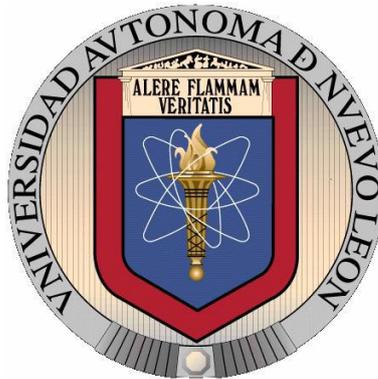


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**GRADO Y NIVEL DE ACCION DE NANOPARTÍCULAS DE METAL Y
COMPUESTOS BIOACTIVOS NATURALES CONTRA EL VIRUS DE
SARAMPIÓN**

Por

Q.B.P. MAYRA ALEJANDRA MELÉNDEZ VILLANUEVA

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS
con orientación en Inmunobiología.

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN

JUNIO 2017

**GRADO Y NIVEL DE ACCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE METAL Y
COMPUESTOS BIOACTIVOS NATURALES CONTRA EL VIRUS DE
SARAMPIÓN**

COMITÉ DE TESIS



Dra. Laura Trejo Ávila
Director de tesis



Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez
Secretario

Dra. Diana Ginette Zárate Triviño
Primer vocal

Dr. Pablo Zapata Benavides
Segundo vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Tercer vocal

LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Virología y Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Laura María Trejo Ávila.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada y el financiamiento de este proyecto.

A la Dra. Laura Trejo por permitirme ser parte de su laboratorio, pero sobre todo por confiar en mí y compartir todos sus conocimientos y consejos a lo largo de este tiempo. Gracias por enseñarme a tener confianza en mis conocimientos, por la paciencia y fomentar en mí ese amor por la investigación.

A la M.C Karla Morán por todas las enseñanzas y por siempre estar ahí para aconsejarme dentro y fuera del laboratorio, por la paciencia y por la bonita amistad que me has brindado.

A la Dra. Diana Zárate por todo su apoyo, por abrirme las puertas de su laboratorio, por todos los consejos, pero sobre todo por las clases intensivas de nanotecnología.

A la Dra. Elizabeth Cruz por permitirme ampliar mis conocimientos, por recomendarme y apoyarme para la realización de este proyecto.

Al Dr. Pablo Zapata por su apoyo, por el aporte de sus conocimientos y enseñanzas para la realización de ésta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, Edgar Amaro, Karen Ledezma, Mario Alberto, Paulina Moreno, Litani Salazar y Miguel García, por todos los buenos momentos, por todo su apoyo y nunca dejarme sola durante la realización de este trabajo.

Al Programa Maricultura, en especial a la QFB. Maribel Maldonado por el apoyo y los conocimientos otorgados para la realización de esta tesis.

Al laboratorio de nanobiotecnología por todos sus conocimientos otorgados, por la amistad y el apoyo durante todo este tiempo.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla jefa del laboratorio de Inmunología y Virología por permitirme formar parte de este.

A mis compañeros de maestría, Dianelys, Ale, Lupita, Hugo, Caro, Gil y Alonso por siempre ser buenos compañeros, por los buenos momentos y por todo su apoyo y amistad.

DEDICATORIA

A mi madre, **Rosa Elena Villanueva Mezquitic**, por siempre apoyarme en mis decisiones, por impulsarme a siempre ser mejor persona, por todo su amor y comprensión durante estos 2 años, gracias mamá por todo lo que has hecho por mí y por seguir a mi lado y ser parte fundamental para la realización de mis metas. Te amo.

A mis hermanos, **Brenda y Salvador**, por ser tan buenos hermanos y estar ahí cuando más los necesito, por su apoyo y por ser tan divertidos y únicos.

A mis sobrinos, **Ángela y Fernando**, por ser esa luz en mi vida, por siempre sacar lo mejor de mí e impulsarme a ser una mejor persona.

A mi **Juanito**, gracias mi amor por todo el apoyo, por los conocimientos teóricos y técnicos que me aportaste, por estar conmigo literalmente hasta el último minuto en el laboratorio, por toda tu confianza y amor, por ser una gran persona conmigo y nunca dejarme sola. Te amo.

INDICE

INDICE DE TABLAS.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	II
LISTADO DE ABREVIATURAS	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Agentes antivirales	3
2.2 Mecanismo de acción de compuestos antivirales.....	3
2.2.1 Inhibidores de adsorción y entrada	3
2.2.2 Inhibidores de desvestimiento de la cápside.....	4
2.2.3 Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos virales	4
2.2.4 Inhibidores de integración	4
2.2.5 Inhibidores de proteasa (Pps).....	5
2.2.6 Inhibidores de liberación	5
2.3 Sarampión.....	8
2.3.1 Virión	8
2.3.2 Organización del genoma	9
2.3.3 Ciclo de replicación	10
2.3.4 Manifestaciones clínicas	13
2.3.5 Poblaciones en riesgo.....	14
2.3.6 Transmisión	14
2.3.7 Tratamiento.....	15
2.4 Incidencia global de Sarampión en la actualidad	15
2.5 Respuesta de la Organización Mundial de la Salud (OMS).....	17
2.5.1 La Iniciativa Sarampión y Rubéola	17
2.5.2 Plan Estratégico Mundial contra el Sarampión y la Rubéola 2012-2020 ..	18
2.5.3 El objetivo para finales de 2020:	18
2.6 Nanopartículas metálicas.....	18
2.6.1 Nanopartículas metálicas como agentes antivirales.....	19
2.6.2 Mecanismos de acción de nanopartículas metálicas.....	21
2.6.3 Nanopartículas metálicas con compuestos bioactivos naturales y su actividad antiviral	22
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	25

5. OBJETIVO GENERAL	26
5.1 Objetivos específicos.....	26
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7.1 Nanopartículas metálicas.....	28
7.2 Cultivo de células Vero	28
7.4 Propagación del virus sarampión en células Vero.....	29
7.5 Titulación por Unidades Formadoras de Placa (UFP).....	29
7.6 Ensayo de actividad antiviral por medio de UFP	29
7.7 Caracterización de nanopartículas	30
7.7.1 Análisis de tamaño de partícula	30
7.7.2 Plasmón de resonancia.....	30
7.8 Ensayo de efecto virucida.....	30
7.9 Ensayos de inhibición viral a diferentes tiempos de infección.....	31
7.10 Análisis estadístico	31
8. RESULTADOS.....	31
Evaluación de la concentración citotóxica 50% (CC ₅₀) de las nanopartículas metálicas sobre la línea celular Vero.....	32
Titulación del virus por Unidades formadoras de Placa.....	33
Ensayos de actividad antiviral por Unidades Formadoras de Placa.....	34
Cálculo del índice terapéutico (IT) de cada una las nanopartículas evaluadas.	36
Caracterización de nanopartículas seleccionadas	36
Evaluación de la actividad antiviral de las nanopartículas a diferentes tiempos de infección	38
Evaluación del efecto virucida de las nanopartículas.....	39
Propuesta de mecanismo de acción de AuNPs-As	41
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES.....	47
PERSPECTIVAS	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

INDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
Tabla 1. Principales drogas antivirales de uso clínico en la actualidad.....	5
Tabla 2. Nanopartículas metálicas con actividad antiviral.....	20
Tabla 3. Valores de la CC50, CE50 y el IT obtenido para cada tratamiento evaluado.....	38

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Diagrama esquemático del virión de Sarampión.....	9
Figura 2. Genoma del virus de sarampión.....	10
Figura 3. Ciclo de replicación de Sarampión.....	13
Figura 4. Casos de sarampión reportados con bases de datos de septiembre de 2016 a febrero de 2017.....	16
Figura 5. Mecanismos de potencial antiviral de las nanopartículas metálicas.....	22
Figura 6. Viabilidad de células Vero en presencia de AgNPs-UC.....	32
Figura 7. Viabilidad de células Vero en presencia de AuNPs-Cts.....	33
Figura 8. Viabilidad de células Vero en presencia de AuNPs-As.....	33
Figura 9. Efecto de las AgNPs-Uc y su precursor AgNO ₃ sobre la formación de UFP por MeV.	34
Figura 10. Efecto de las AuNPs-Cts y su precursor HAuCl ₄ sobre la formación de UFP por MeV.	37
Figura 11. Efecto de las AuNPs-As y sus precursores HAuCl ₄ y extracto de ajo sobre la formación de UFP por MeV.	37
Figura 12. Plasmón de resonancia de nanopartículas de oro.....	39
Figura 13. Tamaño de AuNPs-As por DLS.....	39
Figura 14. Microscopia electrónica de barrido de AuNPs-As.	40
Figura 15. Potencial Z de AuNPs-As.....	40
Figura 16. Efecto de AuNPs-As a diferentes tiempos de la infección sobre la formación relativa de UFP.	41
Figura 17. Efecto de AuNPs-As sobre la formación de UFP por MeV.,,	42
Figura 18. Unidades formadoras de placa formadas después de diferentes horas de incubación del MeV y las AuNPs-As.....	42
Figura 19. Mecanismo de acción de AgNPs-As sobre el virus de Sarampión.....	43

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ssRNA (-)	RNA de cadena sencilla con polaridad negativa
FDA	Food and Droug Administration
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
RSV	Virus Sincitial Respiratorio
DNA	Ácido Desoxirribunocleico
RNA	Ácido Ribunocleico
HBV	Virus de Hepatitis B
HSV-1	Virus de Herpes Simple tipo 1
HSV-2	Virus de Herpes Simple tipo 2
HCV	Virus de Hepatitis C
CMV	Citomegalovirus
VZV	Varicela Zoster
OMS	Organización Mundial de la Salud
VACV	Virus Vaccinia
VSV	Virus de estomatitis vesicular
SFV	Virus del Bosque Semliki
µg	Microgramos
ml	Mililitros
Mg	Miligramos
Nm	Nanogramos
L	Litros
µL	Microlitros
H	Horas
Min	Minutos
Seg	Segundos
Mv	Milivolts

RESUMEN

El Sarampión (MeV) es un virus perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*. La enfermedad causada por este virus se sigue presentando como una importante causa de mortalidad en niños de países menos desarrollados a pesar de la existencia de una vacuna eficaz. Otro de los problemas serios es la reemergencia del virus en poblaciones vacunadas y en adultos no inmunizados y que no se cuenta con un antiviral específico contra esta enfermedad. Este problema enfatiza la importancia de desarrollar terapias accesibles contra MeV. Hoy en día, la nanotecnología brinda una opción innovadora para contrarrestar infecciones virales las cuales han sido propuestas como sistemas antivirales. Actualmente se cuenta con reportes de nanopartículas (NPs) contra virus envueltos y no envueltos, con distintos mecanismos de acción ya sea dentro de la célula huésped mediante la inhibición de la replicación o fuera de la célula mediante el bloqueo de la entrada de las partículas virales, es por ello que la nanotecnología brinda una opción innovadora para contrarrestar las infecciones virales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad anti-sarampión de las NPs metálicas sintetizadas a partir de compuestos bioactivos, así como determinar su posible mecanismo de acción. Se evaluó la citotoxicidad de NPs de plata con extracto de alga verde (AgNPs-UC), Nanopartículas de Oro con quitosano (AuNPs-Cts) y Nanopartículas de Oro con extracto de Ajo (AuNPs-As) y sus componentes por la técnica colorimétrica MTT obteniendo valores de citotoxicidad al 50% (CC50)= 4.71 μ g/mL para AgNPs-UC, 9.27 μ g/mL para las AuNPs-Cts y 141.75 μ g/mL para AuNPs-As. Posteriormente se evaluó la actividad antiviral por la técnica de Unidades Formadoras de Placa (UFP) obteniendo concentraciones efectivas al 50% (CE50)= > 3, > 3 y 8.829 μ g/mL para AgNPs-UC, AuNPs-Cts y AuNPs-As respectivamente. Ninguno de los componentes evaluados individualmente del complejo NPs-compuesto mostraron actividad antiviral significativa. Se calculó el índice terapéutico (IT) para cada una de las NPs evaluadas obteniendo los valores de < 1.57, < 3 y 16.07 μ g/mL para AgNPs-UC, AuNPs-Cts y AuNPs-As respectivamente. De acuerdo a estos resultados se seleccionaron las NPs con mayor IT para su caracterización. Se utilizó espectroscopia de UV-Vis para la determinación del plasmón de resonancia y Dispersión de Luz Dinámica (DLS) así como microscopía electrónica de barrido (SEM) para determinar el tamaño de la nanopartícula y se midió el potencial Z para conocer la carga perteneciente a las AuNPs-As. Obteniendo un tamaño promedio de 34.7nm con una polidispersidad de 0.2 y un potencial Z obtenido fue de 21.2 mV. Para conocer el posible nivel de acción de las AuNPs-As se realizó un ensayo de tiempos de infección observando una reducción significativa de la carga viral en la primera hora de infección. Finalmente se confirmó el efecto virucida al observar una disminución del 84 y 92% de UFP después de poner en contacto el virus y las AuNPs-As por 3 y 6 h respectivamente a 9 μ g/mL (CE50%) y de una 95 y 98% después de un contacto de 3 y 6 h a una concentración de 6 μ g/mL (CE25%) respectivamente. Por lo que es posible un bloqueo de receptores virales considerando la carga tanto de las AuNPs-As (positiva) y de la envoltura viral (negativa). Por lo tanto, las nanopartículas de oro sintetizadas utilizando el extracto de ajo como agente reductor pueden ser consideradas como un antiviral eficaz contra MeV y podrían ser consideradas como una terapia eficaz contra esta enfermedad y probablemente de otros virus envueltos.

ABSTRACT

Measles (MeV) is a virus belonging to the *Paramyxoviridae* family. The disease caused by this virus remains a major cause of mortality in children in less developed countries despite the existence of an effective vaccine. Another serious problem is the re-emergence of the virus in vaccinated populations and in non-immunized adults and that there is no specific antiviral against this disease. This problem emphasizes the importance of developing accessible therapies against MeV. Nowadays, nanotechnology offers an innovative option to counter viral infections which have been proposed as antiviral systems. There are currently reports of nanoparticles (NPs) against both enveloped and non-enveloped viruses with distinct mechanisms of action either within the host cell by inhibiting replication or outside the cell by blocking the entry of viral particles, that is why nanotechnology provides an innovative option to counter viral infections. The objective of this work was to evaluate the anti-measles activity of metal NPs synthesized from bioactive compounds, as well as to determine their possible mechanism of action. The cytotoxicity of silver NPs with green algae extract (AgNPs-UC), Gold Nanoparticles with chitosan (AuNPs-Cts) and Gold Nanoparticles with garlic extract (AuNPs-As) and its components was evaluated by the MTT colorimetric technique obtaining a cytotoxicity at 50% (CC50%)= 4.71 $\mu\text{g/mL}$ for AgNPs-UC, 9.27 $\mu\text{g/mL}$ for AuNPs-Cts and 141.75 $\mu\text{g/mL}$ for AuNPs-As. Subsequently, the antiviral activity was evaluated by the technique of plate forming units (PFU), obtaining effective concentrations at 50% (EC50) = > 3, > 3 and 8,829 $\mu\text{g/mL}$ for AgNPs-UC, AuNPs-Cts and AuNPs-As respectively. None of the individually evaluated components of the NPs-compound complex showed significant antiviral activity. The therapeutic index (IT) was calculated for each of the NPs evaluated, obtaining values of < 1.57, < 3 and 16.07 $\mu\text{g/mL}$ for AgNPs-UC, AuNPs-Cts and AuNPs-As respectively. According to these results, NPs with higher IT were selected for characterization. UV-Vis spectroscopy was used to determine the resonance plasmon and Dynamic Light Dispersion (DLS) as well as scanning electron microscopy (SEM) to determine the size of the nanoparticle and the Z potential was measured to know the charge belonging to The AuNPs-As. Obtaining an average size of 34.7 nm with a polydispersity of 0.2 and a Z potential obtained was 21.2 mV. To know the possible level of action of the AuNPs-As, an infection time trial was performed, observing a significant reduction of viral load in the first hour of infection. Finally, the virucidal effect was confirmed by a decrease of 84 and 92% of PFU after the virus and AuNPs-As were contacted for 3 and 6 h respectively at 9 $\mu\text{g/mL}$ (EC 50%) and 95 and 98 % After a contact of 3 and 6 has a concentration of 6 $\mu\text{g/mL}$ (EC25%) respectively. Thus, a blockade of viral receptors is possible considering the charge of both the AuNPs-As (positive) and the viral envelope (negative). Therefore, gold nanoparticles synthesized using garlic extract as a reducing agent may be considered as an antiviral effective against MeV and could be considered as an effective therapy against this disease and probably other enveloped viruses.

1. INTRODUCCIÓN

El Sarampión es una enfermedad sumamente contagiosa, causada por el virus perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*, es un virus envuelto con un genoma ssRNA (-). Esta enfermedad se caracteriza por presentar fiebre, conjuntivitis, tos, náuseas y erupción cutánea macular generalizada por todo el cuerpo. Aproximadamente uno de cada 10 niños con Sarampión presenta una infección de oído y hasta a uno de cada 20 evoluciona a neumonía. Cerca de uno en 1,000 sufre de encefalitis y dos de cada 1,000 fallecen. A pesar de la existencia de una vacuna exitosa contra sarampión, este virus se sigue presentando como uno de los principales responsables de la mortalidad en niños de países desarrollados. Otro de los problemas serios es la reemergencia del virus en poblaciones vacunadas y en adultos no inmunizados.

En México la última epidemia de sarampión ocurrió en 1989-1990, reportándose 89,163 casos. El último caso autóctono se registró en 1995. En el año 2011 se presentaron tres casos importados: 2 en el Distrito Federal y uno en Guanajuato. En diciembre del 2014 y enero de 2015 se presentaron dos casos importados en las entidades federativas de Baja California Sur y Nuevo León respectivamente.

La Iniciativa Sarampión Rubéola, presentada en 2001, es una iniciativa mundial encabezada por diferentes organizaciones. La Iniciativa se ha comprometido a lograr que ningún niño muera de sarampión o nazca con síndrome de rubéola congénita; a reducir la mortalidad por sarampión en un 95% y a lograr la eliminación de ambas enfermedades en al menos cinco regiones de la OMS para 2020.

Estas cuestiones enfatizan la importancia médica y la necesidad de desarrollar terapias farmacológicas accesibles contra el virus del sarampión.

Hoy en día, la nanotecnología brinda una opción innovadora para contrarrestar infecciones virales las cuales han sido propuestas como sistemas antivirales. Las propiedades antibacterianas, anticancerígenas y antioxidantes de las nanopartículas han sido ampliamente exploradas, sin embargo, sus propiedades antivirales siguen siendo un área en desarrollo. Actualmente se cuenta con reportes de nanopartículas contra virus envueltos y no envueltos, con distintos mecanismos de acción ya sea dentro de la célula huésped mediante la inhibición de la replicación o fuera de la célula

mediante el bloqueo de la entrada de las partículas virales (actividad virucida), es por ello que el uso de nanopartículas sugiere una alternativa antiviral de uso terapéutico contra el virus del sarampión.

2. ANTECEDENTES

2.1 Agentes antivirales

Los agentes antivirales son compuestos que detienen el desarrollo y propagación de un virus sin causar un daño relevante en el hospedero. A pesar de importantes logros en las últimas décadas, el número de compuestos antivirales disponibles siguen siendo pocos y son efectivos solo contra un grupo limitado de patógenos. (De Clercq, 2004)

En la actualidad existen alrededor de 50 fármacos antivirales que han sido aprobados por la FDA para tratamiento de infecciones virales; la mayoría de los medicamentos aprobados se han introducido en los últimos 20 años y se utilizan en el tratamiento de la infección por HIV. (Antonelli y Turriziani, 2012).

2.2 Mecanismo de acción de compuestos anitvirales

La clasificación de los antivirales se puede realizar por su mecanismo de acción o su perfil de actividad. Todos interfieren en distintas etapas de la replicación viral, pueden ser análogos de los ácidos nucleicos, bloquear la adhesión y penetración, inhibir la síntesis de ácidos nucleicos, inhibir la síntesis proteica o alterar la fase de maduración proteica. A demás algunos tienen la capacidad de ejercer un efecto virucida bloqueando los receptores virales impidiendo su adsorción a la célula.

Un número de fármacos actúa sobre los pasos que conducen a la formación de la cápside viral o al virión maduro, mientras que otros, interfieren con los procesos que afectan a la entrada viral y desensamble (De Clercq, 2004). Sin embargo, la mayoría de los fármacos aprobados bloquean eventos intracelulares que afectan a la síntesis y la dinámica de las proteínas virales y ácidos nucleicos (Tabla 1).

A continuación, se describen los diferentes niveles a los que pueden actuar los compuestos antivirales.

2.2.1 Inhibidores de adsorción y entrada

La primera etapa de la infección viral involucra la unión del virus a la membrana celular. Esta fase es mediada por la interacción entre las moléculas de superficie virales y los receptores celulares. Después de la adsorción, la entrada del virus ocurre por diferentes rutas como la fusión y la endocitosis. Los inhibidores que específicamente

se dirigen a estas etapas del ciclo viral han sido aprobados para el tratamiento de la infección por HIV (Esté y Talenti, 2007; Soriano *et al.*, 2009; Tilton y Doms, 2010) y para la prevención de la infección del RSV (Hu y Robinson, 2010; Lanari *et al.*, 2010; Wlliver, 2010).

2.2.2 Inhibidores de desrevestimiento de la cápside

El desrevestimiento viral es un paso esencial en el proceso de replicación viral y los inhibidores que se dirigen directamente a esta fase han sido identificados contra el virus de influenza (Davies *et al.*, 1964)

2.2.3 Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos virales

Los virus sintetizan sus ácidos nucleicos por una enzima viral como la DNA polimerasa, RNA polimerasa y la transcriptasa reversa. Estas polimerasas son cruciales en el ciclo viral y fueron y siguen siendo blancos atractivos de drogas para el tratamiento de muchas infecciones virales (Tsai *et al.*, 2006). Los análogos de nucleósidos (NAs) representan los primeros inhibidores de polimerasa que muestran eficacia clínica (Douglas *et al.*, 1984; Straus *et al.*, 1984; Fischl *et al.*, 1987) y en la actualidad son ampliamente usados para tratar infecciones como HBV, HSV-1, HSV-2 y HIV-1 (Coen y Schaffer, 2003; Dienstag, 2009; Von Kleist *et al.*, 2012), los NAs son típicamente formulados como prodrogas, requiriendo fosforilación intracelular para formar un análogo de (deoxi-) nucleósido trifosfato, el cual puede ser incorporado en una cadena de DNA o RNA viral naciente por la polimerasa viral.

La mayoría de los NAs son fosforilados por quinasas celulares, excepto los compuestos usados contra infecciones herpéticas en las cuales el paso de fosforilación inicial es llevado a cabo por la timidin quinasa viral y los dos pasos siguientes por enzimas celulares (Miller y Miller, 1982). Después de la incorporación, los NAs llevan a la maquinaria de polimerización a un paro, así como la falta del grupo hidroxilo-3' sobre el resto deoxiribosa requerido para la unión del siguiente nucleótido entrante (Coen y Schaffer, 2003; Painter *et al.*, 2004).

2.2.4 Inhibidores de integración

Los inhibidores que específicamente se dirigen a la integración han sido aprobados para el tratamiento de la infección por HIV. La integrasa de HIV es una de las tres enzimas codificadas esenciales codificadas por el gen viral *pol*. La integrasa es responsable para un paso esencial en la replicación de HIV-1 involucrando la

integración del genoma viral en el DNA celular. Esta enzima viral cataliza dos reacciones: procesamiento del extremo 3' del DNA viral durante el cual el dinucleótido GpT terminal es cortado del extremo 3' de cada repetición terminal larga; y la transferencia de la cadena, en la cual se une el genoma viral a el DNA cromosomal del hospedero formando un DNA proviral integrado funcional. Debido a que la integrasa es indispensable para la replicación de HIV, éste se ha convertido en un blanco validado para el desarrollo de agentes anti-HIV (Hazuda et al., 200; Pommier et al., 2005).

2.2.5 Inhibidores de proteasa (Pts)

Las proteasas virales representan un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos agentes antivirales. Los compuestos que bloquean estas han sido aprobadas para la infección de HIV y HCV la proteasa viral cataliza el procesamiento de las poliproteínas virales o el proceso de maduración de precápsides, y su actividad catalítica es requerida para la producción de nuevos viriones infecciosos (Antonelli y Turriziani, 2012)

2.2.6 Inhibidores de liberación

El último paso en el ciclo viral es la liberación de la nueva progenie viral de la célula hospedera. Algunas drogas son capaces de inhibir esta fase actuando sobre las proteínas virales involucradas en dicho proceso y han sido aprobadas para el tratamiento de infecciones por el virus Influenza (Hayden et al., 1997; Gubareva et al., 2000).

Tabla 1. Principales drogas antivirales de uso clínico en la actualidad (Antonelli y Turriziani, 2012)

Tipo de inhibidor antiviral	Área terapéutica	Mecanismo de acción
Inhibidores de entrada		
Enfurvitide	HIV	Péptidos derivados del dominio HR2 de la glicoproteína 41 (gp41). Interfiere con la fusión de membranas dependiente de gp-41.
Maraviroc	HIV	Modulador alostérico del receptor CCR5, el cual es un co-receptor esencial para el proceso de entrada de HIV
Palivizumab ^a	RSV	Anticuerpo monoclonal neutralizante. Se une a la proteína de fusión (F) de RSV, el

cual juega un rol en la unión del virus y media la fusión.

Inhibidores de desrevestimiento

Amantidina	Influenza A	Inhibidor del canal viral de iones M2. La actividad del canal es requerida para el “desrevestimiento”
------------	-------------	---

Rimantidina

Terminadores de la cadena de DNA

Inhibidores de DNA polimerasa

Aciclovir	HSV	Análogos de nucleósidos, activos como derivados de trifosfato, los cuales terminan prematuramente la síntesis de DNA
-----------	-----	--

Famciclovir

Valaciclovir

Ganciclovir	CMV
-------------	-----

Valganciclovir

Brivudina ^b	HSV-1 y VZV
------------------------	----------------

Foscarnet	HSV	Análogo pirofosfato inhibe selectivamente el sitio de unión pirofosfato sobre la DNA polimerasa
-----------	-----	---

Cidofovir	CMV	Análogo de nucleósido, actúa como derivado trifosfato, el cual termina prematuramente la síntesis de DNA
-----------	-----	--

Inhibidor de nucleósidos transcriptasa reversa (NRTIs)

Abacavir	HIV	Análogo de nucleósido, actúa como derivado trifosfato, el cual termina prematuramente la síntesis de DNA viral
----------	-----	--

Didanosina

Emtricitabina

Estavudina

Zalcitabina

Lamivudina	HIV y HBV
------------	-----------

Entecavir	HBV
-----------	-----

Telvivudina	HBV
-------------	-----

Inhibidor de nucleótidos transcriptasa reversa (NtRTIs)

Adefovir	HBV	Análogo de nucleósido, actúa como derivado trifosfato, el cual termina prematuramente la síntesis de DNA
----------	-----	--

Tenofovir	HIV y HBV
-----------	-----------

Inhibidores no nucleósidos transcriptasa reversa (NNRTIs)

Efavirenz	HIV	Unión a la región hidrofóbica de la transcriptasa reversa de HIV-1,
-----------	-----	---

		bloqueando la polimerización del DNA viral.
Etravirina		
Delaviridina		
Nevirapina		
<i>Combinación de productos</i>		
Tenofovir + emtricitabina (Truvada®)	HIV	Termina prematuramente la síntesis de DNA
Abacavir + lamivudina (Epzicom®)		
Tenofovir + emtricitabina + efavirenz (Atripla®)		
Emtricitabina + tenofovir + rilpivirina (Complera®)		
Zidovudina + abacavir + lamivudina (Trizivir®)		
Inhibidor de RNA		
Ribavirina	HCV RSV Fiebre Lassa	Nucleósido anti-metabolito, interfiere con la síntesis del RNA viral.
Inhibidor de integrasa		
Raltregavir	HIV	Unión a la integrasa viral, inhibiendo el paso de transferencia de la cadena de integración de HIV-1
<i>Inhibidor de proteasas (PIs)</i>		
Amprenavir	HIV	Inhibidores peptidomiméticos. Unión al sitio activo de la proteasa viral
Atazanavir		
Fosamprenavir		
Indinavir		
Lopinavir		
Nelfinavir		
Ritonavir		
Saquinavir		
Darunavir	HIV	PIs no peptídicos que se unen fuertemente y selectivamente a la proteasa de HIV-1
Tipranavir		
Boceprevir	HCV	PI peptídico que se une al sitio activo de la proteína no estructural 3 (NS3) de HCV. Inhibidor de la proteasa no estructural 3/4A (NS3/4A) de HCV

Inhibidor de liberación

Inhibidores de neuraminidasa

Oseltamivir	Influenza	Bloquea la neuraminidasa y previene el corte de los residuos de ácido siálico, el cual interfiere con la liberación de la progenie viral
Peramivir ^c	A/B	
Zanamivir		

^a Palivizumab está indicado para la prevención de enfermedades serias del tracto respiratorio bajo causadas por RSV en pacientes pediátricos con alto riesgo de enfermedad del virus sincitial respiratorio.

^b Brivudine está aprobado en algunos países europeos y en América Central.

^c Peramivir está autorizado para uso de emergencia en el tratamiento de ciertos pacientes hospitalizados con infección sospechosa o confirmada de influenza A (H1N1) 2009.

Sin embargo el número de antivirales aprobados se centra en pocas infecciones virales, principalmente infecciones causadas por HIV, HSV, influenza, HCV y RSV, (Antonelli y Turriziani, 2012; FDA, 2017) por lo que es importante recalcar que en la actualidad existen enfermedades virales de importancia clínica para las que no se cuenta con un tratamiento terapéutico, una de éstas enfermedades es el Sarampión, la cual ha tomado gran importancia en los últimos años debido a los brotes recientes presentados alrededor del mundo.

2.3 Sarampión

2.3.1 Virión

El virus de Sarampión (MeV, measles virus) es un virus envuelto de RNA clasificado en la familia *Paramyxoviridae* (Griffin, 2001) en el género *Morbillivirus*. La envoltura constituida por una bicapa lipídica es derivada de la célula del hospedero la cual contiene espículas incrustadas formadas por glicoproteínas virales, la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina (H) (Fig. 1). En el virión la proteína F (tipo I) oligomeriza como un homotrímero mientras que la glicoproteína H (tipo II) probablemente exista como un dímero tetramérico. La proteína F está formada como un precursor inactivo (F₀), el cual es biológicamente activado por un corte proteolítico involucrando proteasas tipo furina (Maisner et al., 2000) para generar las subunidades F₁ y F₂, las cuales están unidas por un puente disulfuro. Las glicoproteínas homo-oligoméricas H y F interactúan entre ellas para formar un complejo de fusión biológicamente activo (Wild et al., 1991). Después de la unión de la glicoproteína H al (los) receptor(es) de superficie celular, es probable que un cambio estructural en la proteína F sea inducido,

el cual activa el proceso de fusión, pero la estequiometría exacta y los detalles moleculares son desconocidos. La capa interna de la membrana del virión está cubierta con una proteína hidrofóbica llamada proteína de matriz (M). Esta proteína se asocia con ambas colas citoplasmáticas cortas de F y H y la ribonucleoproteína helicoidal (RNP) que contienen el genoma. Ésta juega un papel en el ensamblaje del virus a partir la membrana plasmática (Rima y Duprex, 2005).

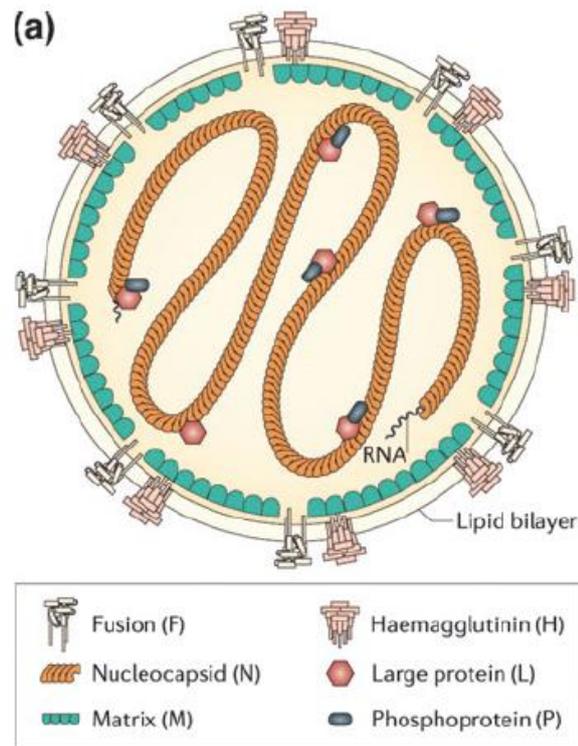


Figura 1. Diagrama esquemático del virión de Sarampión

2.3.2 Organización del genoma

Las RNP de MeV son de 1 μm de longitud y 18-21 μm de diámetro (Lund et al., 1984) y consiste de un genoma viral con polaridad negativa y al menos tres proteínas virales asociadas (Fig. 2). Un estudio reciente demostró que los viriones pueden contener más de una RNP (Rager et al., 2002). El genoma de RNA no segmentado con polaridad negativa, contiene 15,894 nucleótidos. Éste contiene seis unidades de transcripción (TUs), N, P/C/V, M, F, H y L, las cuales están separadas por secuencias intergénicas no transcritas (Ig) comprendidas por tres nucleótidos. Los genomas de los Morbillivirus son los únicos dentro de los *Paramyxoviridae* que contienen una región larga no codificante entre los marcos abiertos de lectura (ORF) de M y F. La región es rica en GC y es probable que se pliegue en un complejo secundario de estructuras de

RNA. La función de esta región aún no está bien entendida. La secuencia intergénica entre los genes M y F está localizada casi en el centro de esta región (Rima y Duprex, 2005).



Figura 2. Genoma del virus de sarampión

2.3.3 Ciclo de replicación

La infección inicia una vez que se da la unión de la proteína H (hemaglutinina) con los receptores principales SLAM o la molécula de señalización para la activación de linfocitos, también llamada CD150 y el receptor 4 relacionado a poliovirus (PVRL4) también llamado nectina 4. El virus de sarampión también puede utilizar el cofactor proteico de membrana CD46 como receptor alternativo para llevar a cabo la adsorción del virus. Mientras que la proteína F (fusión) lleva a cabo la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula huésped para permitir la entrada del virus (Griffin et al., 2012).

La proteína F es una glicoproteína integral de membrana tipo I (el grupo amino terminal yace fuera de la membrana viral). Es sintetizada como un precursor llamado F0 que es cortada durante su paso por la superficie celular por una proteasa de la célula huésped para producir 2 subunidades, F1 y F2 unidas por un enlace disulfuro. El nuevo grupo amino terminal formado por 20 aminoácidos de la subunidad F1 es altamente hidrofóbico, formando una región llamada péptido de fusión. Estos cambios conformacionales en la proteína F pueden dejar al péptido de fusión en una posición expuesta, pudiendo tener contacto así con la membrana de la célula blanco (Flint et al., 2004).

Dado que las células infectadas expresan las glicoproteínas virales en la superficie celular, son capaces de fusionarse con células vecinas no infectadas produciendo células gigantes multinucleadas denominadas sincicios. Sin embargo, no todo tipo de células infectadas forman sincicios. Se han observado de manera *in vivo* en células de pulmón, piel y tejido linfático, pero no en células del sistema nervioso central (Griffin et al., 2012).

Como resultado de la fusión entre la membrana plasmática y la membrana viral, la nucleocápside viral, una ribonucleoproteína que consiste en un genoma viral de RNA de sentido negativo asociado a la proteína virales L (polimerasa) la cual contiene las actividades enzimáticas del complejo de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), la proteína N (nucleocápside) y la proteína P (fosfoproteína) es liberada en el citoplasma donde comienza la síntesis de RNA mensajeros (mRNA). El complejo RdRp actúa tanto como transcriptasa viral y como replicasa (Flint et al., 2004; Griffin y Oldstone, 2009). El complejo de RdRp inicia la transcripción uniéndose a la región 3'UTR de la cadena de RNA negativa. Los mRNA sintetizados de cada gen se les agrega el cap y al final de cada gen viral hay una señal de paro hacia el extremo 5' en la cual RdRp produce una señal de poliadenilación mediante “deslizamiento” sobre un tramo de uracilos en el extremo 5' antes de liberar el mRNA para luego volver a iniciar la transcripción en la siguiente señal de inicio, es decir lleva a cabo una “transcripción secuencial”. Cada RNA se traduce y la replicación de un genoma de longitud completa ocurre eficientemente sólo después de la acumulación de proteínas virales, ya que la molécula de RNA naciente es inmediatamente encapsulada por la proteína N (Griffin y Oldstone, 2009). El complejo RdRp viral es probablemente el mismo para la replicación y para la transcripción. Puede ser transcriptasa y también puede convertirse en replicasa dependiendo de la concentración de nucleocápside.

El proceso de replicación viral de virus de sarampión involucra la producción de anti-genomas con sentido positivo, los cuales actúan como plantilla para la síntesis de nuevos RNAs genómicos de sentido negativo (Flint et al., 2004). El complejo de la RdRp se une a la región 3'UTR del genoma encapsidado de RNA (-) y comienza la replicación creando cadenas de RNA (+) también llamado anti-genoma el cual es al mismo tiempo encapsidado durante replicación. Para esto, el complejo RdRp ignora todas las señales de transcripción cuando está en modo de replicación. A partir de las cadenas de RNA (+) creadas, RdRp comienza a transcribir a partir de la región 3' UTR y crea nuevas cadenas de RNA (-). Al mismo tiempo que las nuevas cadenas de RNA (-) son sintetizadas, éstas son encapsidadas. Los genomas progenie pueden ser usados después de la replicación, transcripción secundaria o su incorporación en partículas virales (Flint et al., 2004). Las proteínas de membrana viral alcanzan su destino mediante una vía secretora celular donde el primer punto de parada es el retículo endoplásmico rugoso (RER). Como los procesos proteolíticos son necesarios para

producir glicoproteínas de envoltura maduras, los precursores entran en esta vía. El lumen del RE posee enzimas que catalizan las modificaciones químicas como la formación de enlaces disulfuro en los pasos iniciales del ensamblaje de las cadenas de los oligosacáridos (glicosilación). La glicosilación se lleva a cabo mediante la adición de asparagina (N-glicosilación) serina o treonina (O-glicosilación). La proteína posteriormente es transportada hacia el aparato de Golgi mediante un transporte de vesículas donde salen de un compartimento a otro en una vía secretora. Cuando la vesícula de transporte se encuentra en con la membrana blanco se desensambla como resultado de interacciones entre proteínas de fusión de membranas presentes en la vesícula y en la membrana blanco. El complejo N-etilmaleimida-sensitiva (Nsf) y la proteína de anclaje soluble a Nsf (Snaps) preparan la fusión de membranas ensamblándose de manera regulada y yuxtaponiendo las membranas que se fusionarán (Griffin y Oldstone, 2009). Una vez dentro del aparato de Golgi ocurren reacciones específicas en cada uno de sus compartimentos. Las enzimas responsables de las reacciones tempranas de maduración de estos oligosacáridos se encuentran en “cisternas *cis*” de la red *cis* del aparato de Golgi, mientras que las reacciones tardías se llevan a cabo en las “cisternas *trans*”. Dicha separación asegura que el procesamiento del oligosacárido siga una secuencia precisa conforme pasan a través del aparato de Golgi.

Las nuevas RNPs sintetizadas son transportadas a sitios selectos de la membrana plasmática, donde ocurre la interacción con las glicoproteínas integrales de membrana viral, seguido del rompimiento de la membrana y la liberación de las partículas virales mediante el complejo endosomal requerido para el transporte (ESCRT) (Griffin et al., 2012) (figura 3).

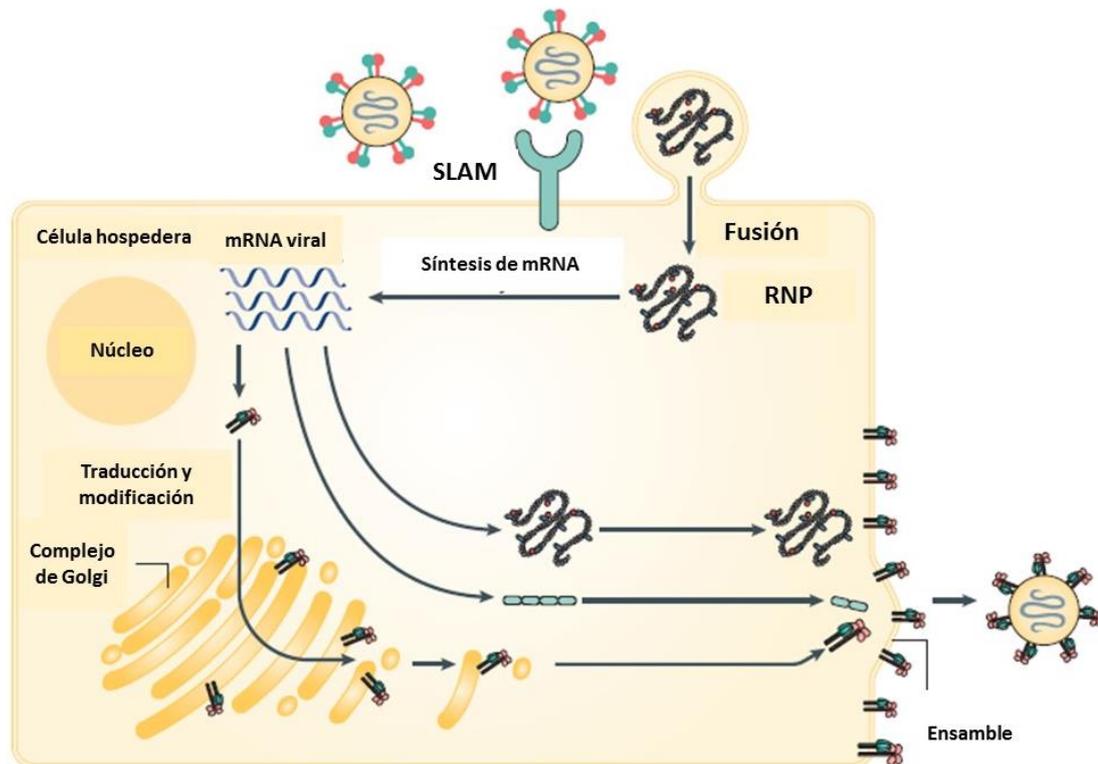


Figura 3. Ciclo de replicación de Sarampión

2.3.4 Manifestaciones clínicas

El primer signo del sarampión suele ser la fiebre alta, que comienza unos 10 a 12 días después de la exposición al virus y dura entre 4 y 7 días. En la fase inicial, el paciente puede presentar rinorrea, tos, ojos llorosos y rojos, y pequeñas manchas blancas en la cara interna de las mejillas (OMS, 2017).

Al cabo de varios días aparece un exantema, generalmente en el rostro y la parte superior del cuello, que se extiende en unos 3 días, acabando por afectar a las manos y pies. El exantema dura 5 a 6 días, y luego se desvanece. El intervalo entre la exposición al virus y la aparición del exantema oscila entre 7 y 18 días (media de 14 días) (OMS, 2017).

La mayoría de las muertes se deben a complicaciones del sarampión, que son más frecuentes en menores de 5 años y adultos de más de 20 años. Las más graves son la ceguera, la encefalitis (infección acompañada de edema cerebral), la diarrea grave (que puede provocar deshidratación), las infecciones del oído y las infecciones respiratorias graves, como la neumonía. Los casos graves son

especialmente frecuentes en niños pequeños malnutridos, y sobre todo en los que no reciben aportes suficientes de vitamina A o cuyo sistema inmunitario se encuentra debilitado por el VIH/SIDA u otras enfermedades (OMS, 2017).

En poblaciones con altos niveles de malnutrición y falta de atención sanitaria adecuada, el sarampión puede llegar a matar al 10% de los casos. La infección también puede provocar complicaciones graves en las mujeres embarazadas e incluso ser causa de aborto o parto prematuro. Quienes se recuperan del sarampión se vuelven inmunes de por vida (OMS, 2017).

2.3.5 Poblaciones en riesgo

Los niños pequeños no vacunados son quienes corren mayor riesgo de sufrir el sarampión y sus complicaciones, entre ellas la muerte. Las mujeres embarazadas sin vacunar también constituyen un importante grupo de riesgo. Sin embargo, puede infectarse cualquier persona que no esté inmunizada (es decir, que no haya sido vacunada y no haya sufrido la enfermedad) (OMS, 2017).

El sarampión sigue siendo frecuente en muchos países en desarrollo, sobre todo en algunas zonas de África, Asia. La abrumadora mayoría (más del 95%) de las muertes se registran en países con bajos ingresos per cápita e infraestructura sanitaria deficiente (OMS, 2017).

Los brotes de sarampión pueden ser especialmente mortales en países que estén sufriendo desastres naturales o conflictos, o recuperándose de ellos. Los daños a la infraestructura sanitaria y a los servicios de salud interrumpen la inmunización sistemática, y el hacinamiento en los campamentos de refugiados y desplazados internos aumenta mucho el riesgo de infección (OMS, 2017).

2.3.6 Transmisión

El virus del sarampión es muy contagioso y se propaga por la tos y los estornudos, el contacto personal íntimo o el contacto directo con secreciones nasales o faríngeas infectadas (OMS, 2017).

El virus presente en el aire o sobre superficies infectadas sigue siendo activo y contagioso durante periodos de hasta 2 horas, y puede ser transmitido por un

individuo infectado desde 4 días antes hasta 4 días después de la aparición del exantema (OMS, 2017).

El sarampión puede producir epidemias que causan muchas muertes, especialmente entre los niños pequeños malnutridos. En países donde el sarampión ha sido prácticamente eliminado, los casos importados de otros países siguen siendo una importante fuente de infección (OMS, 2017).

2.3.7 Tratamiento

No existe ningún tratamiento antiviral específico contra el virus del sarampión. Las complicaciones graves del sarampión pueden evitarse con un tratamiento de apoyo que garantice una buena nutrición, una ingesta suficiente de líquidos y el tratamiento de la deshidratación con las soluciones de rehidratación oral recomendadas por la OMS (para reponer los líquidos y otros elementos esenciales que se pierdan con la diarrea o los vómitos). Se deben prescribir antibióticos para tratar la neumonía y las infecciones de los oídos y los ojos (OMS, 2017).

Todos los niños de los países en desarrollo diagnosticados de sarampión deben recibir dos dosis de suplementos de vitamina A con un intervalo de 24 horas entre ambas. Este tratamiento es eficaz para restaurar los niveles de vitamina A, que durante la enfermedad suelen ser bajos incluso en los niños bien nutridos, y puede ayudar a prevenir las lesiones oculares y la ceguera. Además, se ha demostrado que los suplementos de vitamina A reducen la mortalidad por sarampión en un 50% (OMS, 2017).

2.4 Incidencia global de Sarampión en la actualidad

La enfermedad del sarampión sigue siendo comúnmente transmitida alrededor del mundo, incluyendo algunos países de Europa, Asia, el Pacífico y África. Cada año se reportan 267,000 casos de Sarampión, resultando en 146,000 casos mortales, la mayoría en niños (Secretaría de Salud, 2016). (Fig. 4)

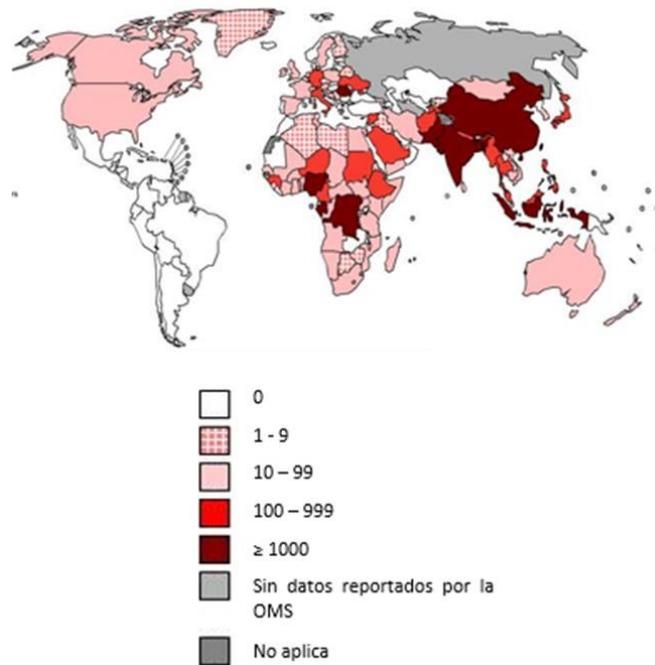


Figura 4. Casos de sarampión reportados con bases de datos de septiembre de 2016 a febrero de 2017 (OMS, 2017).

Según la OMS en 2017 se han confirmado 3,400 casos de personas infectadas, con 17 muertes contabilizadas en lo que va del año. En Myanmar se reportan 84 casos confirmados y en Australia las autoridades de salud han notificado 2 casos de Sarampión potencialmente contagiosos entre el 5 y el 14 de enero del 2017.

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) durante el periodo de diciembre de 2014 a febrero de 2015, se registraron 125 casos confirmados de sarampión entre los residentes de los EE.UU. en un brote vinculado a dos parques temáticos de Disney en el Condado de Orange, California. Desde el 2 de enero hasta el 3 de diciembre de 2016, EE.UU. ha notificado 62 casos de sarampión en 17 estados (Alabama, Arizona, California, Colorado, Connecticut, Florida, Georgia, Hawaii, Illinois, Massachusetts, Michigan, Minnesota, New York, Carolina del norte, Tennessee, Texas y Utah). El 23 de diciembre de 2016, el Departamento de Salud Pública del Condado de Los Ángeles, California, notificó 9 casos confirmados de sarampión. La investigación epidemiológica sigue en curso.

En México la última epidemia de sarampión ocurrió en 1989-1990, reportándose 89,163 casos. El último caso autóctono se registró en 1995. En el año 2011 se presentaron tres casos importados: 2 en el Distrito Federal y uno en Guanajuato. En diciembre del 2014 y enero del 2015 se presentaron dos casos importados en las

entidades federativas de Baja California Sur y Nuevo León respectivamente (Secretaría de Salud, 2017).

Estas cuestiones enfatizan la importancia médica y la necesidad de desarrollar terapias farmacológicas accesibles contra el virus del sarampión.

2.5 Respuesta de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

En 2010, la Asamblea Mundial de la Salud estableció tres hitos en el camino hacia la erradicación del sarampión que deberían lograrse en 2015:

- aumentar la cobertura sistemática de los niños de 1 año con la primera dosis de vacunas con componente anti-sarampión en más de un 90% o más a nivel nacional, y en más de un 80% o más a nivel distrital o de unidad administrativa equivalente;
- reducir y mantener la incidencia anual del sarampión en menos de 5 casos por millón; y
- reducir la mortalidad estimada del sarampión en más de un 95% con respecto a las estimaciones de 2000.

En 2015, el empuje mundial para mejorar la cobertura vacunal dio lugar a una reducción de las muertes en un 79%. Entre 2000 y 2015, con el apoyo de la Iniciativa Sarampión y Rubéola (ISR) y de la Alianza Gavi para las Vacunas, la vacunación contra el sarampión evitó una cifra estimada de 20,3 millones de muertes. En 2015, aproximadamente 183 millones de niños fueron vacunados contra el sarampión en campañas de vacunación en masa llevadas a cabo en 41 países. En la actualidad, todas las Regiones de la OMS tienen objetivos establecidos para eliminar esta enfermedad mortal prevenible para 2020.

2.5.1 La Iniciativa Sarampión y Rubéola

La ISR, presentada en 2001, es una iniciativa mundial encabezada por la Cruz Roja de los Estados Unidos de América, la Fundación pro Naciones Unidas, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América, el UNICEF y la OMS. La Iniciativa se ha comprometido a lograr que ningún niño muera de sarampión o nazca con síndrome de rubéola congénita; a reducir la mortalidad por sarampión en un 95% para 2015, y a lograr la eliminación de ambas enfermedades en al menos cinco regiones de la OMS para 2020.

2.5.2 Plan Estratégico Mundial contra el Sarampión y la Rubéola 2012-2020

En 2012 la ISR presentó un nuevo Plan Estratégico Mundial contra el Sarampión y la Rubéola para el periodo 2012-2020.

El Plan define estrategias claras para que los gestores de la inmunización en los países, en colaboración con los asociados nacionales e internacionales, logren los objetivos de control y eliminación de ambas enfermedades establecidos para 2015 y 2020.

2.5.3 El objetivo para finales de 2020:

Lograr la eliminación del sarampión y la rubéola como mínimo en cinco regiones de la OMS.

Tras analizar las tendencias actuales de la cobertura de vacunación contra el sarampión y de la incidencia de la enfermedad, y sobre la base del examen intermedio de la estrategia, el Grupo de Expertos de la OMS en Asesoramiento Estratégico (SAGE) en materia de inmunización concluyó que los objetivos mundiales y las metas de eliminación de la enfermedad para 2015 no se han alcanzado debido a que persisten las deficiencias de cobertura. El SAGE recomienda centrarse prioritariamente en mejorar los sistemas de inmunización en general para mantener los progresos realizados hasta la fecha en la lucha contra el sarampión.

La OMS continuará reforzando la red mundial de laboratorios para garantizar el diagnóstico rápido del sarampión y hacer un seguimiento de la propagación internacional de los virus que lo causan, a fin de coordinar mejor las actividades de vacunación y reducir la mortalidad por esta enfermedad, que se puede prevenir mediante una vacuna o tratamiento antiviral terapéutico accesible, eficaz y seguro.

2.6 Nanopartículas metálicas

El campo de la nanotecnología es una de las áreas más activas de investigación en ciencias del material moderno. Las nanopartículas (NPs) exhiben propiedades completamente nuevas basadas en características específicas como el tamaño, la distribución y morfología (Rai *et al.*, 2009; Morones *et al.*, 2005).

Las NPs metálicas son agentes biomédicos prometedores debido a su gran relación superficie/volumen y su actividad biológica. Entre las NPs desarrolladas, las nanopartículas de plata (AgNPs) y oro (AuNPs) tienen una amplia gama de aplicaciones en los campos de física, química y biología. Las investigaciones dirigidas a la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de las infecciones causadas por virus se incrementan día a día, las NPs metálicas surgen como un prometedor agente antiviral que podría ser utilizado para enfrentar enfermedades virales.

2.6.1 Nanopartículas metálicas como agentes antivirales

Las NPs metálicas son agentes antivirales muy efectivos y actúan dentro del hospedero inhibiendo la replicación viral o fuera de éste bloqueando la entrada de las partículas virales (Rai et al., 2014) (tabla 2).

Recientemente se encontró que la conjugación de NPs de oro puede covertir moléculas orgánicas terapéuticamente inactivas en drogas altamente activas (Bowman et al., 2008). Di Gianvincenzo et al., (2010) describen que las NPs cubiertas con sulfato amfílico se pueden unir a la glicoproteína de envoltura de HIV gp120 para inhibir la infectividad de éste *in vitro*. Papp et al. (2010) evaluaron NPs de oro funcionalizadas con ácido siálico (SA) de un tamaño de 2 nm y 14 nm con diferentes virus de influenza y encontraron que las NPs de 14 nm pueden inhibir la hemaglutinación a concentraciones nanomolares, sin embargo, no se encontró actividad significativa con las NPs de 2 nm. De acuerdo a estos hallazgos, la actividad de las NPs de oro depende de la dimensión de la NP y la distribución espacial de las moléculas ligando. Se evaluaron NPs de oro cubiertas con sulfonato mercaptoetano (MES) en ensayos antivirales utilizando el HSV-1 wild-type cepa McIntyre, las células Vero y las soluciones del virus fueron tratadas con AuNPs-MES a diferentes tiempos de infección para analizar las diferentes etapas de la infección viral que podrían ser bloqueadas con éstas. Los resultados obtenidos indicaron que las NPs cubiertas con sulfonato inhiben la infectividad de HSV-1 bloqueando las etapas tempranas de la replicación (Baram-Pinto et al., 2010).

Martinez-Avila et al. (2009) prepararon una pequeña librería la cual consistía de *manno*-GNPs (glico-nanopartículas de oro hidrosolubles multivalentes) y las utilizaron para la inhibición de la unión del receptor gp120 de HIV. La glicoproteína gp120 está localizada sobre la envoltura viral y se une a la molécula de adhesión de

células dendríticas DC-SIGN. Se encontró que las *mano*-GNPs imitan a DC-SIGN y esto previene la unión de gp120 a DC-SIGN. Posteriormente estudiaron la captación de AuNPs dentro de la célula produciendo oligomanósidos de gp120 (Martinez-Avila et al. 2009).

En cuanto a la actividad antiviral de las nanopartículas de plata (AgNPs), un estudio demostró que AgNPs de 25 nm fueron capaces de mediar la reducción en los niveles de entrada del virus vaccinia (VACV) a concentraciones no citotóxicas. Las AgNPs previnieron la fusión directa y la entrada por macropinocitosis del virus; las células donde un componente vital de la macropinocitosis (Pak1) fue bloqueado mostraron una reducción del efecto anti-entrada de las AgNPs. Además, ensayos de Western-blot sugieren que las AgNPs se unen directamente al complejo de entrada y fusión de VACV revelando un potencial mecanismo virucida (Gaikwad et al., 2013). La interacción de las NPs con biomoléculas virales sugiere que las NPs tienen un gran potencial no solo para enfrentar el desafío ofrecido por las interacciones virales sino también para potenciar la calidad de las terapias antivirales existentes. Dependiendo de la interacción y los efectos virucidas de éstas contra virus como Hepatitis B (Lu et al., 2008), HIV-1 (Elechiguerra et al., 2005; Lara et al., 2010; Sun et al., 2005) herpes simple tipo 1 (Baram-Pinto et al., 2009), virus sincitial respiratorio (Sun et al., 2008), e influenza (Mehrbod et al., 2009; Xiang et al., 2011) se puede predecir que las nanopartículas metálicas actúan como un escudo antiviral protector.

Tabla 2. Nanopartículas metálicas con actividad antiviral (Rai et al., 2016)

Características de las NPs	Tamaño (nm)	Virus	Mecanismo de acción	Ref.
AuNPs cubiertas con sulfonato mercaptoetano (MES)	4	HSV-1	Competencia por la unión del virus a la célula	Baram-Pinto et al., 2010
AuNPs cubiertas con multiples copias de un ligando terminal sulfonato anfifilico	2	HIV-1	Unión a gp120	Di Gianvincenzo et al., 210
AuNPs funcionalizadas con ácido siálico (SA)	14	Virus Influenza	Inhibición de la unión a la membrana plasmática	Papp et al., 2010
Gliconanopartículas de oro hidrosolubles multivalentes (<i>mano</i> -GNPs)	115	HIV-1	Inhibición de la unión de DC-SIGN a gp120	Lu et al., 2008
AgNPs cubiertas de poli N-vinil-2-pirrolidona (PVP)	1-10	HIV-1	Unión a gp120	Elechiguerra et al., 2005; Lara et al., 2010;

			Sun et al., 2005
AgNPs	10-50	HBV	Interacción con DNA de doble cadena y/o unión con partículas virales
AgNPs	5-20	Influenza	Posible interacción con hemaglutinina. Interacción con partículas virales
AgNPs cubiertas con sulfonato mercaptoethano (MES)	4	HSV-1	Competencia por unión del virus a la célula
AgNPs cubiertas de poli N-vinil-2-pirrolidona (PVP), albúmina de suero bovino (BSA) y proteína F recombinante de RSV (RF 412)	65-72	RSV	Interferencia con adsorción viral
			Lu et al., 2008
			Mehrbod et al., 2009; Xiang et al., 2011
			Baram-Pinto et al., 2009
			Sun et al., 2008

2.6.2 Mecanismos de acción de nanopartículas metálicas

Se ha demostrado que las NPs metálicas tienen potente actividad antiviral, además el potencial virucida de las NPs puede ser incrementado si se conoce el sitio exacto de interacción y el modo de acción llevando a la modificación de la superficie de las NPs para un uso más amplio y efectivo. Podría existir una unión directa con la membrana celular, por lo que las NPs pueden entrar a la célula y prevenir la replicación del genoma (DNA o RNA), y bloquear la multiplicación viral. Las nanopartículas también pueden ayudar a prevenir la fusión de la envoltura viral con la membrana celular bloqueando la penetración viral (Rai et al., 2005). Los posibles mecanismos de acción se muestran en la (Fig. 5)

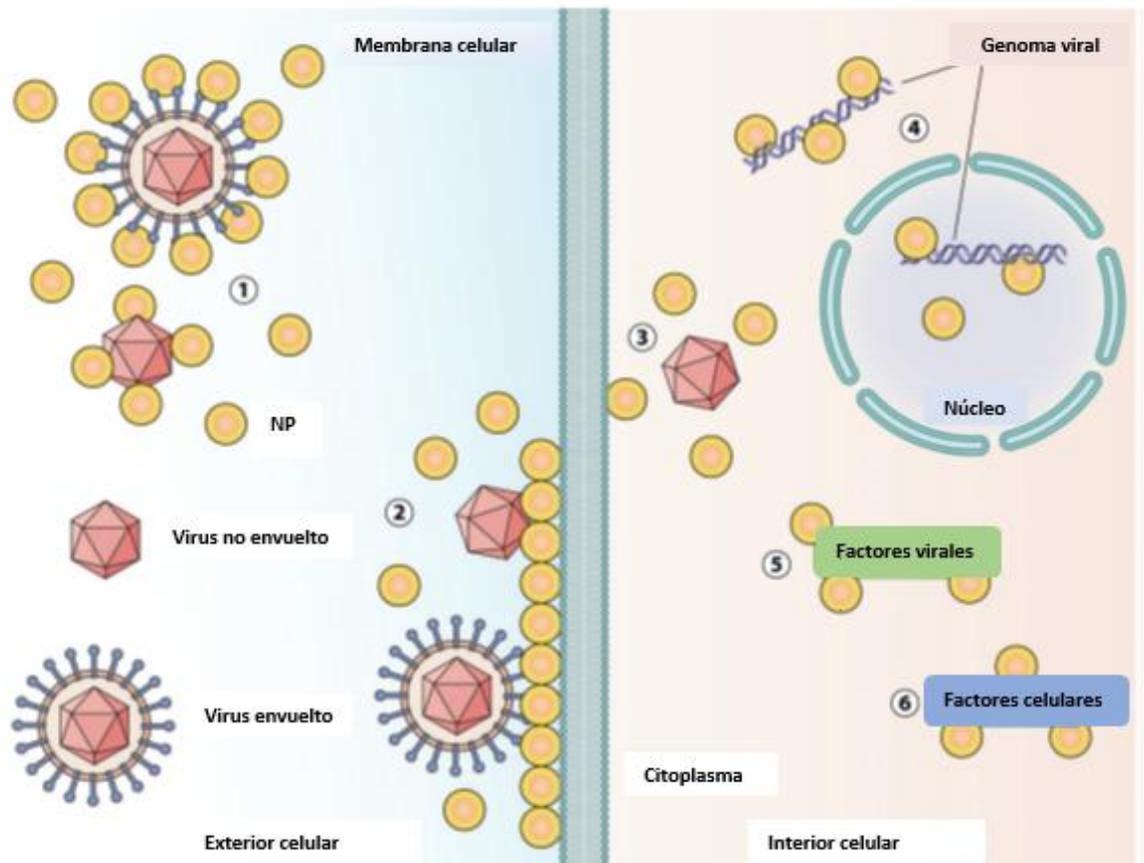


Figura 5. Mecanismos de potencial antiviral de las nanopartículas metálicas. (1) Interacción con la envoltura y/o las proteínas de superficie; (2) Interacción con la membrana celular bloqueando la penetración; (3) Bloqueo de rutas celulares de entrada viral; (4) Interacción con genoma viral; (5) Interacción con factores virales necesarios para la replicación; (6) Interacción con factores celulares necesarios para una replicación viral productiva.

2.6.3 Nanopartículas metálicas con compuestos bioactivos naturales y su actividad antiviral

Recientemente se ha reportado el uso de compuestos bioactivos como extractos herbales, algales o simplemente de origen natural, en la reducción de la plata (Ag^+) u oro (Au^+) a NPs con propiedades antivirales; el excelente poder bioreductor de estos compuestos para formar NPs metálicas es atribuido a la gran cantidad de polisacáridos, alcaloides, esteroides, fenoles, saponinas y flavonoides las cuales ayudan en la reducción y estabilización de NPs por periodos más prolongados en comparación con otros agentes reductores como citrato o algunos otros polímeros (PVP) (Kannan *et al.*, 2013; Mohandass *et al.*, 2013; Venkatpurwar y Pokharkar, 2011). La síntesis de NPs por química verde proporciona un avance sobre métodos químicos y físicos ya que es rentable y favorable al medio ambiente, de fácil aplicación para la síntesis a gran escala y en este método no hay necesidad de usar alta presión, energía, temperatura y productos químicos tóxicos (Sangeetha y Saravanan, 2014).

Diversos grupos de investigación han reportado la síntesis de nanopartículas metálicas (Au, Ag y Pd) usando compuestos naturales, se han sintetizado compositos de AgNPs/quitosano contra el virus de influenza A H1N1 utilizando NPs de un tamaño de 3.5, 6.5 y 12.9 nm a concentraciones de 100, 200, 300 y 400 µg/mL. La actividad antiviral fue evaluada comparando el radio TCID50 de las suspensiones virales tratadas con los compositos y las suspensiones no tratadas. Para todos los tamaños de AgNPs evaluadas, la actividad antiviral contra el virus Influenza A H1N1 incrementó conforme la concentración de AgNPs incrementaba. Se observó una dependencia del tamaño de las AgNPs con el efecto antiviral: la actividad generalmente era más potente con AgNPs más pequeñas en los compositos. Estos resultados indican que los compositos AgNO/Ch interactúan con el virus exhibiendo una actividad antiviral (Yasutaka et al., 2013). Por otro lado, Fatima et al. (2016) sintetizaron y evaluaron la actividad antiviral de AgNPs sintetizadas utilizando un extracto de *Cinnamomum cassia*, obteniendo un tamaño de 42 nm y mostrando una reducción de la carga del virus de Influenza A H7N3 de aproximadamente un 50% con una concentración de 101µg/mL.

Estos estudios demuestran la capacidad antiviral de las nanopartículas metálicas sintetizadas a partir de compuestos naturales, ya que las moléculas presentes en estos compuestos podrían interactuar con el virus o las células potenciando la actividad de las nanopartículas y bloqueando algún paso de la replicación viral y por lo tanto la producción de viriones infectivos.

3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad del sarampión ha tomado gran importancia debido a que han surgido recientes brotes, la OMS ha decidido establecer un plan estratégico para la erradicación de esta enfermedad. Una combinación de enfoques profilácticos (vacunas) y terapéuticos (antivirales e inmunomoduladores) podrían contribuir a la erradicación de este virus.

Los antivirales podrían facilitar el rápido control de los brotes, suprimiendo la enfermedad mediante la profilaxis en los contactos y en las personas con inmunosupresión. Actualmente no se cuenta con un antiviral específico para sarampión.

El uso de nanopartículas metálicas sintetizadas a partir de compuestos naturales como antivirales podría funcionar como una terapia prometedora contra esta enfermedad ya que la síntesis de estas es rentable, de baja toxicidad y favorable al medio ambiente.

4. HIPÓTESIS

Las nanopartículas metálicas a partir de compuestos bioactivos tienen la capacidad de inhibir la infección del virus de sarampión en células Vero a concentraciones no tóxicas.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiviral de las nanopartículas metálicas a partir de compuestos bioactivos y definir el nivel de acción en el ciclo de replicación del sarampión.

5.1 Objetivos específicos

- Determinar la concentración citotóxica 50% (CC50) de nanopartículas metálicas a partir de compuestos bioactivos sobre la línea celular Vero.
- Evaluar la actividad antiviral de las nanopartículas sobre el virus de sarampión y definir la concentración efectiva 50% (CE50).
- Caracterización de las nanopartículas con mayor Índice Terapéutico.
- Evaluar la actividad virucida de las nanopartículas con mayor Índice Terapéutico
- Determinar el nivel de acción de las nanopartículas seleccionadas durante el ciclo de replicación del virus de Sarampión:

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se determinó la concentración citotóxica al 50% (CC50) de las nanopartículas y sus vehículos por el ensayo de MTT. Para evaluar la capacidad antiviral contra el virus de Sarampión de nanopartículas metálicas, se tituló la cepa vacunal del virus de sarampión mediante la técnica de Unidades Formadoras de Placa (UFP) en la línea celular Vero, se evaluó el efecto antiviral contra el virus de sarampión de cada una de las nanopartículas y se obtuvo el Índice terapéutico (IT) para cada tipo de nanopartícula. Se realizó la caracterización de las NPs con mayor IT obteniendo el plasmón de resonancia por espectroscopía UV-VIS, tamaño de NP por dispersión de luz dinámica, así como su carga superficial midiendo el potencial Z. Se determinó el nivel de acción de las nanopartículas seleccionadas y su efecto virucida contra sarampión por medio UFP.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Nanopartículas metálicas

Se utilizaron las nanopartículas de plata con extracto de *Ulva clathrata* (AgNPs-UC) sintetizadas por el Programa Maricultura, así como las nanopartículas de Oro y Quitosano (AuNPs-Cts) y las Nanopartículas de oro y extracto de ajo (*Allium sativum*) (AuNPs-As) sintetizadas por la Unidad de Nanobiotecnología, del Laboratorio de Inmunología y Virología, ambos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

7.2 Cultivo de células Vero

Se utilizó la línea celular VERO (ATCC® CCL-81™) y se cultivará en un medio DMEM F-12 (Life technologies) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS), y 10 mL/L de antibiótico. En frascos de 25 cm³, con 5 mL de medio a 37°C, en atmósfera de aire con 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa.

7.3 Ensayos de viabilidad

Se realizó empleando el método de reducción del MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetil-1,2,4-triazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio] introducido por Mossman y preparando el reactivo a una concentración de 5mg/mL en PBS (Buffer de fosfatos-salina).

Las células con 80% de confluencia fueron tripsinizadas, contadas en la cámara de Neubauer y transferidas a placas de 96 pozos con fondo plano, con una cantidad de 15,000 células por pozo, las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta obtener una confluencia de 80-90%. Se agregaron 200 µl de los compuestos por pozo a diferentes concentraciones. Se incubaron durante 48h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se eliminó el medio y se agregaron 22 µl de la solución de MTT a cada pozo y se incubaron a 37°C durante 2 h. Se les eliminó el MTT, se adicionaron 100µl de DMSO (dimetilsulfóxido) y se midió la absorbancia a 450 nm en el lector de ELISA. Se calcularon los porcentajes de supervivencia relativas a las células control no tratadas y se calcularon las concentraciones citotóxicas al 50% (CC₅₀). Los valores de CC₅₀ se determinaron mediante un análisis de regresión Probit. La valoración de las NPs se realizó empleando tres pozos con cada concentración evaluada y el ensayo se realizó por triplicado.

7.4 Propagación del virus sarampión en células Vero

El virus de sarampión fue propagado en células Vero. La propagación de los virus se realizó en cajas de cultivo de 75cm² de superficie, con medio DMEM, 5% de SFB y 1% (v/v) de antibiótico, en condiciones de atmósfera húmeda con 5% CO₂ y temperatura de 37°C.

7.5 Titulación por Unidades Formadoras de Placa (UFP)

En placas de 6 pozos se sembraron 320,000 células Vero y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ hasta obtener 80-90% de confluencia, posteriormente se infectaron con 1 mL de diluciones seriadas al doble de virus de sarampión; se incubaron durante 1 h a 37°C con 5% de CO₂, se retiró el inóculo y se cubrió con 1 mL de agar (MP Biomedicals Cat No. 194615 Lot No. R19854) al 1.2% y 1 mL de DMEM, –incubadas por 72 h en ambiente controlado, al término de lo cual se retiró el agar y se fijó con metanol-acetona 1:1 durante 30min a -30°C y se tiñeron con cristal violeta al 1% para cuantificar las UFP. Este ensayo se realizó por triplicado.

7.6 Ensayo de actividad antiviral por medio de UFP

El Virus Sarampión puede ser agregado a un medio de cultivo celular en una fase semisólida como el agar, de esta manera cuando un virus infecta una célula, los nuevos virus formados solo pueden infectar a las células inmediatamente vecinas y no a las alejadas, ya que el medio semisólido limita su movilidad. Coloreando las células se observarán zonas no teñidas (placas de lisis), correspondientes a las células destruidas, estas placas de lisis contienen los nuevos viriones que se produjeron. En teoría cada placa de lisis formada corresponde a un único virus de la suspensión inicial en consecuencia las concentraciones virales medidas por la cantidad de placas se denominan unidades formadoras de placas.

Se plaquearon 320,000 células por pozo en placas de 6 pozos, y al obtener una confluencia del 80-90% se infectaron con 80-90 UFP de MeV y se adicionaron al mismo tiempo los NPs a diferentes concentraciones (0.03-30 µg/µL), en un volumen total de 1 mL y se incubaron por una hora a 37°C con 5% de CO₂. Después de la adsorción, la solución conteniendo NP y virus fue removida y se les agregó 1 mL de agar al 1.2% en medio DMEM y 1 mL de DMEM, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Después de 72 horas, se retiró el agar, y se fijaron con metanol-acetona por 30min

a -30°C y se tiñeron con cristal violeta al 1%, se contó el número de placas detectadas ya que este es directamente proporcional al número de partículas virales.

Los valores de CE_{50} se determinaron mediante un análisis de regresión Probit y se calculó el Índice Terapéutico (IT) con los valores de CC_{50} previamente obtenidos por los ensayos de viabilidad y se seleccionaron las NPs con el mayor IT. La valoración de las NPs se realizó empleando tres pozos con cada concentración evaluada y el ensayo se realizó por triplicado.

$$IT = \frac{CC_{50}}{CE_{50}}$$

7.7 Caracterización de nanopartículas

Se caracterizaron las nanopartículas con mejor actividad antiviral, basados en el valor de su IT. Se determinó el tamaño promedio de las NPs y su plasmón de resonancia correspondiente para el tipo de NP.

7.7.1 Análisis de tamaño de partícula

El análisis de las nanopartículas se determinó mediante dispersión de luz dinámica utilizando el equipo nanosizer NS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Se analizaron 3 diluciones de las nanopartículas (1/100, 1/1,000 y 1/10,000) por un tiempo de 15 minutos.

7.7.2 Plasmón de resonancia

Se utilizó espectrofotometría UV-Vis para determinar la presencia del plasmón de resonancia perteneciente a las NPs utilizando el equipo de NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific®) empleando un intervalo de frecuencia de 200 a 700 nm.

7.8 Ensayo de efecto virucida

Para analizar la posibilidad de que los compuestos actúen directamente sobre la partícula viral llevando a cabo la inactivación de los viriones, se realizó un ensayo virucida. En placas de 6 pozos se sembraron 320,000 células por pozo y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 hasta obtener una confluencia del 80-90 % y se retiró el medio de las células confluentes. Se pusieron en contacto 500µL del virus de Sarampión (80-90 UFP) con 500µL (9 y 6 µg/mL) de las nanopartículas por 0, 3 y 6 h. Se incubaron por 1 h a 37°C, posteriormente se retiró la mezcla de las nanopartículas con el virus y se

cubrieron con 1 mL de DMEM y 1 ml de agar (MP Biomedicals Cat No. 194615 Lot No. R19854) al 1.2%, para ser incubadas por 72 h en ambiente controlado, al término de lo cual se retiró el agar y se fijaron con metanol-acetona 1:1 durante 30 min a -30°C y se tiñeron con cristal violeta al 1% para cuantificar las UFP. Este ensayo se realizó por triplicado.

7.9 Ensayos de inhibición viral a diferentes tiempos de infección

Se plaquearon 320,000 células por pozo en placas de 6 pozos, al obtener una confluencia del 80-90% se infectaron con 80-90 UFP de MeV y se adicionaron las NPs a diferentes tiempos de infección (1 h pre-infección, 0 h, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4h, y 6 h), en un volumen total de 1 mL y se incubaron por una hora a 37°C con 5% de CO₂. Después de la adsorción, la solución conteniendo NP y virus fue removida después de una hora de contacto con la célula, se les agregó 1 mL de agar al 1.2% en medio DMEM y 1 mL de DMEM, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Después de 72 horas, se retiró el agar, y se fijaron con metanol-acetona por 30min a -30°C y se tiñeron con cristal violeta al 1%, se contó el número de placas detectadas ya que este es directamente proporcional al número de partículas virales.

7.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por el paquete estadístico SPSS versión 20.0. Se realizó un análisis de varianza de una vía y se utilizó la prueba de Dunnet para las comparaciones contra el control viral. Los resultados de las comparaciones fueron consideradas significativas si $p < 0.05$ o altamente significativas si $p < 0.001$

8. RESULTADOS

Evaluación de la concentración citotóxica 50% (CC₅₀) de las nanopartículas metálicas sobre la línea celular Vero.

Para determinar la citotoxicidad de las NPs metálicas, AgNPs-Uc, AuNPs-Cts y AuNPs-As, así como de sus precursores a diferentes concentraciones, se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante la técnica colorimétrica MTT previamente descrita. Se realizaron tres ensayos por triplicado para cada uno de las NPs y se calculó la CC₅₀ mediante regresión lineal (Probit) con el programa SPSS 20.

En la figura 6 se muestra el efecto citotóxico de las AgNPs-UC así como de sus vehículos (AgNO₃ y extracto del alga verde *Ulva clathrata*) en un cultivo de células Vero. Mediante el análisis Probit se determinó una CC₅₀= 4.71 µg/mL, al evaluar la citotoxicidad de los vehículos utilizados, se observa un aumento en los niveles de muerte a partir de 3 µg/mL con el AgNO₃, por otro lado, no se observa muerte celular, obteniendo una viabilidad de 95-100 % con el extracto de *Ulva clathrata* incluso a una concentración de 500 µg/mL.

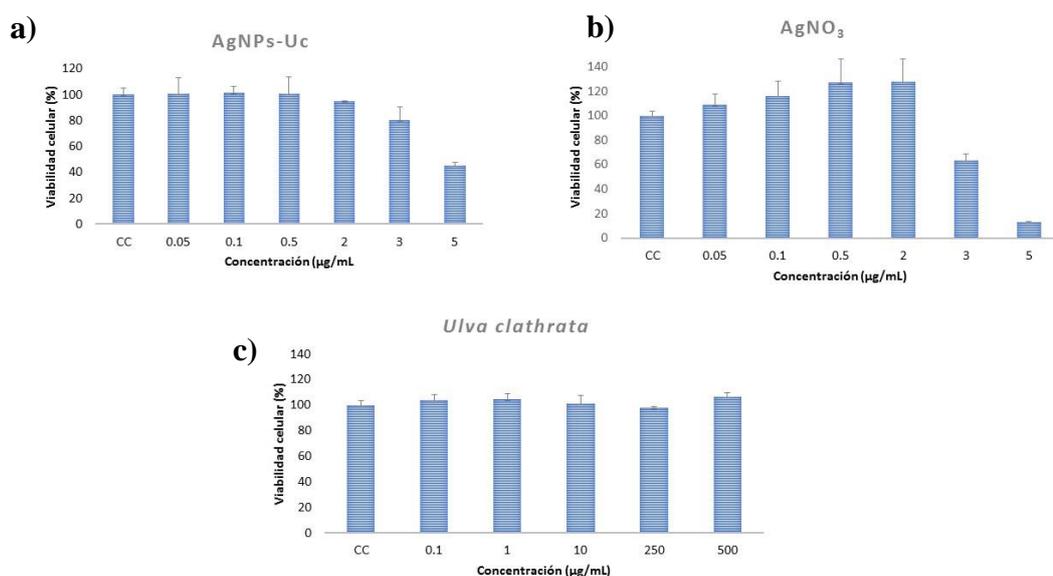


Figura 6. Viabilidad de células Vero en presencia de AgNPs-UC (a) y sus vehículos, AgNO₃ (b) y *Ulva clathrata* (c) por 48h a diferentes concentraciones (0.05-500 µg/mL). CC: control celular

En la figura 7 se observa el efecto citotóxico de las AuNPs-Cts obteniendo una CC₅₀= 9.27 µg/mL (a) y su precursor HAuCl₄ obteniendo una CC₅₀= 231.54 µg/mL (b) sobre células Vero

a)

b)

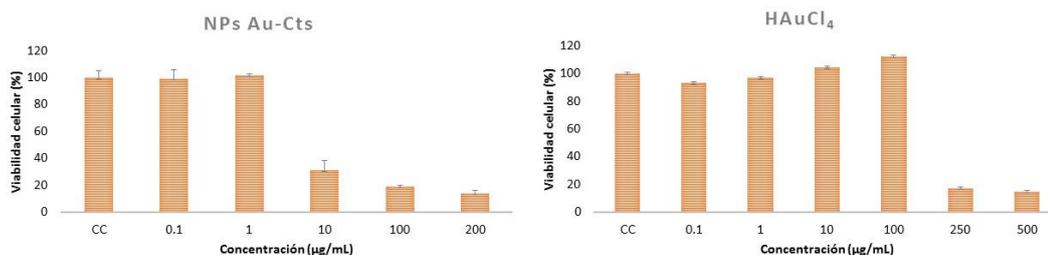


Figura 7. Viabilidad de células Vero en presencia de AuNPs-Cts (a) y HAuCl₄ (b) por 48h a diferentes concentraciones (0.1-500 µg/mL). CC: control celular

En la figura 8 se observa el efecto citotóxico de las AuNPs-As obteniendo una CC50= 141.75 µg/mL (a). Se evaluó el nivel de citotoxicidad de los componentes de las AuNPs-As los cuales son el precursor HAuCl₄ (b) y el extracto de Ajo (*Allium sativum*) (c) a diferentes concentraciones. Se obtuvo una CC50= 231.74 µg/mL con el HCl₄ y una CC50 > 1500 µg/mL con el extracto de ajo.

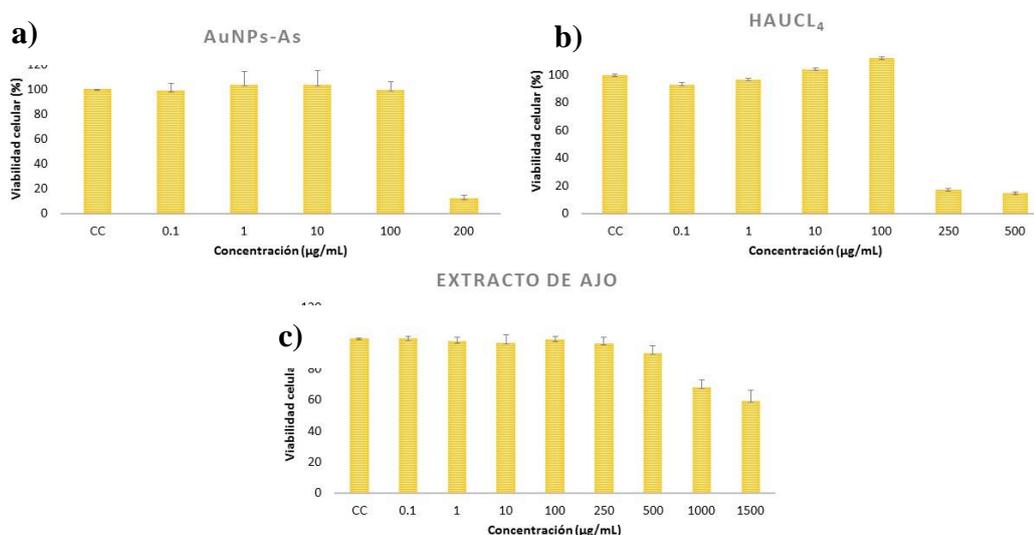


Figura 8. Viabilidad de células Vero en presencia de AuNPs-As (a), HAuCl₄ (b) y extracto de ajo (c) por 48h a diferentes concentraciones (0.1-500 µg/mL). CC: control celular

Titulación del virus por Unidades formadoras de Placa

A fin de determinar el título viral de nuestro stock de MeV cepa Edmoston por la técnica de Unidades Formadoras de Placa se utilizó la técnica descrita por McGinnes

et al., (2006). Se obtuvo un título viral de 2.1×10^5 UFP/mL. Este ensayo se realizó por triplicado

Ensayos de actividad antiviral por Unidades Formadoras de Placa

Se utilizó la medición de Unidades Formadoras de Placas para determinar la actividad antiviral contra MeV presente en las NPs metálicas y en sus precursores. En la figura 9 se observa el efecto de las AgNPs-Uc y de su precursor el AgNO₃ sobre el virus de sarampión después de 72h de interacción obteniendo una CE₅₀ = > 3 µg/mL para ambos compuestos.

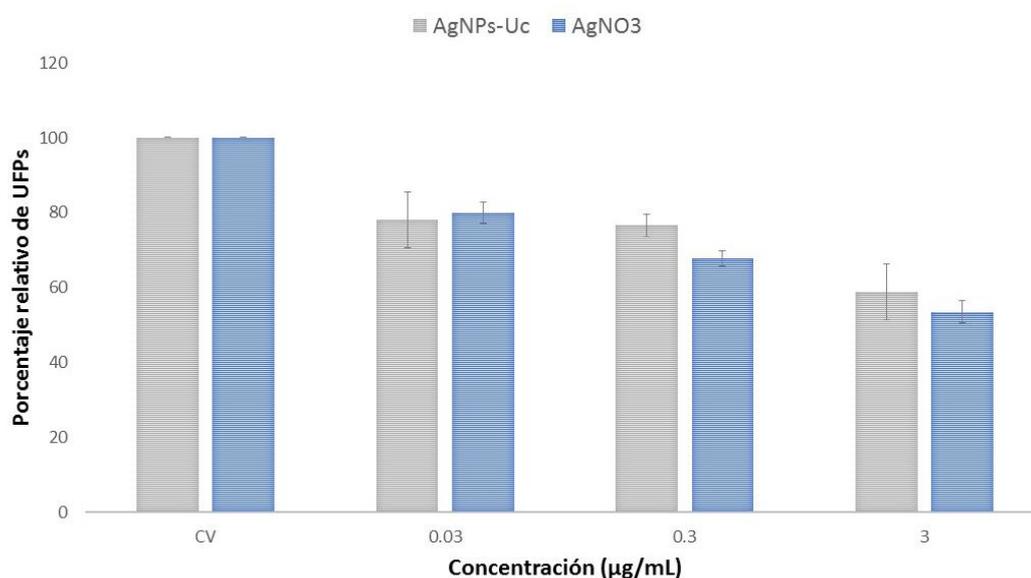


Figura 9. Efecto de las AgNPs-Uc (barra gris) y su precursor AgNO₃ (barra azul) sobre la formación de UFP por MeV. Las columnas de la izquierda muestran las células infectadas sin tratar (control viral) las cuales fueron tomadas como 100 % de porcentaje relativo de UFP, continuando con las células infectadas y tratadas con 0.03, 0.3 y 3 µg/mL de los compuestos.

En la figura 10 se muestra el efecto de las AuNPs-Cts y su precursor el HAuCl₄, obteniendo un efecto de inhibición de las nanoparticulas de solamente 21.83 % con la concentración de 3 µg/mL.

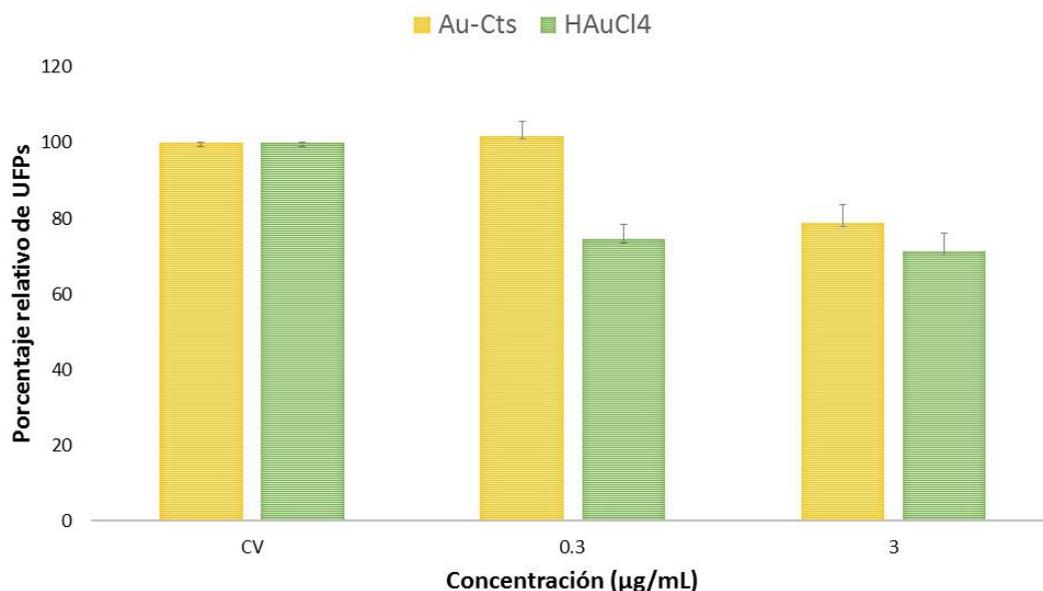


Figura 10. Efecto de las AuNPs-Cts (barra amarilla) y su precursor H AuCl₄ (barra verde) sobre la formación de UFP por MeV. Las columnas de la izquierda muestran las células infectadas sin tratar (control viral) las cuales fueron tomadas como 100% de porcentaje relativo de UFP, continuando con las células infectadas y tratadas con 0.3 y 3 µg/mL de los compuestos.

Se evaluó la actividad antiviral de las AuNPs-As obteniendo una CE₅₀= 8.829 µg/mL y de sus precursores H AuCl₄ y extracto de ajo, obteniendo una CE₅₀= > 10 µg/mL (fig. 11).

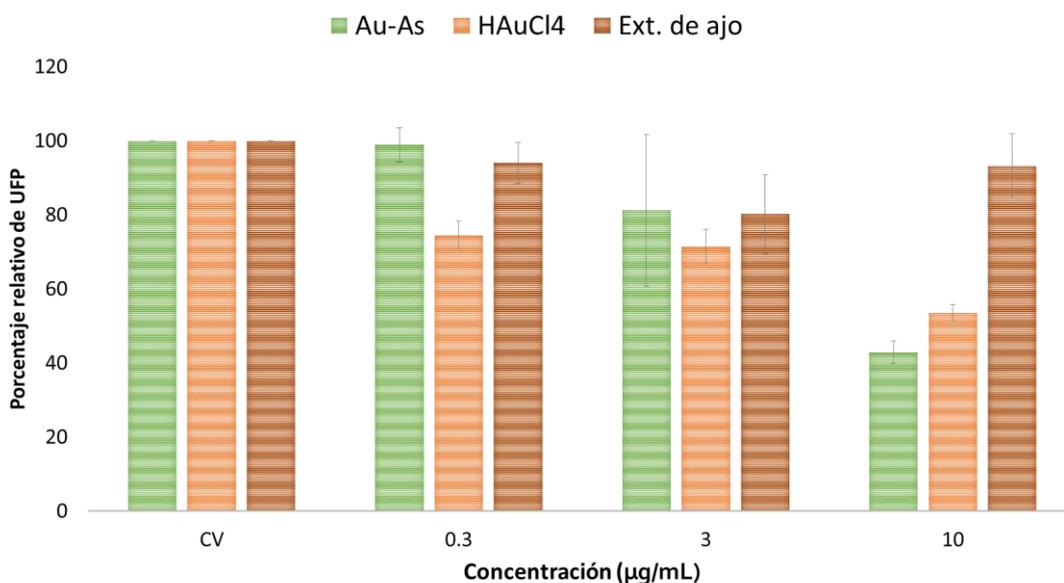


Figura 11. Efecto de las AuNPs-As (barra verde) y sus precursores H AuCl₄ (barra naranja) y extracto de ajo (barra café) sobre la formación de UFP por MeV. Las columnas de la izquierda

muestran las células infectadas sin tratar (control viral) las cuales fueron tomadas como 100% de porcentaje relativo de UFP, continuando con las células infectadas y tratadas con 0.3, 3 y 10 µg/mL de los compuestos.

Cálculo del índice terapéutico (IT) de cada una las nanopartículas evaluadas.

El IT se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$IT = \frac{CC_{50}}{CE_{50}}$$

En la tabla 3 se resumen las CC₅₀, CE₅₀ y los IT para cada tratamiento evaluado.

Tabla 3. Valores de la CC₅₀, CE₅₀ y el IT obtenido para cada tratamiento evaluado

Tratamiento	CC₅₀	CE₅₀	IT
AgNPs-UC	4.71 µg/mL	-	< 1.57
AuNPs-Cts	9.27 µg/mL	-	< 3.09
AuNPs-As	147.75 µg/mL	8.829 µg/mL	16.05

Caracterización de nanopartículas seleccionadas

Se seleccionaron las nanopartículas de oro y extracto de ajo (AuNPs-As) debido a alto IT para su caracterización. Se utilizó espectroscopia de UV-Vis para la determinación del plasmón de resonancia y Dispersión de Luz Dinámica (DLS) así como microscopía electrónica de barrido (SEM) para determinar el tamaño de la nanopartícula y se midió el potencial Z para conocer la carga perteneciente a las AuNPs.

En la figura 12 se observa la banda de absorción obtenida por espectroscopia de UV-Vis, dicha banda se detectó a los 523 nm, longitud característica de las AuNPs.

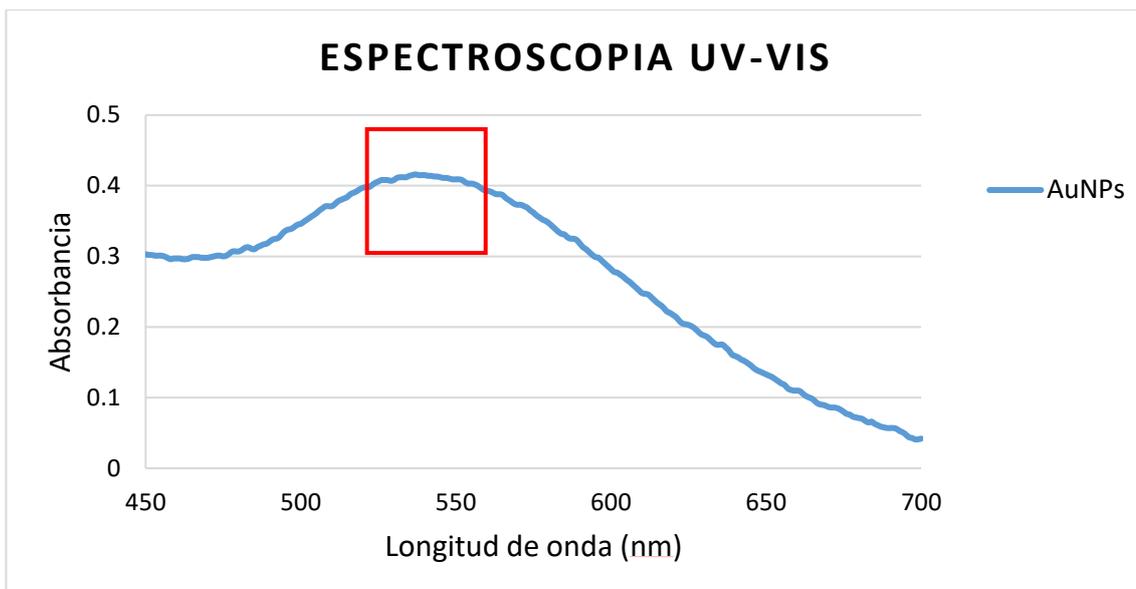


Figura 12. Plasmón de resonancia de nanopartículas de oro

Como se muestra en la figura 13, el tamaño de las nanopartículas de oro a una concentración de 2mM, mostraron la presencia de dos poblaciones de un tamaño de 2.1 y 34.77 nm con una polidispersidad de 0.211, lo cual indica un tamaño homogéneo en la población de nanopartículas. Estos resultados fueron confirmados por SEM (Fig. 14). El potencial Z obtenido fue de -92.5 y 21.2 (Fig. 15).

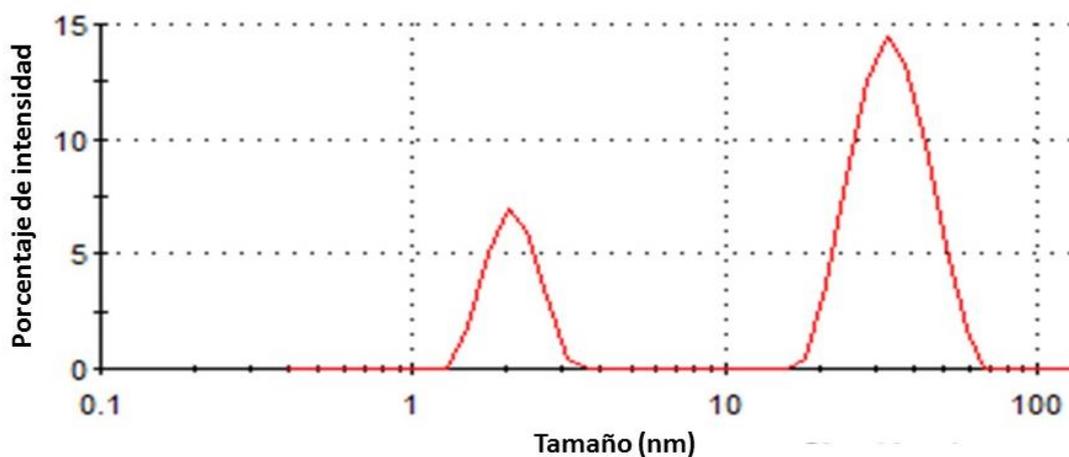


Figura 13. Tamaño de AuNPs-As obteniendo un tamaño de 2.1 y 34.77 nm.

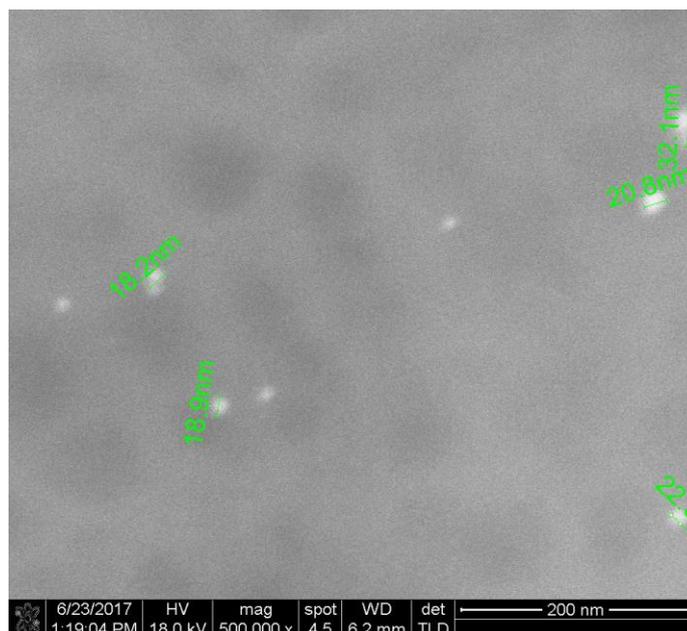


Figura 14. Microscopia electrónica de barrido de AuNPs-As.

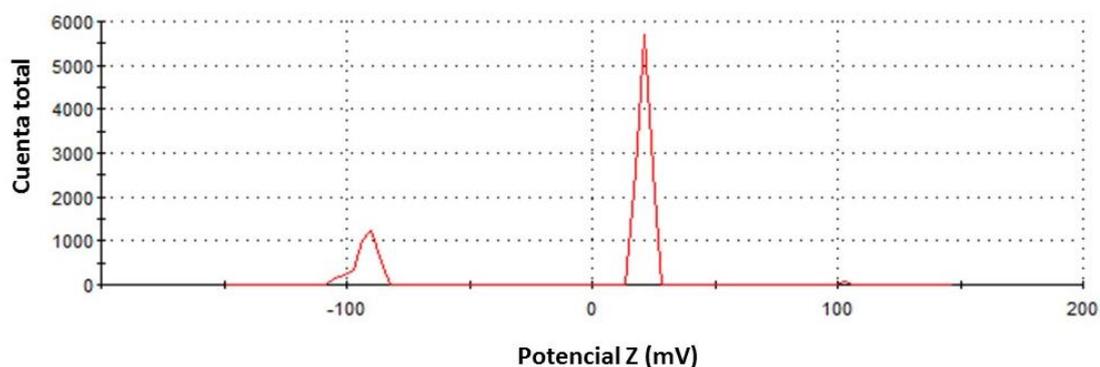


Figura 15. Potencial Z de AuNPs-As de -92.5 y 21.2

Evaluación de la actividad antiviral de las nanopartículas a diferentes tiempos de infección

Para conocer mecanismo de acción de las nanopartículas se adicionaron a diferentes tiempos de infección del MeV. En la figura 16 se observa el efecto de las AuNPs-As a la CE50% sobre el ciclo de replicación del MeV.

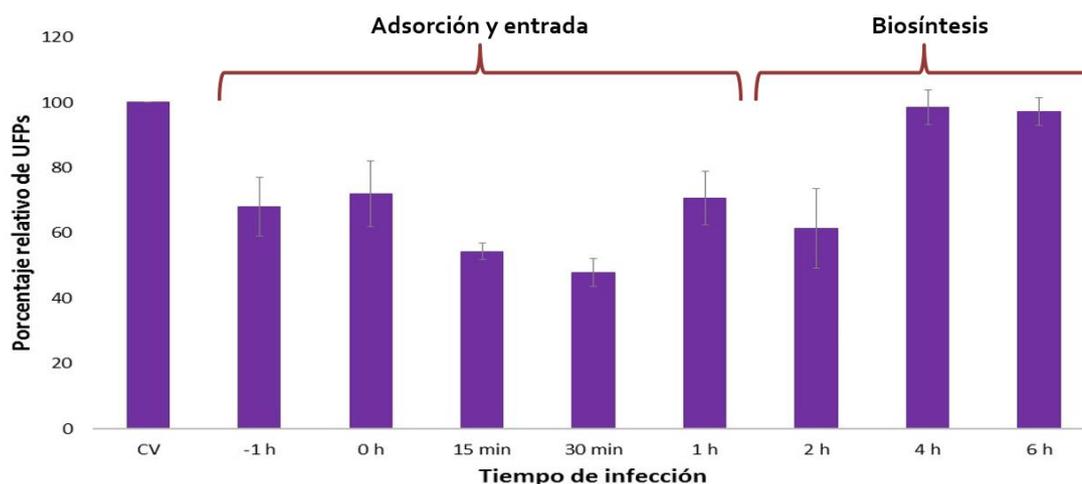


Figura 16. Efecto de AuNPs-As a diferentes tiempos de la infección sobre la formación relativa de UFP. La columna de la izquierda muestra el porcentaje de UFP en células Vero infectadas con MeV y sin Au-NPs seguida por células infectadas y con el compuesto aplicado a la hora -1 h, 0, 15 min, 30 min, 0 h, 1 h, 2 h, 4 h o 6 h. Los resultados se muestran como porcentaje relativo de UFP considerando el control viral sin tratamiento como 100% de porcentaje relativo de UFP.

Evaluación del efecto virucida de las nanopartículas

Una vez seleccionadas las NPs con mayor IT y su posterior caracterización, se realizaron ensayos de efecto virucida por la técnica de UFPs para poder determinar si las NPs tenían un efecto directamente sobre la partícula viral impidiendo su contacto con la célula, para esto, se pusieron en contacto las NPs seleccionadas con el virus a diferentes tiempos, con las CE50 y CE25 previamente obtenidas, para así evaluar el porcentaje de reducción de UFP.

En la figura 17 se observa una reducción de un 84% de UFP a las 3 h de incubación y del 92% a las 6 h de incubación con la CE50 del virus. Al evaluar la CE25 se obtuvo una reducción de un 95% a las 3 h y un 98% a las 6 h de incubación.

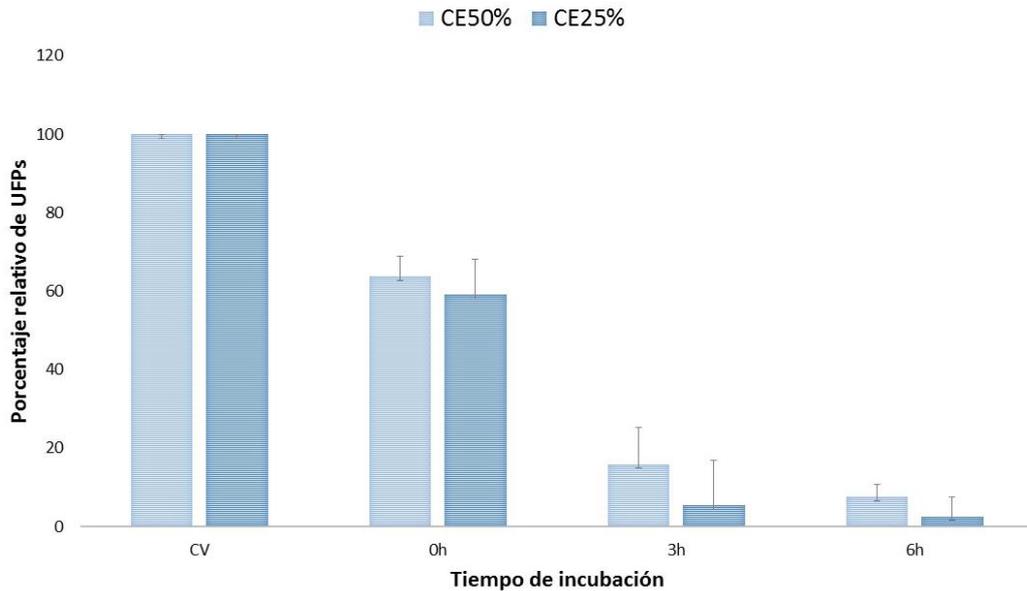


Figura 17. Efecto de AuNPs-As sobre la formación de UFP por MeV. Las columnas de la izquierda muestran las células infectadas sin tratar (control viral) las cuales fueron tomadas como 100% de porcentaje relativo de UFP, continuando con las células infectadas y tratadas con la CE50 (barra azul) y CE25 (barra naranja) durante 0, 3 y 6 h de contacto virus-NPs.

En la figura 18 se muestra la reducción de las Unidades formadoras de placa con respecto al control viral en una monocapa previamente infectada con MeV, donde se observa una reducción significativa a las 3 y 6 h de la interacción virus-nanopartícula.

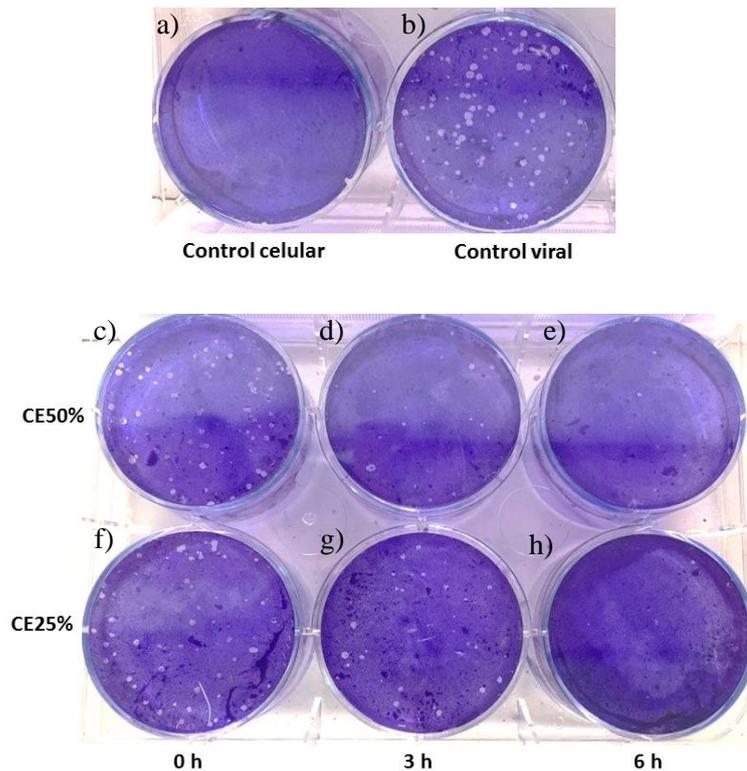


Figura 18. Unidades formadoras de placa formadas después de diferentes horas de incubación del MeV y las AuNPs-As a una CE50%= 9 µg/mL y CE25%= 6 µg/mL y una infección de 90 UFP por pozo. a) Control celular: células sin infectar (0 UFP), b) control viral: células sin tratamiento (90 UFP), c) células tratadas con CE50% después de 0 h de interacción con MeV (60 UFP), d) células tratadas con CE50% después de 3 h de interacción con MeV (20 UFP), e) células tratadas con CE50% después de 6 h de interacción con MeV (6 UFP), f) células tratadas con CE25% después de 0 h de interacción con MeV (57 UFP), g) células tratadas con CE25% después de 3 h de interacción con MeV (28 UFP) y h) células tratadas con CE25% después de 6 h de interacción con MeV (7 UFP).

Propuesta de mecanismo de acción de AuNPs-As

En la figura 19 se esquematiza el posible mecanismo de acción de las AgNPs-As sobre el virus de Sarampión, proponiendo un posible bloqueo de receptores virales bloqueando así la adsorción del virus a la célula impidiendo el inicio de su ciclo de replicación.

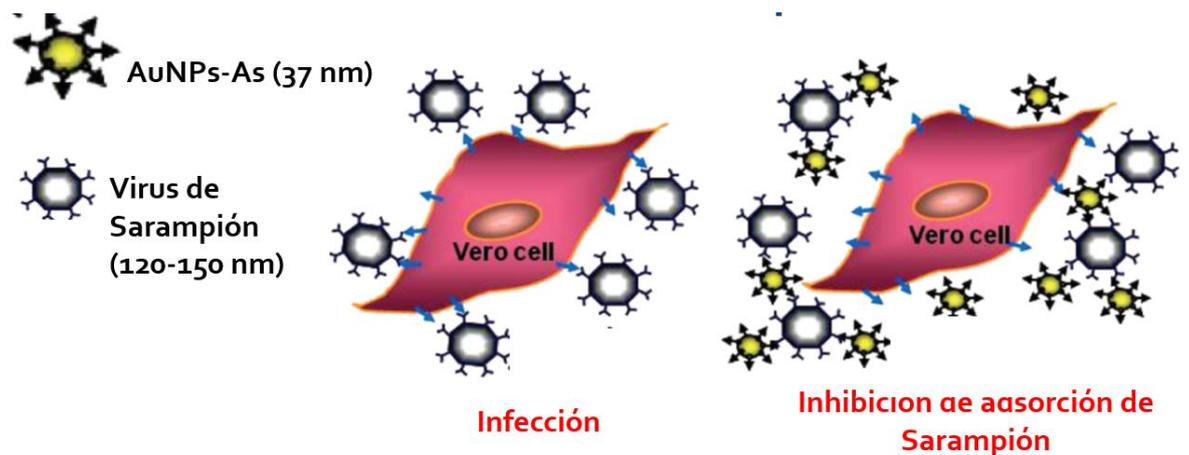


Figura 19. Mecanismo de acción de AgNPs-As sobre el virus de Sarampión (Modificado de Baram-Pinto et al., 2009)

DISCUSIÓN

La nanotecnología proporciona una plataforma para modificar y desarrollar las propiedades de los metales reduciéndolos en nanopartículas metálicas, las cuales tienen amplias aplicaciones en diferentes campos de diagnóstico, biomarcadores, sistemas de liberación de drogas, agentes antimicrobianos y otras nanomedicinas para el tratamiento de diversas enfermedades (Singh y Nalwa, 2011). En la actualidad existe una continua investigación para una solución nanotecnológica efectiva para el tratamiento de infecciones virales.

Las nanopartículas metálicas han sido estudiadas cada vez con más frecuencia debido a su inherente actividad antimicrobiana y varias propiedades bioactivas (Ip et al., 2006). Por el contrario, su uso aumentado planteó varias cuestiones al impacto de salud y ambiental.

Se ha observado que a bajas concentraciones las nanopartículas metálicas poseen una excelente actividad antimicrobiana mientras que a concentraciones más altas inducen efectos tóxicos a diversos organismos incluidas las líneas celulares de mamíferos (Han et al., 2012).

En este trabajo se evaluó la citotoxicidad de las diferentes nanopartículas metálicas a partir de compuestos bioactivos sobre la línea celular Vero, obteniendo una CC50% de 4.71 $\mu\text{g/mL}$ para las AgNPs-Uc. Devi y Bhimba en 2012 reportaron una CC50% = 95 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs con *Ulva lactuca*, esta es una de la síntesis más similar a la síntesis evaluada en este trabajo ya que no se cuentan con reportes previos de AgNPs sintetizadas con el alga verde *Ulva clathrata*. Por otro lado, se evaluó la citotoxicidad de las AuNPs-Cts obteniendo una CC50% de 9.27 $\mu\text{g/mL}$. Las citotoxicidades de este tipo de nanopartículas han sido evaluadas en diferentes líneas celulares, Regiel-Futyra en 2015 reportaron una viabilidad de células HaCaT tratadas con nanocompositos de oro y quitosano con una viabilidad del 35% con 500 $\mu\text{g/mL}$. Thakor et al., (2012) reportan que a bajas concentraciones de AuNPs no se mostraban efectos citotóxicos sobre las líneas celulares HeLa o HepG2. Otro estudio por Paino et al., 2012, demuestran que AuNPs cubiertas con poliamidoamino-dendrimeros (PAMAM) o citrato de sodio pueden ejercer genotoxicidad y citotoxicidad *in vitro* sobre células HepG2 y PBMC incluso a concentraciones muy bajas. Chuang et al., (2013)

observaron que la citotoxicidad de AuNPs no necesariamente se correlaciona con la internalización de las nanopartículas dentro de la célula. La toxicidad puede ser causada por la interacción de las nanopartículas en la superficie celular o por la disolución de partículas. Esta variabilidad es debido a diferentes parámetros usados en los ensayos de citotoxicidad incluida la línea celular, el tamaño de la partícula, la carga superficial, concentraciones y la cubierta de las nanopartículas (Paino et al., 2012; Chuang et al., 2013). Para las AuNPs-As se obtuvo una CC50% de 147.75 µg/mL, en la actualidad no se cuentan con reportes de citotoxicidad de este tipo de NPs sintetizadas con extracto de ajo como agente reductor, sin embargo, los resultados obtenidos muestran su baja toxicidad en comparación con las síntesis anteriores (AgNPs-Uc y AuNPs-Cts).

Los virus representan un gran desafío para las industrias médicas, farmacéuticas y biotecnológicas, siendo una de las principales causas de enfermedades y mortalidad en los humanos. Varias enfermedades causadas por virus como los resfriados comunes, influenza, hepatitis, varicela, mononucleosis infecciosa, herpes, encefalitis viral y sarampión se diseminan ampliamente alrededor del mundo. Se han propuesto alternativas para el desarrollo de medicinas y vacunas para combatir a estos agentes infecciosos (Rai et al., 2014). La increíble habilidad de los virus para una rápida adaptación en el hospedero y de cambiar a un nuevo hospedero es una de las principales razones por las que existe un estancamiento en el desarrollo de tratamientos antivirales (Esteban, 2010; Tauxe, 2002).

A pesar de las enormes mejoras en la terapia antiviral, los tratamientos actuales y medicamentos disponibles hasta ahora, son incapaces de controlar completamente las enfermedades virales. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar nuevos agentes antivirales potenciales (Rai et al., 2014).

El Sarampión es una enfermedad altamente contagiosa la cual es causada por un virus perteneciente a la familia *Paramixoviridae*, es un virus envuelto con un genoma ssRNA (-), es uno de los principales responsables de mortalidad en niños menores de 5 años, a pesar de la existencia de una vacuna segura y eficaz actualmente no se cuenta con una terapia antiviral específica para esta enfermedad, siendo de gran importancia debido a los brotes recientes presentados alrededor del mundo.

En cuanto a la actividad antiviral obtenida por las AgNPs-Uc contra el virus de Sarampión, se observó una reducción de UFP de un 40% con una concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$, al evaluar la actividad antiviral de su precursor AgNO_3 no se observaron diferencias significativas del efecto de éste en comparación con las NPs sintetizadas. Posteriormente se evaluó la actividad antiviral de las AuNPs-Cts obteniendo una reducción de UFP de un 20% a 3 $\mu\text{g/mL}$ y al probar el efecto de su precursor el HAuCl_4 no se encontraron diferencias significativas entre éste y las NPs sintetizadas.

Al evaluar la actividad de las AuNPs-As se encontró una reducción de UFP de un 60% a 10 $\mu\text{g/mL}$ obteniendo una $\text{CE}_{50\%}$ de 8.829 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados nos arrojan que las AuNPs-As tienen un índice terapéutico de 16.05. El índice terapéutico constituye una medida del margen de seguridad de un medicamento. Se expresa numéricamente como una relación entre la dosis del medicamento que causa la muerte ($\text{CC}_{50\%}$) y la dosis que causa el efecto terapéutico deseado ($\text{CE}_{50\%}$). El margen de seguridad es tanto mayor cuanto mayor es el valor del índice siendo extremadamente reducido y por tanto muy peligroso el consumo del medicamento cuando el valor se aproxima a 1. Se ha evaluado *in vitro* el IT de la droga antiviral aprobada Ribavirina contra diversos virus de importancia humana obteniendo IT de 0.1 para ZIKV, 1 para WNV y 3 para DENV-1 (Crance et al., 2002). Estos antecedentes resaltan la seguridad del uso de las AuNPs-As como un posible tratamiento contra el virus de Sarampión.

Se realizó la caracterización de las AuNPs-As ya que mostraron el mayor IT, su caracterización se realizó por espectroscopía Uv-Vis, dispersión de luz dinámica, microscopía electrónica de barrido (SEM) y potencial Z.

Se ha reportado que las NPs sintetizadas con oro muestran un plasmón de resonancia característico entre los 500 y 600 nm de absorbancia evaluado con Uv-Vis (Rastogi y Arunachalam, 2013), de igual manera estos autores reportaron un plasmón de resonancia de nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de ajo de 520 nm, esto concuerda con los resultados obtenidos ya que se encontró que las AuNPs-As mostraron una banda de absorbancia de 523 nm, mediante Uv-Vis con tamaños de 2.1 y 34.7 nm.

El potencial Z obtenido de las AuNPs-As fue de -92.5 y 21.2 mV, sin embargo, Farooq et al., (2011) reportan que un potencial Z de -90 es característico de H_2O pura a pH 9

y que dicho potencial se vuelve más negativo conforme aumenta la alcalinidad del agua, esto concuerda con los resultados obtenidos tomando en cuenta que el extracto de ajo utilizado en la síntesis fue previamente alcalinizado hasta obtener un pH de 9, justificando que el potencial Z negativo obtenido era debido al extracto de ajo, demostrando que la carga de las nanopartículas es positiva (21.2 mV).

El potencial Z es un parámetro fisicoquímico importante que influye en la estabilidad de nanosuspensiones. Un valor de potencial Zeta extremadamente positivo o negativo causa mayores fuerzas de repulsión, mientras que la repulsión entre partículas con cargas electrostáticas similares previenen la agregación de las partículas y esto asegura una fácil redispersión (Puttipipatkachorn et al., 2001; Kim et al., 2009). En el caso de una estabilización electrostática y estérica un potencial Z de ± 20 mV es el adecuado (Honary y Zahir 2013).

Para conocer el nivel de acción de las AuNPs-As se realizó el ensayo de tiempos de infección, en el cual se evalúa el efecto de las NPs cuando son adicionadas a las células infectadas a diferentes tiempos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las AuNPs-As ejercen un efecto inhibitorio en la primera hora de infección proponiendo un posible bloqueo de receptores virales.

Se ha demostrado que las NPs metálicas pueden poseer un potencial virucida que puede ser incrementado si se conoce el sitio exacto de interacción y el modo de acción llevando a la modificación de la superficie de las NPs para un uso más amplio y efectivo. Podría existir una unión directa con la membrana celular, por lo que las NPs pueden entrar a la célula y prevenir la replicación del genoma (DNA o RNA), y bloquear la multiplicación viral. Las nanopartículas también pueden ayudar a prevenir la fusión de la envoltura viral con la membrana celular bloqueando la penetración viral (Rai et al., 2009).

Para evaluar esto, se realizó un ensayo de efecto virucida, el cual mostró una reducción de un 84 y 80 % después de la interacción del virus y la NPs por 3 h y de un 92 y 95 % después de una interacción por 6 h a la concentración CE50 y CE25 respectivamente.

Recientes avances en la espectrometría de masas de lípidos permitió un análisis del lipidoma entero de virus purificados. Análisis cuantitativos de los constituyentes lipídicos del HIV revelan un enriquecimiento de balsas de lípidos SM, colesterol y PE con un alto contenido de ácidos grasos en la membrana viral. La capa más interna de la membrana viral esta enriquecida en PS (Brugger et al., 2006). Existen reportes de análisis cuantitativos del lipidoma de VSV y SFV observando una composición similar entre estos y la membrana plasmática de la cual se derivaban sus envolturas (Kalvodova et al., 2009).

Tomando en cuenta estos antecedentes y los resultados obtenidos de la carga superficial positiva de las AuNPs-As y la composición de las membranas virales otorgándoles una carga negativa, así como el potente efecto virucida observado, es posible determinar la interacción de las nanopartículas y el virus de sarampión provocando un bloqueo de receptores virales impidiendo la adsorción a la célula y por lo tanto el inicio de la infección viral a la célula huésped.

CONCLUSIONES

1. Las AuNPs-As mostraron el nivel de citotoxicidad más bajo ($CC_{50\%} = 9.27 \mu\text{g/mL}$) en comparación con las AgNPs-Uc y AuNPs-Cts.
2. Las AuNPs-As mostraron la mayor actividad antiviral con una reducción del 60% de UFP a $10 \mu\text{g/mL}$.
3. Las AuNPs-As arrojaron un alto Índice terapéutico de 16.05 proponiéndolas como las más efectivas y seguras para su evaluación.
4. Se logró la caracterización de las AuNPs-As determinando un tamaño promedio de 34.7 nm y una carga superficial positiva.
5. Se observó un potente efecto virucida de las AuNPs-As tanto a la $CE_{50\%}$ y $CE_{25\%}$ con una reducción de un 84 y 79 % de UFP a las 3 h y de un 94 y 92% a 6 h respectivamente.

PERSPECTIVAS

- Evaluación de AuNPs-As en diferentes modelos virales envueltos y no envueltos.
- Evaluación de biocompatibilidad en un modelo *in vivo*
- Síntesis de Nanopartículas con diferentes concentraciones de Au y extracto de Ajo y su efecto en el tamaño de la NP, así como la evaluación de su actividad antiviral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Antonelli G and Turriziani O. 2012. Antiviral therapy: old and current issues. *International Journal of Antimicrobial Agents* 40 95– 102
2. Baram Pinto D, Shukla S, Gedanken A, Sarid R. 2010. Inhibition of HSV-1 attachment, entry, and cell-to-cell spread by functionalized multivalent gold nanoparticles. *Small* 6:1044–50.
3. Baram Pinto D, Shukla S, Perkas N, Gedanken A. Sarid R. 2009. Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate. *Bioconjug Chem* 20:1497–502.
4. Bowman MC. Ballard TE. Ackerson CJ. Feldheim DL. Margolis DM. Melander C. 2008. Inhibition of HIV fusion with multivalent gold nanoparticles. *J Am Chem Soc* 130: 6896–7.
5. Brügger B, Glass B, Haberkant P, Leibrecht I, Wieland FT, Kräusslich HG 2006. The HIV lipidome: A raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci* 103: 2641–2646.
6. Chuang SM, Lee YH, Liang RY, Roam GD, Zeng ZM, Tu HF, Wang SK, Chueh PJ. 2013. Extensive evaluations of the cytotoxic effects of gold nanoparticles. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1830(10):4960-73.
7. Coen DM, Schaffer PA. 2003. Antitherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2:278–88.
8. Crance JM, Scaramozzino N, Jouan A, Garin D. 2002. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Research* 58. 73–79.
9. Devi JS, Bhimba BV. 2012. Anticancer Activity of Silver Nanoparticles Synthesized by the Seaweed *Ulva lactuca* *In vitro*. *Open Access Scientific Reports*. Vol 4. 1: 242.
10. Davies WL, Grunert RR, Haff F, McGahen JW, Neumayer EM, Paulshock M, Hoffmann CE. 1964. Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine). *Science* 144:862–3.
11. De Clercq E. 2004. Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol* 2:704–720

12. Di Gianvincenzo P, Marradi M, Martinez Avila OM, Bedoya LM, Alcamí J, Penadés S. 2010. Gold nanoparticles capped with sulfate-ended ligands as anti-HIV agents. *Bioorg Med Chem Lett* 20:2718–21.
13. Dienstag JL. 2009. Benefits and risks of nucleoside analog therapy for hepatitis B. *Hepatology*. 49. S112–21.
14. Douglas JM, Critchlow C, Benedetti J, Mertz GJ, Connor JD, Hintz MA, Corey L. 1984. A double-blind study of oral acyclovir for suppression of recurrences of genital herpes simplex 3 virus infection. *N Engl J Med* 310:1551–6.
15. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara H, H. Yacaman MJ. 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnol* 3:6.
16. Elion GB. Acyclovir: discovery, mechanism of action and selectivity. 1993. *J Med Virol*. 2–6.
17. Esté JA, Telenti A. 2007. HIV entry inhibitors. *Lancet* 370:81–8.
18. Esteban D. 2010. Mechanisms of viral emergence. *Vet Res* 41:38–44.
19. Farooq U, Tweheyo MT, Sjöblom J, Øye G. 2011. Surface Characterization of Model, Outcrop, and Reservoir Samples in Low Salinity Aqueous Solutions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 32: 4, 519-531.
20. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Jackson GG. 1987. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 317:185–91.
21. Flint J, Racaniello V, Rall G, Enquist L, Skalka A. 2003. Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control of animal viruses. American Society for Microbiology: Whashington, pp. 561-572.
22. Gaikwad S, Ingle A, Gade A, et al. 2013. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *Int J Nanomed* 8:4303–14.
23. Griffin DE, Knipe, D.M., Howley, P.M. 2001. Measles virus. *Fields of Virology*, fourth ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 1401–1441.
24. Griffin DE, Lin WH, Pan Ch. 2012. Measles virus, immune control and persistence. *Microbiology reviews* 36: 649-662.

25. Griffin DE, Oldstone M. 2009. Measles: History and basic biology. Springer: Heidelberg, pp. 77-97
26. Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. 2000. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 355:827–35.
27. Han DW, Woo YI, Lee MH, et al. 2012. *In vivo* and *in vitro* biocompatibility evaluations of silver nanoparticles with antimicrobial activity. *J Nanosci Nanotechnol* 12:5205–9.
28. Hayden FG, Osterhaus ADME, Treanor JJ, Fleming DM, Aoki FY, Nicholson KG, Wightman K. 1997. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus infections. GG167 Influenza Study Group. *N Engl J Med* 337:874–80.
29. Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, Wolfe A, Stillmock K, Grobler JA, Espeseth A, Gabryelski L, Schleif W, Blau C, Miller MD. 2000. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 287:646–50.
30. Honary S and Zahir F. 2013. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Trop J Pharm Res*;12 (2):265.
31. Hu J, Robinson JL. 2010. Treatment of respiratory syncytial virus with palivizumab: a systematic review. *World J Pediatr* 6:296–300.
32. Ip M, Lui SL, Poon VK, Lung I, Burd A. 2006. Antimicrobial activities of silver dressings, an *in vitro* comparison. *J Med Microbiol* 55:59–63.
33. Kalvodova L, Sampaio JL, Cordo S, Ejsing CS, Shevchenko A, Simons K. 2009. The lipidomes of vesicular stomatitis virus, semliki forest virus, and the host plasma membrane analyzed by quantitative shotgun mass spectrometry. *J Virol* 83: 7996–8003
34. Kim JO, Kabanov AV, Bronich TK. 2009. Polymer micelles with cross-linked polyanion core for delivery of a cationic drug doxorubicin. *J. Control. Release*; 138: 197-204.
35. Lanari M, Silvestri M, Rossi GA. 2010. Palivizumab prophylaxis in ‘late preterm’ newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med* 23, 53–5.
36. Sun RW, Chen R, Hui CK, Ho CM, Luk JM, Lau GK, Che CM. 2008. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir Ther* 13:253–62.

37. Lund GA., Tyrrell DL. Bradley RD. Scraba DG. 1984. The molecular length of measles virus RNA and the structural organization of measles nucleocapsids. *J. Gen. Virol.* 65, 1535–1542.
38. Maisner A. Mrkic B. Herrler G. Moll M. Billeter MA. Cattaneo R. Klenk HD. 2000. Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity *J. Gen. Virol.* 81, 441–449.
39. Martinez Avila O, Hijazi K, Marradi M, Clavel C. Campion C. Kelly C. Penadés S. 2009. Gold mannoglyconanoparticles, multivalent systems to block HIV-1 gp120 binding to the lectin DC-SIGN. *Chemistry (A Europ J)* 15:9874–88.
40. Mehrbod P, Motamed N, Tabatabaian M, Estyar RS. Amini E. Shahidi M. Kheiri MT. 2009. In vitro antiviral effect of “Nanosilver” on influenza virus. *DARU* 17:88–93.
41. Miller WH, Miller RL. 1982. Phosphorylation of acyclovir diphosphate by celular enzymes. *Biochem Pharmacol* 31:3879–84.
42. Morones J R. Elechiguerra, JL. Camacho A. Holt K. Kouri JB. Tapia J. Yacaman MJ. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16:2346-2353.
43. Moyer SA. Baker SC. Horikami SM. 1990. Host cell proteins required for measles virus reproduction. *J. Gen. Virol.* 71, 775–783.
44. Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva de Sarampión. Disponible en: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs286/es/>
45. Paino M, Marangoni VS, De Oliveira C, Antunes LM, Zucolotto V. 2012. Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocelular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol. Lett.*, vol. 215, no. 2, pp. 119–125.
46. Painter GR, Almond MR, Mao S, Liotta DC. 2004. Biochemical and mechanistic basis for the activity of nucleoside analogue inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Curr Top Med Chem* 4:1035–44.
47. Papp I, Sieben C, Ludwig K, Meike R. Böttcher C. Schlecht S. Herrmann A. Haag R. 2010. Inhibition of influenza virus infection by multivalent sialic-acid functionalized gold nanoparticles. *Small* 6:2900–6.
48. Pommier Y, Johnson AA, 2005. Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov* 4:236–48.

49. Puttipipatkachorn S, Nunthanid J, Yamamoto K, Peck GE. 2001. Drug physical state and drug–polymer interaction on drug release from chitosan matrix films. *J. Control. Release*; 75: 143–153.
50. Rager M, Vongpunsawad, S, Duprex WP, Cattaneo R. 2002. Polyploid measles virus with hexameric genome length. *Embo J*. 21, 2364–2372.
51. Rai M, Yadav A, Gade A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 27:76–83.
52. Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK. 2012. Silver nanoparticles, the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol* 112:841–52.
53. Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gupta IR, Galdiero M, Galdiero S. 2014. Metal nanoparticles: The protective nanoshield against virus infection. *Critical Reviews in Microbiology* Vol. 42, Iss. 1.
54. Rastogi, L. and Arunachalam, J. 2013. Green Synthesis Route for the Size Controlled Synthesis of Biocompatible Gold Nanoparticles Using Aqueous Extract of Garlic (*Allium sativum*). *Advanced Materials Letters*, 4, 548-555.
55. Regiel-Futyr A, Kus-Liskiewicz M, Sebastian V, Irusta S, Arruebo M, Stochel G, Kyzioł A. 2014. Development of Noncytotoxic Chitosan–Gold Nanocomposites as Efficient Antibacterial Materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 5, 7, 1087–1099.
56. Secretaría de Salud. Aviso preventivo de viaje a Los Ángeles, California, Estados Unidos de América por casos de sarampión. Disponible en: www.gob.mx/salud
57. Singh R, Nalwa HS. 2011. Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents, and anticancer nanodrugs. *J Biomed Nanotechnol* 7:489–503.
58. Soriano V, Perno CF, Kaiser R, Calvez V, Gatell JM, di Perri G, Pillay D, Rockstroh J, Geretti AM. 2009. When and how to use maraviroc in HIV-infected patients. *AIDS* 23:2377–85.
59. Straus SE, Takiff HE, Seidlin M, Bachrach S, Lininger L, DiGiovanna JJ, Western KA, Smith HA, Lehrman SN, Creagh-kirk T, Alling DW. 1984. Suppression of frequently recurring genital herpes. A placebo-controlled double-blind trial of oral acyclovir. *N Engl J Med* 310:1545–50.

60. Sun L, Singh AK, Vig K, Pillai SR, Singh SR. 2008. Silver nanoparticles inhibit replication of respiratory syncytial virus. *J Biomed Biotechnol* 4: 149–158.
61. Tauxe RV. 2002. Emerging food borne pathogens. *Int J Food Microbiol.* 78:31–41.
62. Thakor AS, Paulmurugan R, Kempen P, Zavaleta C, Sinclair R, Massoud TF, Gambhir SS. Oxidative stress mediates the effects of Raman-active gold nanoparticles in human cells.
63. Tilton JC, Doms RW. 2010. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Res* 85:91–100.
64. Tsai CH, Lee PY, Stollar V, Li ML. 2006. Antiviral therapy targeting viral polymerase. *Curr Pharm Des* 12:1339–55.
65. Welliver RC. 2010. Pharmacotherapy of respiratory syncytial virus infection. *Curr Opin Pharmacol* 10:289–93.
66. Wild TF, Malvoisin E, Buckland R. 1991. Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J. Gen. Virol.* 72, 439–442.
67. Xiang DX, Chen Q, Pang L, Zheng CL. 2011. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. *J Virol Methods* 178:137