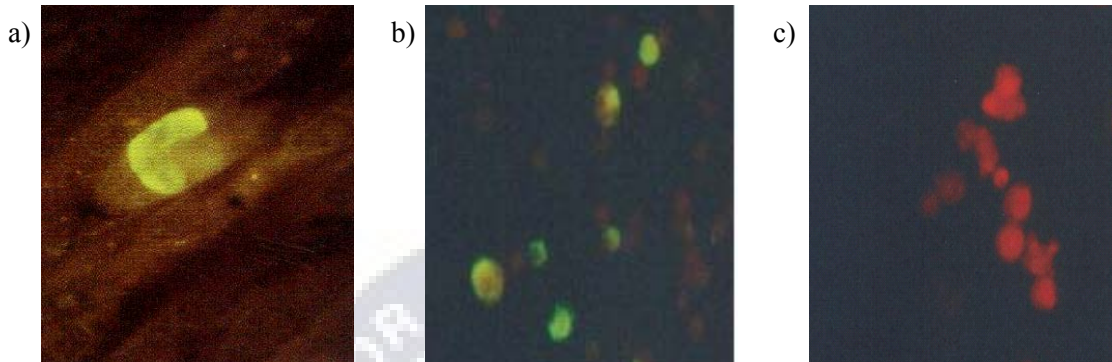


Figura 12. – Expresión de Antígenos de *Virus Respiratorio Sincitial* en la membrana celular.

a) célula epitelial de hisopado nasal infectada con *VRS*, procesada inmediatamente luego de tomada la muestra. Las células presentan patrón positivo de infección por *VRS*. b) células *BHK-21* infectadas con *VRS* cosechadas a las 72 horas de cultivo, fijadas y procesadas para la detección de proteínas antigénicas virales por IFD; c) Células *BHK-21* no infectadas (control negativo) con 72 horas de cultivo procesadas por IFD. Aumento 400X.

Dos variantes llevadas a cabo en el proceso de obtención de las condiciones óptimas para el cultivo y replicación del virus, fue la de infectar *VRS* en células *BHK-21* contenidas en dos sistemas de cultivo: a) tubos Vacutainer cerrados herméticamente y b) policubetas de 24 pozos. Al observar los resultados de la Inmunofluorescencia Directa a las 72 horas de cultivo, se notó en la variante a) fluorescencia tenue opalescente y menor cantidad de células positivas con relación a la variante b) donde la fluorescencia se observa más intensa y la proporción de células positivas es mayor (figura 13). Por lo anterior se optó por el segundo sistema para la amplificación viral y para la realización de los ensayos que se reportan en este trabajo

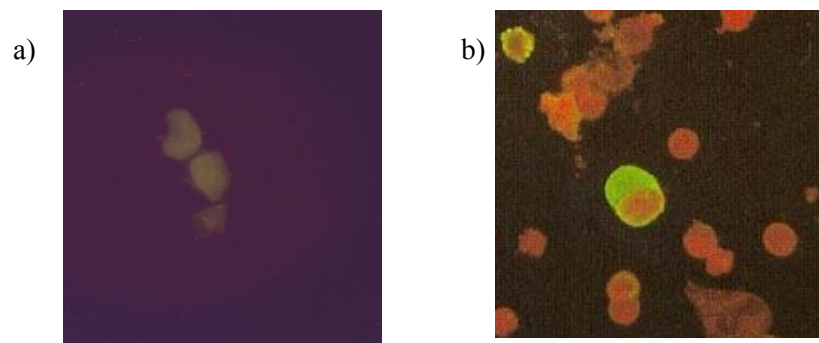


Figura 13.- Estudio comparativo de la expresión de antígenos virales. *VRS* en dos sistemas:

a) análisis morfológico por microscopia de fluorescencia a las 72 horas de infección en tubos

cerrados herméticamente, nótese la opalescencia y la fluorescencia que no es característicamente color verde “manzana”.

b) análisis morfológico por microscopia de

fluorescencia después de 72 horas de infección viral en policubetas, patrón característico de fluorescencia. Aumento 400X.

4. OPTIMIZACIÓN DE ENSAYOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN VIRAL.

4.1 EVALUACIÓN POR EFECTO CITOPATICO.

La evaluación directa de los cultivos infectados fue realizada diariamente, por comparación con los controles negativos, (células cultivadas en iguales condiciones, pero no infectadas). En general, a las primeras 24 horas de cultivo con el virus el aspecto morfológico de las células no presenta cambio en relación a las células del control no infectado. A las 48 horas se evidenciaron pequeñas inclusiones aproximadamente en el 30% de las células del cultivo; a las 72 horas se observó la presencia de inclusiones citoplasmáticas y redondeamiento celular en el 70% de células. Finalmente, a las 96 horas de la infección se observaron inclusiones en el 100% de células, redondeamiento celular, vacuolas citoplasmáticas y pérdida de adherencia celular. Comparativamente el control negativo no presentó cambios morfológicos (figura 14).

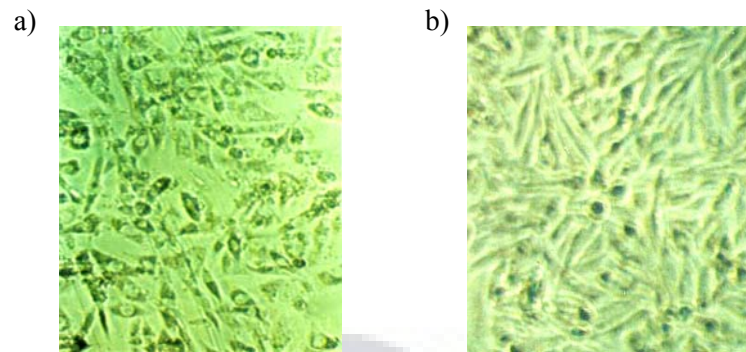


Figura 14.- Análisis morfológico de células *BHK-21* infectadas con *VRS*.
 a) Observación microscópica luego de 72 horas de infección; nótese la presencia de inclusiones citoplasmáticas, redondeamiento celular y vacuolas, en comparación con b) control negativo, células incubadas en las mismas condiciones pero sin infección viral, las células mantienen la morfología de fibroblasto, sin alteraciones notables.
 Aumento 200 X

La tinción con cristal violeta de células infectadas permitió visualizar la formación de Sincicios, producto de la fusión de células infectadas con *VRS* con células adyacentes, la apariencia es de células gigantes policariocíticas característicos de la infección de *VRS*, además de inclusiones citoplasmáticas (figura 15).

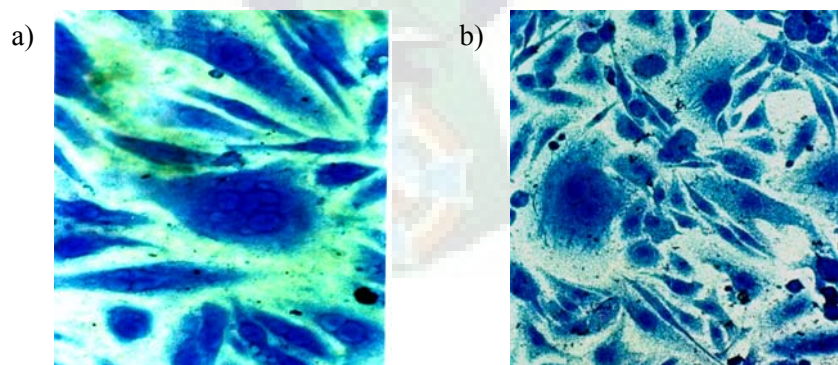


Figura 15. Análisis morfológico de células *BHK-21* infectadas con *VRS*. Efecto citopático luego de 72 horas de infección; nótese la presencia de sincicios (células policariocíticas por la fusión de varias células), además de inclusiones citoplasmáticas y redondeamiento celular. Tinción Cristales de Violeta, aumento 400 X.

4.2 EVALUACIÓN POR DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR EL ENSAYO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE MTT.

La cuantificación de la sal de Tetrazolio reducida nos muestra un gradual incremento de la reducción enzimática directamente proporcional a la población celular, existe una relación lineal entre el formazan producido y el número de células metabólicamente activas o viables. Es importante señalar que para disolver los cristales de formazan se debe realizar el homogeneizado perfectamente y llevar inmediatamente al lector de placas de ELISA, puesto que el alcohol usado para disolver los cristales coagula las proteínas y estos forman grumos que alteran la suspensión homogénea pudiendo dar lugar a lecturas de absorbancia erróneas.

Los espectros de absorción de las sustancias varían de acuerdo a las interacciones de la sustancia y el medio en el que se encuentra disuelto. Por esto se evaluó inicialmente las lecturas del formazan generado a 492 nm de longitud de onda, pero existe mejor sensibilidad a pequeños cambios con 545 nm y 630 nm de referencia de longitud de onda, por lo que se hicieron las lecturas del ensayo de MTT a esta longitud de onda (figura 16).

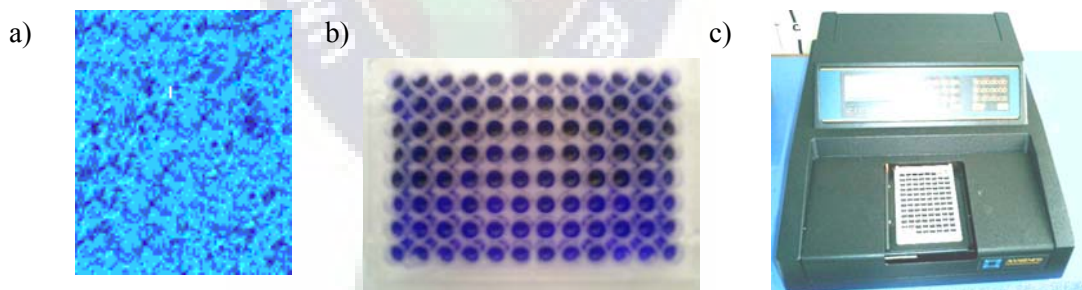


Figura 16.- Ensayo de reducción de MTT. a) En esta figura se muestra las sales de Tetrazolio reducidas a cristales de formazan por la acción oxidante mitocondrial. Principalmente, aumento 10X b) Las placas de micro-titulación correspondiente a un ensayo de MTT, el color azul corresponde al derivado de formazan, siendo su intensidad proporcional a la cantidad de células viables presentes en el cultivo. c) Lector de placas de ELISA, la longitud

de onda empleada en la que se obtienen mayor absorbancia, es 545 nm y 630 nm de referencia.

4.3 EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN VIRAL POR EL ENSAYO DE FORMACIÓN DE PLACAS.

Después de realizar diversos ensayos en células *BHK-21* en los que se modificó la confluencia celular, concentración de agar, tiempo de incubación, colorante, se pudo observar que el desarrollo de placas inducido por *VRS* no es óptimo para su cuantificación reproducible debido a las dimensiones de las placas son muy pequeñas. Esto hizo dificultosa la diferenciación entre las placas inducidas por virus, y los espacios que se forman cuando hay redondeamiento celular (datos no mostrados). Se evaluó, incluso el quinto día esperando que el tamaño de la placa aumentara; sin embargo, lo que se observó es mayor proporción de muerte celular, debido al agotamiento de nutrientes del medio de cultivo. Por esto una vez transcurrido este tiempo (en el sistema celular empleado) se determinó que los ensayos de formación de placas en células *BHK-21* a las condiciones estudiadas no constituyen un ensayo reproducible y de medición objetiva por lo que se optó por no incluir el mismo para la cuantificación de actividad viral.

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

La cuantificación del *VRS*, mediante la determinación de la Dosis Infecciosa Media en Cultivo Celular (TCID₅₀), se realizó por dos métodos: por un lado se observó microscópicamente las células testadas para estimar el Efecto Citopático (ECP) y por otro, para confirmar los resultados obtenidos con ECP se realizó el ensayo de reducción de MTT.

La observación detallada de los cultivos celulares, a lo largo de los ensayos con diferentes concentraciones de *VRS*, mostró la existencia de cambios morfológicos en directa relación con la concentración de virus. Para valorarlos, como se detalla en Material y Métodos se tomaron en cuenta los parámetros de: aspecto celular, pérdida de adhesión celular, cuerpos de inclusión citoplasmáticos y vacuolas.

Los cultivos examinados por ECP, fueron posteriormente evaluados por el ensayo de MTT, para hallar el porcentaje de sobrevivencia celular a la vez valorar la correlación entre ambos parámetros. Las evaluaciones se realizaron a las 48, 72 y 96 horas, los resultados obtenidos se muestran en las figuras 17, 18 y 19.

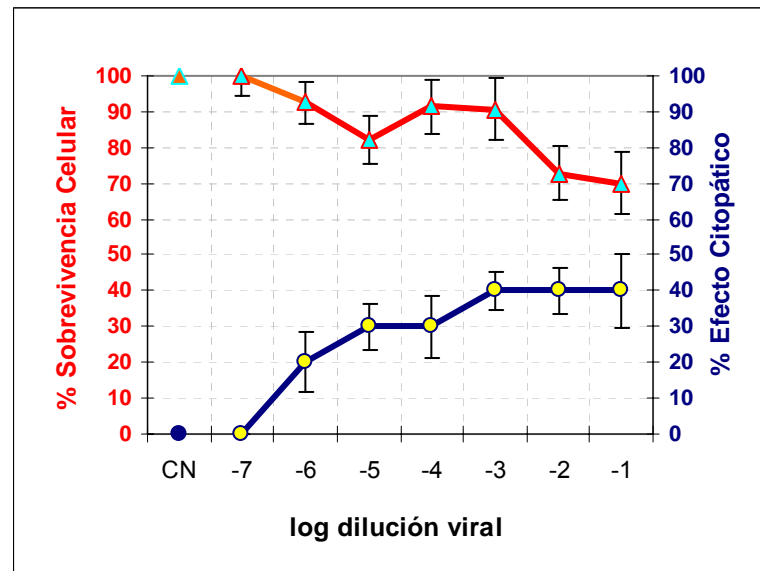


Figura 17.- Actividad biológica de *VRS* a 48 horas de cultivo. Porcentaje de sobrevivencia de células BHK-21 infectadas con diferentes concentraciones de *VRS* por 48 horas, según el ensayo del MTT (▲ CN, ▲ diferentes concentraciones de *VRS*) y el ECP (● CN, ● diferentes concentraciones de *VRS*). Ambos resultados se expresan en términos porcentuales con relación al control negativo (células no infectadas). Los resultados son la media \pm DS de 3 experimentos independientes.

La interacción virus-célula por 48 horas con diferentes concentraciones de virus muestra que los resultados de sobrevivencia celular se encuentran por encima del 50%, lo mismo que a la evaluación morfológica tampoco se observa Efecto Citopático significativo, incluso en los cultivos que corresponden a las interacciones con mayor carga viral (figura 17).

Luego de 72 horas de cultivo a diferentes concentraciones de *VRS*, los resultados muestran una relación dependiente de la concentración de virus. La sobrevivencia celular es inversamente proporcional a la concentración del virus y el ECP es directamente proporcional a la concentración viral.

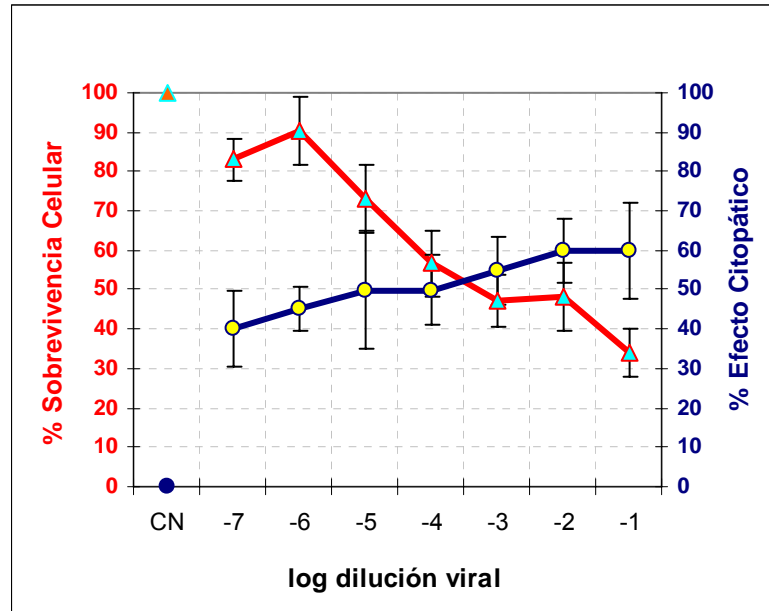


Figura 18.- Actividad biológica de *VRS* a 72 horas de cultivo. Porcentaje de sobrevivencia de células BHK-21 infectadas con diferentes concentraciones de *VRS* por 72 horas, según el ensayo del MTT (▲ CN, ▲ diferentes concentraciones de *VRS*) y el ECP (● CN, ● diferentes concentraciones de *VRS*), ambos resultados se expresan en términos porcentuales con relación al control negativo (células no infectadas). Los resultados son la media \pm DS de 3 experimentos independientes.

La actividad biológica de *VRS* a 72 de cultivo indica que la $TCID_{50}$ se encuentra aproximadamente entre las diluciones correspondientes a 10^{-3} y 10^{-4} de la suspensión stock, los controles sin infectar no presentaron ninguna alteración morfológica, lo cual valida ampliamente el ensayo.

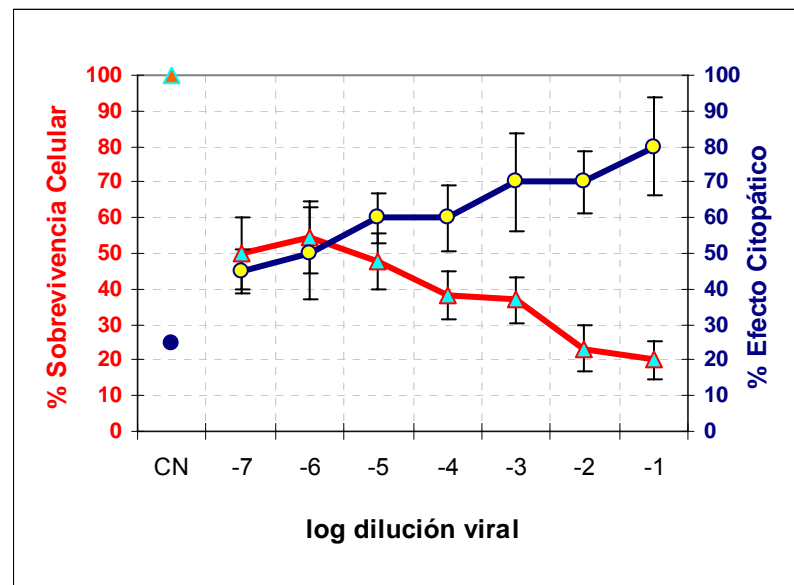


Figura 19.- Actividad biológica de *VRS* a 96 horas de cultivo. Porcentaje de sobrevivencia de células BHK-21 infectadas con diferentes concentraciones de *VRS* por 96 horas, según el ensayo de MTT (▲ CN, ▲ diferentes concentraciones de *VRS*) y el ECP (● CN, ● diferentes concentraciones de *VRS*), ambos resultados se expresan en términos porcentuales con relación al control negativo (células no infectadas). Los resultados son la media \pm DS de 3 experimentos independientes.

El ensayo de MTT y el análisis de ECP realizado en células con concentraciones crecientes de *VRS* a las 96 horas de cultivo, muestran que el efecto sobre la actividad enzimática y la morfología presenta una $TCID_{50}$ cercana a la dilución correspondiente a 10^{-6} . Comparando con el control negativo en el que también se observan algunas alteraciones morfológicas en menor proporción (“normales” para el tiempo de cultivo), podemos decir que las alteraciones presentadas constituyen aquellos debidos a la saturación de la confluencia celular y como consecuencia existe desprendimiento celular por agotamiento de nutrientes del medio de cultivo; efectos que alteran la morfología y fisiología de la célula y que no provienen directamente por inducción de la infección viral.

En la figura 20 se correlaciona la sobrevivencia celular determinado por el ensayo de reducción de la sal de MTT con la aparición de alteraciones morfológicas inducidas por la acción viral (Efecto Citopático), los datos corresponden a la Dosis infectiva

Media en Cultivo Celular a las 48, 72 y 96 horas, la sobrevivencia celular (actividad enzimática celular) es inversamente proporcional a la aparición del Efecto Citopático con $R^2=0,7449$ según el paquete estadístico STATA/SE 8.0.

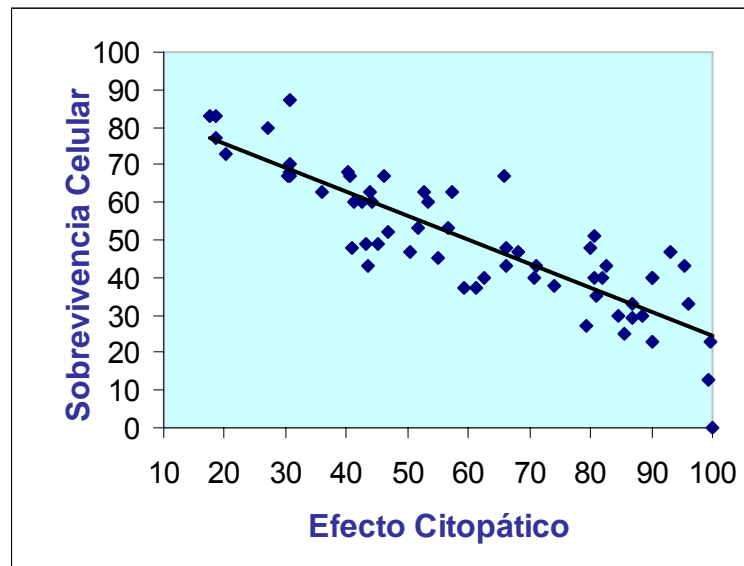


Figura 20.- Correlación de la Sobrevivencia Celular con el Efecto Citopático. Datos de sobrevivencia celular por el ensayo de reducción de MTT con relación al Efecto Citopático, obtenidos de la determinación de la Dosis Infecciosa Media en Cultivo Celular a las 48,72 y 96 horas.

El $TCID_{50}$ (Dosis Infecciosa Media en Cultivo Celular) es definido como la dilución del virus requerido para infectar el 50% del cultivo celular inoculado. Es un ensayo cuantitativo de infectividad viral en el que cada pozo infectado da solo parte de información si hay ECP o no. Si bien el título de $TCID_{50}$ no indica cuantas unidades infecciosas están presentes en una muestra dada, este otorga datos sobre cual es la dosis o dilución a la cual la muestra viral produce un ECP en el 50% del cultivo celular inoculado.

Este valor para fines de precisión también fue calculado de acuerdo con el método de Reed y Muench.

Los resultados obtenidos a las 72 horas luego de la infección por Virus Respiratorio Sincitial se muestran en la tabla 5.

Tabla 5.- Determinación de la $TCID_{50}$ empleando el método de Reed y Muench.

A 72 horas luego de la infección por VRS de células BHK-21.

En la tabla 5 la dilución que corresponde al 50% se encuentra entre las diluciones 10^{-3} (57,1% infectados) y 10^{-4} (25% infectados). La distancia proporcional entre las dos diluciones fue calculada de la siguiente manera.

Log de la dilución viral	Unidades infectadas	Acúmulos infectados (A)	Acúmulos no infectados (B)	Radio de A/(A+B)	Porcentaje infectado
-1	4/4	11	0	11/11	100
-2	3/4	7	1	7/8	87,5
-3	2/4	4	3	4/7	57,1
-4	1/4	2	6	2/8	25
-5	1/4	1	9	1/10	10
-6	0/4	0	13	0/12	0
-7	0/4	0	17	0/12	0

$$\text{Distancia proporcional} = \frac{(57,1\% - 50\%)}{(57,1\% - 25\%)} = 0,22$$

$$50\% \text{ del Efecto Citopático} = (-3) + (0,22 \times (-1)) = -3,22$$

Los resultados obtenidos son:

$$\text{TCID}_{50} \text{ para 48 horas de infección} = \frac{10^{-2,25} \text{ ID}_{50}}{0,1 \text{ mL}} = \frac{10^{-3,25} \text{ ID}_{50}}{1 \text{ mL}} = 3,25$$

$$\text{TCID}_{50} \text{ para 72 horas de infección} = \frac{10^{-3,22} \text{ ID}_{50}}{0,1 \text{ mL}} = \frac{10^{-4,22} \text{ ID}_{50}}{1 \text{ mL}} = 4,22$$

$$\text{TCID}_{50} \text{ para 96 horas de infección} = \frac{10^{-4,19} \text{ ID}_{50}}{0,1 \text{ mL}} = \frac{10^{-5,19} \text{ ID}_{50}}{1 \text{ mL}} = 5,19$$

0,1 mL

1 mL

Como es de esperar, la dilución en el que se encuentra la TCID₅₀ es mayor conforme aumenta el tiempo de cultivo de virus, en el que existe mayor producción de partículas virales. Las TCID₅₀ halladas por el método de Reed y Muench para los tiempos de 48, 72 y 96 (figura 21) horas son similares a las calculadas en las gráficas correspondientes a los ensayos de ECP y MTT.

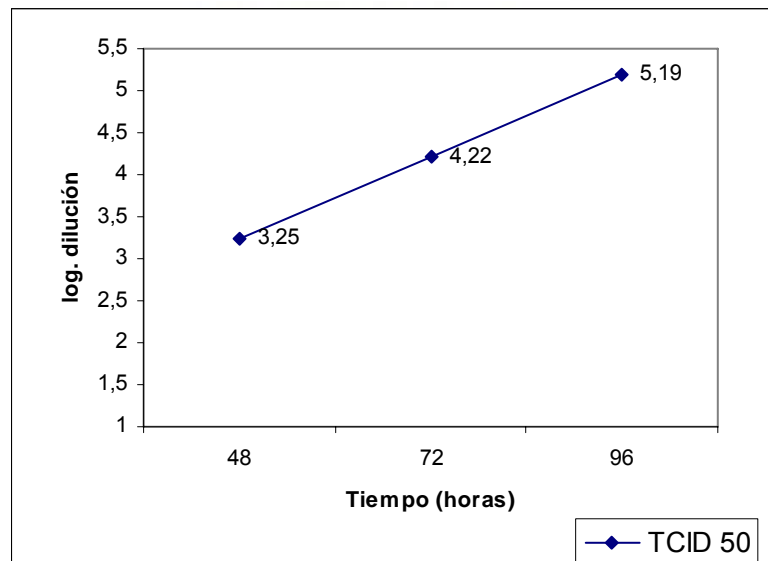


Figura 21.- Determinación de la TCID₅₀ por el método de Reed y Muench. Se evaluó Efecto Citopático inducido por la infección por VRS mediante el método de Reed y Muench a las 48, 72 y 96 horas, en ensayos con 4 replicados.

Para evaluar la actividad de *O. soehrensii* en los ensayos en cualquier tiempo de incubación, se trabajó con la dilución más cercana a la TCID₅₀ (10^{-4}), por esto los siguientes experimentos la determinación se realizó a las 72 horas.

6. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE *O. soehrensii* In Vitro, SOBRE LA INFECCIÓN POR VRS.

Una vez estandarizadas las condiciones óptimas de desarrollo de VRS en cultivo celular, se exploró la posibilidad de que el extracto vegetal en estudio pueda ejercer actividad antiviral en cultivo. De acuerdo con el conocimiento de la medicina tradicional, esta fue evaluada a través de la determinación de la actividad de *O. soehrensii* sobre el proceso infeccioso activo. Para determinar el blanco de acción se

realizaron estudios sobre los componentes de la infección viral, el hospedero celular y el virus.

6.1 EFECTO DEL EXTRACTO *O. soehrensii* SOBRE LAS CÉLULAS *BHK-21*, ANTES DE LA INFECCIÓN VIRAL.

Para determinar el efecto antiviral del extracto acuoso en las células y explorar la posible inducción de un estado antiviral, estas fueron cultivadas con varias concentraciones del producto por el lapso de 24 horas previa a la infección con *VRS*. Al cabo de los cuales el extracto fue eliminado por lavados y se realizó la infección de acuerdo con la siguiente relación; se evaluó cuatro replicados por cada variable.

A:	Células	+	-----	+	-----
B:	Células	+	(2,1 mg/mL <i>O. Soehrensii</i>)	+	-----
C:	Células	+	(31 mg/mL <i>O. soehrensii</i>)	+	<i>VRS</i>
D:	Células	+	(21 mg/mL <i>O. soehrensii</i>)	+	<i>VRS</i>
E:	Células	+	(2,1 mg/mL <i>O. soehrensii</i>)	+	<i>VRS</i>
F:	Células	+	(0,21 mg/mL <i>O. soehrensii</i>)	+	<i>VRS</i>
G:	Células	+	(0,021 mg/mL <i>O. soehrensii</i>)	+	<i>VRS</i>
H:	Células	+	-----	+	<i>VRS</i>

Luego del cultivo por 72 horas se realizó el ensayo para evaluar el Efecto Citopático del virus y el ensayo de reducción de MTT. Se realizaron 3 ensayos independientes en similares condiciones; la figura 22 muestra los resultados.

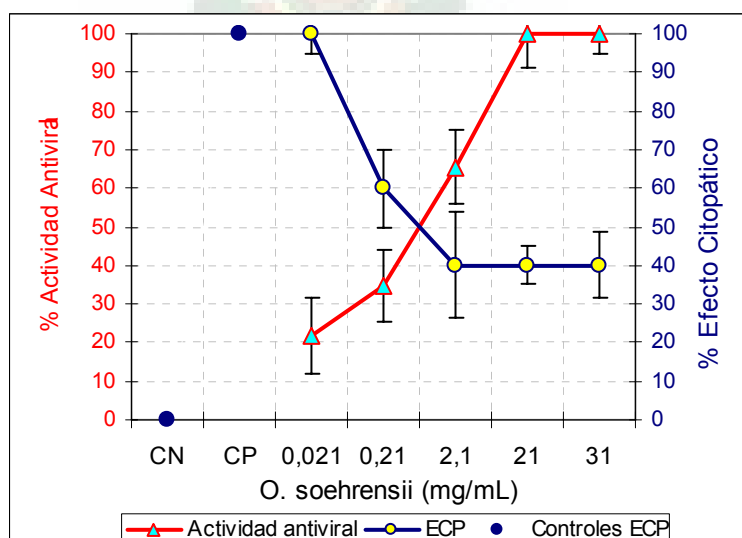


Figura 22.- Efecto del pretratamiento de células BHK-21 con varias concentraciones de *O. soehrensii* durante 24 horas antes de la infección viral. Evaluación del efecto de *O. soehrensii*, sobre las células BHK-21 previo al proceso de infección viral, las células fueron cultivadas con diferentes concentraciones del producto por 24 horas. Los resultados se expresan en términos porcentuales. Cada valor representa el promedio \pm DS de 3 ensayos independientes.

El tratamiento de las células con *O. soehrensii* 24 horas previo a la inoculación viral reduce la infectividad de manera dosis-dependiente, a mayor concentración corresponde mayor actividad antiviral; la actividad antiviral y el Efecto Citopático total se determinó de acuerdo a parámetros descritos en Material y Métodos. La CE_{50} (concentración efectiva media) se encuentra entre 2,1 mg/mL y 0,21 mg/mL; a esta concentración la *O. soehrensii* produjo un 50% de sobrevivencia celular con respecto al control positivo de infección (figura 22). El efecto de pretratamiento de células BHK-21 por *O. soehrensii* fue también explorado mediante ensayos cinéticos, en similares condiciones con tratamiento de 6 y 3 horas previas a la infección. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 23 y 24.

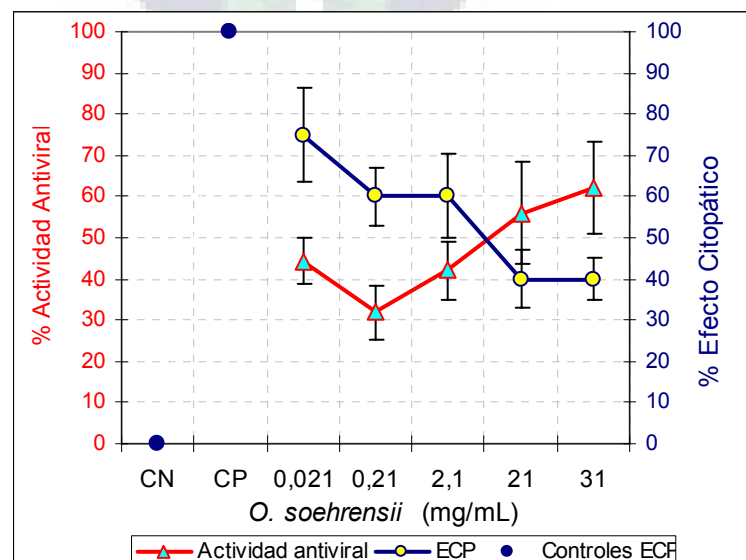


Figura 23.- Efecto del pretratamiento de células BHK-21 con varias concentraciones de *O. soehrensii* durante 6 horas antes de la infección viral. Evaluación del efecto de

O. soehrensii, sobre las células BHK-21 previo al proceso de infección viral, las células fueron cultivadas con diferentes concentraciones del producto por 6 horas. Los resultados se expresan en términos porcentuales. Cada valor representa el promedio \pm DS de 3 ensayos independientes.

El pretratamiento de las células con *O. soehrensii* durante seis horas previa a la inoculación viral muestran actividad antiviral a mayor concentración que en experimentos de exposición de 24 horas ya que la concentración efectiva media se encuentra entre 2,1 y 21 mg/ml del extracto acuoso.

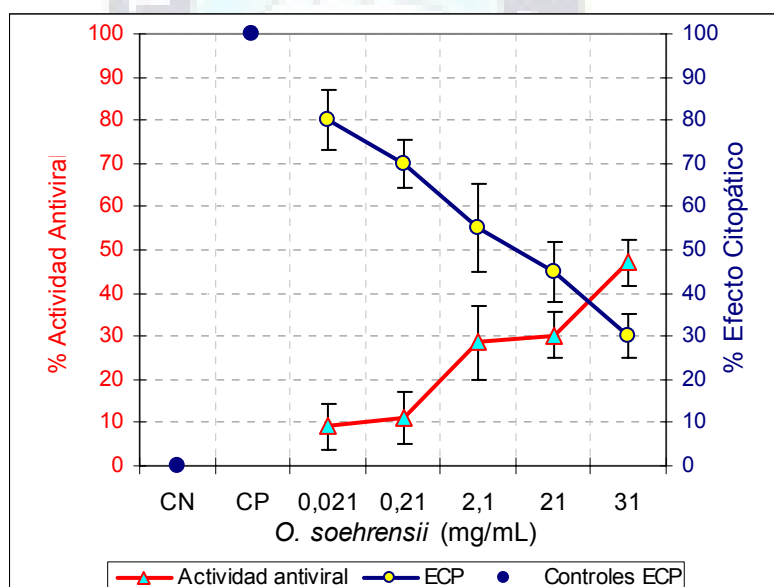


Figura 24.- Efecto del pretratamiento de células BHK-21 con varias concentraciones de *O. soehrensii* durante 3 horas antes de la infección viral. Evaluación del efecto de *O. soehrensii*, sobre las células BHK-21 previo al proceso de infección viral, las células fueron cultivadas con diferentes concentraciones del producto por 3 horas. Los resultados se expresan en términos porcentuales. Cada valor representa el promedio \pm DS de 3 ensayos independientes.

El efecto del extracto sobre las células con una incubación solo por 3 horas mostró un efecto protector de las células, solo a elevadas concentraciones del producto (figura 24), la CE_{50} se observa cercana a la máxima concentración de *O. soehrensii* en el ensayo de MTT y para el análisis observacional de ECP se encuentra entre 2,1 y 21 mg/mL de *O. soehrensii*.

La figura 25 muestra el efecto antiviral determinado por el ensayo de reducción de MTT a los diferentes tiempos de pretratamiento, donde se observa que las diferencias son evidentes.

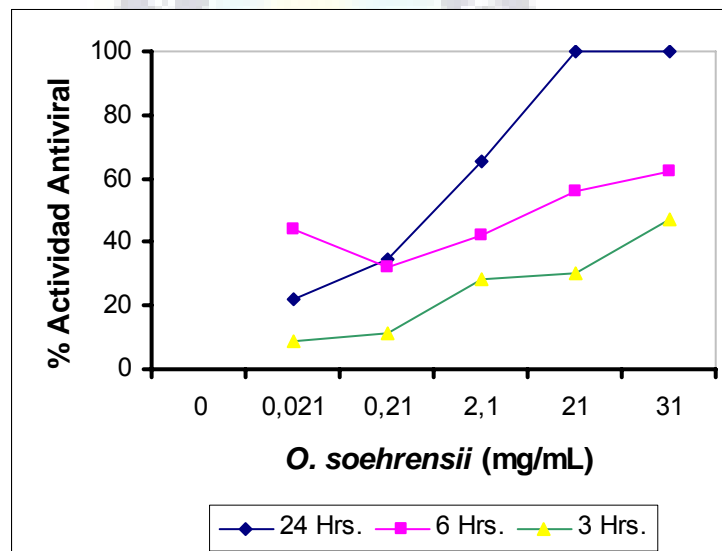


Figura 25.- Efecto del pretratamiento de células BHK-21 con varias concentraciones de *O. soehrensii*, previo a la infección viral. Células cultivadas previamente con *O. soehrensii* a diferentes concentraciones por 24, 6 y 3 horas fueron sometidas a la infección por VRS, para después de 72 horas ser evaluadas. Los resultados se expresan en términos porcentuales, cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes.

6.2. EFECTO DEL EXTRACTO SOBRE EL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL.

Para testar la posibilidad de que el extracto de *O. soehrensii* pueda ejercer actividad virucida sobre el *VRS*, se exploró la capacidad infectiva del virus que se obtuvo de células infectadas. Para esto concentraciones de 31; 21; 2,1; 0,21 y 0,021 mg de *O. soehrensii* por mL de medio de cultivo fueron incubados con una suspensión stock del virus por 24 horas en condiciones de cultivo celular. Luego de este tiempo la concentración del virus fue diluida y sembrada en cultivos celulares a 4°C para permitir la adsorción viral y luego se removió el excedente de virus no adsorbidos así como el extracto para incubar en condiciones de cultivo correspondiente.

Además del control normal (CN, células bajo condiciones de cultivo sin virus, ni extracto), los ensayos se realizaron con 2 controles de infección: Control positivo (CP, células infectadas con *VRS* sin extracto) uno, sometido a 37°C por 24 horas en similares condiciones a los testados y el otro, se obtuvo directamente de la suspensión stock conservada a 4°C, ambos para controlar el efecto de la temperatura sobre la preincubación del *VRS*. La incubación a 37°C disminuyó la infectividad viral, aunque la variación con respecto al control conservado a 4°C no fue significativo (datos no mostrados), para hallar el porcentaje de sobrevivencia se tomó en cuenta la suspensión mantenida a 37°C por 24 horas.

El efecto del extracto sobre las partículas virales fue evaluado mediante el ensayo de MTT y la observación del Efecto Citopático, los resultados se muestran en la figura 26.

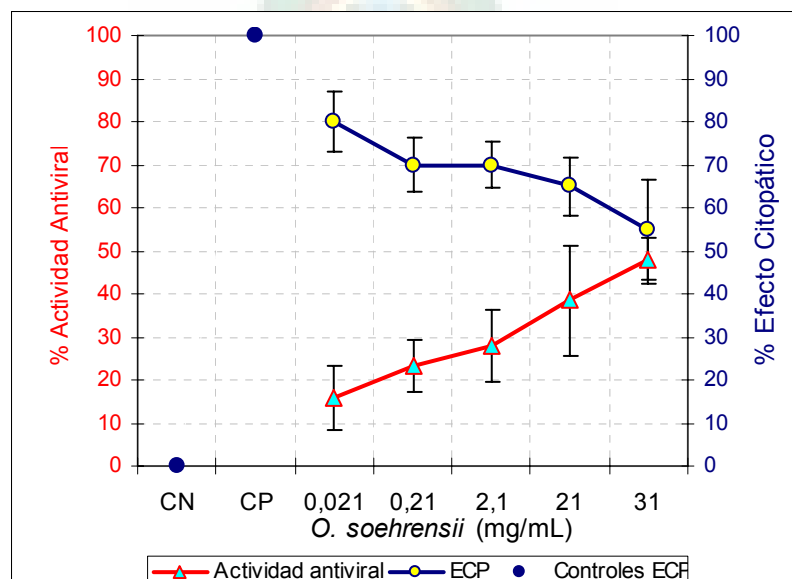


Figura 26.- Efecto de la incubación del extracto de *O. soehrensii* con *VRS* antes de la infección en las células. Varias concentraciones del extracto fue incubado con *VRS* por 24 horas a 37°C previo a la infección en células. Los resultados se expresan en términos porcentuales, cada valor representa la media \pm DS de 3 experimentos independientes

De acuerdo a los resultados obtenidos se tiene que a la preincubación de *VRS* con concentraciones progresivamente elevadas de *O. soehrensii*, la CE_{50} se encuentra aproximadamente a 31 mg/mL, solo a la máxima concentración ensayada se logra un decremento significativo de la infectividad, mientras que con las mínimas concentraciones no se observa que afecte la infectividad viral en forma significativa.

6.3 ACTIVIDAD DEL EXTRACTO DE *O. soehrensii* SOBRE LA REPLICACIÓN VIRAL ACTIVA: ENSAYOS SOBRE LA CINÉTICA DE INFECCIÓN.

Para evaluar la posibilidad de la interacción activa del extracto durante el proceso de replicación viral y la infección viral activa, se realizaron varios ensayos dependientes de la cinética de infección.

Un producto con actividad antiviral puede ejercer efecto en una o varias fases de la replicación del virus y también actuar en los procesos metabólicos celulares, virales durante la infección viral activa (interacción célula-virus). De acuerdo con esto, el extracto *O. soehrensii* fue estudiado en su capacidad de intervenir sobre la interrelación virus-célula.

Inicialmente se evaluó la capacidad de inhibición de la adhesión viral para esto el virus y el extracto fueron puestos en contacto con las células de modo simultáneo de acuerdo a la siguiente relación.

A:	(HBSS)	→	células
B:	(<i>O. soehrensii</i> 2,1 mg/mL)	→	células
C:	(<i>O. soehrensii</i> 31 mg/mL – <i>VRS</i>)	→	células
D:	(<i>O. soehrensii</i> 21 mg/mL – <i>VRS</i>)	→	células

E:	(<i>O. soehrensii</i> 2,1 mg/mL – VRS)	→	células
F:	(<i>O. soehrensii</i> 0,21 mg/mL – VRS)	→	células
G:	(<i>O. soehrensii</i> 0,021 mg/mL – VRS)	→	células
H:	(VRS)	→	células

Este ensayo fue realizado a 4°C para distinguir entre el efecto de unión virus-célula del proceso de fusión. Los resultados de 3 ensayos realizados en diferentes oportunidades se muestran en la figura 27.

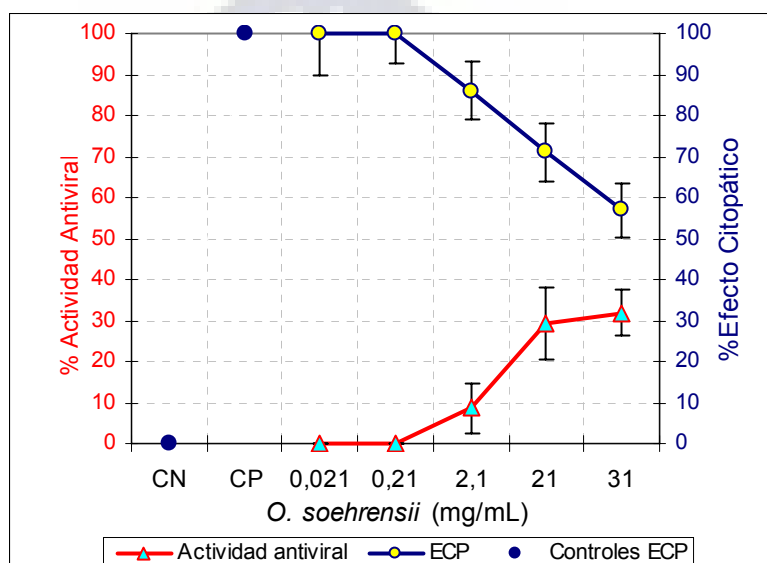


Figura 27. – Efecto de la adhesión de VRS a células BHK-21 en presencia de *O. soehrensii*. Luego de obtener una mezcla de VRS - *O. soehrensii* a concentraciones requeridas se infectó células para evaluar si *O. soehrensii* compete con el VRS por el sitio de unión a 4°C, luego de dos horas de adsorción se lavaron las células y se realizó el cultivo por 72 horas. Se evaluó por el ECP y el ensayo de MTT, los resultados son la media \pm DS de 3 experimentos independientes.

Los resultados mostrados en la figura 27 hacen ver que *O. soehrensii* no tiene efecto sobre la adhesión viral, a la máxima concentración de 31 mg/mL se obtuvo el porcentaje más elevado de actividad antiviral, aunque el valor no alcanza la CE₅₀. Estos resultados son corroborados por el análisis observacional del efecto citopático inducido por la infección.

Para evaluar el efecto de *O. soehrensii* sobre el proceso de fusión, el extracto fue incorporado al cultivo inmediatamente luego del periodo de adsorción y se mantuvo por 72 horas, hasta realizar los ensayos de MTT y observación del Efecto Citopático, los resultados se muestran en la figura 28.

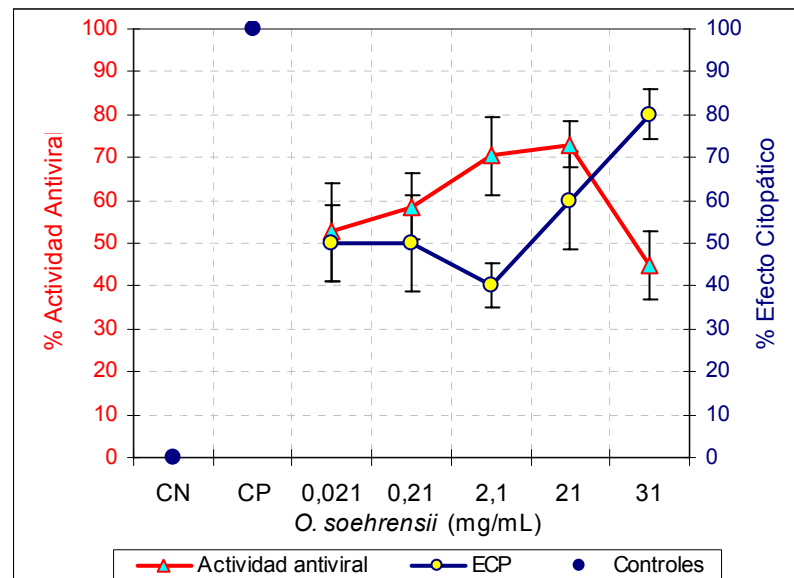


Figura 28.- Efecto del extracto de *O. soehrensii* adicionado inmediatamente después del periodo de adsorción viral. Transcurrido 2 horas del periodo de adsorción se incorporó el extracto de *O. soehrensii*, manteniéndose este por 72 horas hasta realizar la observación del ECP y el ensayo de MTT. Cada valor es la media \pm DS de 3 experimentos independientes.

Los resultados sugieren que *O. soehrensii* es capaz de inhibir el desarrollo viral, alcanzando la CE_{50} a 0,021 mg/mL por el análisis del ECP; para el ensayo de MTT se ubica por debajo de la concentración mínima ensayada.

También se observa una abrupta disminución de la actividad antiviral a la máxima concentración; a la observación microscópica las células presentaban peculiar redondeamiento general, aspecto notablemente opalescente con pequeñas inclusiones. A raíz de esta observación para los siguientes ensayos se suprimió la concentración de 31 mg/mL.

Llamo la atención que a la concentración mínima ensayada se observa una significativa actividad antiviral; para evaluar este efecto a concentraciones menores se realizó el ensayo empleando concentraciones gradualmente descendentes con similar procedimiento (figura 29)

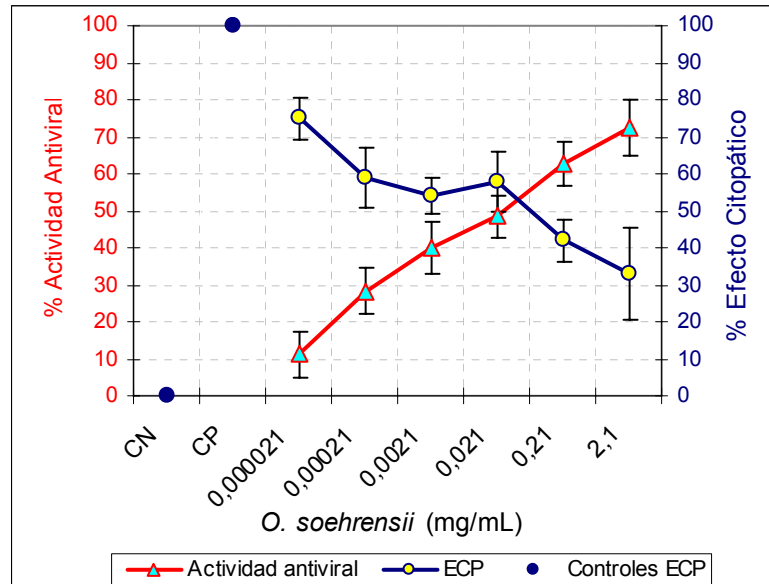


Figura 29.- Efecto del extracto de *O. soehrensii* inmediatamente luego del periodo de adsorción viral. Transcurrido 2 horas del periodo de adsorción viral se incorporó el extracto de *O. soehrensii*, manteniéndose este por 72 horas, hasta realizar la observación del ECP y el ensayo de MTT. Cada valor representa la media \pm DS de tres experimentos independientes.

La figura 29 representa los resultados obtenidos en los que se logra evidenciar el efecto de la *O. soehrensii* a dosis menores sobre la infección, mostrando una acción dosis- dependiente. Cuando la concentración de *O. soehrensii* es cercana a 0,021 y 0,21 mg/mL se alcanza la CE_{50} y se observa una disminución del efecto de *O. soehrensii* a concentraciones menores.

Con la finalidad de establecer el efecto de inhibición viral observado luego del periodo de adsorción, se realizaron estudios cinéticos incorporando el extracto a las 3 y 6 horas luego del periodo de adsorción, los resultados obtenidos son los siguientes. (Figura 30 y 31)

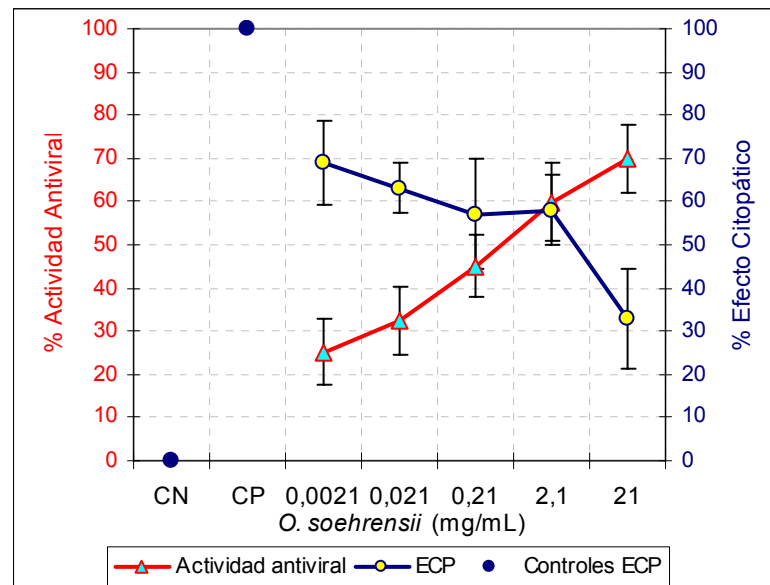


Figura 30.- Efecto de *O. soehrensii* sobre la infección viral activa de *VRS* en células BHK-21. Este ensayo fue realizado exponiendo al conjunto virus-célula, *O. soehrensii* 3 horas después del periodo de adsorción viral en cinco concentraciones diferentes. Se muestra los datos obtenidos en términos porcentuales de la actividad del extracto en comparación con controles positivo y negativo del ECP. Cada valor es el promedio \pm DS de 3 experimentos independientes.

El efecto de las diferentes concentraciones de *O. soehrensii* sobre la asociación virus-célula cuando el extracto se adiciona 3 horas después del periodo de adsorción se halla incrementada gradualmente en relación a las concentraciones, alcanzando la CE_{50} aproximadamente a 0,21 mg/mL para la determinación por el ensayo de MTT; para la observación del Efecto Citopático la CE_{50} se encuentra por encima de 2,1 mg/mL de *O. soehrensii*.

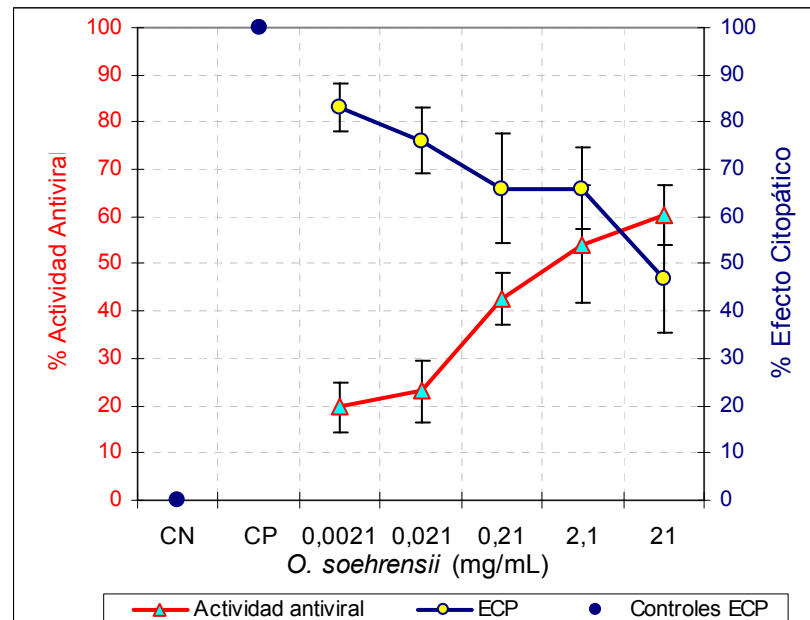


Figura 31.- Actividad antiviral de *O. soehrensii* sobre la interacción virus-célula, incorporado luego de 6 horas del periodo de adsorción viral. Para este ensayo el extracto se incorporó 6 horas luego del periodo de adsorción viral y se mantuvo hasta las 72 horas momento en el que se realizó la observación del ECP y el ensayo de MTT. Cada punto representa la media \pm DS de 3 experimentos independientes.

La incorporación del extracto de *O. soehrensii* luego de 6 horas del periodo de adsorción viral, mantiene el efecto antiviral de manera dosis dependiente. La CE_{50} es de aproximadamente 0,21 mg/mL y 21 mg/mL, a concentraciones menores la *O. soehrensii* no es capaz de proteger a la célula de la acción viral.

Las diferencias en el efecto cuando se adiciona a diversos tiempos luego de la infección viral se muestran en la figura 32.

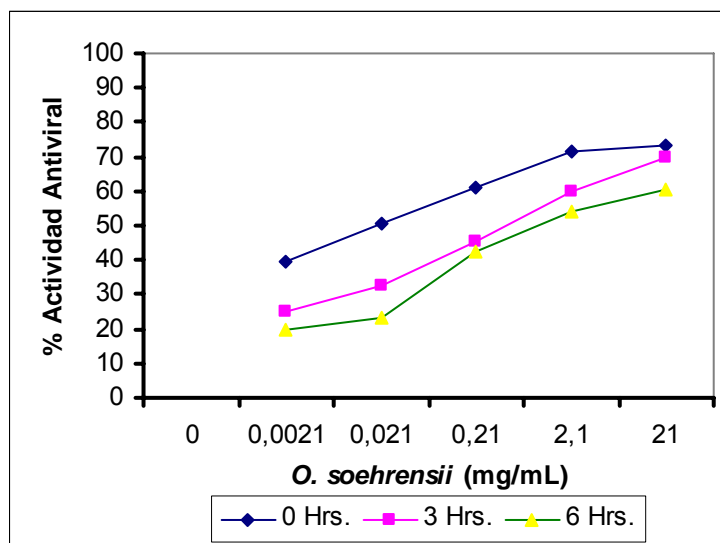


Figura 32.- Actividad antiviral de *O. soehrensii* sobre la interacción virus-célula. El Extracto de *O. soehrensii* se incorporó inmediatamente después del periodo de adsorción viral a las células en cultivo, así como también luego de 3 y 6 horas para ser mantenido por 72 horas, antes de la medición de la actividad antiviral por el ensayo de MTT. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes.

6.4 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE *O. soehrensii* EN RELACIÓN AL TIEMPO DE INOCULACIÓN VIRAL.

Para conocer cual es la etapa que es principalmente afectada por el extracto de *O. soehrensii* respecto al tiempo de infección viral (tiempo 0) y al cual el producto fue incorporado, se condensan los datos anteriores en la figura 33. En esta se distinguen dos etapas: preinfección y postinfección. La figura muestra la actividad antiviral cuando *O. soehrensii* se adiciona a diferentes tiempos antes y después de la inoculación a diferentes dosis. Puede establecerse que el mayor efecto biológico se observa cuando se adiciona 24 horas antes de la infección aunque la Concentración Efectiva Media a este tiempo es mayor. También existe efecto cuando se adiciona después de la inoculación y si bien el efecto antiviral no es total (100%) el máximo efecto ocurre con dosis menores del extracto; a dosis mayores no puede verse efectos notables por el envejecimiento del cultivo en presencia de *O. soehrensii*.

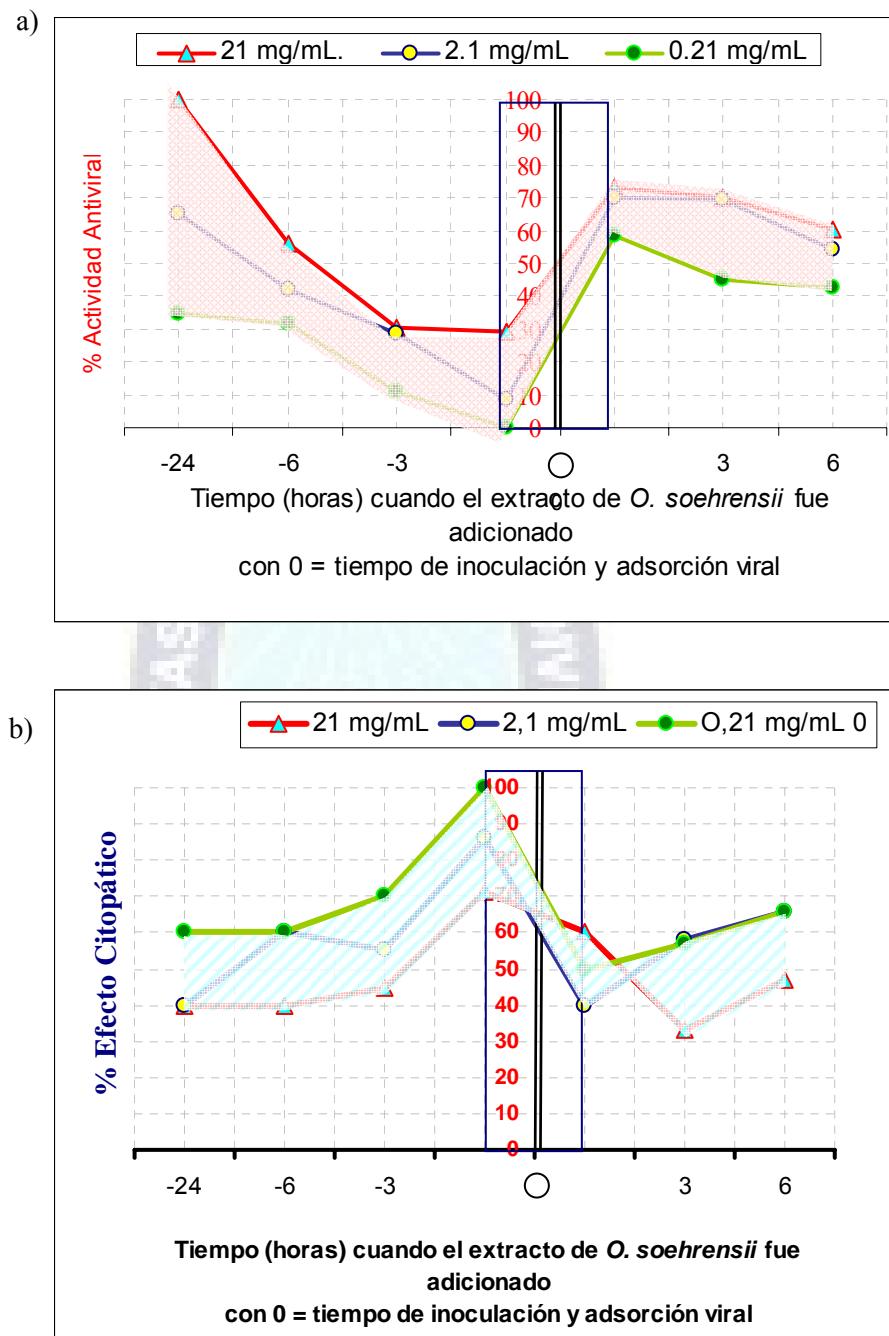


Figura 33.- Efecto de *O. soehrensii* antes, durante y después de la infección viral.
 a) porcentaje de la actividad antiviral, datos de la evaluación de la actividad enzimática mediante el ensayo de reducción de MTT. b) porcentaje del Efecto Citopático inducido por la infección viral.

IX. DISCUSIÓN

a. Características del *Virus Respiratorio Sincitial*.

Las características biológicas de desarrollo del *VRS*, hacen que sea importante tomar consideraciones particulares para su manipulación *ex vivo* que van desde la toma de muestra clínica hasta su aislamiento en laboratorio. La recuperación del virus a partir de muestras obtenidas en la fase crónica de la enfermedad por expectoración no necesariamente refleja la localización pulmonar de la infección, debido a la contaminación con agentes presentes en la faringe; algunas investigaciones evalúan la importancia de estos aislamientos y sugieren su empleo solo en casos de neumonía causado por *Virus de la Influenza* y *VRS*, alternativamente muestras obtenidas por aspiraciones transtraqueales o biopsia transbronquial orientan más a la localización, aun cuando por razones obvias son mucho menos frecuentes ⁽¹⁴⁾. En las muestras colectadas y procesadas se logró detectar el antígeno de *VRS* por Inmunofluorescencia Directa en la superficie de células epiteliales infectadas procedentes de la cavidad nasal en todos los casos, apoyando así la utilidad del muestreo por hisopado nasal en la fase aguda de la enfermedad comparada con los lavados nasales y faringeos recomendados.

Las discrepancias de datos existentes en la literatura sobre las características de multiplicación en líneas celulares, una vez aislada determinada cepa viral, además de la prevalencia de cepas ya sean del grupo A o B con sus diferentes subgrupos por regiones ^(21,33,34,105,107,108,109,111,112,154), han impulsado a trabajar con una cepa obtenida de muestra clínica. Esto conduce a que los estudios realizados sean válidos con cepas circulantes en nuestro medio.

En nuestro caso para otorgar la validez científica necesaria al trabajo se controló el tiempo de transporte, temperatura de mantenimiento, así como las características del medio de preservación a utilizar, considerando que de estos factores depende la conservación de la virulencia e infectividad viral *in vitro* sobre células permisivas ^(15,33,34,55).

La amplificación viral fue realizada en 2 sistemas de cultivo: con y sin intercambio gaseoso; Esto permitió establecer condiciones óptimas para la multiplicación viral; de acuerdo con lo observado, el cultivo viral en un ambiente herméticamente cerrado (tubos

Vacutainer) en comparación con el cultivo en policubetas, no es ideal para la replicación del virus, esto se podría explicar por las características de crecimiento del

virus *in vivo*, circunscrito a células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior, ambiente en donde existe alto grado de intercambio de O_2/CO_2 ⁽¹⁶⁾, tal ambiente no se proporcionaría en un tubo cerrado. Por otro lado al realizar sucesivos pases de infección en policubetas se apreció que existe reducción del tiempo en que se lleva a cabo cada ciclo replicativo viral (alrededor de 12 horas) ⁽¹⁴⁾, esto se explicaría por un proceso de selección *in vitro* de clones a partir de la cepa local de VRS, quedando viriones que poseen capacidad de infección elevada para la línea celular BHK-21.

Es conocido que luego del aislamiento y amplificación viral, su conservación mediante el método de exposición a temperaturas de $-196^{\circ}C$ en nitrógeno líquido (criopreservación), así como el proceso de descongelación del virus, alteran la estructura viral, disminuyendo la concentración infectiva del virión; debido a esto de manera posterior a estos procedimientos se determinó la Dosis Infecciosa Media en Cultivo Celular del stock viral previo a su uso en los diferentes ensayos.

Según las figuras número 18, 19 y 20 correspondientes a 48, 72 y 96 horas de cultivo respectivamente de células BHK-21 con infección viral, se encontró que el tiempo óptimo para determinar la $TCID_{50}$ es 72 horas. A las 48 horas de cultivo no se logra detectar Efecto Citopático ni alteración notable en la actividad enzimática celular. A las 96 horas el porcentaje de células afectadas es total, pero a este tiempo según lo observado en los controles de células sin infectar ya no son adecuados pues presentan alteraciones morfológicas (aunque no significativas), así se estima que las variaciones no se deben exclusivamente a la inducción de infección viral sino a aquellas que son propias del envejecimiento celular en cultivo. Por tanto, la $TCID_{50}$ se determina de manera óptima a las 72 horas además de no prolongar el tiempo para la realización de los ensayos a este tiempo se encontró diferencias en las alteraciones morfológicas y actividad enzimática relacionada de manera directa con la concentración viral (las diluciones por encima o por debajo del 50% no son adecuados, pues cambios en las dosis evaluadas tienen efectos relativos en la respuesta de células infectadas)

b. Tecnología de cultivo celular.

Para evaluar productos con potencial actividad antiviral de fuentes vegetales es requisito indispensable contar con instrumentos biológicos adecuados, lo que considera el trabajo con cultivos celulares, virus lábiles a factores ambientales

(especialmente *VRS*), volúmenes reducidos, material y medios de cultivo recientemente preparados y tratados especialmente para el mantenimiento de la fisiología celular y viral *in vitro*, factores que son importante tomar en cuenta puesto que cualquier variación en los ensayos hace que sea magnificada. En el afán de hacer efectivos estos procedimientos los materiales utilizados (frascos de Roux, policubetas de cultivo celular, tubos Vacutainer, cajas petri), sean lavados “grado cultivo celular” y esterilizados por radiación ultravioleta para emplearlos nuevamente. Para el uso de cada stock de material, se comprobó que la adherencia, desarrollo y viabilidad celular fueran similares a lo observado en materiales nuevos; esto demostró que el uso de estos materiales (además de tips, tubos falcon, viales, etc.), por mas de una vez es posible, disminuyendo de esta manera el costo de requerimiento de material en este tipo de ensayos controlados.

La consideración de este y otros aspectos permitió establecer y optimizar los ensayos; dicha optimización dio lugar a la cuantificación de la actividad antiviral de manera altamente reproducible en experimentos realizados de modo independiente y por triplicado.

Por tanto el trabajo aquí presentado abarca, por un lado, la optimización de ensayos sensibles a las variables en estudio y, por otro la evaluación de la actividad antiviral del extracto de *O. soehrensii* en el modelo de infección *in vitro*.

c. Ensayos para la cuantificación viral y evaluación del efecto antiviral.

Una variedad de interacciones son posibles entre un virus y la célula hospedera los resultados de la interacción de un sistema virus-célula susceptible pueden ser: a) infección citolítica donde el virus causa la muerte de la célula infectada, que es causado por los efectos del genoma viral en la célula y su regulación, b) un estado de infección no citolítico (no causa muerte) y el virus es producido continuamente por la célula, mientras el metabolismo y división celular no son alteradas, c) la infección del virus en un cultivo celular es oncogénico resultando en cambios morfológicos, bioquímicos y biológicos, estos cambios llevan a la formación de tumor⁽¹³⁶⁾.

Para cuantificar el stock viral así como determinar el efecto del extracto sobre la replicación viral, es necesario contar con ensayos que permitan evaluar varios replicados experimentales, obtener resultados en breve tiempo y menos complejos en su aplicación. Para esto se evaluaron tres ensayos: la observación directa del Efecto

Citopático, la reducción enzimática de la sal de tetrazolio y la formación de placas virales.

- El análisis de la observación directa del Efecto Citopático permitió distinguir alteraciones morfológicas inducidas por la infección viral, la evaluación se validó con la comparación con el control de células no infectadas, debido a que pueden aparecer en ellas cambios morfológicos no relacionados con la infección viral, puesto que la densidad de células en las líneas diploides y en particular en las líneas establecidas pueden hacerse muy alta y las células moribundas o en división pueden aparecer redondeadas o granulosas ⁽¹⁵⁵⁾. Como en todo cultivo pueden presentarse células atípicas aisladas, especialmente notables en las áreas menos densas, como los bordes de la monocapa donde, asimismo, puede hacerse evidente en primer lugar la acción citopatogénica de un virus. Por lo tanto y como se verá adelante en este trabajo resultó fundamental mantener controles no inoculados de células para cada ensayo realizado a similitud de lo observado por otros autores ^(121,135). De acuerdo con esto se consideraron: la pérdida de adherencia, aspecto celular (redondeamiento, opalescencia); presencia de cuerpos de inclusión y vacuolas en el citoplasma celular; formación de sincicios.

Existe mayor proporción de redondeamiento y pérdida de refringencia en las células infectadas por VRS.

La pérdida de adherencia se atribuye a la expresión de antígenos virales en la superficie celular, lo que altera la estructura externa normal de la célula, de esa manera se conduce a que las células se desprendan del soporte en menor tiempo en comparación con los que se desprenden por haber cumplido el ciclo de vida celular o por agotamiento de nutrientes del medio de cultivo.

La aparición de cuerpos de inclusión y posteriormente vacuolas en el citoplasma de células infectadas con VRS es uno de los parámetros característicos que definen a la infección viral, ello es debido a la generación de productos virales en el citoplasma de la célula hospedera los cuales al acumularse forman estructuras visibles al microscopio óptico ^(15,56).

Una observación, que nos pareció muy interesante, fue la formación de sincicios que se logró visualizar mejor cuando se coloreó la monocapa celular con Cristal Violeta; sin embargo la cuantificación de sincicios fue dificultosa

en los ensayos, por lo que no se tomo en cuenta para la valoración final del ECP. Según diversos autores la variación en la formación de sincicios se debe a factores como: algunos aislados de *VRS* requieren para formar sincicios de la glicoproteína F ⁽²⁵⁾. Shahrabadi y Lee demostraron que el medio de cultivo debe contener calcio para que el *VRS* induzca fusión en células Hep-2, la formación de sincicios puede ser relacionada, al menos en parte, con la concentración de glutamina en el medio de cultivo. Otro factor es el tipo de sustrato celular en el que se lleva a cabo la replicación viral, características que se deben tomar en cuenta para la optimización del ensayo. No existen datos con relación a células *BHK-21*, sin embargo, al parecer por los resultados otros deben ser los requerimientos, toda vez que el medio de cultivo contiene calcio a concentraciones de 0,1 g/L y 0,3 g/L de glutamina. Asimismo se debe considerar que no todas las cepas de *VRS* inducen la formación de sincicios *in vitro* ^(33,34).

- La cuantificación de la actividad metabólica celular por la presencia de enzimas reductoras que actúan sobre la sal de tetrazolio como indicador de viabilidad es un ensayo ampliamente empleado en la actualidad. La exactitud de sus resultados es comparada con el ensayo de formación de placas, sin embargo, es indispensable descartar factores que pueden dar lugar a reacciones inespecíficas como la presencia de ácidos grasos, proteínas del medio de cultivo o excluir factores externos como la temperatura y el tiempo de incubación que pueden alterar la directa proporcionalidad entre la actividad enzimática celular y la producción de cristales de formazan. Si bien existen discrepancias de la especificidad del rol de enzimas celulares que intervienen en la reducción de la sal, esto no consideramos ser tan trascendental como el hecho de diferenciar de la reducción inespecífica, puesto que al actuar exclusivamente las enzimas celulares la actividad metabólica celular en conjunto es evaluada, no identificando cual o cuales son las enzimas particularmente involucradas ^(146,156).

Los ensayos se realizaron siguiendo el método descrito por varios autores para la obtención de resultados fiables ^(147,157). Los valores obtenidos por el ensayo de reducción de MTT muestran correlación con los valores

encontrados luego de la observación del ECP (figura 20), ratificando lo observado con la correlación MTT-viabilidad en estudios previos ⁽¹²³⁾.

- El ensayo de formación de placas virales es el Gold Standard de la medición de la replicación viral. Sin embargo, en el caso de VRS la formación de placas obtenidas en sustrato celular *BHK-21*, no son adecuadas para el estudio de productos con efecto sobre la replicación viral. El diámetro de las mismas es pequeño lo que dificulta su identificación y cuantificación. Con la finalidad de optimizar la formación de áreas de lisis celular, se incluyeron variantes tales como la concentración del virus, la confluencia de la monocapa celular, tiempo de incubación viral, la concentración del agar en el medio de cultivo, el colorante de revelado y otros. En ninguna de las variantes se obtuvo la formación de placas virales cuantificables y reproducibles en número y aspecto en los replicados; por esto no se consideró la aplicabilidad de este ensayo a los propósitos del estudio.

La deficiente formación de placas virales se atribuyó a la línea celular empleada, no obstante que las células *BHK-21* son susceptibles a la infección de *VRS*. Por su parte, las características propias de la célula de ser más estable y resistente frente a cambios de condiciones de cultivo u otros factores externos, posiblemente generó condiciones para que el *VRS*, en su liberación desde la célula, no de lugar a un proceso lítico, ya que el virus se libera mediante una forma de exocitosis que produce la brotación de la partícula viral ^(14,16); también se plantea que *VRS* inhibe la apoptosis *in vitro*, esto hace que la célula conserve su vitalidad por mayor tiempo para la producción de más viriones y de esta manera facilitar su diseminación ⁽⁴²⁾, este dato es compatible con la dificultad para lograr la formación de placas de lisis en cultivo celular. Se empleó la línea celular *BHK-21* por poseer un tiempo de duplicación menor, lo que posibilita obtener una monocapa celular en menor tiempo, asimismo se utilizaron células con un número limitado de pases *in vitro* para evitar la variación de susceptibilidad a infección activa por *VRS*, siendo esto apto para fines de investigación ⁽¹²⁹⁾. No obstante que existen reportes de formación de placas en infección de *VRS* sobre células Hela y Hep-2 se sabe que estas células son más sensibles a los cambios de medio de cultivo y pH. Por otro lado, se considero que el tiempo necesario

para obtener respuesta luego de la infección viral es mayor en células Hela y Hep-2 lo cual reduce el margen de acción en el modelo aquí propuesto.

Con la finalidad de observar lisis celular debido a la replicación viral continua, se hicieron pruebas en los que se incubó por mayor tiempo; si bien se observaron áreas con lisis celular, sectores circundantes presentaban alteraciones morfológicas debido a otros factores como el agotamiento de nutrientes en el medio de cultivo sólido, lo cual mermó en la fiabilidad de los resultados. Todo lo anterior lleva a la necesidad de recalcar que es imprescindible considerar que la respuesta celular frente a un virus es dependiente del tipo de cultivo celular empleado en cada sistema de infección, las propiedades de la cepa viral, la concentración del virus en el inóculo de infección.

Cada variante ensayada se realizó con tres replicados con el fin de minimizar variaciones de resultados propios del sistema, tomando en cuenta que en ocasiones una dilución dada puede dar resultados negativos y una más diluida ser positiva.

Las diferencias en los resultados obtenidos en la optimización de los ensayos puede explicarse por la variación propia de cada ensayo en los sistemas *in vitro* virus-célula, añadiendo la sensibilidad de los ensayos para evaluar los diferentes parámetros tomados en cuenta con respecto a la fisiología y anatomía celular; entre estos se cita: a) la presencia de alteraciones morfológicas inducidas por la abundante cantidad de productos virales resultado de varios ciclos de replicación que ocasiona que los mismos se acumulen en el citoplasma celular, b) la actividad metabólica celular redireccionada a la síntesis de productos virales en forma continua cuando se lleva a cabo la replicación viral en forma activa y c) la capacidad del virus de lisar la célula que en este caso no da lugar por las características de liberación del *Virus Respiratorio Sincitial*.

d. Actividad antiviral de *O. soehrensii*, sobre la infección por VRS *in vitro*.

Para aproximarse al mecanismo de acción de *O. soehrensii* se evaluó por separado su efecto sobre los tres componentes que son parte de la infección.

Actividad sobre las células.

Inicialmente al incubar el extracto de *O. soehrensii* con células *BHK-21* antes de la infección, se evaluó el efecto del componente activo en la célula ante la posibilidad de que su presencia en esta pueda promover algún mecanismo que modifique a la célula ante la infección viral^(158,159). Los resultados de la exposición por 24 horas previo a la infección indican que la célula adquiere un estado de resistencia a los cambios inducidos por la infección viral, ya que disminuye la muerte celular en comparación con las células no tratadas con *O. soehrensii*, alcanzando la Concentración Efectiva Media a concentraciones entre 0,21 mg/mL y 2,1 mg/mL de *O. soehrensii* (figura 22). Una vez confirmada la existencia de actividad antiviral por tratamiento celular con *O. soehrensii* por 24 horas previo a la infección, el siguiente ensayo fue evaluar el efecto de *O. soehrensii* a menores tiempos de contacto, para esto se realizaron ensayos con exposición de *O. soehrensii* en las células por 6 y 3 horas antes de la infección, a estos tiempos se alcanzó la CE₅₀ a una concentración más alta (con respecto a las requeridas para 24 horas) que oscila entre 2,1 mg/mL a 21 mg/mL para las 6 horas de exposición (figura 23, 24), indicándonos que el ingreso del componente activo esta en directa relación con el tiempo de exposición. Para las 3 horas de exposición la actividad antiviral calculada por la medición de absorbancia de cristales de formazan no alcanzó la CE₅₀, a las concentraciones evaluadas, no obstante esta se encontraría cercana a 31 mg/mL de *O. soehrensii*; por el análisis observacional del ECP la CE₅₀ se encuentra entre 2,1 y 21 mg/mL.

Los resultados de la exposición de células con concentraciones crecientes de *O. soehrensii* por diferentes tiempos antes de ser sometidos a la infección viral nos señalan que existe la inducción de cierto estado antiviral en la célula de manera dependiente de la concentración del extracto y del tiempo de exposición (figura 25).

La importante actividad a mayor tiempo de exposición (24 horas) de *O. soehrensii* en la célula antes de la infección tiene varias explicaciones; un componente del extracto induciría modificación en la respuesta celular, entre ellas, la producción de interferon, una glicoproteína de reconocida actividad antiviral que actúa sobre receptores específicos de membranas celulares circundantes para posteriormente ser internalizado a la célula donde induce la producción de proteínas que inhiben la síntesis de RNA, promueve la síntesis de enzimas que fragmentan el DNA viral,

inhibe el mRNA y altera las membranas celulares, con lo que inhibe la replicación y liberación de los viriones, además de sus efectos inmunomoduladores ^(49,115). Por otra parte afectaría rutas metabólicas imprescindibles para la replicación viral.

Los resultados anteriores no permiten distinguir entre el efecto del extracto dado por la presencia de algún componente activo que activen mecanismos internos antivirales en la célula o por que el componente sin ingresar a la célula bloquea los sitios receptores de unión de la partícula viral ⁽¹⁶⁰⁾, manteniéndose en estas condiciones a pesar de los lavados para remover el exceso de extracto.

Actividad sobre el *Virus Respiratorio Sincitial*.

Al incubar *VRS* con el producto vegetal se evaluó la posibilidad de que el extracto de *O. soehrensii* posea algún componente que actúe de manera directa sobre las partículas virales y modifique su capacidad infectiva previo a su ingreso al hospedero susceptible; esto sería posible si los componentes del extracto se unen a la superficie del virión; Una probabilidad es que algún (os) componente (s) del extracto actúe específicamente recubriendo la glicoproteína G para evitar su adherencia. Es poco probable el ingreso y actividad lítica del componente activo en la partícula viral – efecto no esclarecido- ya que si esto ocurriese hay poca probabilidad de intervenir en algún proceso, puesto que, la actividad de replicación viral solamente se lleva a cabo cuando el virus ingresa a la célula hospedera, manteniéndose inerte fuera de ella ⁽⁹⁸⁾.

Los resultados a 24 horas de incubación de *O. soehrensii* - *VRS* no evidencian cambios significativos sobre la capacidad infectiva del virus. A la más alta concentración evaluada se obtuvo disminución significativa de la infectividad viral. Esta inactivación de la infectividad viral a elevadas concentraciones tiene muchas explicaciones factibles entre los que destaca un efecto residual en el proceso de infección viral.

Llamó la atención el cambio de color observado en la suspensión correspondiente a 31 mg de *O. soehrensii* por mL de medio de cultivo con *VRS*, con un viraje de color de rosado-escarlata a café-mostaza; esto parece ser el resultado de alguna reacción química que haría que las condiciones del medio de cultivo no sean adecuadas para mantener estable la infectividad viral, la desestabilización del pH es otra alternativa de explicación, especialmente para el *VRS* que es uno de los virus más exigentes en cuanto a condiciones requeridas para su conservación ⁽¹¹⁵⁾. Alternativamente esta

actividad antiviral podría explicarse por saturación de la concentración del extracto que interfiere en la adherencia viral o debido al hecho de que a pesar del tiempo (2 horas de adsorción viral) y la temperatura (4°C) el componente activo a concentraciones de 31 mg/mL haya logrado ingresar a la célula y dio lugar a la actividad antiviral. El hecho de observar que no obstante lo anterior a ninguna de las concentraciones ensayadas de *O. soehrensii* se presenta una actividad apreciable hace descartar la hipótesis de que el efecto antiviral o sobre el control de la infección viral esta dada por sustancias del extracto que sean inactivantes o tengan efectos tóxicos directos sobre la partícula viral, en forma previa a su ingreso al huésped susceptible (figura 26).

La labilidad de *VRS* a condiciones ambientales (temperatura), hizo que se adicionara un control de infección con *VRS* sin *O. soehrensii* incubado a 37°C, en idénticas condiciones a las suspensiones testadas (*VRS*- *O. soehrensii*), para evaluar si existe disminución de la infectividad debido a la temperatura y al cultivo extendido y no directamente a la actividad antiviral de *O. soehrensii*. Al comparar 2 controles, el primero mantenido a 37°C por 24 horas y el otro conservado a 4°C la evaluación no presento una diferencia significativa. No obstante, se tomo en cuenta el control mantenido a 37°C para determinar la actividad antiviral.

Actividad sobre la interacción virus-célula.

Los procesos de adsorción, fusión y penetración viral en la célula son atractivos blancos para la intervención terapéutica, particularmente en las infecciones agudas, tales como lo que ocurre en la infección por *VRS*. Estos procesos implican la neutralización del virus antes de infectar la célula con moléculas solubles que funcionen como receptores específicos de membrana celular (para *VRS* aún no identificado), o la neutralización del virus mediante la acción de agentes tales como los anticuerpos antivirales específicos⁽⁹⁸⁾. A pesar de que el mecanismo de entrada no es totalmente conocido, continúan los estudios para esclarecerlos. El *VIH* fue el sistema modelo para descubrir una nueva clase de inhibidores peptídicos, polisacáridos sulfatados, que bloquean las interacciones proteína-proteína en el proceso de fusión viral, a partir de este descubrimiento muchos grupos análogos de péptidos son identificados como inhibidores por bloqueo de la entrada viral,

presumiblemente por interferencia en el proceso de unión, adhesión, fusión o penetración ^(23,53,95,100,115,160,161,162).

En este trabajo se evaluó la posibilidad de actividad de *O. soehrensii* en la adhesión de *VRS*, obteniendo suspensiones virales con diferentes concentraciones de *O. soehrensii* para inmediatamente infectar células. Los datos obtenidos muestran que aparentemente no es posible alcanzar la CE_{50} (figura 27), descartándose por lo tanto que *O. soehrensii* compita por el sitio receptor de la superficie celular cuando se mantiene *O. soehrensii* con *VRS*-célula-. Es interesante hacer notar que existe cierta inhibición de la infección a la máxima concentración testada. Sin embargo, este hecho puede ser atribuido a interferencias inespecíficas relacionadas con la concentración del extracto que ocupa parte del espacio físico, obstruyendo la adhesión viral de manera inespecífica en la célula hospedera; otra posible explicación se vincula al hecho de que a pesar del tiempo sea relativamente corto para la exposición, 2 horas de adsorción viral (tiempo que permite que el 90% de virus en el inóculo se una a su receptor celular) ⁽¹⁴⁾ de acuerdo con el procedimiento para la determinación de la $TCID_{50}$, sea suficiente para que ingrese el componente activo de *O. soehrensii* a la célula por la concentración con esto puede ejercer su actividad paralelamente a la infección viral, este mecanismo inactivaría la infección, sin embargo, su modo tal de acción merece adicionales investigaciones.

Con el fin de diferenciar el posible efecto de *O. soehrensii* sobre la adhesión del que podría ocurrir en la fusión viral, el tiempo de adsorción se llevo a cabo a 4°C, temperatura a la que se disminuye la posible interacción de la actividad metabólica celular con el extracto de *O. soehrensii* disminuyendo de esta manera su ingreso sin bloquear su efecto sobre la adhesión, conociendo que el *Virus Respiratorio Sincitial* es capaz de adherirse a la célula huésped a 4°C y 37°C, pero necesita temperaturas mayores a 18°C para llevar a cabo el proceso de fusión con la célula huésped ^(33,34).

Para evaluar la posible intervención en el proceso de infección viral a partir de la fusión virus-célula se adicionó medios de cultivo conteniendo diferentes concentraciones de *O. soehrensii* inmediatamente luego del periodo de adsorción viral, El análisis de resultados resalta que la CE_{50} se encuentra a la mínima concentración ensayada, esto nos llevo a realizar un ensayo adicional en las mismas condiciones respecto al tiempo de incorporación del extracto pero a menores concentraciones a las anteriormente testadas. Los resultados corroboran el ensayo

previo: se encontró que la CE_{50} está entre 0,021 mg/mL y 0,21 mg/mL denotando un potente efecto sobre la infección viral (figura 28 y 29).

Cuando se mantuvo el tratamiento con 31mg/mL de *O. soehrensii* en las células por 72 horas luego del periodo de adsorción viral se observa que existe disminución abrupta de la reducción de la sal de Tetrazolio, a la vez que se observó alteraciones morfológicas no relacionadas con el Efecto Citopático inducido por la infección viral (redondeamiento celular, células hinchadas o contraídas y granulosas o lisas, que son formas habituales de daño celular), este fenómeno puede atribuirse al efecto tóxico del extracto, por la concentración y tiempo de exposición de *O. soehrensii* sobre las células, eventos que añadidos a la alteración producida por la infección viral producen cambios en la morfología celular. La concentración del extracto utilizado es mucho mayor a la que se obtendría si se identifica y purifica el o los componentes activos antivirales para diferenciar entre el efecto tóxico del extracto en la célula de la real propiedad antiviral del agente vegetal y así descartar interacciones inespecíficas de otros componentes del extracto acuoso.

Los resultados de la exposición sostenida de *O. soehrensii* en periodos postinfección orientan a plantear que el producto tiene propiedad antiviral cuando la célula está infectada y el virus lleva a cabo el proceso de replicación. Existen muchas posibilidades para explicar probables mecanismos de acción, sin embargo destaca la posibilidad de que algún componente de *O. soehrensii* podría bloquear enzimas virales en distintas etapas del ciclo replicativo, impedir la modificación de péptidos y proteínas virales en: la decapsidación, transcripción primaria, traducción primaria, replicación del genoma viral, transcripción secundaria, traducción secundaria, glucosilación de proteínas virales, ensamblaje de los componentes virales o liberación de la partícula viral a través de la membrana celular ^(67,115,163,164).

El hecho de que la efectividad de *O. soehrensii* puede verse en este proceso a concentraciones menores, hizo que se lleven a cabo ensayos de incorporación de *O. soehrensii* 3 horas luego del periodo de adsorción viral, los resultados sugieren que *O. soehrensii* actúa luego de que *VRS* ingresó a la célula una vez iniciada el proceso de transcripción viral. En este caso la CE_{50} se encuentra entre 2,1 mg/mL y 21 mg/mL (figura 30).

Finalmente se evaluó la actividad de *O. soehrensii* 6 horas después del periodo de adsorción viral, los resultados de la adición del extracto a este tiempo (CE_{50} entre 2,1 y 21 mg/mL), muestran que *O. soehrensii* continua exhibiendo actividad antiviral

hasta 6 horas luego de la adsorción viral, sugiriendo que *O. soehrensii* afecta los últimos eventos de la replicación viral (aunque la acción antiviral se puede dar en sucesivos ciclos de replicación) (figura 31).

La figura 32 muestra que *O. soehrensii* es capaz de inhibir la replicación del virus a través de su efecto sobre las células, la presencia constante a lo largo del proceso infeccioso mejora su actividad. Siendo necesaria bajas concentraciones del producto para detectar actividad inhibitoria antiviral.

La actividad de *O. soehrensii* sobre la infección activa implica la intervención del extracto en alguna de las fases del ciclo de replicación viral, la actividad antiviral dependiente de la concentración, encontrada *in vitro*, durante la replicación de VRS, sugiere un mecanismo que involucre una acción específica en: a) el genoma RNA del virus y el complejo replicativo, que tiene características peculiares para ser blanco apropiado de antivirales^(94,165). La ribavirina (análogo de nucleosido) actúa a este nivel. b) síntesis de mRNA y replicación del genoma viral, debido a que la célula normalmente sintetiza ribonucleótidos y RNA en forma continua, interferir en la síntesis de RNA altera la función celular. La RNA polimerasa del VRS es un posible blanco para los antivirales. c) El proceso de síntesis de macromoléculas se inicia a partir del mRNA siendo la traducción un proceso universal; la síntesis de proteínas virales ocurre en el citoplasma de las células infectadas, los ribosomas de las células hospedadoras son utilizadas para producir proteínas estructurales y no estructurales^(14,100). Por estas razones, es difícil actuar sobre esta etapa sin interferir en los procesos de traducción de la célula hospedadora. d) Ensamblaje, algunos virus requieren que proteasas virales procesen poliproteínas para su ensamblaje, una alternativa para el tratamiento del VIH es la inhibición competitiva de estas proteasas por péptidos miméticos que al interactuar con estas enzimas impiden su acción sobre el péptido viral. Una droga efectiva para el tratamiento del virus de la viruela que interfiere con el ensamblaje de las proteínas estructurales sintetizadas es el tsatin- β -tiosemicarbazona⁽⁹⁸⁾. e) Liberación, recientemente se disponen de drogas antivirales que intervienen en la liberación de la partícula viral desde la célula infectada, evitando de esta manera la propagación del virus a células no infectadas (ganamavir, aseltamivir)⁽⁹⁸⁾.

Investigaciones adicionales podrían explorar el mecanismo de acción del componente activo del extracto de *O. soehrensii*.

La intervención de *O. soehrensii* en la cinética de infección de *VRS* se condensa en la figura 33 con lo que se permite afirmar que cuando el extracto de *O. soehrensii* fue inicialmente preincubado con células antes de la infección, observamos incremento de la actividad antiviral dependiente del tiempo de contacto y de la concentración del producto. Los resultados muestran que *O. soehrensii* posee una potente actividad *in vitro* cuando se tratan las células horas previas a la infección. La adición de *O. soehrensii* paralela a la infección muestra que la inhibición viral es parcial, siendo necesario utilizar altas concentraciones del producto y que esta puede ser en parte como efecto residual. La incorporación de *O. soehrensii* después de la infección muestra importante actividad antiviral.

El perfil de actividad observado cuando se expone *O. soehrensii* en las diferentes etapas de la infección viral, sugiere que un componente del extracto induce alguna modificación en la célula previo a la infección viral que le otorga resistencia a alteraciones enzimáticas y morfológicas, además, la actividad antiviral es importante cuando se lleva a cabo la replicación viral activa en la célula. La utilidad de estos datos, es importante para correlacionarlos con su aplicación ya que este producto podría disminuir los efectos de la infección de *VRS* en las células epiteliales del tracto respiratorio bajo, con lo que la infección no sería tan devastadora.

Diferentes autores plantean que el extracto acuoso de *O. soehrensii* contiene estructuras similares a antocianinas, taninos, saponinas, terpenoides, polipéptidos, lectinas, componentes que en otras plantas tienen reconocida actividad antiviral^(6,74); la identificación del componente activo permitiría detallar su modo de acción. Sin embargo no se descarta el efecto sinérgico de la combinación de varios componentes químicos del extracto que en conjunto serían responsables de la neutralización de actividad viral o disminución de la toxicidad. La comparación de la actividad antiviral del extracto crudo con una fracción separada en la que se encuentre el principio activo podría dar lugar a la explicación sobre una pérdida de actividad antiviral durante el curso del fraccionamiento ya que la actividad del extracto no va a ser exactamente igual que la de su principio activo aislado. No obstante, el hecho de que tenga la actividad comprobada *in vitro* ya le da la perspectiva de su utilización como fitofármaco una vez probadas los efectos a nivel clínico.

Existen estudios de que un potencial mecanismo para la actividad de *O. soehrensii* es la inhibición de la interacción proteica. Una variedad de péptidos y proteínas son testadas por su habilidad de bloquear la replicación viral de *VRS in vitro*,

especulaciones plantean que inhibirían la fusión célula-célula para disminuir la severidad de la enfermedad, esta probabilidad es sustentada por el hecho de que péptidos sintéticos derivados de dominios separados de la proteína F bloquean la formación de sincicios ^(42,63,96,166). Otras proteínas demostraron tener actividad anti-*VRS*, incluyendo extractos de plantas que forman la superoxido dismutasa. (Es conocido que una proteína de *Opuntia streptacantha* actúa sobre la transcripción inversa en VIH) ^(6,7).

Una vez evaluada la actividad de *O. soehrensii* *in vitro*, otros aspectos deben de ser analizados con detenimiento para proponer su uso como fitofármaco. El siguiente paso es la evaluación *in vivo*; para esto, es importante contar con modelos animales para probar la eficacia *in vivo* ^(162,167,168,169).

Las características que debe cumplir para su utilización en clínica según los modelos convencionales son: eficacia, contrastada con el fin que pretende, alta especificidad; seguridad, en términos de beneficio/riesgo, baja toxicidad, sin acción mutagénica, teratogénica y carcinogénica; además debe cumplir con criterios de calidad, en referencia a estándares predeterminados sobre materias primas, procesos de fabricación, buena disponibilidad en el área afectada; políticas de uso racional, dosificación y costo inconveniente ^(11,170).

El extracto acuoso de *O. soehrensii* a las concentraciones testadas posee actividad antiviral, lo que posibilita su uso teniendo en cuenta los elementos farmacológicos mencionados, ya que se puede disponer de materia prima suficiente en nuestro medio para la elaboración de fitofármacos sin afectar a la especie en su hábitat natural.

X. CONCLUSIONES.

1. CONCLUSIÓN GENERAL.

El extracto acuoso de la semillas y pulpa anexa de *O. soehrensii*, poseen actividad antiviral en infecciones *in vitro* de la línea celular BHK-21 por *Virus Respiratorio Sincitial*.

2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS.

- La optimización de monitores biológicos permite obtener ensayos sensibles para la evaluación de productos antivirales como *O. soehrensii*. Los resultados de cada ensayo varía de acuerdo a las características de los componentes incluidos.
 - La actividad enzimática celular se relaciona directamente con la reducción de la sal de MTT cuando se controlan factores internos (presencia de ácidos grasos, proteínas del medio de cultivo) y externos (temperatura, tiempo de incubación), lo que permite que se cuente con un ensayo útil para el estudio de la actividad *O. soehrensii*.
 - La infección *in vitro* de *Virus Respiratorio Sincitial* induce cambios morfológicos característicos en la línea celular continua BHK-21, que son directamente proporcionales a la actividad de replicación del genoma viral.

- La interacción *Virus Respiratorio Sincitial* y la línea celular BHK-21 en las variantes ensayadas en este trabajo, no da lugar a la formación de placas virales cuantificables.

- La evaluación del efecto del extracto acuoso de *O. soehrensii* en diferentes etapas de la infección viral *in vitro*, sugiere que la actividad antiviral tiene lugar sobre la célula hospedera induciendo un estado antiviral, además de que interfiere en el proceso de replicación viral activa. El efecto es mayor cuando la célula ha sido tratada con el extracto previamente.
El extracto acuoso de *O. soehrensii* puede ser considerado como un producto promisorio en la resolución de infecciones por *Virus Respiratorio Sincitial*.



XI. BIBLIOGRAFIA.

1. SNELL N J, (2001), *New treatments for viral respiratory tract infections-opportunities and problems*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 47(3), p.251-259.
2. VALDÉS B Fe, (1999), *La medicina tradicional y natural en Cuba*, Resumed, 12(1), p. 3-6.
3. FRESQUET Freber, BLANQUER Rosello, GALINDO Dobon, et. al. (2001), *Inventario de las plantas medicinales de uso popular en la ciudad de Valencia*. Medicina y ciencias sociales. <http://www.uv.es/medciensoc>.
4. GRAAULT Louis, (1984), *Kallawaya*, Paris: IORSTOM, p.326-328.
5. DEL VITTO L, PETENATTI E, PETENATTI M, *Recursos herbolarios de San Luis (Argentina). Segunda parte: plantas exóticas cultivadas, adventicias y/o naturalizadas*. http://www3.cricyt.edu.ar/multiequina/indice/pdf/07/7_4.pdf
6. DOMINGO D, LOPEZ-BREA M.,(2003), *Plantas con acción antimicrobiana*. RevEspQuimioterapia, Dic. 16 (4), p. 385-393.
7. AHMAD A, DAVIES J, RANDALL S, et.al. (1996), *Antiviral properties of extract of Opuntia streptacantha*, Antiviral Research, 30(2-3), p. 75-85.
8. DE LUCCA Manuel, ZAILES Jaime, (1992), *Enciclopedia Boliviana, Flora medicinal Boliviana*, La Paz: Los amigos del Libro, p. 638.
9. CAÑIGUERAL Salvador, VILA Roser, *Fitoterapia: Concepto y limites. Fuente de información*. http://www.podernatural.com/varios/información_interes.htm.
10. GUERRA Maria, TORRES Dinorah, MARTINEZ Leticia, (2001), *Validación del uso tradicional de plantas medicinales cultivadas en Cuba*. Rev. Cubanaplantmed, 2, p. 48-51.
11. OMS/TRM/98,1, *Situación Reglamentaria de los Medicamentos*. http://www.paho.org/Spanish/ad/ths/eu/PM_Situación-Medicamentos-Herbarios-pdf.
12. TOPALIAN Monica, (2002), *Efecto citotóxico de los cementos selladores utilizados en endodoncia sobre tejidos periapical*. <http://www.carlosboveda.com/odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado23.htm>
13. FALSEY, Ann, WALSH, Edward (2000), *Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults*. Clinical Microbiology Reviews. July:13(3),p.371-384.

14. BASUALDO Juan Angel, COTO Celia, DE TORRES Alberto, (1996), *Microbiología Biomédica*, 8va ed, Buenos Aires: Atlanta, talleres de litografía, p. 1188.
15. RESTREPO Angela, ROBLEDO Jaime, LEIDERMAN, Eduardo, (2004), *Enfermedades infecciosas*, CIB-Corporación para investigaciones biológicas, OPS-OMS.
16. HACKING D, HULL J, (2002), *Respiratory Syncytial Virus-Viral Biology and the Host Response*. Journal of infection, 45, p. 18-24.
17. TRENTO Alfonsina, GALIANO Monica, VIDELA Cristina, et. al. (2003), *Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides*. Journal of General Virology, 84, p. 3115-3120.
18. DOMACHOWSKE Joseph, ROSENBERG Helene, (1999), *Respiratory Syncytial Virus Infection: Immune Response, Immunopathogenesis and Treatment*. Clinical Microbiology reviews, Apr 12(2), p. 298-309.
19. KAHN, Jeffrey, ROBERTS Anjeanette, WEIBEL Carla, (2001), *Replication-Competent or Attenuated, Nonpropagating Vesicular Stomatitis Viruses Expressing Respiratory Syncytial Virus (RSV) Antigens Protect Mice against RSV Challenge*. American Society for Microbiology 75(22), p. 11079-11087.
20. GORMAN Jeffrey, McKIMM-BRESCHKIN Jennifer, NORTON Raymond, et.al. (2001), *Antiviral Activity and Structural Characteristics of the Nonglycosylated Central Subdomain of Human Respiratory Syncytial Virus attachment (G) Glycoprotein*. Journal of Biology Chemical Virology, 276(42), p. 38988-38994.
21. MELERO José, GARCIA-BARRENO Blanca, MARTINEZ Isidoro, et. al. (1997), *Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein*. Journal of General Virology, 78, p. 2411-2418.
22. BLACK, Craig Patrick, (2003), *Systematic Review of the biology and Medical Management of Respiratory Syncytial virus infection*. Respiratory Care, 48(3), p.208-225.
23. DOUGLAS Janet, PANIS Marites, HO Edmund, et. al. (2003), *Inhibition of Respiratory Syncytial Virus Fusion by the Small Molecule VP-14637 via Specific Interactions with F protein*. Journal of Virology May. 77 (9), p. 5054-5064.
24. McCURDY Lewis, GRAHAM Barney, (2003), *Role of Plasma Membrane Lipid Microdomains in Respiratory Syncytial virus Filament Formation*. Journal Virology. Feb 77(3), p. 1747-1756.

25. SMITH Brian, LAWRENCE Michael, COLMAN Peter, (2002), *Modelling the structure of the fusion protein from human respiratory syncytial virus*. Protein Engineering, 15(6), p.365-371.
26. GHILDYAL R, MILLS J, MURRAY M, (2002), *Respiratory Syncytial Virus matrix-protein associates with nucleocapsids in infected cells*. Journal of General Virology, p. 753-757.
27. STOKES H, EASTON A, MARRIO T, (2003), *Chimeric pneumovirus nucleocapsid (N) proteins allow identification of aminoacids assential for the function of the respiratory syncytial virus N protein*. Journal of General Virology 84, p. 2879-2883.
28. LU Bin, MA Chien-Hui, BRAZAS Robert, et. al. (2002), *The Major Phosphorilation Sites of the Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein Are Dispensable for Virus Replication In Vitro*. Journal of Virology. Nov.76(21), p.10776-10784.
29. SULLENDER Wayne, (2000), *Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity*. Clinical Microbiology Reviews. Jan 1, p. 1-15.
30. DOUGLAS Jo, O'HERIR Robyn (2000), *What Determines Asthma Phenotype?* AmJRespir.Crit.CareMed.March 161(3), p. 211-214.
31. SARACHO, Pedro, et. al. (2001), *Virologia*. <http://www.spaglini.fem.unc.edu.ar>.
32. VALENTONA V, (2003), *The antigenic aand genetic variability of bovine respiratory syncytial virus emphasis on the G protein*. VetMed, 9, p.254-266.
33. WIEDBRAUK Danny, JOHNSTON Sherryl, (1993), *Manual of Clinical Virology*, New York:RAVEN PRESS, p. 340.
34. MAHY B, (1985), *Virology, a practical approach*, Washington D.C.:IRLPRESS, p.264.
35. MURRAY Patrick, KOBAYASHI George, PFALLER Michael, ROSENTHAL Ken, (1997), *Microbiologia Médica*, Madrid: HARCOURT BRACE, p. 755.
36. KATO Masahiko, KIMURA Hirokazu, (2004), *Respiratory syncytial virus induces inflammation in bronchial asthma: Role of eosinophils*. Allergology International, Dec. 53(4), p. 301-307.
37. IKEMURA Toshihide, SCHWARZE Jurgen, MAKELA Mika, (2000), *Type 4 Phosphodiesterase Inhibitors Attenuate Respiratory Syncytial Virus-Induced Airway Hyper-Responsiveness and Lung Eosinophilia*. The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 294(9), p. 701-706.

38. THOMAS Lynette, WICKREMASINGHE Melissa, SHARLAND Mike, (2000), *Synergistic Upregulation of Interleukin-8 secretion from Pulmonary Epithelial Cells by Direct and Monocyte-Dependent Effects of Respiratory Syncytial virus Infection*. Journal of Virology, Sept. 74(13),p. 8425-8433.
39. VAN S, WELLIVER R, KIMPEN J, (2000), *Novel pathways in the pathogenesis of respiratory syncytial virus disease*. Pediatric Pulmanol, 30, p. 131-138.
40. WENNERGREN G, KRISTJANSSON S, (2001), *Relationship between respiratory syncytial virus bronchiolitis and future obstructive airway diseases*. EurRespir. 18, p. 1044-1058.
41. <http://xpedio02.childrenshc.org/stellent/groups/public/@Manuals/@PFS/@Condill/documents/PolicyReferenceProcedure/018671.pdf>
42. BREESE, Hall Caroline, (2001), *Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus*. The New England Journal of Medicine, June 344 (25), 1917-1928.
43. http://geosalud.com/geonoticias/VSR_infecciones_oticas.htm.
44. HOBERTMAN A, PARADISE J, (2000), *Otitis media aguda: Diagnóstico y manejo en el año 2000*. Pediatric Annals, 29, p. 609-620.
45. BALOWS, A, HAUSLER W, LENNETTE (1988), *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice*, New York:Springer-Verlag, Vol II, p.541.
46. FARLOW T, STITES D, TERR A, (2001), *Medical Immunology*, 10ed, New York: McGraw-Hill, p.814.
47. JIMENEZ Ana Isabel, (2000), *Respuesta immune a virus. Alergia. Asma e Inmunologia Pediatricas*, Nov-Dic 9(6), p. 195-199.
48. AUNG Sandra, RUTIGLIANO John, GRAHAM Barney, (2001), *Alternative Mechanisms of Respiratory Syncytial Virus Clearance in Perforin Knockout Mice Lead to Enhanced Disease*. Journal of Virology, 75(20), p.9918-9924.
49. BRANDENBURG A, WAAL L, TIMMERMAN H, et. al. (2000), *HLA Class I Restricted Cytotoxic T-Cell Epitopes of the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein*. Journal of Virology, Nov 74(21), p.10240-10244.
50. VANBLEEK Grada, POELEN Martien, VAN DER MOST Robbert, (2003), *Identification of Immunodominant Epitopes from the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein that Are Recognized by Human CD4T Cells*. Journal Virology, Jan77(2), p.980-988.

51. POLACK Fernando, TENG Michael, COLLINS Peter, et. al. (2003), *A Role for Immune complexes in Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease*. The Journal of Experimental Medicine, Sept. 196(6), p. 859-865.
52. PONNURAJ, Esther, HAYWARD, Anthony, RAJ, Anthony, et. al. (2001), *Increased replication of respiratory syncytial virus (RSV) in pulmonary infiltrates is associated with enhanced histopathological disease in bonnet monkeys (Macaca radiata) pre-immunized with a formalin-inactivated RSV vaccine*. Journal of General Virology, 82, p.2663-2674.
53. OSIOWY Carla, ANDERSON Robert, (1995), *Neutralization of Respiratory Syncytial Virus after Cell Attachment*. Journal of Virology, Feb 69(2), p.1271-1274.
54. CARBONELL-ESTRANY, *Virus respiratorio sincitial, prevención tratamiento*. <http://aeped.es/protocolos/neonatologia/vrs.pdf>.
55. CRESPO Maria del Pilar, (2000), *El diagnostico viral por el laboratorio*. Colombia Médica 31(3), p. 735-750.
56. KONEMAN W Elmer, (1999), *Diagnóstico Microbiológico, texto y atlas color*, 5ta ed. Buenos Aires: Panamericana, p. 1432.
57. JOSHI M Anita, *Animal cell biotechnology*. <http://www.tulane.edu/~dmsander/articler/mass.html>.
58. REINA Manuel, *Técnicas de estudio de líneas celulares*. <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap3.htm>.
59. FALSEY Ann, FORMICA Maria, WALSH Edward, (2002), *Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus Infection: Comparison of Reverse Transcription-PCR to Viral Culture and Serology in Adults with Respiratory Illness*. Journal of Clinical Microbiology, Mar. 40(3), p.817-820.
60. PORTILLO Cruz, (1999), *Rapid viral immunofluorescent testing of ARI in hospitalized children*. Rev.Soc.Bol.38(1), p.564-567.
61. ANDERSON Larry, HIERHOLZER John, BINGHAM Patricia, et. al. (1985), *Microneutralization Test for Respiratory Syncytial Virus Based on an Enzyme Immunoassay*. Journal of Clinical Microbiology. Dec.22 (6), p.1050-1052.
62. MIGUEZ Johandra, TEJERO Yahisel, SAVON Clara, (1999), *Evaluación de un ultramicroELISA para la detección de la infección por el Virus Sincitial Respiratorio*. RevBiomed, 10, p. 7-15.

63. ANDRIES Koen, MOEREMANS Marc, GENERS Tom, (2003), *Substituted benzimidazoles with nanomolar activity against respiratory Syncytial Virus*, Antiviral Research, 60, p. 209-219
64. HAYDEN Frederick, (1996), *Combination antiviral therapy for respiratory virus infections*. Antiviral Research, 29, p. 45-48.
65. CROTTY Shane, CAMERON Craig, ANDINO Raul, (2002), *Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis?* J MolMed, 80, p. 86-95.
66. MARKLAND W, McQUAID T, JAIN T, KWOG A, (2000), *Broad Spectrum Antiviral Activity of the IMP dehydrogenase Inhibitor VX 497: a Comparison with Ribavirin and Demonstration of Antiviral Additivity with alpha Interferon*. Antimicrobial Agents and chemotherapy, abril,44(4), p. 859-866.
67. DE CLERQ Erik, (2001), *Molecular targets for Antiviral Agents*, Pharmacology, April 297 (1), p. 1-10.
68. SHIGETA Shiro, MORI Shuichi, BABA Masanori, et. al. (1992), *Antiviral Activities of Ribavirin, 5-Ethynil-1-β-D-Ribofuranosylmidazole-4-carboxamide and 6`-(R)-6`-C-Methylneplanocin a against Several Ortho-and Paramixoviruses*. Antimicrobial Agents and chemotherapy, Feb. 36(2), p.434-435.
69. LIN Ching-chung, LUV Trong, LOURENCO David, et. al. (2003), *Absorption pharmacokinetics and excretion of levovirin in rats, dogs and Cynomolgus monkeys*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51, p. 93-99.
70. PEREZ Victor Hugo, BARQUERO Mercedes, (2001), *Agentes antivirales retrovirus para infecciones causadas no por retrovirus*. Costarric 15(3).
71. KOREN Gideon, KING Susan, KNOWLES Sandra, (2003), *Ribavirin in the treatment of SARS: A new trick for an old drug?* Canadian Medical Association, May. 13(168), p.1289-1295.
72. CROTTY Shane, MAAC David, ARNOLD Jamie, et. al. (2000), *The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen*. Nature America, p.1374-1379.
73. ORDOÑEZ Maria Guerra, TORREZ Dinorah, MARTINEZ Leticia, (2001), *Validación del uso tradicional de plantas medicinales en Cuba*. RevCubanaplantmed, (2), p.48-51.
74. MURPHY Cowan Marjorie (1999), *Plants, Products as Antimicrobial Agents*, Clinical Microbiology Reviews, Oct. 12 (4), p. 564-582.
75. JASSIM S, NAJI M, (2003), *Novel antiviral agents: a medical plant perspective*. Journal of Applied Microbiology, 95, p. 412-417.

76. *Opuntia*, <http://usuarios.lycos.es/Maarian/cactus/o.htm>.
77. LEE E, KIM H, SONG, et. al. (2003), *Constituents of the stems and fruits of Opuntia ficus-indica var.saboten*. ArchPhamRes.Dec.26(12), p.1018-1023.
78. JIANG J, YE W, LIN Y, (2003), *A New Alkaloid form Opuntia vulgaris*. YaoXueXueBao, Sep.38 (9), p.677-679.
79. <http://www.botany.com/opuntia.html>
80. DE LA BARRERA E, NOBEL P, (2004), *Carbon and water relations for developing fruits of Opuntia ficus-indica (L.) Meller, including effects of drought and gibberellic acid*. J.Exp.Bot. Mar 55(397), p.719-729.
81. CASTELLAR R, OBON J, ALACID, (2003), *Color properties and stability of betacyanins from Opuntia fruits*. AgricFoodChem. Apr. 51(9), p. 2772-2776.
82. *Genus Opuntia (incl. Cyllindropuntia, Grusonia, and Corynopuntia)* <http://www.desertmuseum.org/books/opuntia.html>.
83. LAURENZ J, COLLIER C, KUTI J, (2003), *Hypoglycaemic effect of Opuntia lindheirmeri Englem in a diabetic pig model*. Phytotherapy research, Jan. 17(1), p. 26-29.
84. WOLFRAM R, KRITZ H, EFTHIMION Y, (2002), *Effect of prickly pear (Opuntia robusta) on glucose- and lipid-metabolism in non-diabetics with hyperlipidemia- a pilot study*. Wien klin Wochenschr, Oct. 114(19-20), p.840-846.
85. TESORIERE L, BUTERA D, PINTADI A, et. al. (2004), *Supplementation with cactus pear (Opuntia ficus-indica) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamic C*. Am.J.ClinNutr.Aug. 80(2), p 391-395.
86. OCHOA A, SONZA P, ZARATE P, (1998), *Isolation and characterization of reserve protein from the seeds of Opuntia ficus-indica (Cactaceae)*. BrazJMedBioRes. Jun.31 (6), p. 757-761.
87. WIESE J, McPHERSON S, ODDEN M, (2204), *Effect of Opuntia ficus indica on symptoms of the alcohol hangover*. Arch.Interm.Med. Jun: 164(12), p. 1334-1340.
88. GALATI E, MONFORTE M, TRIPODO M, (2001), *Antiulcer activity of Opuntia ficus indica (L.) Mill (Cactaceae): ultrastructural study*. Ethnopharmacology, Jun 70(1), p.1-9.
89. <http://terapia.com/streptafacts.html>

90. QIU Yingkun, CHEN Yingjie, PEI Yupin, (2002), *Constituents with Radical Scavenging Effect from Opuntia dillenii: Structures of New α -Pyrone and Flavonol Glycoside*. Chem.Pharm.Bull. Nov. 50(11), p.1507-1510.
91. LOCK DE UGAZ Olga, (1988), *Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales*. Pontificia Universidad del Perú.
92. RAMILO O, (2003), *Virus respiratorio sincitial: antiguos retos y nuevas estrategias*. Bol.Pediatric 43(184), p.189-190.
93. MEJIAS A, RAMILO O, (2002), *Asma y virus respiratorio sincitial: ¿Mito o realidad?*, AnEspPediatr. 57(3), p.199-204.
<http://db.doyma.es/cgi-bin/wdbc:exc/doyma/mrevista.fulltest?>
94. BARNARD D, SIDWELL R, XIAD W, et. al. (1999), *2-5A-DNA conjugate inhibition of respiratory syncytial virus replication: effects of oligonucleotide structure modifications and RNA target site selection* Antiviral Research. April 41(3), p.119-134.
95. JAIRATH S, VARGAS P, HAMLIN H, (1997), *Inhibition of respiratory syncytial virus replication by antisense oligodeoxyribonucleotides*. Antiviral Research, Feb 33(3), p.201-213.
96. WEIBEL Carla, et. al. (2001), *Replication Competent or Attenuated Nonpropagating Vesicular Stomatitis viruses Expressing Respiratory Syncytial Virus (RSV) Antigens Protect Mice against RSV challenge*.
<http://vi.asm.org/cgi/content/full/75/22/11079>
97. JIN Hong, CHENG Xing, TRAINA-DORGE Vicki, et. al. (2003), *Evaluation of recombinant respiratory syncytial virus gene deletion mutants in African green monkeys for their potential as live attenuated vaccine candidates*. Vaccine 21, p. 3647-3652.
98. Antivirales
<http://www.med.uchilecl/apuntes/archivos/2004/medicina/antivirales.pdf>
99. BULOW S, NIR M, LEVIN E; et. al. (1999), *El tratamiento con prednisolona sistémica no ha mejorado la evaluación de la infección respiratoria por Virus Sincitial Respiratorio en niños menores de 2 años hospitalizados por esta enfermedad*. Pediatría1119(104).
100. BARRETO Jesús, GUNDIÁN José, RODRIGUEZ Miguel, et. al. (1998), *Medicamentos antivirales*. Acta Médica, 8(1), p.86-100.
101. Organización Mundial de la Salud, (2003), *Medicina tradicional*, Informe de la secretaria.
102. Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.
http://www.who.int/medianaes/librarytrm/trm_strat_span.pdf.

103. SHAY David, HOLMAN Robert, NEWMAN Robert, et. al. (1999), *Bronchiolitis-Associated Hospitalizations Among US Children 1980-1996*. JAMA, Oct. 282(15), p.1440-1446.
104. Boletín Epidemiológico Semanal (2003), *Semana Epidemiológica*, Instituto Nacional de Salud, Colombia.
105. CHACON Danay, VALDIVIA Angel, GOYENECHEA Angel, et. al. (1996), *Clasificación en subgrupos de cepas del virus sincitial respiratorio aislados de un brote en ciudad de la Habana*. Rev.CubanaMedTrop, 48(2), p.136-137.
106. Infosalud.Año4/No1,048.
<http://imgbiblio.vaneduc.edu.ar/pinfoSalud/2003/Junio2003/Programa%20InfoSalud%2026-06-03%20mat.htm>
107. VALDIVIA Ángel, CHACON Danay, SAVÖN Clara, (1999), *Confirmation of Unusual Epidemiological Behavior of the Human Respiratory Syncytial Virus During Two Consecutive Epidemics (Seasons94/95) in Havana City*. Biotecnología Aplicada, 16, p.222-225.
108. CAINEY Cakir, KUBAR Ayhan, YAPAR Mehinet, (2004), *An Outbreak of Respiratory infection due to Respiratory Syncytial Virus Subgroup B in Ankara, Turkey*. Infectology, 37, p.178-180.
109. AVENDAÑO Luis, PALOMINO Maria Angelica, LARRAÑAGA Carmen, (2003), *Surveillance for Respiratory Syncytial Virus in infants hospitalized for acute lower respiratory infection in Chile (1989 to 2000)*, *Respiratory care*. Journal of clinical microbiology. March, 48(3), p.4879-4882.
110. BARRERA Francisco, *Plan de invierno y enfermedades respiratorias*.
<http://www.ministeriodesalud.org>.
111. STRALIOTTO Selir, NESTOR Sandra, SIQUEIRA Marilda, (2001), *Respiratory Syncytial Virus groups A and B in Porto Alegre Brazil, from 1990 to 1995 and 1998*. MemInstOswaldoCruz, 96(2), p.155-158.
112. ARAUJO Fernanda, CARLETTO Leonardo, Rodrigues Augusta, et. al. (2003), *Respiratory syncytial Virus Infections during an Epidemic Period in Salvador, Brazil. Viral Antigenic Group Analysis and description of Clinical and Epidemiological Aspects*. MemInstOswaldoCruz, Sept. 93(6), p.739-743.
113. HUNTLEY Clayton, WEISS William, GAZUMYAN Anna, et. al. (2002), *RFI-641 a Potent Respiratory Syncytial virus Inhibitor*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. March 46(3), p.841-847.
114. PROSIN; *Estadísticas de Salud*, Ministerio de Salud y Deportes. Sistema Nacional de Información en Salud. <http://www.ops.org.bo>.

115. SUARA Rahaman, CROWE James, (2004), *Effect of Zinc Salts on Respiratory Syncytial Virus Replication*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, March 48 (3), p. 783-790.
116. DESHPANDE S, NORTHERN V, (2005), *The clinical and health economic burden of respiratory syncytial virus disease among children under 2 years of age in a defined geographical area*. ArchDisChild, 88, p.1065-1069.
117. ZEBALLOS Monica, GARCIA Emilia, BECK Stephan, (2003), Herbario Nacional de Bolivia, La Paz-Bolivia, p. 620.
118. PESTALOZZI H, TORRES M, (1998), Flora ilustrada alto andina, Cochabamba-Bolivia, p. 388.
119. <http://www.agroconnection.com.ar/secciones/forestación/8045A00421.pdf>
120. WEI F, MA S, MA L, et. al. (2004), *Antiviral flavonoides from the seeds of Aesculus chinensis*. JnatProd, April, 67(4), p.650-653.
121. BARNARD D, HUFFMAN J, MEYERSON L, (1993), *Mode of inhibition of respiratory syncytial virus by a plant flavonoid, sp-303*. Therapy, Jun 39(3), p.212-217.
122. MAMANI Gaby, (2003), *Establecimiento del bioensayo de placas virales como monitor en la evaluación de productos con actividad antiviral anti-herpes simplex de Opuntia spp*. UMSA-SELADIS, La Paz, Bolivia.
123. TERRAZAS Katty (1993), *Efectos biológicos de la Musa paradisiaca sobre el sistema inmunitario: establecimiento de sistemas de cultivo celular primario y medición de la activación, proliferación y funcionalidad*. UMSA, La Paz, Bolivia.
124. SIGMA, *Biochemical and Reagents*. For life science research, 2000-2001.
125. LEHNINGER Albert, (1980), *Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular*, Barcelona: Omega S.A. p. 1113.
126. SIGMA ALDRICH, *Fundamental techniques in cell culture...a laboratory handbook*. ecaoa70
127. REINA Manuel, *Las contaminaciones*. <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap5.htm>
128. RPMI-1640, Cell Culture Reagents. Catalog.
129. PARDO Georgina, ALMORA Ernesto, FIDALGO Odalys, *Ensayo in vitro para detectar la presencia de agentes adventicios en un banco de células de*

- trabajo*. Instituto Finlay. Centro de investigación. Producción de vacunas y sueros.
130. SALAZAR Karina, (2005), *Evaluación de las estrategias de diagnóstico de infecciones causadas por Virus Sincitial Respiratorio*.UMSA-SELADIS, La Paz, Bolivia.
 131. FLORES Katerin, (2003), *Contribución al diagnóstico de infecciones respiratorias causada por Virus Sincitial Respiratorio: aislamiento, identificación y cultivo In Vitro.*, UMSA-SELADIS, La Paz-Bolivia.
 132. REINA Manuel, *El laboratorio de cultivo celular*. <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap2.htm>
 133. Biochemicals and Reagents ICN biomedicals Inc. Catalog 2002-2003.
 134. Técnicas de contaje celular, [http://www.ub.es/biocel/wba/tecnicas/contaje celular.htm](http://www.ub.es/biocel/wba/tecnicas/contaje_celular.htm)
 135. MA, Shuang-Cheng, DU Jiang, DUI-HAY BUT Paul, (2002), *Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus*. Journal of Ethnopharmacolgy, Feb. 79(2), p.205-211.
 136. FLORENCE B, CHAMBERS T, WIEDBRAUK D, (1992), *Virology A Laboratory Manual*, California: ACADEMIA PRESS, p.360.
 137. RODRIGUEZ Vicente, ORTEGA Vicente, CARDENAS Jordana, (1997), *Valor del ensayo colorimetrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad in vitro de líneas de melanoma*. Patología 30(1), p.18-27.
 138. ZHANG, Chiyu, CHEN Yunyun, BEN Kunlog, (2003), *An improved microtiter assay for evaluating anti-HIV-1 neutralizing antibodies from sera or plasma*. BMC Infectious Diseases, p. 1-6.
 139. VELLONEM Kati-Sisko, HONKAKOSKI Paavo, URTTI Arti (2004), *Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to under estimation of drug toxicity*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 25(2), p. 181-188.
 140. TWENTYMAN P, LUSCOMBE M, (1987), *A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based cell growth and chemosensitivity*. J.Cancer, Sept. 56(3), p.279-285.
 141. ROSLEV Peter, KING Gary, (1993), *Application of a Tetrazolium Salt with a Water-Soluble formazan as an Indicator of Viability in Respiring Bacteria*. Applied and environmental Microbiology. Sept. 59(9), p. 2891-2896.

142. GEBRAN S, NEWTON C, YAMAMOTO Y, (1994), *A Rapid Colorimetric Assay for Evaluating Legionella pneumophila Growth in Macrophages In Vitro*. Journal of Clinical Microbiology, 32(1), p.127-130.
143. KAWADA Kazuhiko, YONEI Toshiro, VEOKA Hiroshi, et. al. (2002), *Comparison of Chemosensitivity Tests: Clonogenic Assay versus MTT Assay*. Acta Medica Okayama, 55(3), p.129-134.
144. ATCC-MTT Cell Proliferation Assay instructions. Catalog Number 30-1010K. <http://www.atcc.org/pdf/30-1010k.pdf>.
145. Catalog 1465007. Cell Proliferation Kit I (MTT), www.ub.es/biocel/wbc/prac0304/pdf/MTTassay03.pdf SupplementalResult
146. BERNAS Tytus, DOBRUCKI Jurek, (2002), *Mitochondrial and Non mitochondrial Reduction of MTT: Interaction of MTT With TNRE, JC-1, and NAO Mitochondrial Fluorescent Probes*, Cytometry, 47, p. 236-242.
147. BERRIDGE V., Michael, TAN An, McCOY Kathy, et. al. (1996), *The biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium salts*, Biochemical, (4), p.16-19.
148. RUBINO KL, NICHOLAS JA, (1992), *A novel, spectrophotometric microneutralization assay for respiratory syncytial virus*. Virology Methods, Sept.39 (1-2), p.55-67.
149. MONTANER Ramoneda Beatriz, (2000), *Caracterización y purificación de un principio activo de origen bacteriano con actividad antitumoral*. Universidad de Barcelona.
150. XI-HONG Xu, LEE Spencer, LEE Song, et. al. (1999), *Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from Prunella vulgaris*. Antiviral Research, 44, p.43-54.
151. CHINSANGARAM J, PICCONE M, GRUBMAN M, (1999), *Ability of Alpha Beta Interferon*. Journal of Virology, Dec. 73(12), p.9891-9898.
152. Plaque Assay Procedure and Service. www.virapur.com.
153. CHENG Hua-Yew, LIN Ta-chen, (2002), *Antiherpes simplex virus tipo 2 activity of casuarin from the bark of terminalia Arjona Linn*. Antiviral Research, 55, p. 447-455.
154. TSAI Huey-Pin, KUO Pin-Hwa, LIU Ching-chuan, (2001), *Respiratory viral Infections among Pediatric Inpatients and Outpatients in Taiwan from 1997 to 1999*. Journal of Clinical Microbiology, 39(1), p.111-118.
155. KAWANA Fuyuhiko, SHIGETA Shiro, HOSOYA Mitsuaki (1987), *Inhibitory Effects of Antiviral Compounds on Respiratory Syncytial Virus*

- Replication In Vitro*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Aug. 31 (8), p. 1225-1230.
156. HUANG K, CHEN Y, WALKER A, (2004), *Inaccuracies in MTT assays: major distorting effects of medium, serum, albumin and fatty acids*. Biotechniques, Sep. 37(3), p.406-412.
157. CHAPDELAINE Joan, *MTT reduction -a tetrazolium- based colorimetric assay for cell survival and proliferation*. <http://www.moleculardvices.com/pages/max.bib2.html>.
158. ZHANG Yuhong, JAMALUDDIN Mohammad, WANG Shaofei, et.al. (2003), *Ribavirin Treatment Up-Regulates Antiviral Gene Expression via the Interferon-Stimulated Response element in Respiratory Syncytial Virus-Infected Epithelial Cells*. Journal of Virology, May 77(10), p.5933-5947.
159. BEHERA Aruna, KUMAR Mukesh, LOCKEY Richard, et. al. (2002), *2'-5' Oligoadenylate Synthetase Plays a Critical Role in Interferon- γ Inhibition of Respiratory Syncytial Virus Infection of Human Epithelial Cells*. J.Biol.chem. 277(8), p.25601-25608.
160. BUDGE Philip, GRAHAM Barney, (2004), *Inhibition of respiratory syncytial virus by RhoA-derived peptides: implications for the development of improved antiviral agents targeting heparin-binding viruses*. Journal of Antimicrobial Chemoterapy, 54, p. 299-302.
161. BOURGEOIS C, BOUR J, LIDHOLT C, (1998), *Heparin-like structures on Respiratory Syncytial Virus are involved in its infectivity In Vitro*. Journal of Virology, Sept. 72 (9), p. 7221-7227.
162. KIMURA Kazufumi, MORI Shuichi, TOMITA Kiyoko, et. al.(2000), *Antiviral activity of NMSO3 against respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo*. Antiviral Research, July 47 (1), p. 41-51.
163. SUDO Kenji, KONNO Kenji, WATANABE Wataru, et. al. (2001), *Mechanism of Selective Inhibition of Respiratory Syncytial Virus by a Benzodithin compound (RD3- ω 28)*. Microbiology and Immunology, April 45(7), p. 531-537.
164. SUDO Kenji, MIYASAKI Yoji, KOJIMA Naoko, et. al. (2005), *YM-53403, a unique anti-respiratory syncytial virus agent with a novel mechanism of action*. Antiviral Research, Feb. 65(2), p.125-131.
165. PLAYER Mark, BARNARD Dale, TORRENCE Paul, (1998), *Potent inhibition of respiratory syncytial virus replication using a 2-5A-antisense chimera targeted to signals within the virus genomic RNA*, Medical Science, July (95), p. 8874-8879.
166. SZUCHMAN A, TAL J, MIZRAHI Y, (1999), *Antiviral properties in cladodes of the cactus nopalea cochenillifera (L) XVI*. Internacional Botanical Congreso.

167. WYDE P, AMBROSE M, MEYERSON L, et. al. (1993), *The antiviral activity of SP-303, a natural polyphenolic polymer, against respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses in cotton rats*. Antiviral Research, Feb. 20(2), p. 145-154.
168. BUDGE Philip, LI Yeqians, BEELER Judy, (2004), *RhoA-Derived Peptide Dimers Share Mechanistic Properties with Other Polyanionic Inhibitors of Respiratory Syncytial Virus (RSV), Including Disruption of Viral Attachment and Dependence on RSV G*. Journal of Virology, May 78 (10), p. 5015-5022.
169. WYDE P, MOORE P, O'HARA B, (1998), *CL387626 exhibits marked and unusual antiviral activity against respiratory syncytial virus in tissue culture and in cotton rats*. Antiviral Research, April 38(1), p.31-42.
170. *The potencial of plant made pharmaceuticals*.
<http://www.plantpharma.org/ials/fileadmin/thePotentialofPlantMadePharmaceutical>



ANEXOS

Anexo 1. Resumen de los mecanismos de actividad antiviral de componentes de plantas medicinales.

Class of compound	Mechanism virus target	Example of plant source
Furyl compounds: furocoumarins and furanochromones	DNA and RNA genomes. Interactions required long-wave ultraviolet (UVA, 300 – 400 nm)	Rutaceae and Umbelliferae (Apiaceae)
Alkaloids constitute: β -carbolines, furanoquinolines, camptothecin, atropine, caffeine, indolizidines swainsonine, castanospermine, colchicines, vinblastine	DNA and other polynucleotides and virions proteins. In some interactions are enhanced by UVA	Rutaceae, <i>Camptotheca acuminata</i> , <i>Atropa belladonna</i> (L.), <i>Swainsona canescens</i> , <i>Astragalus lentiginosus</i> , <i>Castanospermum australe</i> , <i>Aglaia roxburghiana</i>
Polyacetylenes (polyines)	Membrane interaction. Phototoxic activity frequently requires UVA	Asteraceae, Apiaceae, Campanulaceae <i>Panax ginseng</i> (Korean ginseng roots), <i>Bidens</i> sp., <i>Chrysanthemum sibiricum</i>
Polysaccharides	Blocking virus binding	<i>Achyrocline flaccida</i> , <i>Bostrychia montagnei</i> , <i>Cedrela tubiflora</i> , <i>Prunella vulgaris</i> , <i>Sclerotium glucanicum</i> , <i>Stevia rebaudiana</i> , <i>Rhizophora mucronata</i>
Thiophenes	Membrane interaction. Phototoxic activity frequently requires UVA	<i>Aspilia</i> , <i>Chenactis douglasii</i> , <i>Dyssodia anthemidifolia</i> , <i>Eclipta alba</i> , <i>Eriophyllum lanatum</i>
Flavonoids: amentoflavone, theaflavin, iridoids, phenylpropanoid glycosides, agathisflavone, robustaflavone, rhusflavanone, succedaneoflavanone, chrysofenol C, morin,	Blocking RNA synthesis. Exhibited HIV-inhibitory activity	<i>Agastache rugosa</i> , <i>Euphorbia grantii</i> , <i>Barleria prionitis</i> , <i>Calophyllum cerasiferum</i> , <i>Cal. inophyllum</i> , <i>Cal. teysmannii</i> , <i>Camellia sinensis</i> , <i>Garcinia</i>

Class of compound	Mechanism virus target	Example of plant source
coumarins, galangin (3,5,7-trihydroxyflavone), baicalin		<i>multiflora</i> , <i>Helichrysum aureonitens</i> , <i>Maclura cochinchinensis</i> , <i>Markhamia lutea</i> , <i>Monotes africanus</i> , <i>Pterocaulon sphacelatum</i> , <i>Rhus succedanea</i> , <i>Scutellaria baicalensis</i> , <i>Selaginella sinensis</i> , <i>Sophora moorcroftiana</i> , <i>Sophora tomentosa</i> , <i>Tephrosi</i> sp.
Terpenoids: sesquiterpene, triterpenoids (moronic acid, ursolic acid, maslinic acid and saponin)	Membrane-mediated mechanisms. Inhibition of viral DNA synthesis	<i>Acokanthera</i> sp., <i>Anagallis arvensis</i> (Primulaceae), <i>Cannabis sativa</i> , <i>Geum japonicum</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza radix</i> , <i>Glyptopetalum sclerocarpum</i> , <i>Gymnema sylvestre</i> , <i>Maesa lanceolata</i> , <i>Olea europa</i> , <i>Quillaja saponaria</i> , <i>Rhus javanica</i> , <i>Strophanthus gratus</i>
Lignans		
Podophyllotoxin and related lignans (cyclo lignanolides), such as the peltatins	Blocking virus replication	<i>Amanoa</i> aff. <i>Oblongifolia</i> , <i>Juniperus communis</i> , <i>Justicia procumbens</i> , <i>Podophyllum peltatum</i>
Dibenzocyclooctadiene lignans such as schizarin B and taiwanschirin D	Blocking HBV replication	<i>Kadsura matsudai</i>
Rhinacanthin E and rhinacanthin F	Blocking influenza virus type A replication	<i>Rhinacanthus nasutus</i>
Miscellaneous phenolic compounds: anthraquinone chrysophanic acid, caffeic acid, eugenin, hypericin, tannins (condensed polymers), proanthocyanidins, salicylates and quinines (naphthoquinones, naphthoquinones and anthraquinones in particular aloe emodin)	Inhibition of viral RNA and DNA replication	<i>Aloe barbadensis</i> , <i>Aster scaber</i> , <i>Cassia angustifolia</i> , <i>Dianella longifolia</i> , <i>Euodia roxburghiana</i> , <i>Geum japonicum</i> , <i>Hamamelis virginiana</i> , <i>Hypericum</i> sp., <i>Melissa officinalis</i> , <i>Phyllanthus myrtifolius</i> , <i>Phyllanthus urinaria</i> , <i>Punica granatum</i> , <i>Rhamnus frangula</i> , <i>Rhamnus purshianus</i> , <i>Rheum officinale</i> ,

Class of compound	Mechanism virus target	Example of plant source
		<i>Rhinacanthus nasutus</i> , <i>Shepherdia argentea</i> , <i>Syzygium aromaticum</i> , St. John's wort
Proteins and peptides		
1. Single chain ribosome-inactivating proteins	Interaction with ribosome function in the infected cell and inhibited viral protein synthesis	<i>Clerodendrum Inerme</i> , <i>Dianthus caryophyllus</i> , <i>Gelonium multiflorum</i> , <i>Momordica charantia</i> , <i>Phytolacca Americana</i> , <i>Saponaria officinalis</i> , <i>Trichosanthes kirilowii</i> , <i>Triticum aestivum</i>
Pokeweed antiviral proteins (PAP) (MRK29, MAP30 and GAP31)	Inactivate infective HIV and HIV-infected cells	<i>Phytolacca Americana</i> , <i>Momordica charantia</i> , <i>Gelonium multiflorum</i>
Panaxagin	Inhibit the HIV-1 reverse transcriptase	<i>Panax ginseng</i>
Alpha- and beta-antifungal proteins	Inhibit the HIV reverse transcriptase	<i>Vigna unguiculata</i>
2. Dimeric cytotoxins	Interaction with ribosome function in the infected cell and inhibit viral protein synthesis	<i>Ricinus communis</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Adenia digitata</i>
3. Lectins	Viral membrane interactions	<i>Canavalia ensiformis</i> , <i>Lens culinaris</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Triticum vulgare</i>
4. Antiviral factor	Mechanism of action is not known	<i>Nicotiana glutinosa</i>
5. Meliacine	Affect virus replicative cycle	<i>Melia azedarach</i>

Fuente: JASSIM S, *Novel antiviral* (13)

Anexo 2. ASPECTOS PROCEDIMENTALES.

Lavado.

Debe ser realizado con detergentes biodegradables, no tóxicos, que no alteren la superficie de cristal o de plástico, los lavados son “grado cultivo celular”, el enjuague exhaustivo con agua tridestilada, para eliminar completamente trazas de detergente, material tóxico u orgánico; además de regular el pH de las superficies. Finalmente (solo el material resistente) fue llevado a ebullición en agua destilada.

Esterilización.

Por calor húmedo a 121°C, 1,5 – 2 atm. Por 15-20 minutos, para materiales de vidrio y plástico resistente a elevada temperatura. El material de plástico (frascos de Roux, policubetas de cultivo) se esterilizó por radiación, para esto se colocó el material en bolsas de poliestireno y sellados con cintas de seguridad, así se exponen a radiaciones de luz Ultravioleta (230-280nm) por 30 minutos.

Preparación de medios de cultivo.

El agua para resuspender los medios de cultivo, soluciones balanceadas de sales, deben ser estériles, de alta pureza obtenidos mediante equipos de doble destilación, intercambio iónico y filtración. Inmediatamente luego de resuspender los medios se esteriliza de acuerdo a la composición de la solución: a) las soluciones balanceadas de sales pueden ser esterilizadas por calor húmedo y b) los medios tanto basales como complejos por ser lábiles al calor se hace pasar la solución por un filtro de 0,22µm de diámetro de poro a presión positiva.

Se ajusta el pH a temperatura ambiente 0,2 unidades por debajo del pH deseado a 36,5-37°C puesto que la temperatura además de tener un efecto directo sobre el crecimiento celular a través de la facilitación de la actividad enzimática, tiene influencia en el pH, ya que bajas temperaturas incrementa la solubilidad del CO₂ en el medio.

Conservación de Líneas Celulares.

Generalmente las líneas celulares humanas y animales de cultivo son guardadas en congelación. El congelar las células las protege de cambios genéticos y reduce el riesgo de contaminación. Se alcanza la temperatura de -196°C con el Nitrógeno

líquido, este en conjunción con un agente crioprotector similar al dimetilsulfoxido (DMSO) o glicerol es ampliamente usado para preservar células.

Sin la presencia de agentes crioprotectores, la congelación es letal para la mayoría de células mamíferas. El daño es causado por efecto mecánico producido por los cristales de hielo, concentración de electrolitos, deshidratación, cambios de pH y desnaturalización proteica. Estos efectos letales son minimizados por la adición de agentes crioprotectores los cuales disminuyen el nivel de punto de congelación.

Las células crecidas hasta un 70-80% de confluencia (fase logarítmica de cultivo) se resuspenden en RPMI 1640-DMSO idealmente a elevada concentración y ser alicuotadas en criotubos para ser congeladas gradualmente (descenso de aproximadamente 1°C/min), las células son transferidas inmediatamente a Nitrógeno líquido cuando alcanza una temperatura inferior a -50°C, donde se almacena sumergidas en Nitrógeno o en la fase gaseosa superior durante largos periodos de tiempo (años) sin deterioro celular apreciable.

