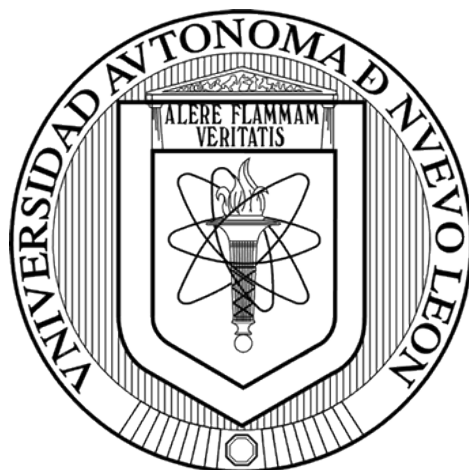


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN DE METABOLITOS BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR
Cladosporium Cladosporioides Y ANÁLISIS DE SU ACTIVIDAD ANTIVIRAL
CONTRA EL VIRUS DEL HERPES SIMPLEX TIPO 1**

Por

L.B.G. ANNETTE DEL CARMEN FLORES CRUZ

Como requisito parcial para obtener el Grado académico de **MAESTRÍA EN
CIENCIAS** con orientación en **Microbiología Aplicada**

JUNIO, 2018

“Si no conozco una cosa, la investigaré”.

Louis Pasteur

“Todo parece imposible hasta que se hace”.

Nelson Mandela

“Sólo tú puedes decidir qué hacer con el tiempo que se te ha dado”.

J.R.R. Tolkien

**EVALUACIÓN DE METABOLITOS BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR
Cladosporium Cladosporioides Y ANÁLISIS DE SU ACTIVIDAD ANTIVIRAL
CONTRA EL VIRUS DEL HERPES SIMPLEX TIPO 1**

Aprobación de tesis:

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio

Directora de Tesis

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

Secretario

Dra. María Teresa Garza González

Vocal

Dra. María Araceli Hernández Ramírez

Sub-Directora de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE METABOLITOS BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR
Cladosporium Cladosporioides Y ANÁLISIS DE SU ACTIVIDAD ANTIVIRAL
CONTRA EL VIRUS DEL HERPES SIMPLEX TIPO 1**

Presentado por:

L.B.G. ANNETTE DEL CARMEN FLORES CRUZ

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, así como en el laboratorio de Inmunovirología del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, ambas facultades pertenecientes de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio.

Se contó con la valiosa colaboración del Dr. Ernesto Torres López, Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu, Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza y con el apoyo de CONACYT por la beca brindada.

Directora:

Dra. Pilar C. Morales San Claudio

DEDICATORIA

A **Dios** por no dejarme caer, por darme fuerzas para continuar, por ayudarme a nunca perder la fe. Gracias por tu amor y protección sobre mi familia, sobre mis amigos y mi vida.

A mi **familia**, mis padres **Sergio Alejandro** y **Blanca Luz** que son la fuerza que me impulsa a seguir adelante, gracias a ustedes he podido lograr aquello que creía imposible, les debo todas mis victorias. Los amo con todo mi corazón, me han enseñado que a pesar de todos los obstáculos que se nos atraviesan en el camino somos los suficientemente fuertes para vencerlos. Es tan grande mi admiración y respeto hacia ustedes. Sin importar las distancias que nos separen, nuestro amor es más grande que todo y lo tenemos siempre presente.

A mi hermana **Blanca Alejandra** porque me conoces tal y como soy, porque me aceptas a pesar de todas mis faltas, porque posiblemente pensarás que “no te queda de otra”, pero estás conmigo incondicionalmente. Tu alma y la mía siempre estarán unidas. Eres lo mejor que me pudo haber pasado. Te amo tanto.

A mis abuelitos **Mario** y **Aura** que son dos grandes pilares en la familia, gracias por darme su amor incondicional en todo momento. Los quiero demasiado.

Para una persona que me cuida de lejos, mi abuelito **Eugenio**, por tu amor, por tus cuidados, por esas manos de consuelo, por ese abrazo protector levanto una oración al cielo. Te guardo en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio, por darme la oportunidad de trabajar bajo su asesoría, brindándome su apoyo, guía, atención y amistad durante mi formación. Gracias por su paciencia y dedicación hacía mi persona. Se le tiene gran estima y verdaderamente fue un placer haber trabajado con usted.

A mi comisión de tesis, Dra. María Elena Cantú Cárdenas, Dra. María Teresa Garza González y Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu por todos sus consejos, amabilidad y atenciones hacia las necesidades y realización del proyecto. Cada una de sus palabras me ha servido enormemente para crecer y hacer las cosas lo mejor posible.

A la Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal por brindarme sus conocimientos en el área de la micología. Al Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza por recibirme y apoyarme en el laboratorio de ingeniería genética y genómica, muchas gracias por la confianza y por su apoyo en la parte experimental de citotoxicidad. Al Dr. Ernesto Torres López por asesorarme en los ensayos de actividad antiviral y por brindarme toda su confianza y su tiempo. Al Dr. Omar González Santiago por toda su ayuda en la interpretación de los resultados.

A la QBP. Adela Sánchez Oseguera por su amistad y por todos los consejos brindados durante estos dos años. A Cecilia Jaramillo y Daniel Espinosa por apoyarme y ser parte fundamental del proyecto. A Armando Flores por ayudarme en el laboratorio y en las dudas que se presentaban.

A mis mejores amigos Estefanía, Daniel, Elda, Paulina y Fanny ustedes me brindaron su amistad y apoyo desde el primer momento en que los conocí, me hicieron parte de su familia y nunca se han apartado de mí. Desde que vine a vivir a Monterrey han hecho cada uno de mis días más felices. Valen tanto y los quiero mucho.

Agradezco a todo el personal del departamento de posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y a todas las personas que hicieron posible y agradable mi estancia en esta maestría, gracias por todo.

Por último pero no menos importante quiero agradecer al CONACYT por la beca otorgada, la cual es una parte importante para que se llevara a cabo mi formación.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	XIV
RESUMEN.....	XVIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Herpes simplex virus.....	1
1.1.1 Prevalencia y características de la infección por VHS-1.....	2
1.1.2 Estructura del virus del Herpes simplex.....	3
1.1.3 Ciclo de replicación viral.....	5
1.1.4 Diagnostico y tratamiento de la infección herpética.....	5
1.2 Generalidades de los hongos.....	6
1.3 Clasificación taxonómica de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	6
1.3.1 Filum <i>Ascomycota</i>	7
1.3.2 Clase <i>Dothideomycetes</i>	7
1.3.3 Orden <i>Capnodiales</i>	8
1.3.4 Género <i>Cladosporium</i>	8
1.3.5 Especie <i>cladosporioides</i>	9
1.4 Justificación.....	10

2. ANTECEDENTES.....	11
2.1.1 Uso de los hongos con actividad biológica.....	11
2.1.2 Metabolitos con actividad antiviral.....	13
2.1.2.1 Actividad antiviral de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	13
2.2 APORTACIÓN CIENTÍFICA.....	15
2.3 HIPÓTESIS.....	15
2.4 OBJETIVOS.....	16
2.4.1 Objetivo General.....	16
2.4.2 Objetivos Específicos.....	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
3.1 Material y Equipo	17
3.1.1 Material.....	17
3.1.1.1 Material de Laboratorio.....	17
3.1.1.2 Material Biológico y reactivos.....	18
3.1.2 Equipo.....	19
3.1.3 Disolventes.....	19
3.2 Métodos.....	20
3.2.1 Caracterización de microorganismo seleccionado.....	20
3.2.1.1 Determinación de las características macroscópicas.....	20
3.2.1.2 Determinación de las características microscópicas.....	22
3.2.2 Crecimiento de <i>Cladosporium cladosporioides</i> y obtención de sus	
Metabolitos.....	22

3.2.3 Preparación del extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i> para la determinación de las actividades biológicas.....	24
3.2.4 Cultivos y condiciones de crecimiento de las células.....	24
3.2.4.1 Ensayo de citotoxicidad del extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i> en la línea celular Vero.....	24
3.3 Cuantificación de las partículas virales por titulación viral.....	26
3.3.1 Determinación de la actividad antiviral del extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	28
3.4 Análisis estadístico.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1 Caracterización de microorganismo seleccionado.....	30
4.1.1 Determinación de las características macroscópicas.....	30
4.1.2 Determinación de las características microscópicas.....	31
4.2 Obtención del Extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	32
4.3 Citotoxicidad del Extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i> en la línea celular Vero.....	35
4.4 Cuantificación de las partículas virales mediante la titulación del VHS-1.....	38
4.5 Actividad antiviral del extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i> en la línea celular Vero en un modelo de infección con el VHS-1.....	41
5. DISCUSIÓN.....	44
6. CONCLUSIONES.....	49
7. PERSPECTIVAS.....	50
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

9. APÉNDICES.....	57
APÉNDICE 1.....	57
APÉNDICE 2.....	58
APÉNDICE 3.....	59

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Especies de virus herpéticos que forman parte de la gran familia <i>Herpesviridae</i>	2
2. Clasificación taxonómica de <i>Cladosporium</i>	7
3. Medios de cultivo para el hongo <i>Cladosporium cladosporioides</i>	21
4. Cantidad en gramos de la biomasa total y del extracto obtenido del hongo <i>Cladosporium cladosporioides</i>	32
5. Promedio y desviación estándar del porcentaje de actividad citotóxica en células Vero.	35
6. Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad citotóxica del Extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i> en la línea celular Vero.	37
7. Unidades Formadoras de Placas líticas (UFP) en la titulación viral a las diferentes diluciones y efecto citopático de las células Vero a las diferentes diluciones antes de la tinción con Giemsa observado a 10X.	38
8. Promedio de las Unidades Formadoras de Placas líticas (UFP) del Extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i> contra el VHS-1.....	42
9. Análisis de varianza (ANOVA) de la de la actividad antiviral del Extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i> en la línea celular Vero.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Estructura del virión y estructura del genoma del VHS-1.....	4
2. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	9
3. Representación de la placa de la placa de 96 pozos para el ensayo de viabilidad de la línea celular Vero.....	26
4. Distribución de los tubos utilizados para las diluciones logarítmicas del stock viral.....	27
5. Distribución de las concentraciones del Extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i> y los controles utilizados.	29
6. Morfología macroscópica del hongo <i>Cladosporium cladosporioides</i>	31
7. Morfología microscópica del hongo <i>Cladosporium cladosporioides</i>	32
8. Obtención del Extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	33
9. Cromatografía en Capa Fina del Extracto de de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	33
10. Espectro UV/Vis del Extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	34
11. Espectro de IR del Extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	35
12. Citotoxicidad del extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i> en la línea celular Vero a las 24 h.....	36
13. Monocapas de células Vero.....	37
14. Formación de las Unidades Formadoras de Placa (UFP) del Extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i> contra el VHS-1.....	42
15. Actividad antiviral del Extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i> contra el VHS-1 a 48 h.....	43

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Ac	Anticuerpo
ACV	Aciclovir
A-DMEM	Medio basal de Eagle modificado de Dulbecco- Advance
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	Colección de cultivos
BSA	Albúmina sérica bovina
CCF	Cromatografía en Capa Fina
cel	Células
cm ⁻¹	Centímetro a la menos uno
CMV	Citomegalovirus
CO ₂	Dióxido de carbono
C(+)	Control positivo
C(-)	Control negativo
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FBS	Suero bovino fetal
FMV	Famciclovir
FD	Factor de dilución
g	gramo
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico

HR	Humedad Relativa
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria del 50%
IF	Inmunofluorescencia
IgG	Inmunoglobulina
IR	Espectroscopia de infrarrojo
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltons
KOS	Cepa de virus de Herpes simple tipo 1
L	Litro
M	Molaridad
M.C.	Maestro en ciencias
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
milliQ	Agua ultra pura
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MNP	Microneutralización en placa
MOI	Multiplicidad de infección
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NaCl	Cloruro de sodio
NAD ⁺ /NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido/ Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaOH	Hidróxido de sodio
N.L.	Nuevo León
nm	Nanómetros

°C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDA	Agar Patata y Dextrosa
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PCV	Penciclovir
ppm	Partes por millón
pH	Potencial de Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDA	Agar Sabouraud
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TA	Temperatura ambiente
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFP	Unidad formadora de placa
UV	Espectroscopia ultravioleta-visible
V	Voltios
VEB	Virus de Epstein-Barr
Vero	Línea celular, fibroblastos de riñón de mono verde africano
VHS-1	Virus del Herpes Simplex tipo 1
VHS-2	Virus del Herpes Simplex tipo 2
VP	Proteína del Virión

VVZ	Virus varicela-zóster
λ	Longitud de onda
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
μM	Micromolar
%	Por ciento
% V/V	Por ciento Volumen/Volumen

RESUMEN

Fecha de obtención del grado: Junio, 2018

L.B.G. Annette del Carmen Flores Cruz
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio:

EVALUACIÓN DE METABOLITOS BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* Y ANÁLISIS DE SU ACTIVIDAD ANTIVIRAL CONTRA EL VIRUS DEL HERPES SIMPLEX TIPO 1

Número de páginas: 59

**Candidata para el grado de Maestría en
Ciencias con orientación en Microbiología Aplicada**

Área de Estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y Método del Estudio: Las infecciones virales en humanos son causa de muerte, daño y pérdidas económicas a nivel mundial, responsables de múltiples patologías. El virus del Herpes constituye actualmente una causa importante y cada vez más frecuente de infecciones transmitidas. Para su tratamiento solo existen agentes antivirales que no erradican el virus del huésped, además se ha registrado resistencia viral a fármacos anti-herpéticos. En el presente trabajo se evaluó la actividad antiviral del extracto obtenido del hongo filamentoso *Cladosporium cladosporioides* aislado previamente a partir de semillas de Encino (*Quercus ilex*) en la comunidad de los Ramones, Estado de Nuevo León, México. Se corroboró la identidad del hongo por análisis de crecimiento y tinciones. La fermentación se llevó a cabo utilizando un medio que consistía en 30 g de sacarosa, 3 g de NaNO₃, 1 g de K₂HPO₄, 1 g de extracto de levadura, 0.5 g de KCl, 0.5 g de MgSO₄·7H₂O y 0.01 g de FeSO₄. La extracción de los metabolitos secundarios en el micelio de *C. cladosporioides* se extrajo con acetato de etilo y se concentró por medio de un evaporador rotativo. El extracto se analizó mediante las técnicas de UV, IR y CCF. Los resultados se obtuvieron midiendo la absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas. Se evaluó la citotoxicidad del extracto fúngico sobre células Vero empleando el método WST-1. El extracto de *C. cladosporioides* se sometió a estudios *in vitro* para determinar su actividad anti-herpética contra VHS-1 mediante el ensayo de reducción de placas.

Contribuciones y Conclusiones: Se observó la presencia de un metabolito en el extracto fúngico con las pruebas de UV, IR y CCF. El extracto fúngico de *C. cladosporioides* no mostró efectos citotóxicos en la línea celular Vero en el rango de las dosis ensayadas (6.25-200 µg/ml). El extracto fúngico tiene actividad antiviral desde la concentración de 50 µg/mL, la cual reduce las Unidades Formadoras de Placas líticas (UFP). Los resultados obtenidos en el trabajo de investigación abrirán más opciones para que en un futuro cercano sean utilizados antivirales de origen fúngico con acción eficaz y de menor toxicidad.

Directora de Tesis:

Dra. Pilar C. Morales San Claudio

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las infecciones virales en humanos son causa de muerte, daño y pérdidas económicas a nivel mundial, responsables de múltiples patologías. Los virus son componentes genéticos de origen extracelular que sólo pueden reproducirse por invasión de células vivientes, es la única forma parasitaria en que se pueden activar. No poseen actividades metabólicas pero si tienen los elementos indispensables para dañar a un organismo (Bernstein D.I *et al.*, 2013).

1.1 Herpes simplex virus

El Herpes simple es una enfermedad infecciosa inflamatoria de tipo vírico, que se caracteriza por erupciones que aparecen en puntos aislados de la piel, de muy distintas formas, acompañadas de comezón o escozor. Es causada por el virus Herpes simplex, o virus Herpes hominis, de tipo I (VHS-1) que afecta cara, labios, boca y parte superior del cuerpo (Barnabas & Celum, 2013). El virus del Herpes simplex forma parte de la subfamilia *Alphaherpesvirus* de la familia *Herpesvirus* (Belshe *et al.*, 2012). El VHS-1 cuenta con baja especificidad de especie y un amplio rango de hospederos. Tiene la capacidad sin precedente para infectar células humanas y no humanas de igual manera (Barnabas & Celum, 2013).

El VHS-1 nunca se elimina del cuerpo; permanece latente y puede reactivarse, lo que causa síntomas. En la actualidad no existe cura definitiva para el Herpes. Cabe mencionar que hay varias formas de tratamiento disponibles para reducir los síntomas y acelerar el proceso de curación de las lesiones (Bernstein *et al.*, 2013).

La prevalencia de la infección por el virus del Herpes en todo el mundo ha aumentado en las últimas décadas, lo que ocasiona un importante problema de salud pública. El presente trabajo se enfoca de manera específica al virus del Herpes simplex tipo 1 (VHS-1) de la subfamilia Alphaherpesviridae. (Tabla 1).

Tabla 1. Especies de virus herpéticos que forman parte de la gran familia *Herpesviridae*.

Familia	Subfamilia	Género	Nombre común
<i>Herpesviridae</i>	<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Virus herpes simple tipo 1
		<i>Varicellovirus</i>	Virus herpes Simple tipo 2 Virus varicela-zóster
	<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	Citomegalovirus
		<i>Roseolovirus</i>	Virus herpes humano 6 Virus herpes humano 7
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	Virus de Epstein-Barr	
	<i>Rhadinovirus</i>	Virus herpes humano 8	

1.1.1 Prevalencia y características de la infección por VHS-1

El Herpesvirus es reconocido desde la antigüedad, debe su nombre al término griego *herpein* (ἔρπειν), que significa “reptar” o “arrastrar”, haciendo alusión a la forma de serpiente de las lesiones cutáneas causadas por algunos de estos agentes infecciosos microscópicos (Torres *et al.*, 2013).

En los últimos 50 años, los avances sustanciales en nuestro conocimiento de la biología molecular del virus del Herpes han dado lugar a una visión de la patogénesis y gestión de la enfermedad.

Estimaciones del 2015 realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) mencionan que el equivalente a un 67% de la población mundial de personas menores de 50 años están infectadas con el virus del Herpes simple tipo 1. La prevalencia estimada de la infección era más elevada en África (87%) y más baja en América (40%-50%).

1.1.2 Estructura del virus del Herpes simplex

Los miembros de las familias *Herpesviridae* poseen características comunes en su estructura y constan de cuatro subcompartimientos distintos (Figura 1 A):

A. Envoltura externa. Formada por porciones de membranas de la célula huésped, que se separan cuando las partículas virales atraviesan el núcleo para pasar al citoplasma y por ultimo abandonar la célula. La membrana viral, la cual es una bicapa lipídica contiene 11 diferentes glicoproteínas designadas como: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, y gM, las cuales median la interacción y penetración del virus a la células.

De todas las glicoproteínas cuatro (gD, gH, gL y gB) son esenciales para la entrada del VHS a la célula animal (Whitley et al., 1998).

B. Tegumento. Es un ensamblaje aparentemente amorfo de las proteínas codificadas del virus; algunas ayudan a iniciar el ciclo replicativo en el interior de las células susceptibles, mientras que otras unen la envoltura a la nucleocápside. Contiene aproximadamente 20 proteínas virales implicadas en las fases iniciales de la infección y replicación viral, como también en el transporte del ADN viral (Arduino et al., 2008).

C. Nucleocápsida y núcleo. Es un núcleo interno formado por proteínas, tiene un diámetro aproximado de 100 nm y está formado por 162 capsómeros que forman una estructura icosapentaédrica. Cada nucleocápsida contiene un núcleo denso de nucleoproteínas enlazadas alrededor del ADN del virión.

D. Genoma viral. Molécula lineal de doble cadena que consta de 80 genes. El genoma está organizado en dos segmentos denominados región única larga (UL) que es el 82% del genoma, una región única corta (Us) el 18%. Estas regiones están flanqueadas por regiones repetitivas no traducibles como se representa en la figura 1 B (Lehman & Boehmer, 1999).

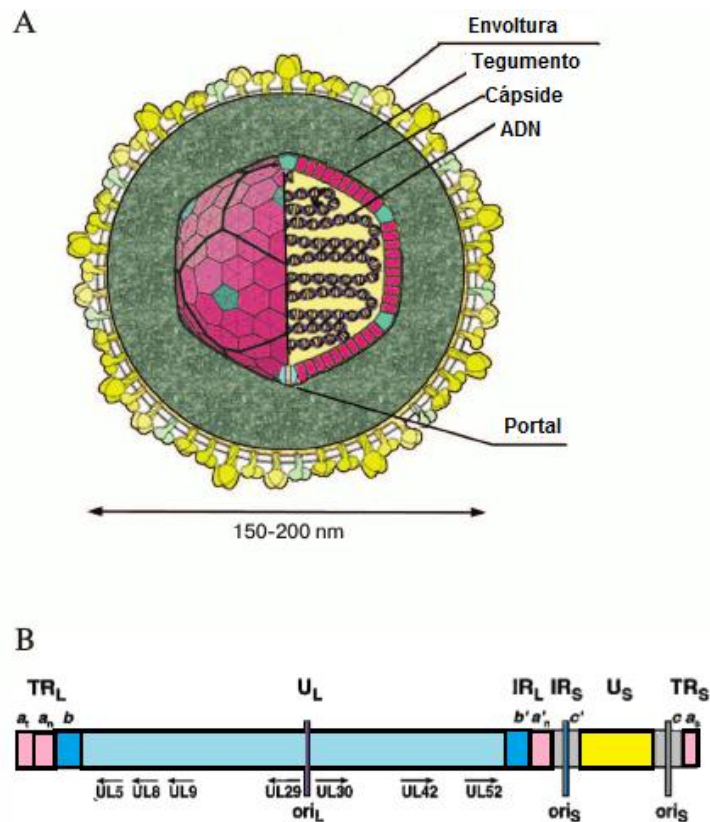


Figura 1. A) Estructura del virión de VHS-1; B) Estructura del genoma de VHS-1; El genoma de ADN codifica aproximadamente de 80 a 85 genes virales, que están situados en la región única larga (UL) y única corta (US) dentro del genoma. Las posiciones de las regiones repetidas a, b y c dentro de las regiones terminales repetidas (TR_L y TR_S), y los orígenes de replicación (*ori*_L y *ori*_S). La posición y transcripción de los siete genes esenciales para la replicación del ADN se indica con flechas (Lehman et al., 1999).

1.1.3 Ciclo de replicación viral

La entrada del VHS en la célula huésped es el resultado de la fusión entre la envoltura viral y una membrana de la célula huésped. Es mediada y modulada por la acción de las glicoproteínas gB, gC, gD, gH, gK, gL, y gM. Sin embargo, sólo cuatro de estas glicoproteínas (gB, gD, gH, y gL) son necesarias y suficientes para permitir la fusión del virus con la membrana plasmática de la célula huésped (Karasneh y Shukla, 2011).

El primer paso en la entrada de VHS es la unión del virus a través de las glicoproteínas de envoltura (gB y/o gC) a los proteoglicanos como heparán sulfato (HSPG) que se encuentran en la superficie de la célula huésped (Manoj *et al.*, 2004). Se cree que el propósito de esta interacción es anclar el virus a las células con el fin de concentrar el virus en la superficie celular (Connolly, Jackson *et al.*, 2011).

Posteriormente se produce la interacción específica entre gD de VHS y un receptor de gD (Shukla y Spear 2001). Esta interacción permite el anclaje de la partícula (virión) a la membrana plasmática de la célula huésped, acercando ambas membranas (Campadelli-Fiume, Cocchi *et al.*, 2000). La fusión requiere la formación de un complejo multiproteico (un complejo de fusión) compuesto de gD, gB, y gH/gL (Atanasiu, Whitbeck *et al.*, 2007).

1.1.4 Diagnóstico y tratamiento de la infección herpética

Actualmente no existe ningún tratamiento definitivo para el Herpes simple tipo 1. Las formas leves no precisan tratamiento, requiriendo solo aplicación de soluciones astringentes. Si son más graves, se utilizan antivíricos vía oral, especialmente en la primoinfección y cuando la afectación es extensa (Newman *et al.* 2013). Cuando las recurrencias son frecuentes, sobre todo en el caso del Herpes genital recidivante, se suele pautar tratamiento profiláctico con valaciclovir o instaurarse tratamiento supresor. Por lo anterior es importante la identificación de agentes antivirales efectivos.

El tratamiento más común para las diferentes formas de infecciones causadas por el virus de Herpes simplex, es mediante el empleo de los fármacos Aciclovir (ACV) y Penciclovir (PCV) (Kumar *et al.* 1993). El ACV es el primer nucleósido purínico sintético, con una actividad inhibitoria *in vitro* e *in vivo* de los virus de Herpes humanos incluyendo el VHS-1 y VHS-2, seguido por el VVZ, VEB y en menor medida por el CMV (Bacon *et al.* 2003).

1.2 Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos eucarióticos caracterizados por la formación de hifas, que son estructuras filamentosas constituidas por una sucesión de células intercomunicadas, que en conjunto constituyen el micelio; son aerobios, macro o microscópicos, heterótrofos, la nutrición la efectúan mediante la secreción de enzimas (exoenzimas) que digieren la materia orgánica antes de ingerirla (absorción) y es almacenada en forma de glucógeno, poseen crestas mitocondriales en placa, membrana celular constituida por ergosterol, quitina como principal componente de la pared celular y se reproducen por propágulos denominados esporas (Guarro *et al.* 2011). Otra característica importante de los hongos es la producción de metabolitos secundarios de interés en medicina y en biotecnología.

1.3 Clasificación taxonómica de *Cladosporium cladosporioides*

El género *Cladosporium* se caracteriza por tener especies que producen colonias de color verde oliva a marrón o negro, y con conidios pigmentados en forma oscura que se agrupan en cadenas simples o ramificadas. Se estima que el género *Cladosporium* contiene alrededor de más de 772 especies.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Cladosporium*.

Reino	Hongos
Filum	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Dothideomycetes</i>
Orden	<i>Capnodiales</i>
Familia	<i>Davidiellaceae</i>
Género	<i>Cladosporium</i>

Tomado de Dugan *et al.*, 2004

1.3.1 Filum *Ascomycota*

El filo *Ascomycota* contiene más de 30.000 especies de hongos, que viven de manera independiente, y cerca de 60.000 especies, si se tienen en cuenta las que forman parte de los líquenes. Los ascomicetos comprenden numerosos hongos, la mayor parte de las levaduras y varios mohos azules, verdes, rosas y marrones. La característica definitoria de este grupo de hongos es el " ascus " (del griego : ἄσκος (askos), que significa "saco" o "bota de vino"), una estructura sexual microscópica llamadas ascosporas (James *et al.* 2006). Sin embargo, algunas especies de *Ascomycota* son asexuales, lo que significa que no tienen un ciclo sexual y, por lo tanto, no forman ascos o ascosporas.

1.3.2 Clase *Dothideomycetes*

Dothideomycetes es la clase más grande y más diversa de hongos ascomicetos. Comprende 11 órdenes de 90 familias, 1300 géneros y más de 19,000 especies conocidas (Kirk *et al.*, 2008).

Su modo de vida es muy variado, existen como hongos parásitos (de plantas, animales e incluso de seres humanos) como saprófitos, endófitos y algunos que forman líquenes. Hay *Dothideomycetes* que generan graves daños agrícolas, especialmente los fitoparásitos necrótrofos, causantes de necrosis (en hojas, tallos y frutos) y otros fabricantes de micotoxinas.

1.3.3 Orden *Capnodiales*

Los miembros de este orden, conocidos con el nombre de fumaginas, son hongos folícolas, que desarrollan micelios superficiales, con hifas fuertemente pigmentadas y dentro del ascoma, como elementos estériles. Un pequeño número de estos hongos también son capaces de parasitar a los seres humanos y animales (Crous *et al.*, 2009).

1.3.4 Género *Cladosporium*

Se menciona a *Cladosporium* como un ejemplo de un hongo con actividades antivirales. *Cladosporium* es un hongo filamentoso, perteneciente al filo *Ascomycota* y al grupo de los dematiáceos, caracterizados por presentar una coloración oscura (Manisha *et al.*, 2012). Microscópicamente presenta hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón. Las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios unicelulares, elipsoides o cilíndricos, algunos con forma de escudo debido a las cicatrices de unión entre ellos (Wu *et al.*, 2014).

Macroscópicamente forma colonias aterciopeladas, pulverulentas o vellosas, con pliegues radiales, de color blanco o crema que tienden a oscurecerse en tonos verde oliva y, a veces, gris verdoso o marrones (Manisha *et al.*, 2012).

1.3.5 Especie *cladosporioides*

Georg Fresenius describió por primera vez a *Cladosporium cladosporioides* en 1850 y de acuerdo a sus estudios se sabe que es un moho de pigmentación oscura que se encuentra en todo el mundo en una amplia gama de materiales, tanto en el exterior como en interiores. Es uno de los hongos más comunes en el aire exterior donde sus esporas son importantes en la enfermedad alérgica estacional. Si bien esta especie rara vez causa enfermedades invasivas en los animales, es un agente importante de la enfermedad de las plantas, atacando tanto las hojas como los frutos de muchas plantas. La reproducción de *Cladosporium cladosporioides* es asexual, se considera una especie exclusivamente anamórfica. Las colonias son de color verde oliva a café oliva y tienen un aspecto aterciopelado o pulverulento. En un medio de agar Patata y Dextrosa (PDA), las colonias son de color gris oliva a verde apagado, aterciopeladas y con mechones. Los bordes de la colonia pueden ser de color verde oliva a blanco y plumoso (Bensch *et al.*, 2010). Las colonias son difusas y los micelios forman esterillas y raramente crecen hacia arriba desde la superficie de la colonia (Figura 2).

Esta especie produce esporas asexuadas en delicadas cadenas ramificadas que se separan fácilmente y flotan en el aire. Es capaz de crecer en condiciones de agua baja y a temperaturas muy bajas.

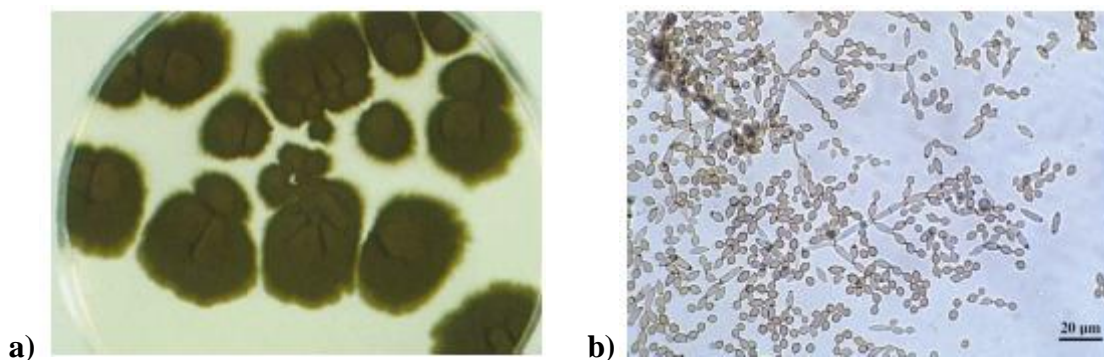


Figura 2: a) Características macroscópicas de *Cladosporium cladosporioides*.

b) Características microscópicas de *Cladosporium cladosporioides*.

Tomado de Sandoval-Denis *et al.*, 2015.

1.4 Justificación

La infección por VHS-1 es muy contagiosa, frecuente y endémica en todo el mundo. Se adquiere mayoritariamente durante la infancia y dura toda la vida, es decir, de una forma persistente estableciéndose de forma latente.

Por lo anterior, es de gran importancia estudiar el efecto que podrían tener diversos metabolitos bioactivos sobre el ciclo de replicación viral del VHS-1 en un modelo de infección *in vitro*.

La investigación con potenciales actividades antivirales de los metabolitos del hongo *Cladosporium cladosporioides* pretende dar a conocer un aporte científico novedoso, ya que actualmente no se cuenta con una gran cantidad de información respecto a este tema.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1.1 Uso de los hongos con actividad biológica

Históricamente, el papel fundamental de los hongos en diferentes aspectos de la vida humana es muy mencionado. Compuestos aislados de hongos provocan una variedad de actividades biológicas, especialmente prometedoras contra el cáncer y las propiedades antidiabéticas (Soheil *et al.* 2015). Sin embargo, también se han reportado otras actividades farmacéuticas, incluyendo la inhibición del ciclo celular, la inhibición de la fosfatasa, actividades antioxidantes, actividades neurogénicas, antiinflamatorias y antivirales (Krause y Tobin 2013). El uso de tecnologías y la optimización de procesos han permitido que se llegue a la caracterización de metabolitos aun en pequeñas cantidades.

El descubrimiento de productos naturales ha jugado un papel importante en la búsqueda de nuevos medicamentos, y es la fuente más potente para el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas. Los productos naturales son compuestos químicos derivados de organismos vivos. Los productores más destacados de productos naturales se pueden encontrar dentro de diferentes grupos de organismos que incluyen de gran medida a los hongos. El descubrimiento de productos naturales implica aislamiento, elucidación estructural y el establecimiento de la ruta biosintética de los metabolitos secundarios. Esta es un área de considerable interés para los científicos debido a la diversidad estructural, la complejidad y diversas bioactividades de compuestos aislados. Los productos naturales en bruto se han usado directamente como medicamentos que son de bajo costo y son fuentes importantes de medicamentos tradicionales.

También proporcionaron la arquitectura química básica para obtener productos naturales semisintéticos (Suryanarayanan *et al.*, 2009). El papel de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos puede ser demostrado por un análisis del número y las fuentes de agentes bioactivos. Hay al menos 200,000 metabolitos naturales con diversas propiedades bioactivas (Bérdy 2005).

En comparación con otros microorganismos, los hongos producen un gran número de actividades secundarias (Zhang *et al.*, 2006). Los hongos endófitos aislados poseen fuertes metabolitos fungicidas, bactericidas y citotóxicos (Wang *et al.*, 2007). Producen enzimas que se utilizan para diversas aplicaciones, como la degradación y la biotransformación de compuestos orgánicos (Firáková *et al.*, 2007; Pimentel *et al.*, 2011). Los componentes derivados de los hongos se usan en aplicaciones biotecnológicas (Tomita 2003) y poseen una gran importancia en la ciencia farmacéutica debido a sus actividades antimicrobianas, anticancerígenas y antivirales. (Selim *et al.*, 2012). Desde el período de 2000 a 2005, se han descrito aproximadamente 100 metabolitos de hongos marinos (Calonge *et al.*, 2011) y desde el período 2006 a 2010 se han reportado un total de 690 productos naturales (Chaparpordi *et al.*, 2012) como aislados de hongos en los hábitats marinos.

En el área terapéutica han sido introducidos metabolitos de hongos medicinales con actividades antitumorales y luego comprobados sus efectos sobre la inmunidad y también los mecanismos de activación de la respuesta inmune y la cascada de señalización. Además, se ha demostrado su estructura molecular y su relación con estas actividades. También se introducen los casos importantes de estos metabolitos, junto con actividades antitumorales de aislados de hongos medicinales putativos (Nong *et al.*, 2014).

A partir de estos estudios la mayoría de los compuestos (casi 50%) pertenecía a policétidos y sus híbridos de isopreno, seguido de alcaloides, terpenos, y péptidos que contribuyeron al 14-20%. Estos nuevos compuestos se produjeron en su mayoría de miembros de los géneros de hongos *Penicillium* y *Aspergillus*. Representantes de otros géneros menos comunes fueron *Acremonium*, *Emericella*, *Epicoccum*, *Exophiala*, *Paraphaeospora*, *Cladosporium*, *Phomopsis* y *Halarosellinia* (Imhoff *et al.*, 2012).

En el futuro, los productos derivados de los hongos serán una fuente barata para las industrias médica y agrícola, entre otras. Es seguro que la investigación sobre los hongos conducirá a aislar compuestos más nuevos y con mejores rendimientos.

2.1.2 Metabolitos con actividad antiviral

2.1.2.1 Actividad antiviral de *Cladosporium cladosporioides*

Hasta el año 2006, se informó de un número limitado de compuestos con actividad antiviral, tal como fue revisado por Bhadury *et. al.* Sin embargo, durante la última década, numerosos compuestos con actividades antivirales prometedores contra varios virus fueron aislados de hongos.

Estudios recientes demuestran la enorme capacidad que tienen los hongos para producir compuestos activos, constituyendo una nueva vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en medicina (Soheil *et al.*, 2015).

Por otro lado, hay muchos virus importantes en humanos que aún no se han estudiado, ya que para la mayoría de las enfermedades virales no ha habido ningún tratamiento terapéutico eficaz disponible hasta el momento (Megens y Laethem, 2013).

El descubrimiento de nuevos productos naturales y metabolitos aislados de hongos que poseen alta eficacia y proponen un gran avance en investigaciones científicas (Zorofchian *et al.* 2014). Recientes publicaciones informaron nuevos agentes antivirales, que generalmente inhiben el ciclo de replicación del virus, lo cual es un factor importante para la replicación del virus y / o elementos virales (Lou *et al.* 2014). La acción antiviral de estos hongos puede darse de forma indirecta, modificando la respuesta biológica y estimulando la inmunidad mediante una inhibición directa del desarrollo del virus (Calonge *et al.*, 2011).

Las propiedades de *Cladosporium* y el estudio de sus metabolitos secundarios de diferentes especies mostraron actividades prometedoras, puede mencionarse a *Cladosporium sphaerospermum* en el cual sus metabolitos (Cladosinas) presentaron actividad antiviral contra el virus de la gripe AH1N1 (Wu *et al.*, 2014). Se han identificado especies de *Cladosporium* (*C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*) como agentes potenciales de control biológico contra diversas plagas tales como la roya blanca del crisantemo (Torres *et al.*, 2017) e igualmente el descubrimiento de alcaloides de indol pertenecientes a *Cladosporium* sp. con propiedades anti-influenza (Peng J. *et al.* 2013), más sin embargo el uso de *Cladosporium cladosporioides* contra el VHS-1 no ha sido reportado.

2.2 APORTACIÓN CIENTÍFICA

Se pretende dar a conocer nuevos agentes antivirales provenientes del hongo *Cladosporium cladosporioides* en base al estudio de sus metabolitos que tengan propiedades para inhibir el ciclo de replicación del virus del Herpes Simplex tipo 1 así como el estudio de posibles factores importantes para la replicación del virus y/o elementos virales.

2.3 HIPÓTESIS

Los metabolitos fúngicos aislados del hongo *Cladosporium cladosporioides* ejercen actividad viricida contra partículas VHS-1 en un modelo de infección *in vitro*, aplicado a la inhibición de la transmisión por VHS-1.

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 Objetivo general

Aislar metabolitos producidos por *Cladosporium cladosporioides* y analizar la actividad antiviral contra el virus del Herpes Simplex tipo 1.

2.4.2 Objetivos específicos

- Activar e identificar de forma microscópica y macroscópica el hongo *Cladosporium cladosporioides* obtenido a partir de semillas de encino (*Quercus ilex*).
- Aislar los metabolitos del hongo *Cladosporium cladosporioides* y evaluar sus propiedades antivirales frente al virus del Herpes Simplex tipo 1 (VHS-1).
- Determinar la citotoxicidad del extracto crudo aislado del cultivo de *Cladosporium cladosporioides*.
- Evaluar la actividad antiviral en un modelo de infección *in vitro* del virus del Herpes Simplex tipo 1 (VHS-1).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material, Equipo y Reactivos

3.1.1 Material

3.1.1.1 Material de laboratorio

- Cajas Petri desechables de plástico Medegen 15 X 100 mm
- Embudos de separación de 250 y 1000 mL Pyrex®
- Gradilla para tubos
- Microplacas estériles de poliestireno de 6 y 24 pozos de fondo plano Costar®
- Matraces Erlenmeyer Pyrex® de 250, 500 y 1000 mL
- Matraces bola de 250, 500 y 1000 mL con esmeril 24/40
- Puntillas 100 µL, 1000 µL, 200 µL estériles
- Pipetas automáticas Transferpette® y Eppendorf® de 1, 10, 200 y 1000 µL
- Probeta de 10, 25 50, 100, y 250 mL
- Pinzas de disección
- Probetas de 10, 50, 250 y 500 mL
- Pipetas serológicas de 5 y 10 mL
- Pipetas Pasteur
- Pipetas serológicas desechables 1, 2, 5 y 10mL Corning®
- Tubos de ensaye 13 X 100, 18 X 150 mm
- Tubos con tapón de rosca 13 X 100 mm
- Tubos eppendorf de 0.6 y 2 mL
- Tubos cónicos 15 y 50 mL Corning®

- Viales de vidrio oscuros de 2 y 5 mL
- Vasos de precipitados

3.1.1.2 Material biológico y reactivos

- Células epiteliales de riñón de mono verde africano *Chlorocebus sabaues* (Vero ATCC CCL-81) donadas por el Dr. Ernesto Torres López, del departamento de Inmunología de la Facultad de medicina, UANL.
- Aislado clínico de VHS-1 donado por el Dr. Ernesto Torres López del departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL
- Cepa del hongo *Cladosporium cladosporioides* aislada a partir de semillas de Encino (*Quercus ilex*) de la comunidad de los Ramones, Estado de Nuevo León, México, proporcionadas por la Dra. Ma. Elena Cantú Cárdenas y M.C. Ángel Josué Arteaga Garcés del Laboratorio de Biotecnología 1 perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas. UANL.
- Suero Fetal Bovino (Biowest)
- Aciclovir (Laciken)
- Medio A-DMEM (Biowest)
- Buffer Fosfato Salino (Biowest)
- Inmunoglobulina Humana Normal (Grifols)
- Tripsina 0.25% (Invitrogen)
- L-glutamina (Biowets)
- Colorante de Giemsa (Sigma aldrich)
- Agar Patata y Dextrosa (BD DIFCO)
- Agar Sabouraud Dextrosa (BD DIFCO)
- WST-1 Cell Proliferation Reagent (Sigma aldrich)

3.1.2 Equipo

- Autoclave MarketForge® Sterilmatic
- Agitador de tubos eppendorf Ika MS1
- Balanza analítica AND® modelo GR-120
- Colector Automático de Muestras Bio Rad® 2128
- Centrífuga IEC® Micro MB
- Congelador Vertical Magic Chef®
- Campana de Flujo laminar Marca ESCO. Modelo Labculture
- Espectrofotómetro Infrarrojo (IR) Marca Perkin Elmer. Modelo Spectrum one
- Espectrofotómetro UV-Vis Marca GBC. Modelo Cintra 6
- Microscopio óptico (Marca Carls Zeiss, Modelo Primo Star, Serie: 3144003760)
- Lector de microplacas modelo ELx800 BioTek
- Placa de Calentamiento digital Cimarec
- Refrigerador Daewoo® DFR N141D
- Rotaevaporador marca Yamato modelo RE 200

3.1.3 Disolventes

- Acetato de etilo grado analítico, Fermont®
- Cloroformo, Aldrich®
- Dimetil sulfóxido (DMSO), Fisher Scientific®
- Etanol grado analítico, Fermont®
- Éter de Petróleo, Fermont®
- Metanol grado analítico, Fermont®
- Tolueno, Fermont®
- Agua destilada

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterización de microorganismo seleccionado

La cepa de *Cladosporium cladosporioides* fue proporcionada por la Dra. Ma. Elena Cantú Cárdenas y el M.C. Ángel Josué Arteaga Garcés del Laboratorio de Biotecnología 1 perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas. UANL. Los colaboradores del grupo de trabajo aislaron la cepa del *C. cladosporioides* a partir de semillas de Encino (*Quercus ilex*) en la comunidad de los Ramones, Estado de Nuevo León. Para su aislamiento se colocaron aproximadamente 5 g de semilla de encino en un matraz que contenía 100 mL de NaCl 0.85% estéril. Posteriormente llevaron a cabo la técnica de dilución y siembra en placa, utilizando un medio de cultivo selectivo para hongos (PDA) para la obtención de cultivos puros a partir de colonias aisladas.

3.2.1.1 Determinación de las características macroscópicas

Se realizó una siembra del material fúngico (cepa de *Cladosporium cladosporioides*) para la determinación de las características morfológicas, tales como la topología, la apariencia de las colonias, la textura y el color. La cepa del hongo se reactivó en medios PDA (Agar Patata y dextrosa) y SDA (Agar Sabouraud) (Tabla 3) a 24 °C para la identificación y confirmación de la clasificación taxonómica.

Tabla 3. Medios de cultivo para el hongo *Cladosporium cladosporioides*.

AGAR PDA		AGAR SDA	
Patatas	300 g	Pluripeptona	10 g/L
Dextrosa	20 g	Glucosa	40 g/L
Agar	15 g	Cloranfenicol	0.05 g/L
Agua destilada	1000 mL	Agar	15 g/L

Tomado de Peng J. *et al.* 2013.

Con el fin de seleccionar el mejor medio de cultivo, se hicieron ensayos preliminares con la cepa aislada (*Cladosporium cladosporioides*).

1. Preparación del medio PDA y SDA

- Se rehidrató 39 g del medio en un litro de agua destilada.
- Se dejó reposar 10 a 15 minutos.
- Posteriormente se calentó el medio agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante un minuto para disolverlo por completo.
- Se esterilizó en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos.
- Se dejó enfriar aproximadamente a 45°C.

2. Para la resiembra del hongo *Cladosporium cladosporioides* se tomó una muestra del material fúngico con la asa de siembra, previamente esterilizada en la flama del mechero.

3. Se colocó el micelio en el centro de una caja de Petri con medio PDA y/o SDA por inoculación por picadura.

4. Se incubó las cajas de Petri a 28-30 °C para su crecimiento óptimo.

3.2.1.2 Determinación de las características microscópicas

Se realizó tinción con azul de lactofenol utilizando la técnica de cinta adhesiva (Apéndice 1) para observar las características microscópicas del hongo *Cladosporium cladosporioides*. Se observó la forma, tamaño y color de las hifas y esporas.

Se utilizó la técnica de cinta adhesiva debido a que se conserva la yuxtaposición original de las esporas y segmentos de hifas. Además de permitir observar las estructuras fúngicas casi sin alteración. Para su realización se tomó una tira de cinta de 4 cm, con el lado adhesivo hacia fuera, presionando firmemente contra la superficie de la colonia del hongo. Posteriormente, la tira de cinta fue colocada en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol.

3.2.2 Crecimiento de *Cladosporium cladosporioides* y obtención de sus metabolitos

La cepa crecida del hongo *Cladosporium cladosporioides* se inoculó en el medio de cultivo PDA en tubos inclinados (siembra 1) por rasgadura y se incubó a 28°C por 5 días, posteriormente se observaron sus características macroscópicas y microscópicas para finalmente inocular en cajas con medio PDA e incubar a 28°C por 10 días. Se realizó una resiembra de la caja de Petri a tubo inclinado con PDA (siembra 2).

Se preparó una suspensión de esporas de la siembra 1 colocando 1 mL de un tubo de 10 mL con solución salina al 0.85% en un tubo con crecimiento y se raspó la superficie del hongo con un asa bacteriológica para suspender la mayor cantidad de esporas posibles al líquido, el mililitro se regresó a su tubo original. Se realizó la cuenta de esporas con una cámara de Neubauer en un microscopio óptico.

Se llevó a cabo la fermentación del hongo *C. cladosporioides* utilizando un medio que consistía en 30 g de sacarosa, 3 g de NaNO₃, 1 g de K₂HPO₄, 1 g de extracto de levadura, 0.5 g de KCl, 0.5 g de MgSO₄·7H₂O y 0.01 g de FeSO₄ en 1 L de agua. Se inocularon 10 matraces Erlenmeyer (250 mL) que contenían 100 ml de medio con 1 ml de las esporas de *C. cladosporioides* (6x10⁴ esporas por mililitro). Los matraces se incubaron estáticamente a 28°C durante 3 semanas en una incubadora microbiológica convencional.

Una vez obtenida la biomasa ésta fue filtrada y separada y se procedió a la extracción de los metabolitos. La biomasa obtenida fue colocada en un embudo de separación (250 mL) utilizando acetato de etilo (2x50 mL). Se agitó vigorosamente y se dejó reposar. Posteriormente el extracto líquido obtenido fue evaporado a sequedad bajo presión reducida a una temperatura de 40°C en un evaporador rotativo.

El residuo obtenido de la evaporación del extracto se analizó por medio de Espectroscopía Ultra Violeta – Visible (UV-Vis) mediante un Espectrómetro GBC Modelo Cintra 6 en un rango de 200 a 600 nm utilizando etanol como blanco, determinando los máximos de absorción. Se hizo un análisis de éste por medio de un Espectrofotómetro Infrarrojo (IR) Marca Perkin Elmer, modelo Spectrum one. Se realizó una Cromatografía en Capa Fina (CCF) al extracto fúngico obtenido para el análisis de los metabolitos usando etanol como eluyente, tomando en cuenta la cantidad de muestra aplicada, el volumen de aplicación, composición del eluyente, distancia recorrida por eluyente y el tiempo de saturación.

3.2.3 Preparación del extracto de *Cladosporium cladosporioides* para la determinación de las actividades biológicas

Para las actividades biológicas el total del extracto de *C. cladosporioides* (se disolvió en 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para su almacenamiento en refrigeración (4°C).

3.2.4 Cultivos y condiciones de crecimiento de las células

Se trabajó con la línea de células epiteliales de riñón de mono verde africano *Chlorocebus sabaues* (Vero, ATCC CCL-81) donadas por el Dr. Ernesto Torres López, del departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL.

Las células Vero fueron cultivadas en monocapa a una confluencia 80-90% a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa y en medio advanced-DMEM suplementado con suero fetal bovino al 2%, glutamina, aminoácidos esenciales, estreptomicina y penicilina al 1%.

3.2.4.1 Ensayo de citotoxicidad del Extracto de *Cladosporium cladosporioides* en la línea celular Vero

El ensayo de citotoxicidad del Extracto de *C. cladosporioides* se realizó en la línea celular Vero. Se utilizaron cultivos confluentes de la línea celular para obtener una suspensión de células, utilizando tripsina al 0.5%.

Las células se colocaron en un tubo eppendorf, se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos a 25 °C, se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió la pastilla celular con medio (MEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se contaron las células en un invertoscopio. Una vez conocido el número total de células, se preparó una suspensión celular para colocar 5000 células en cada uno de los pozos (100 µL por pozo) de una microplaca de 96 pocillos. La placa así preparada se incubó por 24 horas a 37 °C, bajo una atmósfera de CO₂ al 5% en una incubadora con CO₂ modelo MCO-17AC (INCUSAFE SANYO). Posteriormente se adicionaron a las células, diferentes concentraciones del extracto fúngico a probar (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 µg/mL) y se incubaron por 24 horas bajo las mismas condiciones. Una vez transcurrido este tiempo, se colocaron 10 µL del reactivo WST-1 [2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio] a cada uno de los pozos y se incubó la microplaca por 120 minutos a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂ y finalmente, se realizó la lectura de la densidad óptica a 450 nm con un lector de microplacas modelo ELx800 (BioTek).

Para preparar las distintas diluciones a probar del extracto fúngico, se preparó una solución “stock” de 8 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO) y se diluyó a 15.5 mL con medio de cultivo MEM.

Como control positivo (0% de viabilidad) se utilizó tritón X-100 al 1% en PBS y como blanco de reacción medio MEM y WST-1 (Figura 3). Se probó el extracto en la microplaca llevando a cabo cuatro repeticiones independientes bajo las mismas condiciones de estudio.

La técnica utilizada para la determinación de la viabilidad celular fue la de WST- 1, la cual se fundamenta en la reacción de reducción del reactivo WST-1 por enzimas deshidrogenasas mitocondriales, lo que da lugar a la formación de formazán y es directamente proporcional al porcentaje de células viables.

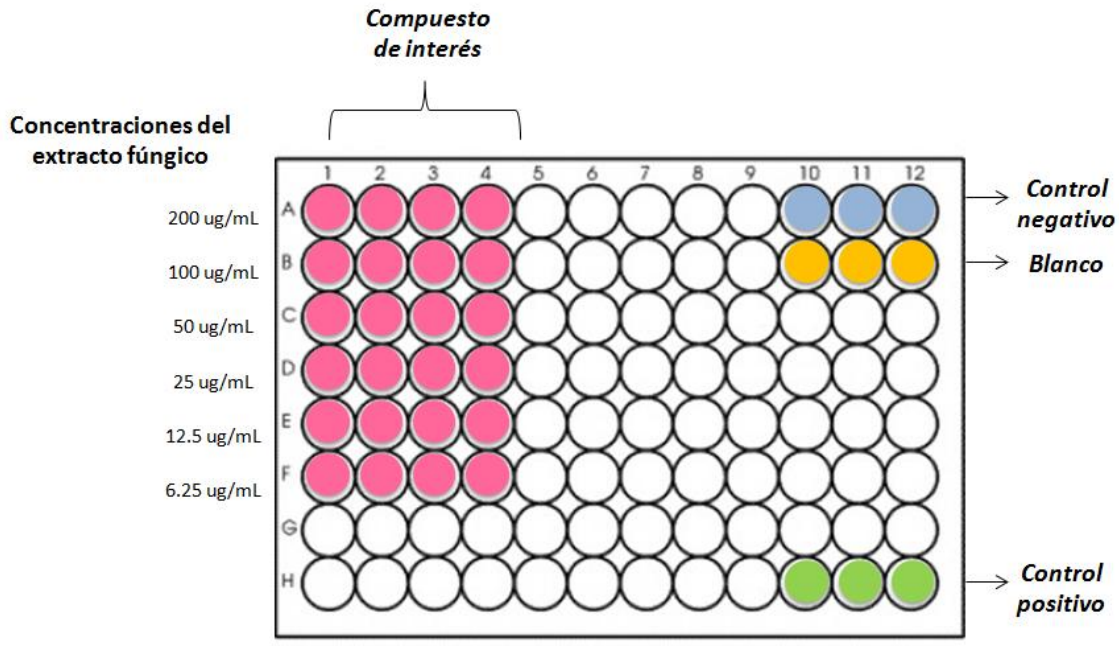


Figura 3. Representación de la placa de 96 pozos para el ensayo de viabilidad de la línea celular Vero. Con las concentraciones del Extracto de *Cladosporium cladosporioides* y los controles utilizados.

3.3 Cuantificación de las partículas virales por titulación viral

La cuantificación de las partículas virales fue determinada mediante la técnica de neutralización de placas (KOS, ATCC VR-1493) y se trabajó con el VHS-1 proporcionado por Dr. Ernesto Torres López, del departamento de Inmunología de la Facultad de medicina, UANL.

En condiciones de esterilidad se realizó un título viral mediante diluciones seriadas logarítmicas base 10 a partir de un concentrado del VHS-1.

En los tubos seriados se adicionó una solución de PBS-glucosado 0.1% (1:10) los cuales se manejaron a 4°C. Cada uno de los tubos seriados fue homogenizado y 1 mL fue transferido con una pipeta serológica estéril a cada tubo.

Se sembraron 2 placas de cultivo de 6 pozos con células Vero (aproximadamente 0.5×10^5 células por pozo). En los pozos fueron colocados 1 mL de cada uno de los tubos de las diluciones y posteriormente se incubó en agitación a 60 rpm a 37°C durante 1 hora. A continuación, el sobrenadante se desechó y se adicionó medio fresco advanced-DMEM suplementado (0.32% de IgG). Las células se incubaron por 48 h a 37°C con 5% de CO₂ y como controles de crecimiento celular se utilizaron células sin presencia del virus.

Finalizando el período de incubación se desechó el medio, posteriormente las células fueron fijadas con 2 mL de metanol por 5 minutos y teñidas con 1 mL de colorante Giemsa por 10 minutos. Se lavaron las placas con agua y se dejaron secar para observar las UFP/mL (Unidades Formadoras de Placa por mililitro). Se realizó un conteo de las zonas líticas de cada uno de los pozos (células lisadas a causa de la infección por parte del VHS-1) para la determinación de las UFP/mL de las diluciones correspondientes (Morales-San Claudio, 2013).

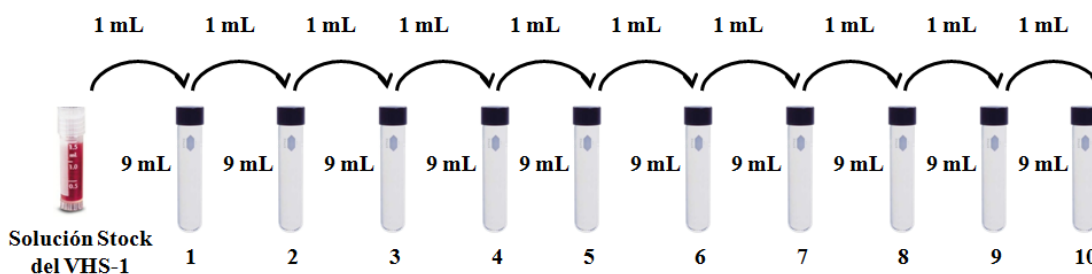


Figura 4. Distribución de los tubos utilizados para las diluciones logarítmicas del stock viral.

Se determinará la concentración de UFP/mL mediante las siguientes fórmulas:

- $\text{UFP contadas en el pozo} / \text{UFP del título} = \text{Concentración de UFP/mL}$.
- $100 \text{ UFP} / \text{El número de UFP contadas} = \text{Volumen necesario para las UFP}$

3.3.1 Determinación de la actividad antiviral del Extracto de *Cladosporium cladosporioides*

La determinación de la actividad antiviral se realizó mediante el ensayo de reducción de placas líticas. Se sembró 1×10^6 células Vero por pozo en medio fresco advanced-DMEM suplementado en una placa de 24 pozos 24 h antes de realizar la infección. Se infectó con 20 UFP a cada pozo de la placa de cultivo. Se incubó en agitación por 1 h a 37°C en agitación a 60 rpm.

Posterior al tiempo de incubación se desechó la solución viral y se adicionaron 0.5 mL de medio fresco advanced-DMEM suplementado (2.5% Suero Fetal Bovino). Como control positivo se utilizaron las células tratadas con Aciclovir (ACV) Laciken $8.8 \mu\text{M}$ (Figura 5). Se preparó el extracto fúngico en medio de cultivo 0.5% DMSO y se realizaron diluciones seriadas del mismo a las concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.50 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$, se incubó la placa a 37°C con 5% de CO_2 por 48 h.

Transcurrido el período de incubación se removió el sobrenadante y se fijaron las células con 1 mL de metanol por 10 minutos, se procedió a realizar una tinción con 1 mL de colorante Giemsa para posteriormente contar y evaluar la capacidad de reducción de placas líticas.

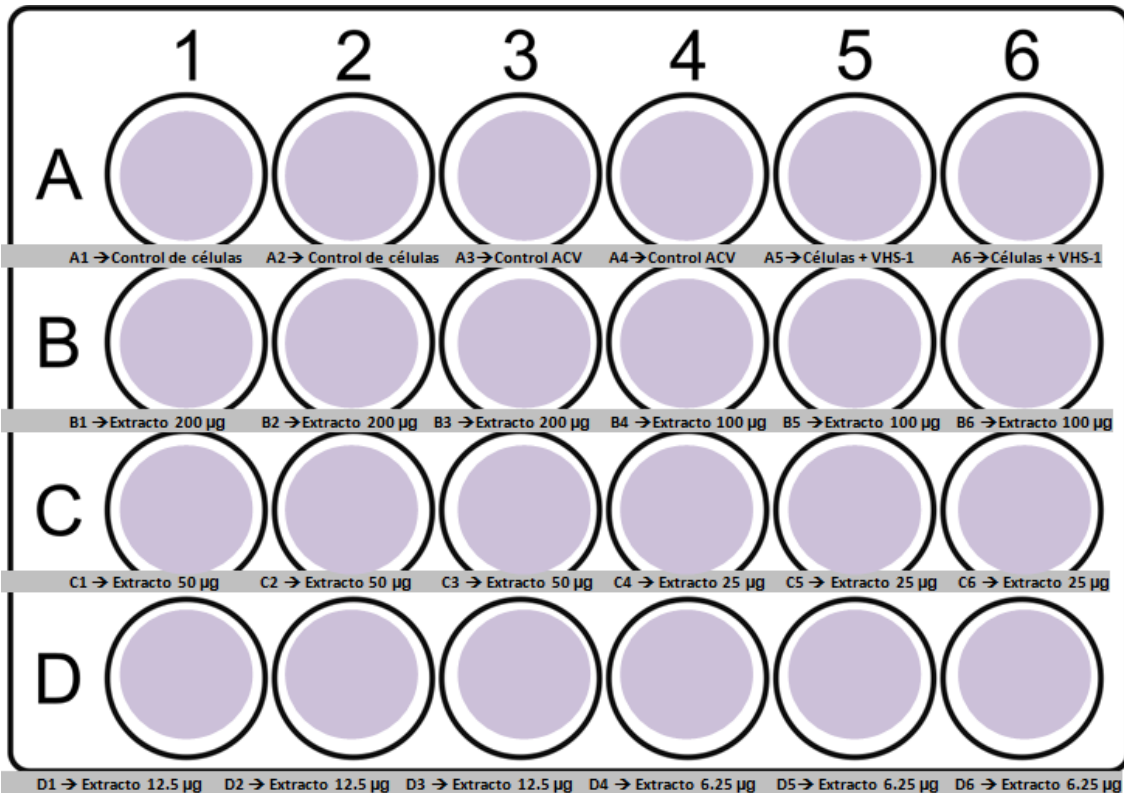


Figura 5. Distribución de las concentraciones del Extracto de *Cladosporium cladosporioides* y los controles utilizados.

La IC_{50} se determinó como la concentración en la que se observó reducción del 50% de la formación de UFP comparado contra el 0% de reducción del control negativo, el ensayo se realizó por triplicado.

3.4 Análisis estadístico

Las diferencias significativas fueron determinadas empleando un análisis de varianza (ANOVA), considerando una $p < 0,05$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Caracterización de microorganismo seleccionado

4.1.1 Determinación de las características macroscópicas

La morfología macroscópica fue diferente en cada medio, así mismo el tiempo en el cual se alcanzó el máximo crecimiento. Se observó que la morfología macroscópica constaba de la formación de colonias color amarillo grisáceo con pigmentación no uniforme, de apariencia rugosa y aterciopelada a los 7 días de incubación. A los 14 días de incubación se observó la formación de colonias color grisáceo oscuro con pigmentación no uniforme, de apariencia ligeramente rugosa, aterciopelada y algodonosa (Figura 6 a y c).

Mientras que en el Medio SDA el micelio desarrollado era abundante, en PDA por el contrario, era menor. El medio SDA generó un crecimiento abundante y que a la vez permitió la toma de muestra para los inóculos (Figura 6 b y d).

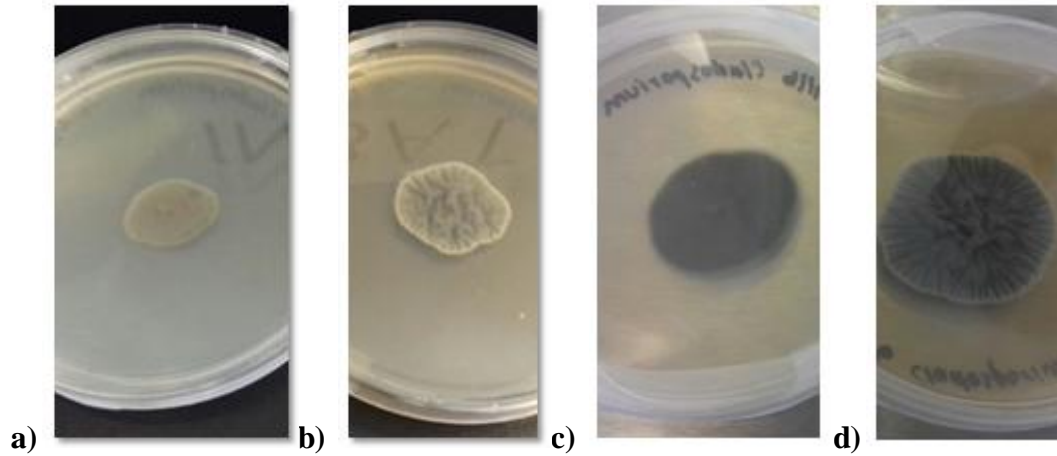


Figura 6. Morfología macroscópica del hongo *Cladosporium cladosporioides*. **a)** Crecimiento del hongo en medio agar PDA con 7 días de incubación a 24 °C. **b)** Crecimiento del hongo en medio agar SDA con 7 días de incubación a 24 °C. **c)** Crecimiento del hongo en medio agar PDA con 14 días de incubación a 24 °C. **d)** Crecimiento del hongo en medio agar SDA, con 14 días de incubación a 24 °C.

4.1.2 Determinación de las características microscópicas

Para ambos medios utilizados (PDA y SDA) se observó una morfología microscópica característica del hongo *Cladosporium cladosporioides*, tales como la formación de hifas gruesas, septadas, dematiáceas, células conidiógenas indiferenciadas, conidias dematiáceas y en cadenas (Figura 7).

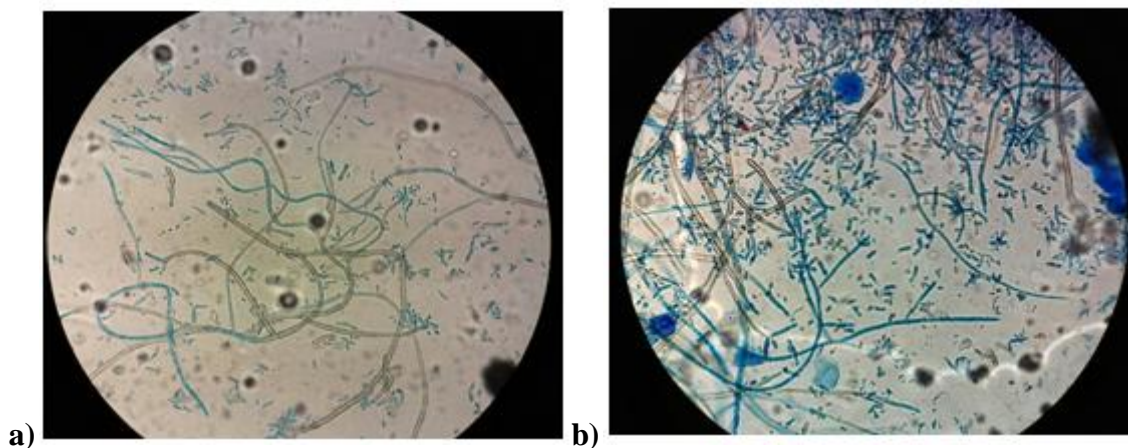


Figura 7. Morfología microscópica del hongo *Cladosporium cladosporioides* después de 14 días de incubación a 24° C. **a)** Azul de lactofenol, 40x. Agar PDA. **b)** Azul de lactofenol, 40x. Agar SDA.

4.2 Obtención del Extracto de *Cladosporium cladosporioides*

La producción de la biomasa obtenida a partir de la fermentación de los 10 matraces Erlenmeyer (250 mL) que contenían 100 ml del medio (30 g de sacarosa, 3 g de NaNO₃, 1 g de K₂HPO₄, 1 g de extracto de levadura, 0.5 g de KCl, 0.5 g de MgSO₄·7H₂O y 0.01 g de FeSO₄ en 1 L de agua) adicionado con las esporas del hongo *C. cladosporioides* (6x10⁴ esporas por mililitro) fue de 11.361 g (Tabla 4). Finalmente a partir de la extracción con acetato de etilo (2 X 50 mL) por medio de un evaporador rotativo se obtuvo un residuo color blanquecino con un peso de 2.577 g (Figura 7).

Tabla 4. Cantidad en gramos de la biomasa total y del extracto obtenido del hongo *Cladosporium cladosporioides*.

Extracto de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	
Peso total de la biomasa	11.361 g
Peso total del Extracto fúngico	2.577 g

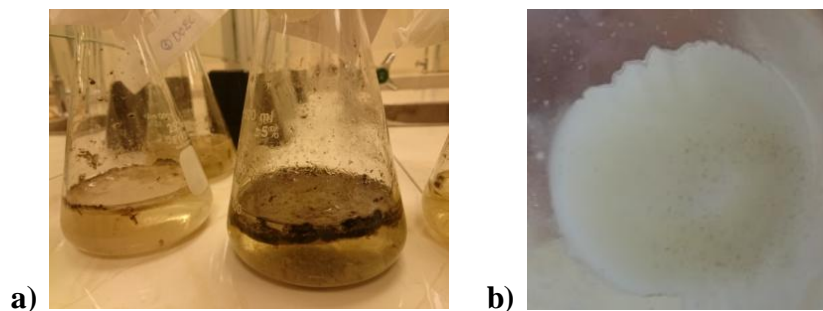


Figura 8. Obtención del Extracto de *Cladosporium cladosporioides*. **a)** Incubación de matraces Erlenmeyer (250 mL) a 28°C durante 3 semanas. **b)** 2.577 g del extracto concentrado del hongo *Cladosporium cladosporioides* bajo presión reducida, a una temperatura de 40 °C.

En la técnica de CCF del extracto de *Cladosporium cladosporioides* se visualizó una banda definida con un factor de retención (R_F) de 0.76 (Figura 9).

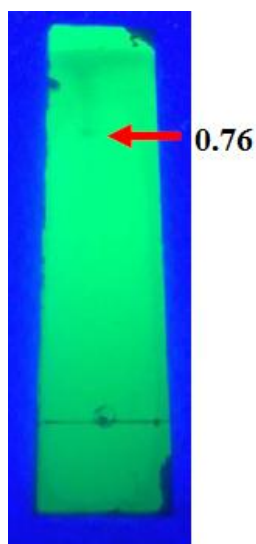


Figura 9. Cromatografía en Capa Fina del Extracto de *Cladosporium cladosporioides*. Se visualizó una banda definida con un R_F de 0.76.

Se obtuvo un espectro de absorción UV/Vis del extracto de *Cladosporium cladosporioides*. Se pudo observar que existe un pico de máxima absorción (0.187) a una longitud de onda de 265 nm (Figura 10).

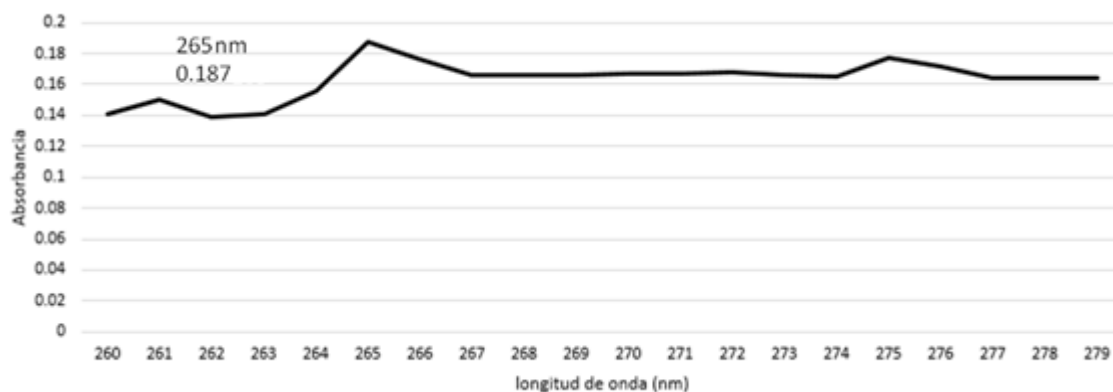


Figura 10. Espectro UV/Vis del Extracto de *Cladosporium cladosporioides* a una longitud de onda de 265 nm.

El espectro IR del extracto presentó un comportamiento similar a las lactonas, debido a que se visualizaron bandas de grupo éster y bandas alquilo correspondientes a alcanos cíclicos ($1330-1050\text{ cm}^{-1}$), algunas bandas adicionales observadas en el espectro corresponden a alquenos ($3000-2975\text{ cm}^{-1}$), además se observa una banda de alcohol ($3650-3580\text{ cm}^{-1}$) y una banda correspondiente a ésteres cíclicos ($1750-1715\text{ cm}^{-1}$), por lo que la estructura puede tratarse de un éster cíclico con dobles enlaces y sustituyentes OH (Figura 11).

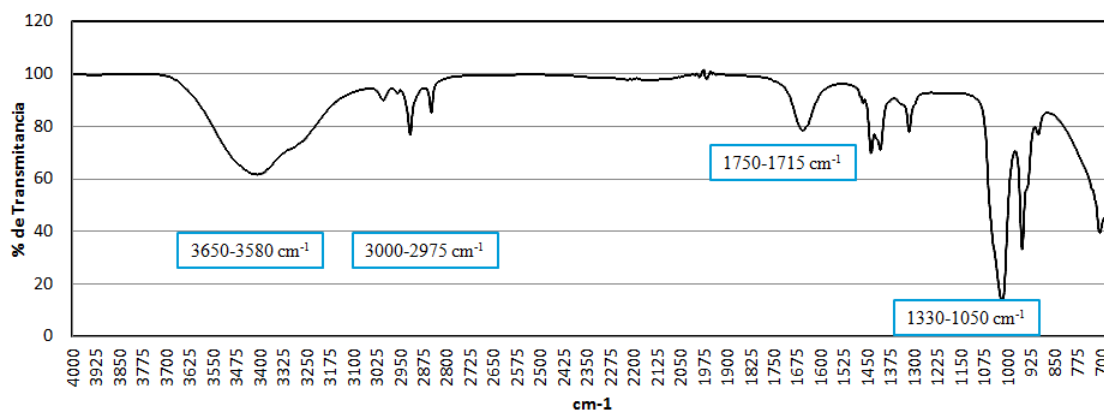


Figura 11. Espectro de IR del Extracto de *Cladosporium cladosporioides*.

4.3 Citotoxicidad del Extracto de *Cladosporium cladosporioides* en la línea celular Vero

Se determinó la citotoxicidad del extracto de *Cladosporium cladosporioides* por medio de la técnica WST-1 sobre la línea celular Vero a las concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Se obtuvieron los resultados del porcentaje de viabilidad de las 6 concentraciones probadas sobre la línea celular Vero con sus respectivas desviaciones estándar (Tabla 5).

Tabla 5. Promedio y desviación estándar del porcentaje de actividad citotóxica en células Vero. Se probaron concentraciones de de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de *Cladosporium cladosporioides*.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de viabilidad	DE
200	93,05	2,81
100	91,67	5,50
50	95,06	9,27
25	92,93	4,90
12,5	88,73	5,52
6,25	90,15	4,93

La figura 12 muestra los resultados de la citotoxicidad obtenidos, graficando la viabilidad celular en porcentaje y las concentraciones del extracto fúngico en la línea celular Vero.

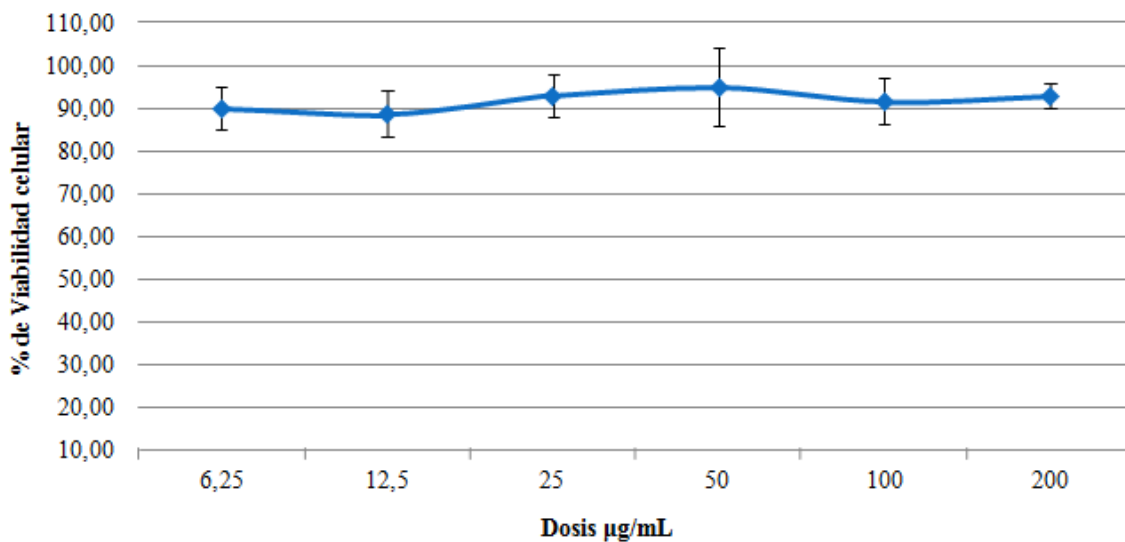


Figura 12. Citotoxicidad del Extracto de *Cladosporium cladosporioides* en la línea celular Vero a las 24 h. Ensayo realizado por triplicado.

A las 24 h del ensayo se determinó que a la menor concentración de 6.25 $\mu\text{g/mL}$ del extracto fúngico hay un 90.15% de viabilidad celular y a la mayor concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ la viabilidad celular es de 93.05%. En todas las concentraciones se observa una actividad prometedora debido a que muestran un porcentaje por arriba del 85% de viabilidad celular, lo cual indica que el extracto de *Cladosporium cladosporioides* no ocasiona un daño en el crecimiento celular (Vero).

Se visualizó el control (células Vero) contra la mayor concentración del extracto empleada, la cual fue de 200 µg/mL. El crecimiento del control de las células Vero presentó una morfología de células pleomórficas poligonales o elongadas, tipo fibroblasto con núcleos definidos, presentando una monocapa confluyente al 90%. En comparación a las células tratadas con la concentración de 200 µg/mL del extracto fúngico que presentaron aproximadamente un 85% de confluencia, las células presentaron un desprendimiento bajo en la monocapa sin cambios morfológicos aparentes (Figura 13).

La actividad citotóxica presentó una $p < 0.05$ la cual fue de 0.02, lo que indica que es un ensayo estadísticamente significativo (Tabla 6).

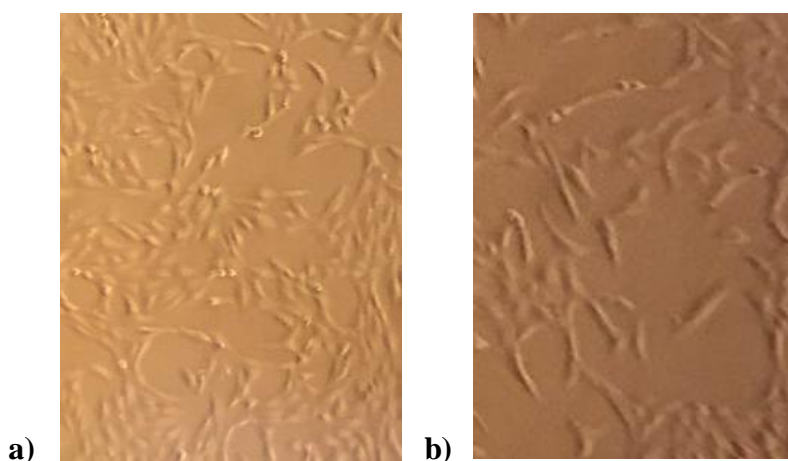


Figura 13. Monocapas de células Vero. **a)** Control de células Vero. **b)** Células Vero tratadas con 200 µg/mL del extracto fúngico.

Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad citotóxica del extracto del hongo *Cladosporium cladosporioides* en la línea celular Vero. Valor de $p < 0.05$.

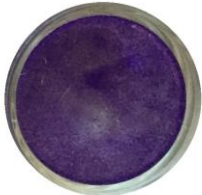
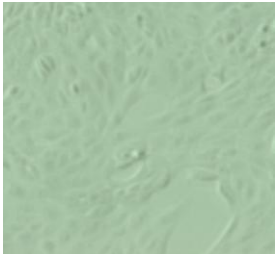
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	200,3300458	2	100,1650229	5,13835848	0,02121126	3,738891832
Dentro de los grupos	272,9101768	14	19,49358406			
Total	473,2402226	16				




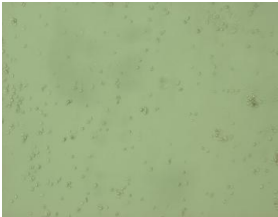

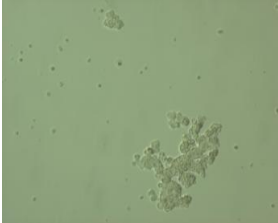








4.4 Cuantificación de las partículas virales mediante la titulación del VHS-1






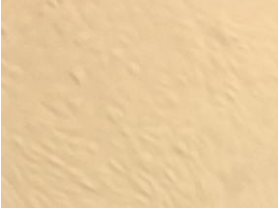
A partir del stock del VHS-1 se realizó la cuantificación de las partículas virales por la técnica de formación de placas líticas. En la tabla 7 se muestra los pozos correspondientes a las diferentes diluciones trabajadas. Puede observarse el efecto de lisis celular causada por la infección del VHS-1 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) debido a la alta concentración del mismo, en donde se definen algunas zonas de infección. Conforme se va aumentando las diluciones se pueden visualizar UFP líticas definidas (10^{-5} y 10^{-6}). A diluciones mayores se observa la monocapa sin UFP líticas ya que la concentración viral es menor (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10}).

De acuerdo a las distintas diluciones utilizadas las células manifestaron cambios morfológicos tales como hinchamiento y pérdida de adherencia hasta llegar a una lisis celular. En las diluciones mayores existe un menor daño citopático y puede observarse la monocapa sin zonas líticas (Tabla 7).

Tabla 7. Unidades Formadoras de Placas líticas (UFP) en la titulación viral a las diferentes diluciones y efecto citopático de las células Vero a las diferentes diluciones antes de la tinción con Giemsa observado a 10X.

Células control	UFP	Monocapa celular
VERO		

Dilución		
10^{-1}		
10^{-2}		
10^{-3}		
10^{-4}		
10^{-5}		
10^{-6}		
10^{-7}		

10^{-8}		
10^{-9}		
10^{-10}		

4.5 Actividad antiviral del extracto de *Cladosporium cladosporioides* en la línea celular Vero en un modelo de infección con el VHS-1

La evaluación de la actividad antiviral se realizó en la línea celular Vero (ATCC CCL-81) mediante el método de reducción de placas líticas. Fue utilizado Aciclovir con 8.8 μM (fármaco usado en el tratamiento contra el VHS-1) y células Vero como control, en la que se visualiza una monocapa completa sin presencia de UFP para ambos (Figura 14). La concentración inhibitoria al 50% (IC_{50}) se determinó por análisis de regresión lineal la cual fue de 16.48 $\mu\text{g/mL}$. Se observó en los resultados de la relación de las Unidades Formadoras de Placas (UFP) respecto a la concentración del extracto (Figura 15) que entre mayor es la concentración del extracto fúngico (*Cladosporium cladosporioides*) mayor es la reducción de placas líticas, tal como se analiza en la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ en la que no existen UFP, para la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo un promedio de 1 UFP. Para las concentraciones de 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvieron un promedio de 4, 5 y 11 de UFP respectivamente. Para la concentración menor de 6.25 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo la mayor cantidad de UFP con el promedio de 19 unidades (Tabla 8). De acuerdo a lo anterior se determinó que a partir de la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ se reducen aproximadamente un 80% las UFP.

Analizando los resultados obtenidos de la actividad antiviral con la prueba estadística ANOVA se obtuvo una $p < 0.05$ la cual fue de 0.01 lo que indica que el ensayo es estadísticamente significativo (Tabla 9).

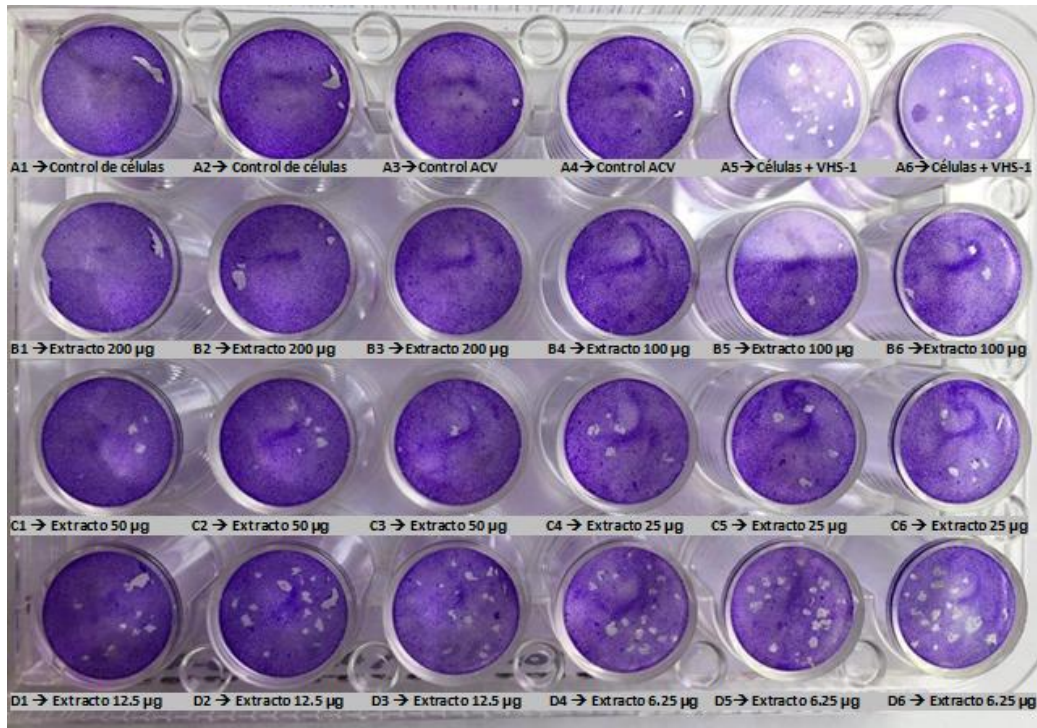


Figura 14. Formación de las Unidades Formadoras de Placa (UFP) del Extracto de *Cladosporium cladosporioides* contra el VHS-1.

Tabla 8. Promedio de las Unidades Formadoras de Placas líticas (UFP) del Extracto de *Cladosporium cladosporioides* contra el VHS-1.

Concentración (µg/mL)	Promedio de UFP
200	0
100	1
50	4
25	5
12,5	11
6,25	19

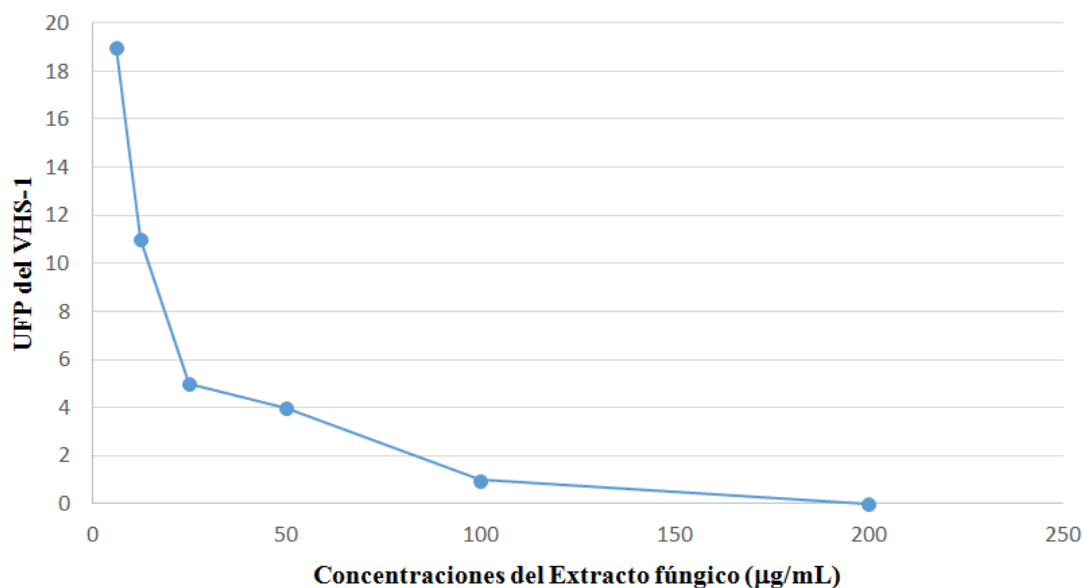


Figura 15. Actividad antiviral del Extracto de *Cladosporium cladosporioides* contra el VHS-1 a 48 h. A mayores concentraciones del extracto fúngico se observa una disminución de las Unidades Formadoras de Placa.

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad antiviral del Extracto de *Cladosporium cladosporioides* en la línea celular Vero. Valor de $p < 0.05$.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	17805,56641	1	17805,56641	8,3295524	0,011966269	4,600109908
Dentro de los grupos	29926,92969	14	2137,637835			
Total	47732,49609	15				

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se seleccionó a la cepa del hongo *Cladosporium cladosporioides* aislado a partir de semillas de Encino (*Quercus ilex*) en la comunidad de los Ramones, Estado de Nuevo León.

Dada la gran biodiversidad fúngica del país, es de suma importancia la investigación en la búsqueda de nuevos medicamentos con capacidad antiviral promisorio. En los últimos años, investigaciones han demostrado el enorme potencial de los hongos como fuente prometedora para desarrollar nuevos fármacos antivirales contra diferentes virus de importancia, incluidos el virus del Herpes simplex tipo 1 (Soheil *et al.* 2015).

El género *Cladosporium* es considerado por muchos especialistas como uno de los géneros fúngicos predominante en el mundo (Levetin 2002), puesto que puede aislarse, tanto del aire, como de diferentes soportes. Su nombre latino se deriva del griego y quiere decir «esporas encadenadas formando ramas» (Payam y Ramanathan, 2004). Se han descrito alrededor de 500 especies (Abbott, 2002). A nivel de laboratorio, se caracteriza por un crecimiento rápido en los medios de cultivo para hongos como agar Patata Dextrosa y agar Sabouraud.

Cladosporium cladosporioides en los medios PDA y SDA posee una morfología macroscópica que consta de la formación de colonias color amarillo grisáceo con pigmentación no uniforme, de apariencia rugosa y aterciopelada a los 7 días de incubación. A los 14 días de incubación se observó la formación de colonias color grisáceo oscuro con pigmentación no uniforme, de apariencia ligeramente rugosa, aterciopelada y algodonosa. Las características microscópicas presentes fueron la formación de hifas gruesas, septadas, dematiáceas, células conidiógenas indiferenciadas, conidias dematiáceas y en cadenas, lo que concuerda con las características reportadas por Zhan *et al.*, (2014).

Para la producción de la biomasa de *C. cladosporioides* se utilizó un medio de cultivo que consistió en 30 g de sacarosa, 3 g de NaNO₃, 1 g de K₂HPO₄, 1 g de extracto de levadura, 0.5 g de KCl, 0.5 g de MgSO₄·7H₂O y 0.01 g de FeSO₄ en 1 L de agua, para optimizar el rendimiento y siguiendo las recomendaciones de Zheng *et al.* (2004). Se obtuvo un peso total de la biomasa de 11.361 g y un peso total del extracto fúngico de 2.577 g. Se realizó una Cromatografía en Capa Fina al extracto fúngico utilizando etanol como solvente, obteniendo un factor de retención (R_F) de 0.76. Se observó una mancha en la placa al emplear la luz UV por lo que se deduce la presencia de un solo componente en la fase de extracción (Figura 9).

Se obtuvo una longitud de onda máxima de 265 nm para los resultados de la Espectroscopia de UV/Vis del extracto de *C. cladosporioides* (Figura 10). De acuerdo a la longitud de onda obtenida puede mencionarse que el resultado difiere en relación a otros estudios donde se han aislado y analizado metabolitos del extracto de hongo *Cladosporium cladosporioides*. Cabe resaltar el estudio realizado por Zhang *et al.*, (2001) donde se aislaron 3 metabolitos conocidos como cladospolides A, B y D, cuyas longitudes de onda máximas fueron 217, 211 y 204 nm respectivamente, lo cual puede deberse a que es un componente con características diferentes.

El espectro IR del extracto presenta bandas de grupo éster y bandas alquilo correspondientes a alcanos cíclicos, algunas bandas adicionales observadas en el espectro corresponden a alquenos y además se observa una banda de alcohol por lo que la estructura puede tratarse de un éster cíclico con dobles enlaces y sustituyentes OH (Figura 11) similar al grupo de las lactonas. Para la evaluación de el efecto de citotoxicidad del extracto de *C. cladosporioides* en la línea celular Vero se determinó con la técnica WST-1 ya que compradas con técnicas de citotoxicidad como el MTT es más sensible, rápida y sencilla (Chucheep *et al.*, 2005). En las concentraciones trabajadas se observó un porcentaje de viabilidad por arriba del 85%, lo cual es un indicador positivo en esta línea celular. Lo anterior es comparable con lo mencionado con Namasivayam (2014) en el que su estudio de citotoxicidad con la línea celular Vero reveló que las concentraciones de 10, 25, 50 y 100 µg/mL del extracto crudo que fueron probadas indujeron un menor efecto citotóxico.

La investigación de metabolitos bioactivos con propiedades antivirales eficaces es crucial, ya que la creciente tasa de resistencia viral a los medicamentos antivirales y la toxicidad de los fármacos se están convirtiendo en un problema difícil en la terapia antiviral (Menéndez *et al.*, 2014). El enfoque en el potencial antiviral de compuestos aislados de hongos marinos salió a la luz en 1998 tras el aislamiento de *stachyflin* un terpenoide (compuesto derivado del isopreno) aislado del hongo *Stachybotrys* sp. RF-7260 por Taishi, *et al.* (1998), tenía prometedora actividad antiviral contra el virus de influenza A (H1N1) (Qin *et al.*, 2014) y se comprobó que es significativamente mejor que otros fármacos, tales como Zanamivir.

Compuestos novedosos se aislaron a partir de la fermentación del hongo *Aspergillus terreus* (cepa OUCMDZ-1925) (Zhu *et al.*, 2014) tal como Rubrolide S el cual es un compuesto heterocíclico que presenta destacada actividad antiviral contra el virus de la influenza A (H1N1).

Del extracto de *Cladosporium sp.* se han aislado componentes que incluyen alcaloides de indol tales como glicantrapina y pirazinoquinazolina con potencial propiedad antiviral contra la cepa H1N1 del virus de la gripe (Wu *et al.*, 2014).

Dicho lo anterior se procedió a evaluar la actividad antiviral del extracto de *C. cladosporioides* contra el VHS-1. Los resultados obtenidos muestran que a mayor concentración del extracto fúngico existen una menor cantidad de UFP líticas, mostrando una reducción del 80% a partir de la concentración de 50 µg/mL. Investigaciones sobre antivirales contra el virus del Herpes mencionan numerosos informes de productos naturales con efectos inhibidores. Se han aislado compuestos antivirales contra el VHS-1 derivados de *Aspergillus terreus* SCSGAF0162, dichos compuestos son Arisugacina A, Isobutirilactona II y Aspernolida A. (Nong *et al.*, 2014). Otros ejemplos de la actividad antiviral que se pueden mencionar son los halovirs A-E, que son hexapéptidos obtenidos de *Scytalidium sp.*, un hongo derivado de la hierba marina *Halodule wrightii* y los cuales exhibieron una inhibición del virus del Herpes simplex 1 (VHS-1) (Duarte *et al.*, 2012). Un alcaloide policíclico de guanidina denominado ptilomicalina A fue aislado de la esponja del Caribe *Ptilocaulis spiculifer*, la cual demostró actividad contra el VHS-1 (Kashman *et al.*, 1989). Más sin embargo no existen registros actuales que involucren la actividad antiviral específicamente de *C. cladosporioides* contra el VHS-1.

En actualidad solo se utilizan fármacos comerciales que se limitan generalmente a agentes antivirales sintéticos tal como aciclovir, penciclovir y famciclovir (Imhoff *et al.*, 2012) pero se ha visto que están generando resistencia principalmente en pacientes inmunosuprimidos.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede deducir que existen posibles opciones o alternativas terapéuticas contra VHS-1. Además de que éstas serían accesibles ya que el hongo utilizado cuyo extracto demostró tener efectos virales, puede encontrarse en prácticamente cualquier habitat ya que se considera un hongo cosmopolita.

Lo anterior apoya la hipótesis de que existe un componente en el extracto de *C. cladosporioides* que ejerce actividad viricida contra partículas VHS-1 en un modelo de infección *in vitro*.

La investigación y estudios posteriores abrirán más opciones para que en un futuro cercano sean utilizados antivirales de origen fúngico con acción eficaz, menor toxicidad y de pocos efectos secundarios.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- Se logró caracterizar morfológicamente el hongo aislado, concluyendo que pertenece al género *Cladosporium* y a la especie *cladosporioides*.
- Se obtuvieron 11.361 g de biomasa total a partir de la fermentación de *Cladosporium cladosporioides* y un peso del extracto fúngico de 2.577 g a partir del total de biomasa.
- Se observó la presencia de un metabolito en el extracto fúngico con las pruebas de UV, IR y CCF. Estudios adicionales permitirán identificar el compuesto bioactivo en el extracto crudo de *Cladosporium cladosporioides*, el cual podría conducir al desarrollo de un producto farmacológicamente activo.
- Se determinó que el extracto de *Cladosporium cladosporioides* no mostró efectos citotóxicos en la línea celular Vero en el rango de las dosis ensayadas (6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml).
- Se evaluó la actividad *in vitro* contra VHS-1 del extracto de *Cladosporium cladosporioides* en la que se demostró que tiene una actividad antiviral de acuerdo a que existe una reducción de UFP líticas del 80% desde la concentración de 50 µg/mL.

CAPÍTULO VII

PERSPECTIVAS

- Optimizar procesos de fermentación y extracción para continuar con estudios de composición química para asegurar el rendimiento de los componentes fúngicos obtenidos.
- Evaluar el extracto de *Cladosporium cladosporioides* con diferentes tipos de virus (VHS-2, H1N1, VIH, entre otros) para determinar sus propiedades antivirales.
- Continuar con los estudios de aislamiento de compuestos antiherpéticos a partir del extracto fúngico (*Cladosporium cladosporioides*), determinando sus estructuras y características.
- Determinar si el extracto de *Cladosporium cladosporioides* presenta algún efecto o actividad antiherpética en el sistema neuronal debido a que el VHS-1 desarrolla una infección de latencia.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, S. P. 2002. Molds and other fungi in indoor environments. Summary of biology, known health effects and references. 1, 114.
- Arduino, P. G., Porter, S. R. 2008. Herpes Simplex Virus Type 1 Infection: Overview On Relevant Clinico-Pathological Features. J Oral Pathol Med, 37, 107–121.
- Atanasiu, D., Whitbeck, J. C., Cairns, T. M., Reilly, B., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. 2007. Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion." Proc Natl Acad Sci, 47, 18718-18723.
- Bacon, T.H., Levin, M.J., Leary, J.J., Sarisky, R.T., Sutton, D. 2003. Herpes Simplex Virus Resistance to Acyclovir and Penciclovir after Two Decades of Antiviral Therapy. Clinical Microbiology Reviews, 16, 114-128.
- Barnabas, R.V., Celum, C. 2013. Infectious co-factors in HIV-1 transmission Herpes simplex virus type-2 and HIV-1: new insights and interventions, 228-237.
- Belshe, R.B. 2012. Efficacy Results of a Trial of a Herpes Simplex Vaccine. The New England Journal of Medicine, 366, 34-43.
- Bensch, K., Groenewald, J.Z., Dijksterhuis, J., Starink-Willemse, M., Andersen, B., Summerell, B.A., Shin, H.-D., Dugan, F.M., Schroers, H.-J., Braun, U., Crous, P.W. 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). Studies in Mycology, 67, 1–94.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites: a personal view. Journal of Antibiotics, 58, 1–26.

- Bernstein D.I. 2013. Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with Herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. *Clinical Infectious Diseases*, 344-351.
- Calonge, F. D. 2011. Medicinal mushrooms. Oxford University Press, Madrid, 130.
- Campadelli-Fiume, G., Cocchi, F., Menotti, L., Lopez, M. 2000. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev. Med. Virology*, 5, 305-319.
- Chaparpordi, S. R., Assmar, M., Amirmozafari, N., Modiri, L., Massiha, A., Shokri-Fashtali, S., Gholizadeh, Z., Akbari, S. 2012. Seroepidemiology Of Herpes Simplex Virus Type 1 And 2 In Northern Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 75-79.
- Chucheep, K., Kanlayanarat, S., Maneerat, C., Matsuo, T. 2005. Application of WST-1 to measurement of cell viability in low temperature-stressed explants of tropical vegetables. *J. Food Agric. Environ.*, 3, 262-268.
- Connolly, S.A., Jackson, J.O., Jardetzky, T.S., Longnecker, R. 2011. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev. Microbiology*, 5, 369-381.
- Crous, P.W., Schoch, C.L., Hyde, K.D., Wood, A.R., Gueidan, C., De Hoog, G.S., Groenewald, J.Z. 2009. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Studies in Mycology*, 64, 17-47.
- Duarte, K., Rocha-Santos, T.A., Freitas, A.C., Duarte, A.C. 2012. Analytical techniques for discovery of bioactive compounds from marine fungi. *Trends in Analytical Chemistry*, 97, 110.
- Dugan, F. M., Schubert, K., Braun, U. 2004. Check-list of *Cladosporium* names. *Schlechtendalia*, 11, 1-119.
- Firáková, S., Šturdíková, M., Múčková, M. 2007. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Botany, Zoology and Cellular and Molecular Biology*, 3, 251-257.
- Guarro, J., Chander, J., Álvarez, E., Stchigel, A.M., Robin, K., Dalal, U. 2011. *Apophysomyces variabilis* infections in humans. *Emerg Infect Dis*, 17, 134-5.

- Harrison, P.F., Hemmerling, A., Romano, J. 2013. Developing multipurpose reproductive health technologies: an integrated strategy. *AIDS Research and Treatment*. ID, 790154.
- Imhoff, J.F., Labes, A., Wiese, J. 2012. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. *Biotechnology Advances*. 468,482.
- James, T. Y. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443,818–22.
- Karasneh, G. A., Shukla D. 2011. Herpes Simplex Virus Infects Most Cell Types In Vitro: Clues To Its Success. *Virology Journal*, 8, 481.
- Kashman Y., Hirsh, S., McConnell, O.J., Ohtani, I., Kusumi, T., Kakisawa, H. 1989. Ptilomycalin A: a novel polycyclic guanidine alkaloid of marine origin. *Journal of the American Chemical Society*, 24, 8925-8926.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi* (10^a ed.). Wallingford: CABI. ISBN, 8, 816.
- Krause, J., Tobin, G. 2013. Discovery, development, and regulation of natural products. In: Marianna K (ed) *Using old solutions to new problems. Natural drug discovery in the 21st century*. InTech Magazine, 3, 36.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. 1993. *Structural and Functional Pathology*. Elsevier España, 7, 369-371.
- Lehman, R., Boehmer, P. E. 1999. Replication of Herpes Simplex Virus DNA. *The Journal Of Biological Chemistry*, 274.
- Levetin, E. 2002. Aerobiology of agricultural pathogens. *Manual of Environmental Microbiology*, 2th edition ASM Press, 884-897.
- Lou, Z., Sun, Y., Rao, Z. 2014. Current progress in antiviral strategies. *Trends in Pharmacological*, 35, 86–102.
- Manisha, K., Panwar, N. 2012. Morpho-Pathological Effects of Isolated Fungal Species on Human Population. *Open Access Scientific Reports*, 1,521.
- Manoj, S., Jogger, Ch. R., Myscofski, D., Yoon, M., Spear, P. G. 2004. Mutations in herpes simplex virus glycoprotein D that prevent cell entry via nectins and alter cell tropism. *PNAS*, 34, 12414-12421.

- Megens, S., Laethem, K.V. 2013. Antiretroviral therapy and drug resistance in human immunodeficiency virus type 2 infection. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11, 1159–1178.
- Menéndez, A. L., Álvarez, M. 2014. Antiretroviral therapy and drug resistance in human immunodeficiency virus type 2 infection. *Antiviral Research*, 102, 70-86.
- Morales-San Claudio. 2013. Identificación de antígenos Inmunodominantes del VHS-1 en pacientes con infección activa y su comparación en la Infección latente *in vitro*. UANL, 30.
- Namasivayam, K. R., Swetha, R., Srivatsan, k.v. 2014. Evaluation of potential biological activities of metabolites from endophytic fungi residing in leaves of *Azadirhacta indica*. *Int.J. ChemTech Res*, 6, 3116-3121.
- Newman, L., Kamb, M., Hawkes, S., Gomez, G., Say, L., Seuc, A. 2013. Global Estimates of Syphilis in Pregnancy and Associated Adverse Outcomes: Analysis of Multinational Antenatal Surveillance Data. *PLOS Medicine*, 10, 2.
- Nong, X.H., Wang, Y.F., Zhang, X.Y., Zhou, M.P., Xu, X.Y., Qi, S.H. 2014. Territrem and butyrolactone derivatives from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*. *Marine Drugs*, 12, 6113–6124.
- Payam, F., Ramanathan, K. 2004. Fungus of the month: *Cladosporium* species. *The Environmental Report EMLab*, 2, 4.
- Peng, J., Lin, T., Wang, W., Xin, Z., Zhu, T., Gu, Q., Li, D. 2013. Antiviral alkaloids produced by the mangrove-derived fungus *Cladosporium sp.* PJX-41. (2013). *The Journal of Antibiotics*, 76, 1133–1140.
- Pimentel, M.R., Molina, G., Dionísio, A.P., Junior, R.M., Pastore, G.M. 2011. The Use of Endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int*, 1–11.
- Qin, C., Lin, X., Lu, X., Wan, J., Zhou, X., Liao, S., Tu, Z., Xu, S., Liu. Y. 2014. Sesquiterpenoids and xanthenes derivatives produced by sponge-derived fungus *Stachybotry sp.* HH1 ZSDS1F1-2. *The Journal of Antibiotics*, 68, 121–125.
- Reed, J., Muench, H. 1938. A simple Method of Estimating Fifty per Cent Endpoint. *The American Journal of Hygiene*, 3, 493-497.

- Selim, K.A., El-Beih, A.A., AbdEl-Rahman, T.M., El-Diwany, A.I. 2012. Biology of eEndophytic Fungi. *Curr Res Environm Appl Mycol*, 31-82.
- Shukla, D., Spear, P. G. 2001. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *Journal of Clinical Investigation*, 4, 503-510.
- Soheil, Z. M., Sonia, N., Habsah, A. K., Sazaly, A., Keivan, Z. 2015. Potential Antiviral Agents from Marine Fungi: An Overview. *Marine Drugs*, 13, 4520–4538.
- Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B., Sasse, F., Jansen, R., Murali, T.S. 2009. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, 23, 9– 19.
- Taishi, T., Takechi, S., Mori, S. 1998. First total synthesis of (±)-stachyflin. *Tetrahedron Lett.* 39, 4347–4350.
- Tomita, F. 2003. Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. *Fungal Diversity*, 14, 187–204.
- Torres, D.E., Rojas-Martínez, R.I, Zavaleta-Mejía, E., Guevara-Fefer, P., Márquez-Guzmán, G.J., Pérez-Martínez, C. 2017. *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn, the causal agent of chrysanthemum white rust. Sarrocco S, ed. *PLoS ONE*, 12.
- Torres, N.I. 2013. Safety, Formulation and In Vitro Antiviral Activity of the Antimicrobial Peptide Subtilisin Against Herpes Simplex Virus Type 1. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 26, 35.
- Wang, F.W., Jiao, R.H., Cheng, A.B., Tan, S.H., Song, Y.C. 2007. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World J Microbiol Biotechnology*, 23, 79– 83.
- Whitley, R. J., Kimberlin, D. W., Roizman B. 1998. Herpes Simplex Viruses. *Clinical Infectious Diseases*, 26, 541–555.
- Wu, G., Sun, X., Yu, G., Wang, W., Zhu, T., Gu, Q., Li, D. 2014. Cladosins A–E, hybrid polyketides from a deep-sea-derived fungus, *Cladosporium sphaerospermum*. *The Journal of Antibiotics*, 77, 270–275.

- Zhan, G., Tian, Y., Wang, F., Chen, X., Guo, J. 2014. A Novel Fungal Hyperparasite of *Puccinia striiformis f. sp. tritici*, the Causal Agent of Wheat StripeRust. PLoS ONE, 9, 11.
- Zhang, H., Tomada, H., Tabata, N. 2001. Cladospolide D, a New 12-Membered Macrolide Antibiotic Produced by *Cladosporium* sp. FT-0012, 8, 635-641.
- Zhang, H.W., Song, Y.C, Tan, R.X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. Nat Prod Rep, 23, 753-771.
- Zheng, L., Lin, W., Yan X., Chen H. 2004. A primary study on antimicrobial and cytotoxic activity of marine bacteria. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao, 9, 1633-1636.
- Zhu, T., Chen, Z., Liu, P., Wang, Y., Xin, Z., Zhu, W. 2014. New rubrolides from the marine-derived fungus *Aspergillus terreus* OUCMDZ-1925. The Journal of Antibiotics, 67,315–318.
- Zorofchian, M. S., Karimian, H., Khanabdali, R., Razavi, M., Firoozinia, M., Zandi, K., AbduL, K. H. 2014. Anticancer and antitumor potential of fucoidan and fucoxanthin, two main metabolites isolated from brown algae. The Scientific World Journal, 10, 1155.

CAPÍTULO IX

APÉNDICES

APÉNDICE 1

Técnica de en montaje con cinta adhesiva

Se cortó una tira de 4-5 cm de cinta adhesiva transparente tomándola por los extremos, posteriormente cerca del mechero se abrió la caja y se presionó ligeramente la cinta transparente sobre la periferia de la colonia de *Cladosporium cladosporioides*. Se colocó la cinta con la muestra adherida sobre una gota de azul de lactofenol, previamente colocada en el centro de un portaobjetos. La cinta funcionó como cubreobjetos por lo que se aplanó lo mejor posible, evitando la formación de burbujas y evitando alterar demasiado las estructuras.

Se dejó reposar durante 3-5 minutos y se realizaron las observaciones con los objetivos de 10X y 40X para localizar las estructuras fúngicas, tales como hifas, conidióforos, conidios y esporangios.

APÉNDICE 2

Activación de la línea celular Vero (ATCC CCL-81)

Para realizar la activación de células se sacó el criovial de un congelador de -80°C, se colocó el criovial en hielo por 20 min, después de esto se descongeló en un refrigerador por 30 min y se colocó 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Se colocó medio A-DMEM fresco y se centrifugó para posteriormente desechar el sobrenadante. Para finalizar se re-suspendió con medio A-DMEM y se transfirió a un frasco T-25 con 3mL de medio A-DMEM suplementado. Se incubó a 37°C, con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

Observaciones: Las células después de ser descongeladas se encuentran muy sensibles por lo que se recomienda trabajar lo menos brusco posible para evitar dañarlas.

APÉNDICE 3

Mantenimiento de la línea celular Vero (ATCC CCL-81)

Las células Vero fueron colocadas en frascos T-25 para comenzar con los pasajes celulares con una confluencia del 80-85%. Se realizaron lavados con PBS 1X, agregando medio A-DMEM suplementado.

Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80-85% se hizo el pasaje celular, realizando los lavados al frasco T-25 con PBS 1X y agregando 0.5 mL de Tripsina 1X e incubando en agitación de 10-15 minutos a 37°C. Se agregó medio A-DMEM con Suero Fetal Bovino, se recuperó la suspensión celular para posteriormente ser colocada en tu tubo falcón y llevarlo a una centrifugación de 1500 rpm durante 10 minutos. Finalmente se desechó el medio y se colocaron las células en un nuevo frasco T-25 con 3 mL de A-DMEM suplementado y se dejó incubar a 37°C, con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

Observaciones: Para una viabilidad favorable de la línea celular es necesario realizar los lavados cada 2 a 3 días y trabajar en condiciones de esterilidad para evitar contaminación.