SALUD
SECRETARIA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS
INER

EFECTO INHIBITORIO DE LA SOLUCIÓN EXMICROR SOBRE LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA A H1N1, INFLUENZA B Y VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO TIPOS A Y B

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

"ISMAEL COSIO VILLEGAS"

INER

DR. CARLOS CABELLO GUTIÉRREZ

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE

INVESTIGACIÓN EN VIROLOGIA Y MICOLOGIA

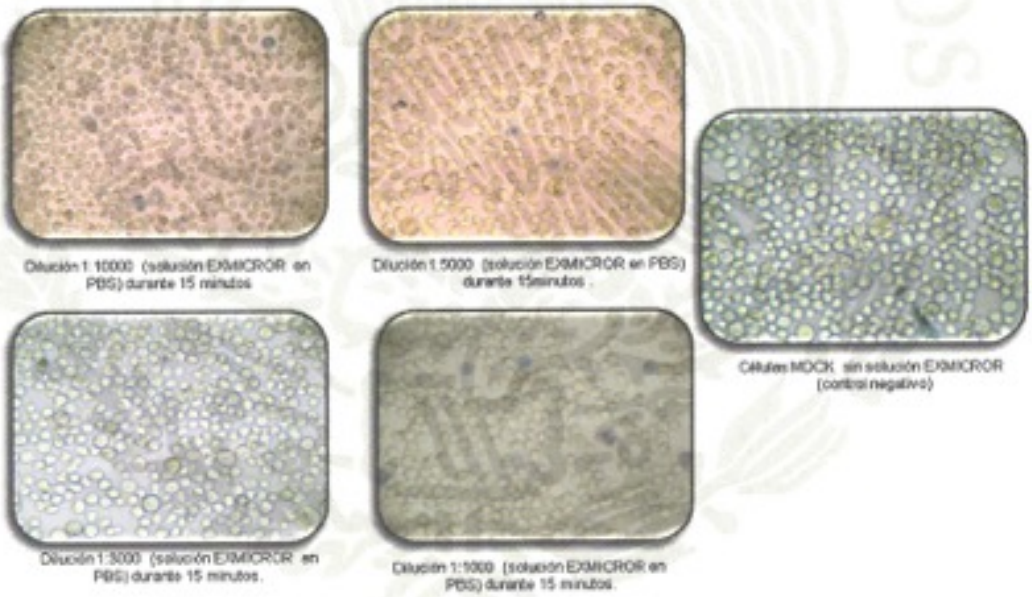
EFECTO INHIBITORIO DE LA SOLUCIÓN EXMICROR SOBRE LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA A H1N1, INFLUENZA B Y VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO TIPOS A Y B

Primeramente se realizaron ensayos de viabilidad celular con azul de tripan, el cual, al ser absorbido por las células indican que las células están muertas. Una vez realizadas las pruebas de viabilidad celular con la solución, encontramos que las concentraciones empleadas de la solución EXMICROR, no es toxica para las células MDCK, ya después de incubarlas con la solución EXMICROR durante 15 minutos, no se observan células teñidas de azul en abundancia.

La figura 1 muestra el resultado obtenido con distintas diluciones de la solución EXMICROR. Solamente se observan pocas células teñidas de azul en las diluciones más concentradas (1:3000 y 1:1000), por lo que podemos considerar que la solución X no mata a las células MDCK.

Figura 1

Ensayos de viabilidad por tinción con azul de tripan



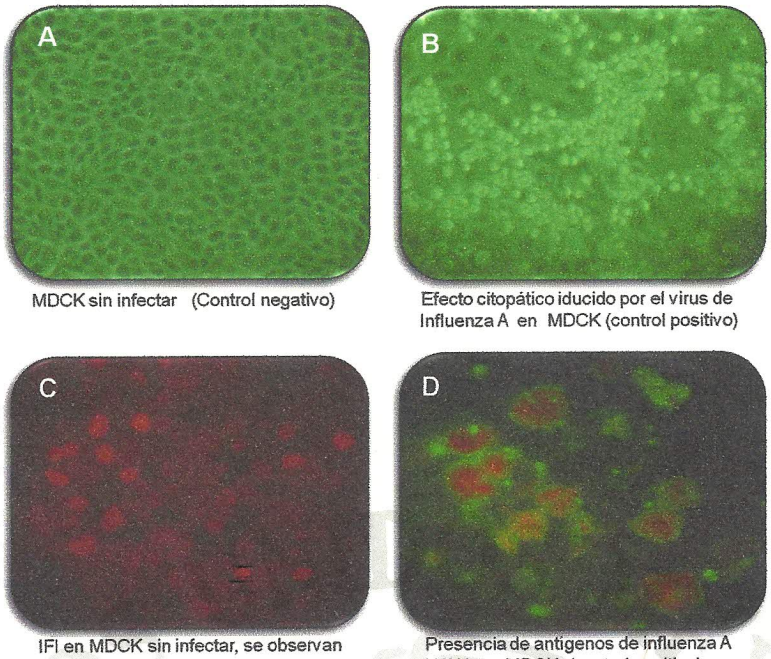
La siguiente serie de experimentos se realizaron empleando 100 microlitros de la solución EXMICROR a una dilución de 1:3000 más 50 microlitros de virus de influenza A H1N1, a una dosis infecciosa de 4 Unidades Hemaglutinantes (UHE), esta mezcla se incubó durante 5 minutos y posteriormente se infectaron monocapas confluentes de células MDCK. Después de 2 horas de incubación se retiró la mezcla (virus +solución EXMICROR) y se agregaron 3 ml de medio de cultivo para finalmente ser incubadas a 37^0C y 5% de CO2 durante 48 horas. Como control positivo, empleamos cultivos celulares de MDCK infectadas con el virus de influenza en ausencia de la solución EXMICROR.

La figura 2 muestra los resultados de los controles negativos y positivos de los ensayos con el virus de influenza. En la figura 2 A observamos los resultados correspondientes a las células sin infectar por lo que no existe efecto citopático,

en la figura 2 C, se observa la inmunofluorescencia de estas misma células por lo que no se observa la presencia de antígenos virales.

La figura 2 B y D muestran el efecto citopático inducido por el virus de influenza A H1N1, el cual se caracteriza por el redondeamiento de las células y la presencia del antígeno viral del virus de influenza A mediante inmmunofluorescencia indirecta respectivamente, donde se puede observar el color verde fluorescente, indicando la presencia del virus.

Controles negativos y positivos, efecto citopático y detección antigénica del virus de Influenza A H1N1 en MDCK



MDCK sin infectar (Control negativo)

Efecto citopático iducido por el virus de Influenza A en MDCK (control positivo)

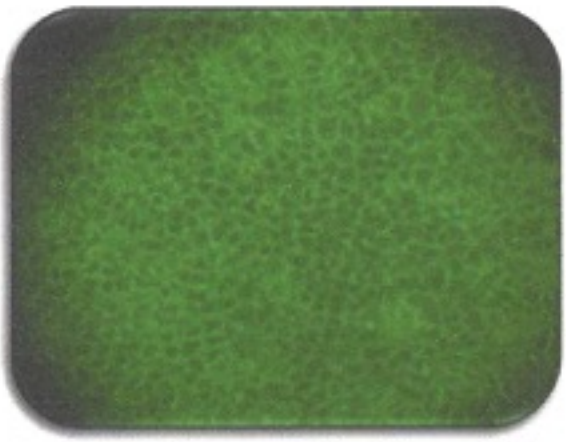
IFI en MDCK sin infectar, se observan núcleos celulares teñidos con Isopropidio En color rojo

Presencia de antígenos de influenza A H1N1 en MDCK (control positivo)

Una vez establecidos los controles, se procedió a pre-incubar durante 5 minutos la solución EXMICROR (dilución 1:3000), con 4UHE del virus de la influenza A y posteriormente infectar monocapas de células MDCK con este conjugado de virus mas EXMICROR

Después de 48 horas de infección observamos la ausencia de efecto citopático en las células que fueron infectadas con el virus de influenza pre-incubado con la solución EXMICROR, así mismo, no se logra observar la presencia de antígenos de influenza después de realizar el ensayo de inmunofliorescencia indirecta, (figura 3 A y B respectivamente).

Figura 3

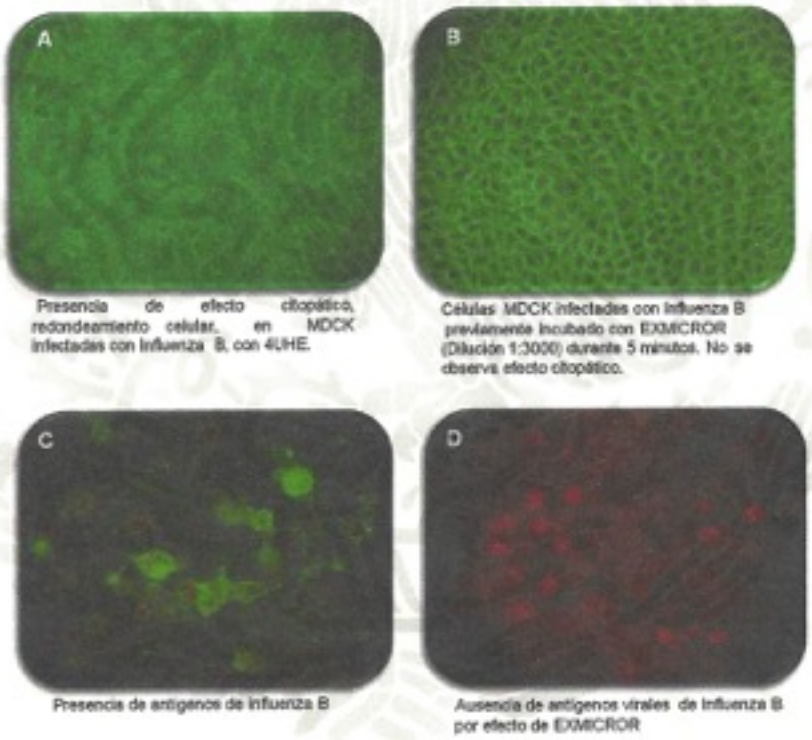


A. MDCK 48 horas post-infección con H1N1 pre-incubado con EXMICROR durante 15 minutos. No se observa el efecto citopático característico inducido por el virus de influenza A H1N1.

B. Ausencia de antígenos del virus de influenza A en MDCK 48 horas post-infección con H1N1 pre-incubado con EXMICROR durante 5 minutos. No se observa la marca verde fluorescente producida por el anticuerpo marcado con FITC.

Para el caso de EXMICROR-Influenza B (IB), realizamos los mismos experimentos y observamos que este producto es igualmente eficiente en la inhibición de la replicación del virus de IB. Se realizaron diluciones de la solución de 1: 3000 y mezclamos 50 microlitros con el volumen correspondiente a 4 UHE de IB y los incubamos durante 5 minutos. La figura 4 A muestra el efecto de la infección por IB, se puede observar el redondeamiento de las células, la figura 4 C, indica la presencia de los antígenos de IB por ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Después de pre-incubar 4UHE del virus IB con EXMICROR, observamos que se inhibe la infección de las células (figura 4 B), ya que no hubo cambios en la morfología de las células. Para corroborar lo anterior se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para buscar la presencia de antígenos virales y resultaron ser negativas, por lo que se concluye que el EXMICROR inhibió la replacación del IB, (figura 4, D).

Figura 4. efecto inhibitorio de EXMICROR sobre la infección por el virus de Influenza B



Presencia de efecto citopático, redondeamiento celular, en MDCK infectadas con Influenza B, con 4UHE.

Células MDCK infectadas con Influenza B previamente incubado con EXMICROR (Dilución 1:3000) durante 5 minutos. No se observa efecto citopático.

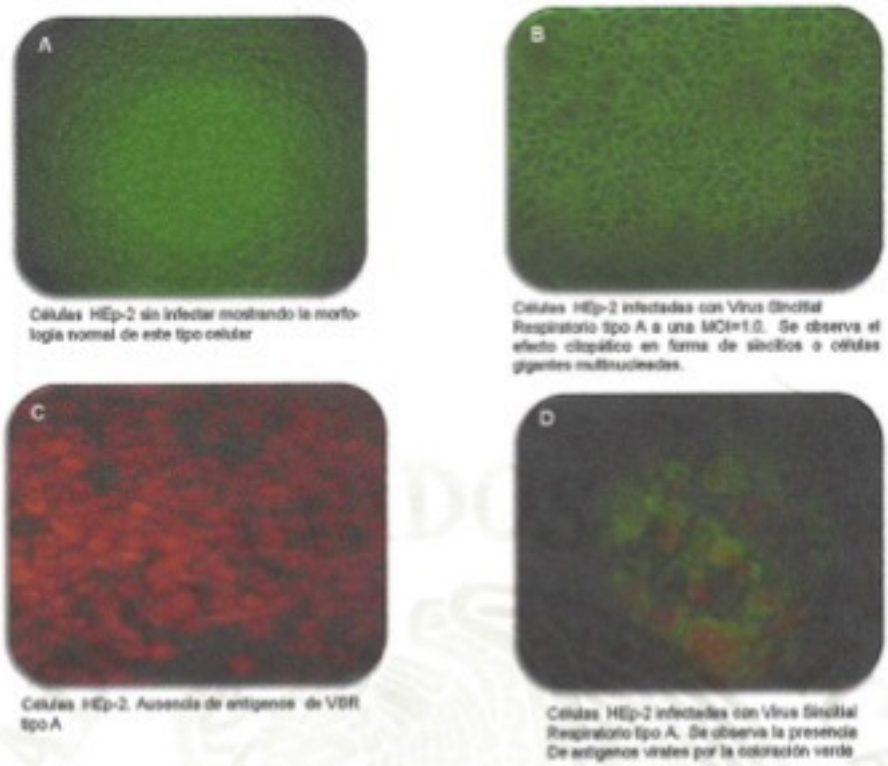
Presencia de antígenos de Influenza B

Ausencia de antígenos virales de Influenza B por efecto de EXMICROR

Para los ensayos de inhibición de la infección por el Virus Sincitial Respiratorio tipos A y B (VSR A y B) se realizaron los mismos ensayos anteriormente descritos. En estos nuevos ensayos empleamos monocapas celulares de la línea celular HEp-2, la cual es de origen epitelial de vías respiratorias altas, humanas. Para estos experimentos empleamos una multiplicidad de infección de cada virus de 1.0 (MOI=1.0), lo cual significa que usamos el mismo número de partículas virales infectivas y de células.

Se empleó la misma dilución de EXMICROR que la usada para los virus de Influenza (1:3000), y después de pre-incubar la solución con los virus durante 5 minutos, se infectaron las monocapas de HEp-2. La figura 5 muestra los controles positivos y negativos para el VSR A. En la figura 5 A se muestran la morfología de las células sin infectar. Así mismo, la figura 5 C es el resultado de los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, en la cual empleamos anticuerpos específicos contra la proteína G del VSR. El resultado de estos ensayos, indican la ausencia de la proteína viral. La figura 5 B, muestra el efecto citopático de las células HEp-2 infectadas con VSR A, la formación de células gigantes multinucleadas o sincitios, es la característica más importante de la infección por este virus. El panel de la figura 5 D.

Figura 5. Controles positivos de la infección de células HEp-2 por el Virus Sincitial Respiratorio tipo A



Células HEp-2 sin infectar mostrando la morfología normal de este tipo celular

Células HEp-2 infectadas con Virus Sincitial Respiratorio tipo A a una MOI=1.0. Se observa el efecto citopático en forma de sincitios o células gigantes multinucleadas.

Células HEp-2. Ausencia de antígenos de VSR tipo A

Células HEp-2 infectadas con Virus Sincitial Respiratorio tipo A. Se observa la presencia De antígenos virales por la coloración verde

El VSR B fue sometido a las mismas condiciones que el VSR A, en la figura 6 A, se muestran las células HEp-2 infectadas con el VSR B a una MOI=1.0 durante 48 horas. El efecto citopático que se muestra es el característico para el VSR, por lo que se pueden observar grandes sincitios o células gigantes multinucleadas, el panel C, mustra la presencia de antígenos específicos para el VSR B, por lo que seobserva el color verde fluorescente.

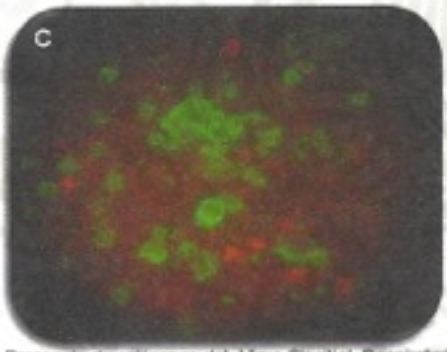
Finalmente confrontamos EXMICROR–VSR B bajo las mismas condiciones experimentales anteriormente descritas para el VSR. Los resultados obtenidos para este tipo viral difieren levemente de los anteriores, ya que después de pre-incubar durante 5 minutos la solución de EXMICROR (dilución 1:3000) con una MOI=1.0 del VSR B, encontramos señal fluorescente de color verde en estas células (figura 6 D). Sin embargo,

es importante mencionar que el efecto citopático en estas células a las 48 horas post-infección, no fue notorio (figura 6 B). lo que nos indica que para poder inhibir a este tipo de virus de manera total, es necesario emplear tiempos mas largos de pre-incubación o bien, aumentar la concentración de EXMICROR.

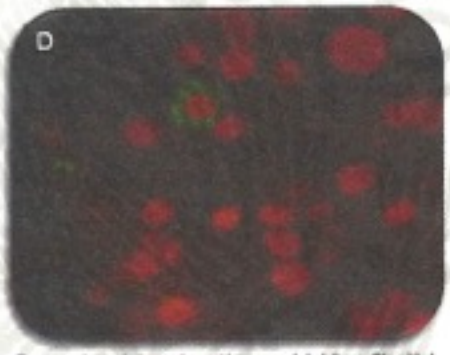
Figura 6. Controles positivos de la infección de células HEp-2 por el Virus Sincitial Respiratorio tipo B

Células HEp-2 infectadas con Virus Sincitial Respiratorio tipo B con una MOI=1.0 durante 48 horas. Se observa la presencia de sincitios o células gigantes multinucleadas

Células HEp-2 infectadas con Virus Sincitial Respiratorio tipo B preincubado por 5 minutos con EXMICROR (Dilución 1:3000). No se observa el efecto citopático en forma de sincitios o células gigantes multinucleadas.



Presencia de antígenos del Virus Sincitial Respiratorio tipo B , mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta en células HEp-2 infectadas con éste virus.



Presencia mínima de antígenos del Virus Sincitial Respiratorio tipo B mediante ensayos de inmunofluorescencia por el efecto ejercido por EXMICROR (Dilución 1:3000).