



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

## EFFECTO ANTIVIRAL DE NANOPARTICULAS DE ORO Y PLATA, E INTERACCIÓN DE RADIACIÓN UV EN LAS INFECCIONES POR EL VIRUS HERPES SIMPLEX: NANOTERAPIA

Nora Elizondo Villarreal<sup>1</sup>, María Aracelia Alcorta García<sup>1</sup>, Ernesto Torres López<sup>2</sup>

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Físico Matemáticas<sup>1</sup>, Facultad de Medicina<sup>2</sup>

nelizond@yahoo.com , maaracelia@gmail.com,

ernesto\_torreslopez@yahoo.com

### Resumen

Virus del herpes simple (HSV) es un virus muy común en todo el mundo y en los Estados Unidos va en aumento, a la par como el VIH y la enfermedad de Alzheimer. En la naturaleza la radiación ultravioleta germicida es una parte de la radiación solar. El objetivo de este trabajo es evaluar y producir datos que proporcionen información básica sobre la tasa de inactivación de la luz UV-C cuando se prueba contra el VHS 1 in vitro. El ensayo experimental y diseños de física se hicieron con una fuente de radiación ultravioleta "Sterilray", Corporation (patente en curso). Este equipo puede emitir radiación de longitud de onda de la banda MUV-C. Células VERO estaba infectado con el virus HSV-1 cepas (KOS) obtenidas de la ATCC. Una Monocapa de células VERO se extendió y se infectaron con 100 Unidades formadoras de placa (UFP) / ml de HSV-1 y se incubó a 37 ° C, a 65 rpm por 1 h. Después de la infección de los cultivos de células VERO estas se expusieron a diferentes tiempos de irradiación de luz UV-



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

C, a temperatura ambiente para observar el efecto de la irradiación UV en el virus herpes.

### Abstract

Herpes simplex virus (HSV) is a virus very common around the world and the increase in the United States goes for, many co-infections as HIV and closed relationship with Alzheimer disease.

In nature germicidal ultraviolet is a part of the sun radiation however; most germicidal radiation (UV-C) does not reach earth, that is mind many virus particle are not inactivated. The goal of this work was to evaluate and produce data that provides basic information on rate of inactivation of UV-C light when is tested against HSV 1 in vitro. The experimental physics assay was made and designs with a source of ultra violet radiation “Sterilray”, Corporation (patent in course). This equipment can emit wavelength radiation of mUV-C band. VERO cell was infected with HSV-1 strains (KOS) obtained from ATCC. Monolayer VERO cell was spread and infected with 100ufp/ml of HSV-1 and incubated at 37°C, 65 rpm per 1 h. After infection them was different time UV-C light irradiation, the exposure were performed at room temperature.

**Palabras Clave:** virus Herpes (HSV), radiación ultravioleta, nanopartículas.

### I. Introducción

Este proyecto se envió para participar en la convocatoria de redes temáticas de Cuerpos académicos, concursando los CA: Nanobiotecnología (CA 304) y Matemáticas Aplicadas (CA 32) de la UANL, a través de Promep de 2012-2014, siendo aprobada por dos ocasiones, en 2013 y 2014. Cabe mencionar que la red fue llamada Nanobiotecnología. En México no se tiene información consensada acerca de la susceptibilidad contra antivirales para las cepas del virus



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

de Herpes Simple (VHS) que circulan en nuestra región; sin embargo, es conocida la ceroprevalencia de esta infección y la falta de cultura de la población para obtener un control y tratamiento contra estos virus. Así como las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos, los virus desarrollan resistencia a los antivirales. En este proyecto se busca combatir el virus por los diferentes medios de investigación mediante el uso de nanopartículas de oro y plata para el tratamiento del virus de Herpes Simple en combinación con el efecto de los rayos UV. La interacción de las nanopartículas metálicas de oro y plata se realiza cuando la radiación ultravioleta producida por la lámpara STERIL RAY® incide en las nanopartículas metálicas “*in situ*” en el cultivo de células VERO con el virus Herpes Simplex, produciéndose un plasmón de resonancia característico y específico que depende del número atómico Z del elemento (oro y plata) y que provoca la resonancia de los electrones de los átomos de oro y plata del “clúster” de nanopartículas en respuesta a la radiación que llega por la exposición a la luz ultravioleta, causando la absorción y la dispersión de la luz UV. Este efecto es el que se aprovecha para destruir el virus Herpes Simplex (VHS) por calentamiento local en un área específica como blanco y liberación de energía de las nanopartículas, logrando un depósito intracelular de alta energía con gran importancia en medicina terapéutica de nanoterapia fototérmica con nanopartículas de plata de aproximadamente 20 nm y con una distribución muy estrecha.

Los Herpes virus son viriones de 150nm con una envoltura que contiene glucoproteínas, posee un centro con ADN rodeado por una cápside icosaédrica cuya replicación ocurre en el núcleo a nivel intracelular. (Figura 1) Los herpesvirus se clasifican en 3 grupos: alfa, beta y gamma. El VHS tipo 1 y 2 pertenecen al grupo de los alfa herpesvirus. De los más de 100 tipos diferentes de herpesvirus, 8 (probablemente 9, aún no definido) se han encontrado en humanos: HSV-1 y 2; Varicela; Epstein-Barr; Citomegalovirus, HHV6, 7 y 8.



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

El virus Herpes Simplex (VHS), es uno de los virus patógenos de mayor transmisión en los países industrializados. El VHS es una enfermedad ampliamente distribuida en todo el mundo, que se caracteriza por la aparición de vesículas sobre una base eritematosa en mucosa y piel, llegan rápidamente a erosionarse provocando la aparición de úlceras, generalmente acompañada por fiebre, linfadenopatía, malestar general y dolor en las regiones afectadas (Likhitwitayawuid et al 2005. Ferrandiz et al. 2001), esta enfermedad es causada por virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1), principalmente asociadas a las lesiones orofaciales y por virus herpes simplex tipo 2 (VHS-2), principalmente asociadas a las lesiones genitales (Conde-González et al. 2003). A la fecha existen reportes de la importancia del VHS-1 en el desarrollo de encefalitis herpética con un alto índice de mortalidad y actualmente el VHS-1 está estrechamente relacionado con el péptido beta amiloide generado en el Síndrome de Alzheimer. Por otra parte algunos estudios muestran que la infección por el VHS-2 aumenta el riesgo de contraer el VIH/SIDA (McQuillan et al. 2008). Los virus del herpes se caracterizan por su capacidad de permanecer en las células nerviosas del huésped, y con el tiempo pueden ser reactivados varias ocasiones (Lowden et al. 2003).

El tratamiento consiste de drogas como el Aciclovir, Ganciclovir o Famciclovir, que son análogos de nucleósidos e inhiben la ADN polimerasa, también actúan como señaladores que impiden la elongación del ADN viral. Sin embargo, debido a que estos agentes antivirales puede producir efectos tóxicos, además de la aparición de nuevas cepas de VHS resistentes a estos fármacos en pacientes inmunocompetentes así como en inmunocomprometidos, además de que esta infección viral cuenta con una alta prevalencia de aproximadamente 7.4% (Reichling et al. 2008), es necesario investigar nuevas opciones de tratamiento antiviral.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

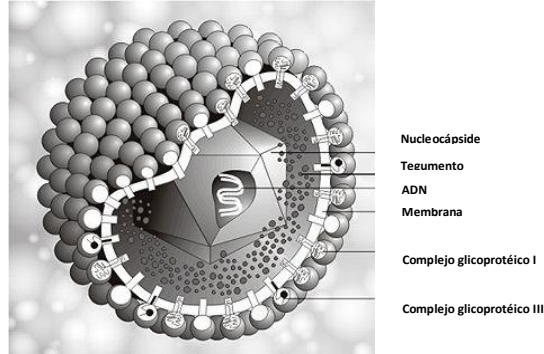


Figura 1: Estructura Virus Herpes Simplex

En el presente estudio desarrollaremos y produciremos biomaterial a nivel de nanopartículas naturales que porten o acarren actividad antiviral contra el VHS 1 y 2, evaluaremos las propiedades biológicas de citotoxicidad de nanopartículas de plata y oro, así como el efecto de la luz UV como posibles candidatos a portar actividad antiviral contra HSV-1 y HSV-2 por métodos de reducción de placas en un modelo de infección experimental in vitro.

## II. Metodología

### Determinación de la actividad antiviral de nanopartículas.

A partir de los títulos virales se ajustará a una concentración de 100 UFP/0.5mL. Para este ensayo se realizarán placas de cultivo de 12 pozos que contendrán  $3 \times 10^5$  células cada una. Simultáneamente se realizará la dilución correspondiente de las nanopartículas de oro o plata respectivamente y por separado. Deberá incluirse un control con Aciclovir (ACV), un control de células sin virus y sin antiviral. Además incluiremos diferentes concentraciones de cada una de las nanopartículas. Posteriormente, se dejará en una incubadora a 37°C en agitación suave durante 1 hora. El exceso de la suspensión viral se retirará y se suplementará con medio de cultivo A-DMEM con 0.32% de IgG. Las nanopartículas deberán estar incluidas en el medio de cultivo a diferentes concentraciones. Las placas de cultivo posteriormente se incubarán en las mismas



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

condiciones descritas previamente durante 72 horas. Se realizará la lectura posterior a la tinción con Giemsa, y se cuantificará la disminución en las UFP de acuerdo a la concentración y a las nanopartículas con actividad antiviral utilizadas, se calculará la IC50 de cada uno de los antivirales. Este ensayo será por triplicado para cada uno de los dos virus, VHS-1 y VHS2.

### **Determinación de la actividad viricida de la radiación UV**

Este estudio se determinará la actividad viricida de diferentes fuentes de UV (A, B y C) en los cultivos de infección por herpes, todo se realizará en las mismas condiciones como se mencionó anteriormente para las nanopartículas, inclusive se combinarán los dos estudios en presencia y ausencia de UV, además se diseñarán los instrumentos necesarios para evaluar la intensidad, penetración, dispersión y tiempo de exposición de la radiación UV sobre los cultivos celulares infectados.

### **Determinación de la actividad viricida de las nanopartículas de oro y plata en combinación con el efecto de la radiación UV**

Se realizará un diseño experimental de estudio para probar la causa y efecto entre las variables de los efectos de las nanopartículas de oro y plata, y la interacción de la radiación UV en las infecciones por el virus del Herpes Simple. El diseño experimental especifica un grupo experimental y un grupo de control. La variable independiente será administrada al grupo experimental y no al grupo de control, y ambos grupos se medirán con las mismas variables dependientes. Se utilizarán posteriores diseños de experimentos para más grupos y mayor cantidad de mediciones para periodos más largos. Los resultados recopilados deben de tener control, aleatoriedad, y manipulación. En este proyecto se propone utilizar el Método de Diseño Experimental ANOVA y la optimización de los mismos resultados experimentales por el Método de Mínimos Cuadrados.

### **Experimentación para la obtención de Nanopartículas de oro y plata**





## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Para esta parte se utilizará el extracto de *Aloe Barbadenses* de 1-40 gr de extracto fresco por prueba. Este extracto se calentará en un recipiente con agua desionizada a 100 ° C con agitación durante 10 minutos y se filtrará en tres ocasiones. A continuación, 10 a 50 mililitros de los extractos de estas plantas, se disolverán en agua o en etanol con agitación vigorosa, con calefacción en el reflujo, hasta alcanzar la temperatura deseada. Después, se adicionará a este extracto una solución acuosa de 0,1 mM de metal precursor, con agitación continua durante 30 minutos a 24 h en el reflujo, y en un rango de temperaturas de trabajo de 60 a 100 °C. Por último, se filtrará la solución para la obtención de aglomerados que contienen nanopartículas de oro y plata.

### **Experimentación para la examinación del Virus Herpes Simplex**

#### **Cepas virales de referencia:**

En este trabajo utilizaremos las cepas de referencia para VHS-1 KOS (VR1493), para VHS-1 y VHS-2G (VR734) para VHS-2, de la ATCC (American Type Culture Collection), serán mantenidas A -80 °C.

#### **Obtención y aislamiento de las partículas virales a partir de las cepas de referencia**

Para obtener una mayor concentración de partículas virales se realizará una infección celular en la línea celular epitelial VERO, en monocapa sobre frascos T25, a una confluencia del 80-90%. Los frascos T25 se incubarán a 37°C en agitación a 250rpm durante 1 hora en presencia de una cantidad determinada de partículas virales para inducir la infección en las células; posteriormente se agregarán 0.5ml de medio de cultivo Advanced-DMEM, 5% FCS y se dejarán incubando a 37°C/5% CO2 y 10% de humedad durante 72 horas para observar el daño citopático, posteriormente, se cosecharán las células infectadas con el virus aislado y este se almacenará en alícuotas de 1mL a -80°C hasta su uso.

#### **Obtención del stock viral (P2)**



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

A partir de las muestras obtenidas de los cultivos mencionados anteriormente, las muestras se descongelarán gradualmente colocando en frascos de 175 cm<sup>2</sup> con células VERO confluentes para cosechar hasta ver infección al 90%. Se realizarán alícuotas y se almacenarán a -80°C hasta su utilización. Se trabajará con 2 cepas de referencia obtenidas de la ATCC, las cuales corresponden a la cepa KOS para VHS-1 y G para VHS-2 por separado.

### Titulación viral

Se tomará 0.5mL del vial del aislado correspondiente para su amplificación y titulación, se realizarán diluciones seriadas logarítmicas base 10 de  $1 \times 10^1$  hasta  $1 \times 10^{10}$ , las diluciones se realizarán en una solución amortiguada PBS/ glucosada. Una vez realizadas las diluciones cada una de éstas se colocará en placas de 6 pozos que conteniendo  $5 \times 10^5$  células VERO, se incubará a 37°C en agitación de 250 rpm durante 1 hora. Posteriormente se descartará la suspensión viral y se reconstituirá con medio de cultivo A-DMEM con 0.32% de IgG. Las placas de cultivo posteriormente se incubarán en las mismas condiciones descritas previamente durante 72 horas. Posteriormente, se retirarán de incubación y se eliminará el medio de cultivo, finalmente se teñirán con de Giemsa, para cuantificar la unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL), e identificar el título viral del stock evaluado.

**Objetivo General:** Determinar el efecto antiviral de nanopartículas de oro y plata en un medio con rayos UV en la infección *in vitro* de células epiteliales con virus Herpes Simplex (VHS).

### Objetivos particulares

1. Estudiar las infecciones causadas por los VHS 1 y 2, involucrando a los Cuerpos Académicos y Grupos de Investigación, de la red temática; propiciando la colaboración entre los CA para el desarrollo de soluciones a problemas de interés regional o nacional basados en la investigación y en el desarrollo tecnológico.





## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

2. Amplificación, y caracterización de las partículas virales VHS1 y 2.
3. Obtener nanopartículas de oro y plata durante todo el proyecto por el Método de Química Verde.
4. Implementación de un dispositivo capaz de controlar la emisión de rayos UV en un portamuestras contra el VHS en presencia y ausencia de nanopartículas de oro y plata, respectivamente.
5. Evaluar el efecto de reducción de placas virales por la emisión UV A, B, y C, por nanopartículas y por la combinación de los dos efectos en una infección experimental in vitro.
6. Realizar un tratamiento estadístico de la población del virus de Herpes, antes y después de cada ensayo.
7. Realizar un modelo de crecimiento del Herpes.
8. Obtener un modelo matemático de la interacción UV con las nanopartículas de oro y plata en el medio con el virus del Herpes.

### Metas Científicas

1. Determinación de la actividad antiviral de nanopartículas así como de la actividad viricida de la radiación UV.
  2. Determinación de la actividad viricida de las nanopartículas de oro y plata en combinación con el efecto de la radiación UV. Diseño experimental del estudio. La publicación de un capítulo de libro sobre el Método de Química Verde en el primer año. Organización de 1er Simposium Internacional de Nanobiotecnología en la FCFM, con memorias y más de 60 trabajos presentados en ponencias y posters.



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

3. Registro de una patente sobre partículas de plata. Presentación de trabajos arbitrados, en Congresos Científicos de reconocido prestigio como en el BIT's 1st Annual *World Congress of Advanced Materials-2012* en China 2012.
4. Participación en el Congreso Internacional ICMEAE2015-IEEE.

### III. Resultados

Los resultados muestran que la actividad viral de la exposición UV -C con intensidad 18mWcm , redujo un 54 % la formación de PFU en un tiempo de 30 minutos. Hasta ahora la radiación ultravioleta C es adecuada y precisa para inactivar partículas del virus del herpes en presencia de nanopartículas metálicas de oro y plata.

### V. Bibliografía.

1. Likhitwitayawuid, K; Supudompol, B; Sritularak, B; Lipipun, V; K, Rapp; Schinazi, R.F; 2005. Phenolics with Anti-HSV and Anti-HIV Activities from *Artocarpus gomezianus*, *Mallotus pallidus*, and *Triphasia trifolia*. *Pharmaceutical Biology*. 43, (8), 651–657.
1. Ferrandiz, C. 2001. *Dermatología Clínica*. 2<sup>da</sup> Ed. Elsevier. 45–50.
2. Conde-González, Carlos J; Lazcano-Ponce, Eduardo; Hernández-Girón, Carlos; Juárez-Figueroa, Luis; S. Smith, Jennifer; Hernández-Avila, Mauricio. 2003. Herpes simplex virus type 2 seroprevalence among three female population groups from Mexico City. *Public Health*. 45 (5), 608-616.
3. Lowden, C. T.; Bastow, K. F.; 2003. Anti-Herpes Simplex Virus Activity of Substituted 1-Hydroxyacridones. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 5015-5020.
4. McQuillan, Geraldine; Kruszon-Moran, Deanna. 2008. HIV Infection in the United States Household Population Aged 18–49 Years: Results from 1999–2006. *NCHS Data Brief*. 4, 1-8.
5. Reichling, Jürgen; Nolkemper, Silke; Stintzing, Florian C; Schnitzlerb, Paul. 2008. Impact of Ethanolic Lamiaceae Extracts on Herpesvirus Infectivity in Cell Culture. *Forsch Komplementmed*. 15, 313–320.