

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**”EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE UN
POLIFITOFÁRMACO EN UN MODELO MURINO DE INFLUENZA TIPO
A”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

PRESENTA:

HERNÁNDEZ ALARCÓN RITA XÓCHITL

DIRECTORES DE TESIS:

DR. DAVID GUILLERMO PÉREZ ISHIWARA
DRA. NURY PÉREZ HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE DEL 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 25 del mes Noviembre del año 2011, el (la) que suscribe Rita Xóchitl Hernández Alarcón alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular con número de registro B091477, adscrito a ENMyH, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara y cede los derechos del trabajo intitulado "Evaluación del efecto terapéutico de un polifitofármaco en un modelo murino de influenza tipo A", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección dra_rita_alarcon@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Nombre y firma

INDICE

1.	RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS	I
2.	RESUMEN / ABSTRACT	IV
3.	INTRODUCCIÓN	1
3.1	DEFINICIÓN	1
3.2	ANTECEDENTES HISTÓRICOS	1
3.3	EPIDEMIOLOGÍA	1
3.4	ETIOLOGÍA.....	7
3.5	FISIOPATOLOGÍA.....	9
3.6	PATOLOGÍA	11
3.7	CUADRO CLÍNICO	16
3.8	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	17
3.10	TRATAMIENTO	18
3.11	FARMACOLOGÍA	19
4.	ANTECEDENTES	22
5.	JUSTIFICACIÓN	32
6.	OBJETIVOS	33
7.	HIPÓTESIS.....	34
8.	MATERIALES Y MÉTODO	35
9.	RESULTADOS.....	41
10.	DISCUSIÓN.....	64
11.	CONCLUSIONES.....	69
12.	PERSPECTIVAS	70
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	71

1. RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Distribución de los casos confirmados de acuerdo a la fecha de inicio de síntomas.....	3
Figura 2. Distribución de la Influenza Porcina A (H1N1), Región de las Américas.....	5
Figura 3. Estatus del número de casos y muertes confirmados por laboratorio hasta el 7 de mayo del 2009, 18:00 GMT (OMS).....	6
Figura 4. Presencia de casos confirmados de influenza A H1N1 a nivel internacional	6
Figura 5. Distribución de las defunciones y de los casos confirmados por grupo de edad	7
Figura 6. Esquema del virus de influenza A.	9
Figura 7. Ciclo replicativo del Virus Influenza.....	10
Figura 8. Producción de citocinas por macrófagos y células epiteliales infectadas por el virus de influenza A.	14
Figura 9. Activación de factores de transcripción en la infección por el virus de influenza A.....	15
Figura 10. Representación de los sitios blanco para los antivirales vs virus influenza.	20
Figura 11. Valoración histológica de cortes pulmonares	44
Figura 12. Cambio ponderal de los animales en el establecimiento del modelo de infección por influenza A.	47
Figura 13. Distribución del primer grupo infectado con tratamiento	48
Figura 14. Histopatología pulmonar..	57
Figura 15. Histología pulmonar de animales no infectados.....	58
Figura 16. Inmunohistoquímicas..	60
Figura 17. Cromatograma del aceite esencial de la formulación fitofarmacéutica....	63

Tabla 1. Guía de la OMS de preparación y respuesta ante una pandemia (2009): Definición de las distintas fases	4
Tabla 2. Manifestaciones clínicas de influenza de acuerdo a la edad.....	16
Tabla 3. Diagnóstico diferencial de la influenza y catarro común.....	17
Tabla 4. Dosis de antivirales para la influenza	19
Tabla 5. Estudios sobre efectos farmacológicos de alga <i>Spirulina</i>	24
Tabla 6. Usos etnomédicos de <i>Psidium guajava</i>	29
Tabla 7. Especies vegetales utilizadas.....	35
Tabla 8. Especies y cantidades utilizadas para el extracto acuoso.....	35
Tabla 9. Puntaje otorgado a los signos clínicos de animales inoculados.	38
Tabla 10. Rendimiento de los diferentes extractos.....	41
Tabla 11. Datos de titulación viral	42
Tabla 12. Peso de los animales del primer pase.....	43
Tabla 13. Puntaje clínico para infección de influenza otorgado a los animales del primer pase	43
Tabla 14. Peso de los animales del segundo pase	44
Tabla 15. Puntaje clínico para infección de influenza otorgado a los animales del segundo pase.....	45
Tabla 16. Peso de los animales del tercer pase.....	45
Tabla 17. Puntaje clínico para infección de influenza otorgado a los animales del tercer pase	46
Tabla 18. Diferencia del peso de los ratones al inicio y al final del tratamiento con diferentes extractos de la formulación fitofarmacéutica vía intraperitoneal.	49
Tabla 19. Diferencia en las medias finales de los pesos de los animales tratados con los diferentes extractos de la formulación fitofarmacéutica, vía intraperitoneal.....	49
Tabla 20. Diferencia del peso de los animales al inicio y al final del tratamiento con diferentes extractos de la formulación fitofarmacéutica, vía oral.	51
Tabla 21. Diferencia en las medias finales de los pesos de los animales tratados con los diferentes extractos de la formulación fitofarmacéutica, vía intraperitoneal.....	52

Tabla 22. Diferencia en las medias finales de los pesos de los animales administrados con los diferentes extractos como tratamiento o profilaxis vía intranasal o mediante nebulizaciones.....	54
Tabla 23. Componentes del aceite esencial identificados por GC-MS.....	61

2. RESUMEN / ABSTRACT

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda autolimitada; su forma grave se caracteriza por una respuesta inflamatoria sistémica intensa, con afectación pulmonar, estado de choque vasodilatado y elevada mortalidad. El agente etiológico de esta patología es el virus de la influenza A, el cual pertenece a la familia *Orthomixoviridae*; su genoma, consta de varios segmentos de RNA, característica que lo hace mutar fácilmente propiciando epidemias y en algunos casos, pandemias. Farmacológicamente se han empleado diversos antivirales que no han tenido la respuesta requerida por resistencias a ellos o por sus altos costos por lo cual se han buscado otras alternativas. En el presente trabajo en búsqueda de efectos benéficos de una formulación fitofarmacológica, a base de orozuz, canela, guayaba, propóleo, alga espirulina y mentol, sobre esta infección, se evaluaron las características clínicas, histopatológicas e inmunohistoquímicas del tratamiento profiláctico y terapéutico.

Se obtuvieron extractos de la formulación de diferente polaridad, y se estudiaron en un modelo murino de influenza H1N1 estacional 2010; de los cuales, el aceite esencial vía intranasal fue el extracto con efecto benéfico. El tratamiento terapéutico no mostró diferencias significativas a nivel clínico; sin embargo, los animales que fueron administrados profilácticamente con el aceite esencial mostraron un cuadro clínico menos severo; sin datos de consolidación del parénquima pulmonar y con un proceso inflamatorio limitado, los análisis inmunohistoquímicos mostraron que la disminución en el proceso inflamatorio correlaciona con la disminución en la translocación de NF-kB al núcleo. Los resultados de la presente tesis nos permite concluir que el aceite esencial de la formulación administrado por vía intranasal fue el que mostró tener un efecto anti-inflamatorio, mientras que los extractos de acetato de etilo, de hexano y de agua no presentaron dicho efecto.

Influenza is an acute self-limited respiratory illness, its severe form is characterized by an intense inflammatory response with lung disease, vasodilator shock and high mortality. The etiologic agent of this disease is the influenza A virus, which belongs to Orthomixoviridae family, its genome consists of several segments of RNA, a feature that makes it easily mutate encouraging and in some cases it causes epidemics or pandemics. Pharmacologically have employed various antiviral but this response were failure because their resistance or their high costs; therefore scientific community looks for other alternatives. In this study, we search the beneficial effects of formulation fito pharmaceutical, based on licorice, cinnamon, guava, propolis, spirulina and menthol, about the infection, we evaluated the clinical, histopathological and immunohistochemical prophylactic and therapeutic treatment. Extracts of different polarity were obtained from the formulation, and we studied it in a murine model of seasonal H1N1 influenza 2010, of which the essential oil extract intranasally via was with beneficial effect. The therapeutic treatment showed no clinically significant differences, however, animals were administered prophylactically with the essential oil showed a less severe clinical illness, with no evidence of pulmonary parenchymal consolidation with an inflammatory process limited, immunohistochemical analysis showed that the decrease in the inflammatory process correlates with the decrease in NF- κ B translocation to the nucleus. With the results of this thesis we can conclude that the essential oil intranasal via was shown to have anti-inflammatory effect, while extracts of ethyl acetate, hexane and water showed no such effect.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 DEFINICIÓN

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda que normalmente se resuelve en un periodo de dos a cinco días; sin embargo, existen complicaciones entre las que se encuentran la otitis media, la neumonía, la exacerbación de enfermedad crónica respiratoria y la bronquiolitis¹. Adicionalmente, la influenza puede causar complicaciones no respiratorias como convulsiones por fiebre, síndrome de Reye y miocarditis¹. La forma grave de la enfermedad se caracteriza por una respuesta inflamatoria sistémica intensa, con afectación pulmonar, estado de choque vasodilatado y elevada mortalidad². Esta variante se presenta fundamentalmente en gente joven y aparentemente sana³; por lo que se ha sugerido que además de la carga y capacidad patogénica del virus, existen otros factores genéticos del huésped que generan una respuesta inmunológica exacerbada, en la que domina un estado pro-inflamatorio y pro-coagulable. El virus de la influenza se transmite por gotas de saliva al estornudar, toser o hablar; o bien, por contacto directo persona a persona, o indirecto persona-fomite-persona².

3.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Datos históricos señalan como la primera epidemia de influenza, el brote ocurrido en 1173-1174, mientras que el primer reporte bien documentado ocurrió en 1694 en París. Durante el siglo XVII, diversos datos sobre gripes epidémicas incrementaron de manera considerable. El virus de la Influenza A aislado por primera vez en 1933 comenzó a usarse en estudios científicos en 1957. Análisis subsecuentes demostraron que el virus de la influenza muta rápidamente, lo cual dificulta cada año los esfuerzos de desarrollar nuevas vacunas efectivas⁴.

3.3 EPIDEMIOLOGÍA

El 18 marzo del 2009, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SNVE) detectó un incremento en el número de infecciones respiratorias agudas, ligeramente superior a lo presentado en periodos similares de años anteriores. Las autoridades

sanitarias atribuyeron dicho incremento a una prolongación de la temporada invernal. Cronológicamente, el brote epidémico se presentó de la siguiente manera; el primero de abril, el SNVE detectó el caso de un niño de 4 años de edad, de la localidad la Gloria, municipio de Perote, Veracruz, con fiebre, tos y anorexia⁵, que posteriormente se confirmó como positivo a influenza tipo A, subtipo H3N2. El 4 de abril se reportó el segundo caso confirmado de una mujer de Oaxaca quien después de 11 días de evolución falleció. El 16 de abril, el SNVE recibió la notificación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de casos “inusualmente altos” en adultos jóvenes, aparentemente sanos, que ingresaban a urgencias con neumonía grave, y que evolucionaba de manera rápida; por lo que se lanzó una alerta epidemiológica, para intensificar la vigilancia diaria a través de la red epidemiológica, donde se reportan los casos hospitalarios graves de neumonía; esto permitió detectar una concentración alta de casos en San Luis Potosí⁶.

El 20 de abril, Estados Unidos confirmó la existencia de un nuevo virus de la Influenza A, subtipo H1N1, que combinaba parte del genoma del virus humano A H1N1, con un segmento de virus porcino A H1N1 y al día siguiente, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por su siglas en inglés), ubicado en Atlanta, notificó oficialmente la existencia de esta nueva cepa⁶. El 23 de abril, el Laboratorio Nacional de Microbiología en Winnipeg, Canadá informó vía telefónica que entre las 51 muestras enviadas por México, 17 resultaban positivas e idénticas a los casos aislados de esta cepa. Se confirmó el caso del niño de Perote, Veracruz, el de la mujer en Oaxaca y algunos del INER como H1N1. Ese mismo día, México notificó a la OMS sobre una probable pandemia de Influenza; para el 27 del mismo mes, la OMS elevó a fase 4 la contingencia. Hasta entonces habían ingresado a los hospitales 1,995 personas por padecer problemas de neumonía grave y se incrementó a 149, y en cuestión de horas a 152 los decesos relacionados con la influenza de origen porcino, aunque sólo en 20 casos se tuvo la evidencia etiológica⁶ (Figura 1).

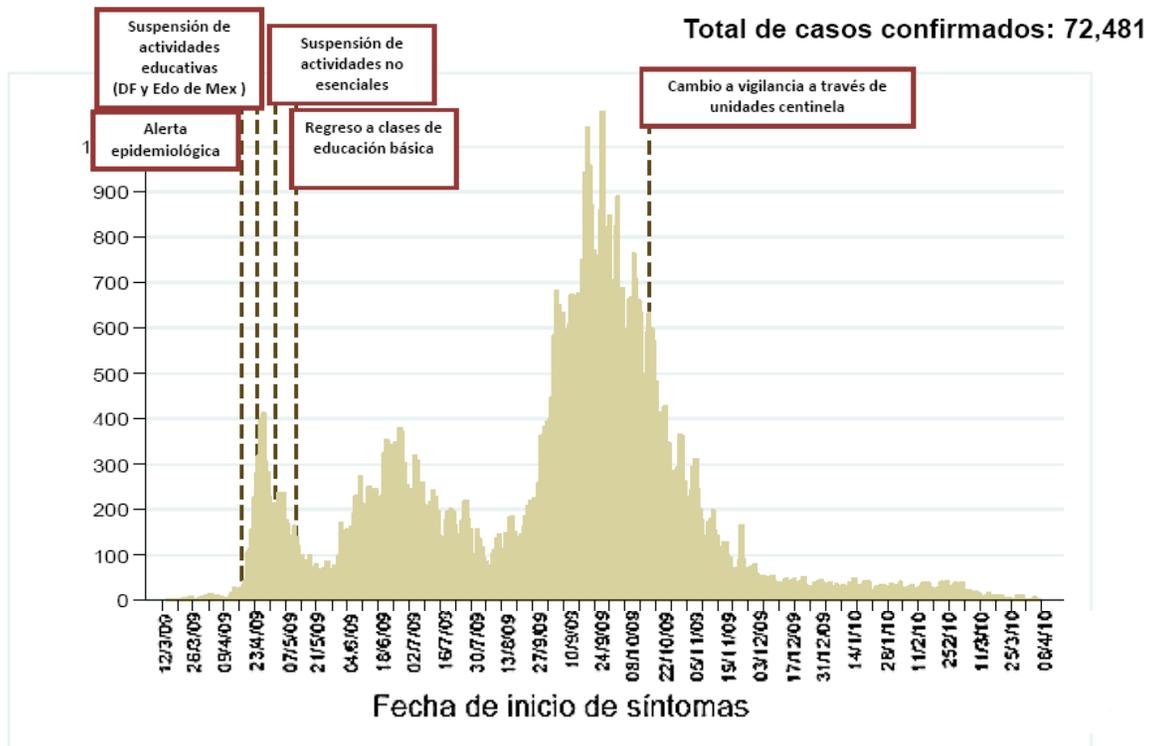


Figura 1. Distribución de los casos confirmados de acuerdo a la fecha de inicio de síntomas. Tomado de: [http://portal.salud.gob.mx/sites/salud/descargas/pdf/influenza/situación actual epidemia 190410.pdf](http://portal.salud.gob.mx/sites/salud/descargas/pdf/influenza/situación_actual_epidemia_190410.pdf)

El 30 de Abril del 2009, la OMS (Organización Mundial de la Salud), declaró la fase 5, o pandemia inminente (Tabla 1, Figura 2). El 7 de Mayo, una red nacional fue organizada en la República de China para la vigilancia, reporte, diagnóstico y tratamiento de la infección pandémica de la influenza A (H1N1)⁷. Se reportaron 3 casos confirmados tempranamente; 2 de éstos fueron importados de EUA, mientras que el otro de Canadá; ese mismo día, la OMS reportó el número de casos confirmados por laboratorio, tanto de infectados como de muertes ocasionadas por la infección (Figura 3). El 17 de Junio del 2009, 88 países reportaron oficialmente un total de 39,620 casos confirmados por laboratorio; de éstos, 6,241 (incluyendo 108 muertes) ocurrieron en México, 17,855 (44 muertes) en EUA, 4,049 (7 muertes) en Canadá, 2,335 (2 muertes) en Chile, 733 (1 muerte) en Argentina, 1,461 (1 muerte) en el Reino Unido, 149 (1 muerte) en Costa Rica, 2,112 en Australia, 666 en Japón, 832 en la República Popular China, 195 Alemania y 10 en otros países. El 6 de Junio del 2009, la OMS declaró la fase 6⁸ (Tabla 1).

Tabla 1. Guía de la OMS de preparación y respuesta ante una pandemia (2009): Definición de las distintas fases (WHO, Mayo 2009)

Fase 1	No se ha notificado que un virus de la gripe que circula entre los animales cause infección en los seres humanos.
Fase 2	Un virus de la gripe que circula entre los animales domésticos o silvestres ha causado infección comprobada en seres humanos y, por lo tanto, se considera una amenaza específica que puede causar una pandemia.
Fase 3	Un virus recombinado de la gripe animal o humana ha causado casos esporádicos o pequeños conglomerados de enfermedad en personas, pero no ha tenido una transmisión de persona a persona suficiente para sostener brotes en la comunidad.
Fase 4	Se ha comprobado la transmisión de persona a persona de un virus recombinado de la gripe animal o humana capaz de sostener la existencia de brotes en la comunidad.
Fase 5	El mismo virus identificado ha causado niveles sostenidos de brotes comunitarios en dos o más países de una región de la OMS.
Fase 6	Además de los criterios de la fase 5, el mismo virus ha causado brotes comunitarios sostenidos en, por lo menos, otro país de otra región de la OMS.
Período posterior al punto máximo	Los niveles de gripe pandémica en la mayoría de los países con una vigilancia apropiada han disminuido por debajo del nivel máximo.
Una posible nueva oleada	Aumenta de nuevo el nivel de la actividad de la gripe pandémica en la mayoría de los países con una vigilancia apropiada.
Período pospandémico	Los niveles de actividad de la gripe pandémica han regresado a los niveles que presenta la gripe estacional en la mayoría de los países con una vigilancia apropiada.

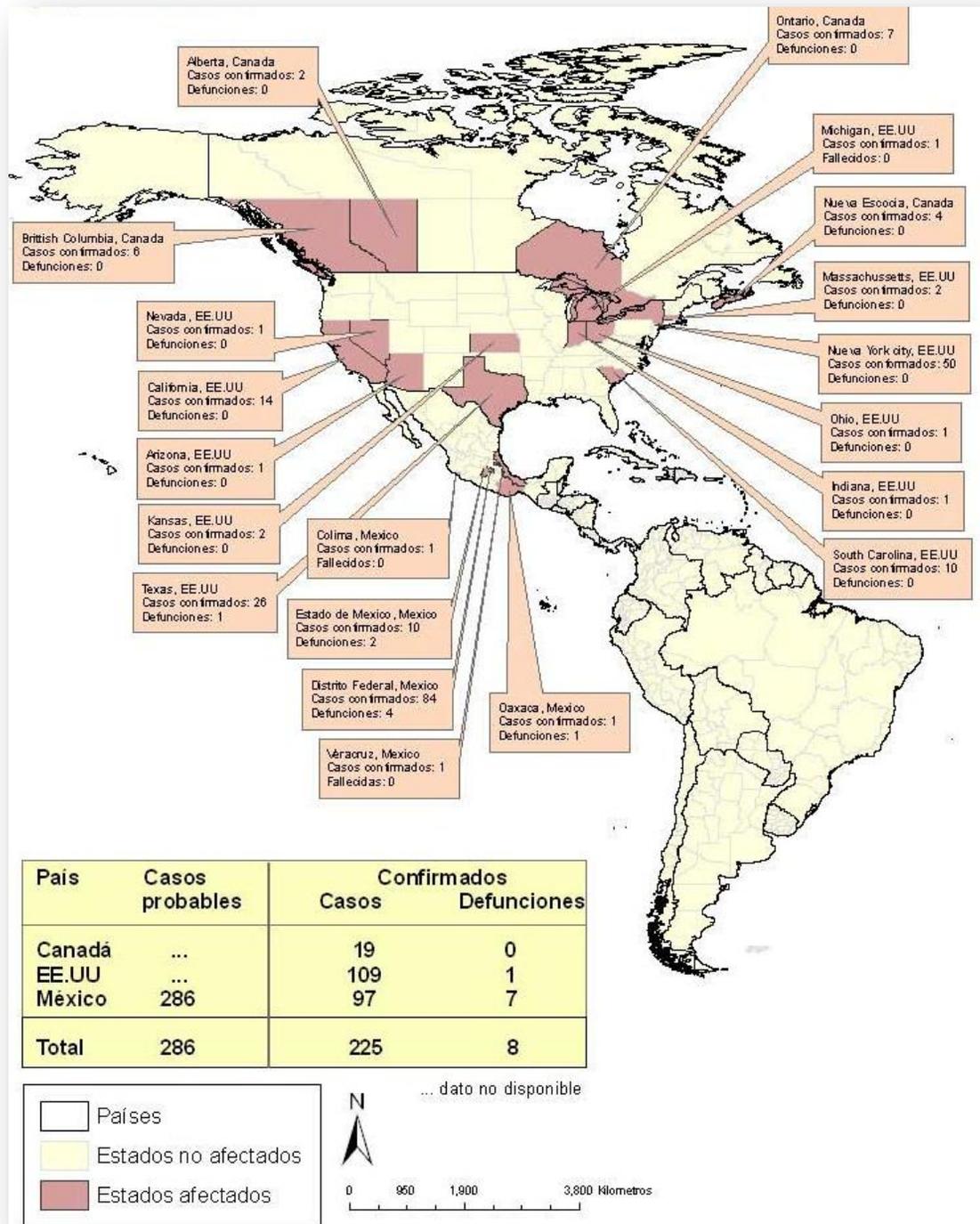


Figura 2. Distribución de la Influenza Porcina A (H1N1), Región de las Américas. 30 de Abril, 2009 1100h (Organización Panamericana de la Salud). Tomado de http://new.paho.org/hq/swine_files/mapspa.htm



Figura 3. Estatus del número de casos y muertes confirmados por laboratorio hasta el 7 de mayo del 2009, 18:00 GMT (OMS). Tomado de: http://influenza09.files.wordpress.com/2009/05/globalsubnationalmaster_20090522_06001.jpg



Figura 4. Presencia de casos confirmados de influenza A H1N1 a nivel internacional (OMS al 21 de Febrero del 2010). Tomado de http://www.who.int/csr/don/H1N1_20090603_0930.jpg

Hasta el día 21 de Febrero del 2010, la OMS continuó confirmando casos de influenza H1N1 a nivel mundial, cuya distribución se puede observar en el mapa de la Figura 4.

El Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) y la Comisión Nacional de Arbitraje Médico (CONAMED), hasta el 19 Abril del 2010, reportaron 72,481 casos confirmados y 1,198 defunciones, cuya distribución por grupos de edad podemos observar en la Figura 5.

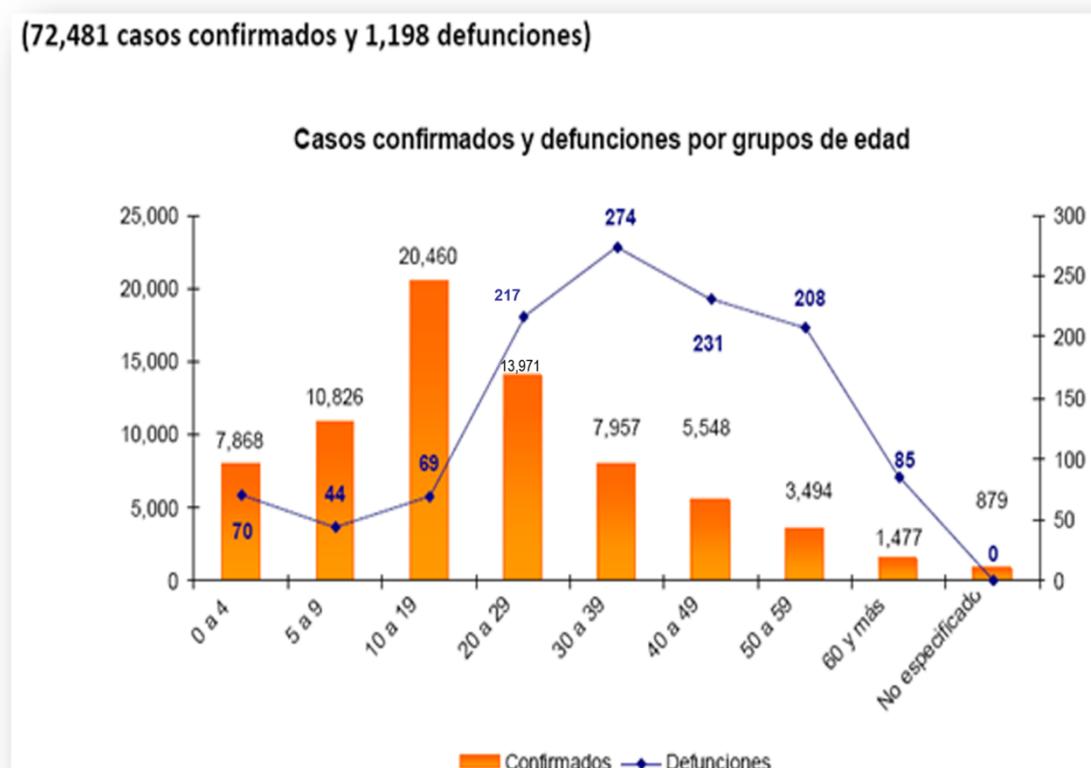


Figura 5. Distribución de las defunciones y de los casos confirmados por grupo de edad (Casos confirmados: Base de datos InDRE; Defunciones: CONAMED). Tomado de: http://portal.salud.gob.mx/sites/salud/descargas/pdf/influenza/situacion_actual_epidemia_190410.pdf

3.4 ETIOLOGÍA

El virus influenza pertenece a la familia *Orthomixoviradae*; existen tres géneros denominado A, B y C, de éstos, el más patogénico es el A; el cual puede infectar a humanos de todos los grupos de edad⁹. Cada virus se denomina internacionalmente indicando el género o tipo de virus; el nombre en inglés de la especie animal de la

que se aisló (excepto si es de humano); el lugar de aislamiento, el número de caso del laboratorio; el año de su aislamiento y entre paréntesis, se escribe el subtipo de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA)¹⁰.

Las características estructurales generales de la familia del virus de influenza son el diámetro de 50 a 120 nm, la forma esférica, la presencia de una envoltura constituida por una bicapa lipídica derivada de la membrana celular, de la cual sobresalen alrededor de 500 espículas conformadas por las glicoproteínas de envoltura HA y NA (Figura 6). Hacia el interior de la partícula viral, existe una capa formada por la proteína de la matriz (M1) y más al interior, está la nucleocápside de simetría helicoidal, constituida por un complejo nucleoproteico que incluye el genoma viral. Este último es una hebra de ácido ribonucleico (RNA), de polaridad negativa, formada por 12,000 a 15,000 nucleótidos y segmentada en 7 (influenza C) u 8 fragmentos (influenza A y B)⁹. El genoma viral codifica para 10 proteínas; HA, NA, M1 (proteína de matriz), NP (nucleoproteína), tres polimerasas (PB1, PB2 y PA), proteínas de canales iónicos (M2) y proteínas no estructurales (NS1 y NS2)¹¹. Se ha demostrado que NS1 es un inmunomodulador que posee diversos efectos, como la inhibición del interferón tipo I en las células infectadas⁹. Las proteínas PA, PB1 y PB2, interactúan con el genoma viral constituyendo el complejo nucleoproteico y su función es la de sintetizar los nuevos RNA virales. La NP se asocia a los segmentos del RNA viral y a las polimerasas, conformando la nucleocápside helicoidal; mientras que la proteína M1 forma la matriz y, junto a la NP, constituyen el antígeno que permite clasificar los virus de influenza en 3 tipos: A, B y C; la HA y la NA son los antígenos de superficie, que participan en la patogenicidad viral y determinan los diferentes subtipos de virus (H1-H15 y N1-N9)⁹.

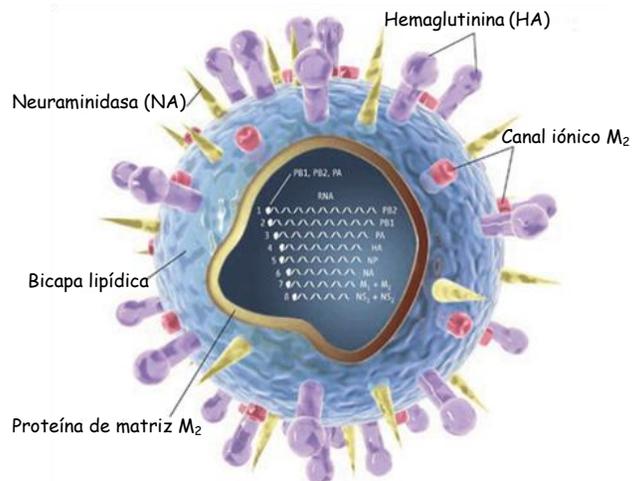


Figura 6. Esquema del virus de influenza A. Modificado de: Chris Bickel/Science, 2006

3.5 FISIOPATOLOGÍA

Una vez que el virus ha logrado entrar al hospedero, es capaz de penetrar la capa de mucina del tracto respiratorio y llegar a su blanco principal, las células del epitelio columnar. Para que el virus penetre es necesario que éste y la membrana celular se pongan en contacto, lo cual se logra mediante la unión del antígeno viral HA a la galactosa presente en el ácido siálico de la célula hospedera (endocitosis mediada por receptor) además de ayudar a la posterior fusión de la membrana viral con las membranas endosomales, para la liberación de las partículas virales al citoplasma¹². El ácido siálico es una molécula altamente conservada, sin embargo, presenta variaciones químicas específicas de los diferentes *phila*⁹. Debido a eventos de recombinación, una co-infección en los cerdos con los virus de influenza humana y aviar puede originar un nuevo virus, con un rearrreglo genético que potencialmente permitiría co-infectar tanto a las aves como a los humanos⁹.

Después de la endocitosis del virus vía clatrina dependiente¹¹, la vesícula endocítica se va acidificando en su camino al interior de la célula por la entrada de protones (H^+); en este proceso de bombeo de H^+ hacia el interior del endosoma, participa la molécula viral M2 (Figura 7). Con la acidificación del medio, la partícula viral sufre cambios conformacionales que alteran su membrana permitiendo, con ayuda de la HA, la liberación de los complejos de ribonucleoproteínas virales al citoplasma celular, para posteriormente ser transportadas al núcleo de manera dependiente de energía (ATP). Es en el núcleo donde se lleva a cabo la replicación y la transcripción,

procesos que son efectuados por tres subunidades de la polimerasa (PB2, PB1 y PA), y por la NP.

Los nuevos complejos de ribonucleoproteínas son exportados desde núcleo al citoplasma, para su traducción por la proteína de exportación nuclear (NEP, llamada NS2), y la M1. El RNA mensajero de las proteínas sintetizadas por las células del huésped tiene un tracto de poli-adeninas en el extremo 5', la cual lo protege de ser degradado. La molécula NS1 del virus inhibe el transporte nuclear de aquellas moléculas con tracto de poli-adeninas, de esta manera se da prioridad al transporte y síntesis de las moléculas virales¹³. Las proteínas virales tempranas que son requeridas para la replicación y la transcripción son transportadas de vuelta al núcleo. Finalmente el ensamble y la gemación de los viriones ocurren en la membrana plasmática y la NA facilita la liberación del virus, removiendo el ácido siálico¹³.

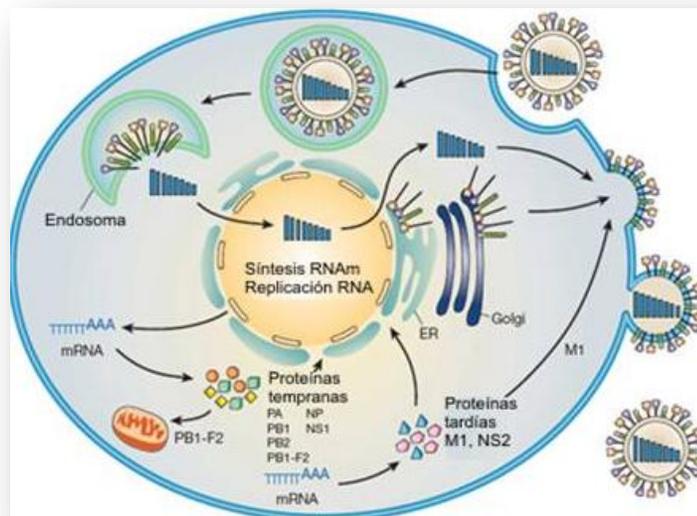


Figura 7. Ciclo replicativo del Virus Influenza. Tomado de Neumann et al., 2009

Diversas vías de señalización del hospedero están implicadas en la replicación del virus; varios grupos han reportado que la inhibición de la señalización de la cinasa Raf/MEK/ extracelular inhibe la producción viral^{14,15}. De la misma manera se ha demostrado que la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa, la cual es activada por la proteína viral NS1 juega un rol importante en el ciclo replicativo del virus de la

influenza A. Sin embargo, la principal vía de señalización implicada en la replicación del virus, es la vía del NF- κ B¹⁶. La activación de dicha vía podría ser causada por la sobreexpresión de proteínas virales como la HA, NP y MI durante la infección. Wurzer *et al.*, 2004, demostraron experimentalmente que en líneas celulares de linfoma de Burkitt que presentan niveles bajos de actividad del NF- κ B, son resistentes a la infección del virus de influenza, pero cuando esta vía de señalización es activada, las células son susceptibles, promoviendo la producción del virus¹⁶.

3.6 PATOLOGÍA

El mecanismo de transmisión del virus de influenza es de persona a persona mediante gotitas de saliva o secreción nasal (>5 nm de diámetro). Se calcula que 0.1 μ L de secreción nasal en forma de aerosol contienen alrededor de 100 partículas virales. La dosis infectiva para esta enfermedad en el humano es de alrededor de 100 a 1000 partículas virales, sin embargo, debido a que éstas no permanecen suspendidas en el aire, es necesario el contacto cercano¹⁷. La transmisión también puede ocurrir a través del contacto directo piel a piel o del contacto indirecto con secreciones a través de superficies contaminadas. El virus es fácil de inactivar mediante desinfectantes a base de alcohol, cloro o aldehídos, así como por cambios bruscos de temperatura¹⁷.

Una vez que el virus ha logrado entrar al hospedero, se enfrentará con las barreras que forman parte de la inmunidad innata como son los cilios del tracto respiratorio, el moco, los agentes surfactantes, etc¹⁸. Cuando logra evadir estas barreras y llega a los alvéolos, debe ser destruido por los macrófagos o las células dendríticas; si el virus no es eliminado, entonces se unirá a las células blanco del epitelio respiratorio, a los monocitos/macrófagos, así como a otros leucocitos, en donde llevará a cabo la replicación¹⁹.

A pesar de que se sabe que el virus de la influenza tiene tropismo por las células del epitelio columnar del tracto respiratorio, en algunos estudios realizados en cadáveres de individuos cuyo deceso se debió a la infección por la cepa patogénica H5N1, se encontraron focos de infección en otros órganos tales como el intestino, el cerebro y el endotelio del miocardio¹⁹. En la necropsia de una mujer embarazada infectada con

el virus, se observó la presencia viral incluso en los macrófagos fetales, también denominados células de Hofbauer¹⁹.

Existen varios factores que regulan o limitan la infección por el virus de influenza, entre ellos se encuentran las barreras naturales de entrada de los patógenos al organismo, tales como la mucosidad, los macrófagos alveolares y el propio epitelio. Existen moléculas que favorecen la entrada del virus a las células del hospedero como la hemaglutinina y las serin proteasas transmembranales (TMPRSS)²⁰. En cuanto a la hemaglutinina, se ha mostrado que su enlace al ácido siálico puede limitar el grado de infección en el hospedero; por ejemplo, el virus de influenza aviar se enlaza por medio de la hemaglutinina al ácido siálico SA- α -2,3-Gal, mientras que el de influenza humana se enlaza comúnmente a SA- α -2,6-Gal²⁰. La diferencia anteriormente mencionada junto con la predominancia de SA- α -2,6-Gal en la tráquea humana, genera una pobre replicación y por tanto una respuesta inmune disminuida producida por el virus de influenza aviar en humanos. Por otro lado, diversas evidencias indican que la expresión del gen *Tmprss2*, que codifica para la proteasa transmembranal y que está disminuido en ratones antes de la infección con influenza, aumenta significativamente su expresión al sexto día post-infección, lo que se relaciona con una respuesta inmune exacerbada²¹.

Si el virus de influenza logra evadir las barreras naturales del organismo, se promueve la activación de las células epiteliales y de las células presentadoras de antígenos (APC's), principalmente los macrófagos alveolares y las células dendríticas, generando la liberación de mediadores inflamatorios²². Las APC's van a estimular la activación, expansión, proliferación y diferenciación de células T, y según el tiempo en el cual las APC's lleven a cabo su función puede generarse una respuesta inflamatoria limitada o exacerbada. Se ha demostrado que la co-expresión de reguladores de la apoptosis, como Bcl-x_L, modula la supervivencia de las APC's, determinando así, si se presenta una reacción inmune normal, o bien una respuesta exacerbada. De estos hallazgos se concluye que la duración y la magnitud de la expansión de células T, y consecuentemente de una respuesta inflamatoria, depende del balance de varios factores, entre los que destacan: i) la coordinación, la duración y el grado de producción de APC's, ii) la carga antigénica, iii) el grado de

decaimiento de las APC's y iv) la presencia de moléculas reguladoras, entre otras cosas²².

El desarrollo de una respuesta inflamatoria exacerbada en algunos pacientes se presenta por un desbalance de la respuesta inmune, comúnmente referida como “tormenta de citocinas” o hipercitocinemia^{23,24}. Se ha observado que en el pulmón pneumónico de pacientes infectados por influenza, existen niveles elevados de mediadores pro-inflamatorios, tales como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), y las interleucinas 17 (IL-17) y 6 (IL-6), entre otras²³. Estos mediadores favorecen interacciones autócrinas y parácrinas de diversos tipos celulares, que culminan en una respuesta inflamatoria desregulada en el hospedero²⁵.

La influenza usualmente es una enfermedad de naturaleza autolimitada en la que para poder eliminar el virus, es necesaria la generación de la respuesta Th1; la cual consiste en la secreción del interferón gamma (IFN- γ) por parte de las células T CD4+ y CD8+ que destruyen las células infectadas²⁶. Por otro lado, las células dendríticas inician una respuesta inmune primaria^{27,28} con cambios fenotípicos que incluyen la sobreexpresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) tipo II, y la liberación de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas que aumentan la capacidad de las células dendríticas para estimular a las células T, iniciando de esta forma la respuesta inmune contra el patógeno^{29, 30}. Así mismo, las células dendríticas secretan INF- α y β , las cuales tienen una potente actividad antiviral²⁶.

La hiperactividad del proceso inflamatorio se ha asociado de manera importante a la activación de ciertos factores de transcripción que se activan durante la infección con el virus de influenza, involucrando la sobre expresión de varios genes que codifican para diversas quimocinas y citocinas; entre los que se encuentran el factor nuclear kappa B (NF- κ B), la proteína activadora AP-1, el factor regulador de interferón (IRF), los activadores y transductores de señales de transcripción (STATs) y el factor nuclear de IL-6 (NF-IL-6 o C/EBP β)¹¹. Aunadas a la participación de estos factores, se encuentran también las proteínas activadas por mitógenos (MAP), que son reguladoras importantes en la expresión de los genes que codifican para diversas citocinas; así como muchas MAP cinasas tales como la ERK (cinasa regulada por señales extracelulares), MAP cinasa p38 y la cinasa c-Jun-NH₂-terminal¹¹.

3.6.1 El papel de los factores reguladores de interferón (IRF`S).

Actualmente, se sabe que la familia del IRF está constituida por nueve miembros, de éstos, el IRF-1, el IRF-3 y el IRF-7 han sido asociados con la sobreexpresión del IFN- α/β . El IRF-1 normalmente se expresa de forma basal y es inducido y activado por diversos virus incluido el de influenza A. Por otro lado, también se ha observado en cultivos celulares de macrófagos humanos infectados con H1N1 y H5N5, la activación del factor de transcripción regulador de IFN 3, IRF3, y su translocación al núcleo, siendo de mayor magnitud con el virus H5N5. El aumento de la actividad del IRF3 se ha relacionado con la acumulación de algunos co-activadores como p300 y CREB que inician la transcripción de IFN- β , IFN λ 1, IP-10 y TNF- α , entre otros³¹. También se observó en los cultivos celulares que a 6 horas post-infección, la actividad de IRF-3 se relacionaba con la expresión de MCP-1, MIP-1 α y RANTES³¹. Estos resultados sugieren que IRF3 favorece la síntesis de diversas citocinas que se relacionan con la expresión de moléculas pro-inflamatorias, lo cual explica el gran número de quimocinas y citocinas producidas durante la infección con el virus de influenza (Figuras 8 y 9).

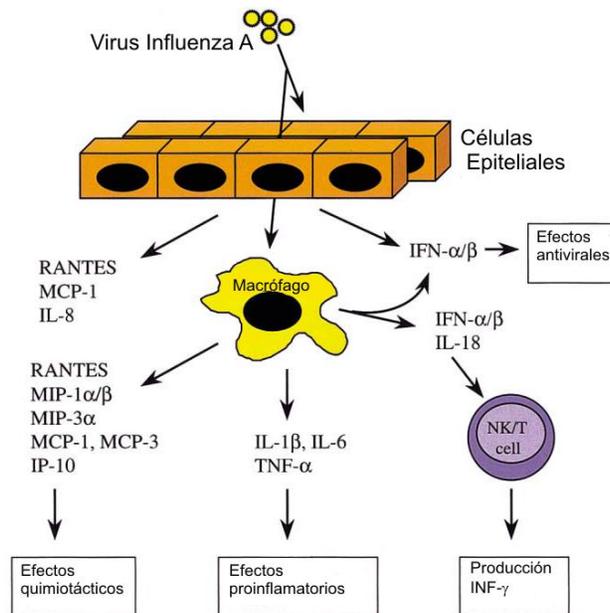


Figura 8. Producción de citocinas por macrófagos y células epiteliales infectadas por el virus de influenza A. Tomado de: Julkunen et al., 2007

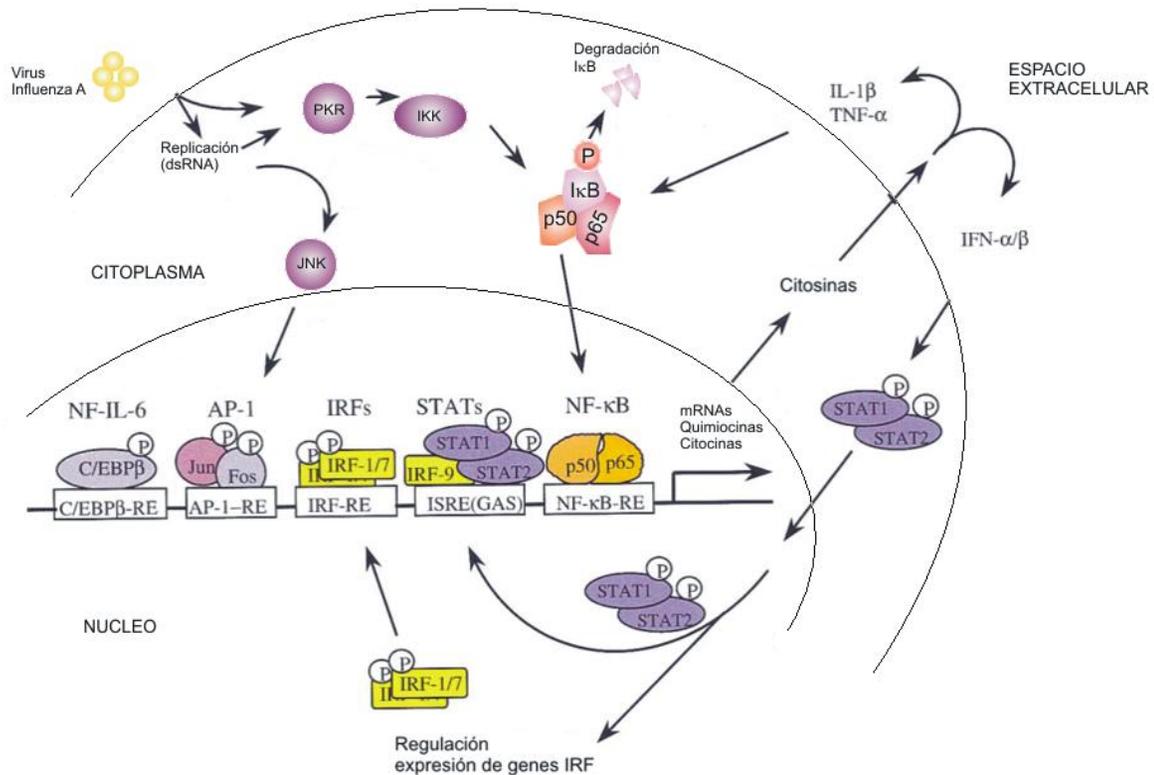


Figura 9. Activación de factores de transcripción en la infección por el virus de influenza A. Modificado de Julkunen et al., 2007

La replicación del virus de la influenza activa los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B. El dsRNA viral activa PKR seguido por la activación de cinasa I κ B (IKK) y la translocación nuclear de NF- κ B; también activa la cascada de MAP cinasa y la posterior activación de JNK y AP-1. En fases tempranas, las células infectadas producen IFN- α/β y citocinas activadas por NF- κ B, así como también activa IL-1 β y TNF- α . IFN- α/β activa, vía receptores específicos, STAT1 y STAT2. La tirosina fosforilada y activada forma heterodímeros, STAT1 y STAT2, los cuales se translocan al núcleo y se une a IRF-9/p48 para formar el complejo ISGF3. El IFN- α/β también estimula la expresión de IRF-1 y 7¹¹.

3.7 CUADRO CLÍNICO

Las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes infectados por virus influenza son variables, según el grupo etario al que pertenecen (Tabla 2)³².

Tabla 2. Manifestaciones clínicas de influenza de acuerdo a la edad. Tomado de: Moore y cols, 2009

Manifestación	Porcentaje positivo				Total (n=505)
	< 6 meses (n=116)	6-23 meses (n=172)	24-59 meses (n=135)	> 5 años (n=82)	
Fiebre	92	93	96	89	93
Tracto respiratorio					
Tos	72	85	88	77	81
Rinorrea	64	54	53	38	53
Dificultad respiratoria	46	45	39	41	43
Neumonía	17	39	39	29	32
Sibilancias	10	25	16	16	18
Otitis media	3	26	17	4	15
Faringitis	3	3	9	24	8
Sinusitis	0	3	1	6	2
Otros					
Deshidratación	42	33	34	13	32
Letargia	32	31	33	21	30
Naúseas	16	30	39	24	28
Diarrea	5	12	16	9	11
Convulsiones	3	13	12	4	9
Exantema	4	4	7	6	5
Conjuntivitis	3	1	4	1	2

Los adultos y los adolescentes presentan el cuadro clásico, de inicio brusco, con fiebre alta (38-40°C) que dura 4 días, acompañado de mialgias, cefalea, calofríos, decaimiento, malestar general y fotofobia. Posterior al inicio de la fiebre, aparece obstrucción nasal, tos no productiva, disfagia, faringitis y rinitis³³. Los niños pequeños, en cambio, no presentan el cuadro típico, aunque también pueden presentar fiebre alta (generalmente >39.5°C), con grados variables de compromiso del estado general, rinitis, cefalea y odinofagia. Los menores de 5 años presentan particularmente anorexia y síntomas gastrointestinales como vómitos y diarrea. En los recién nacidos el cuadro clínico es muy inespecífico, con fiebre alta, letargia, rechazo alimentario, piel moteada y apneas³³. En un estudio canadiense, evaluaron las características clínicas de la influenza en la población pediátrica, observándose que la deshidratación es una manifestación frecuente (42%) en menores de 6 meses.

Por otra parte, se determinó que las convulsiones, corresponden al 10% de las consultas en el grupo entre los 6 y los 59 meses, a diferencia de los lactantes y preescolares, los mayores de 5 años presentan, como signo frecuente, faringitis (24%)³². El cuadro clínico no diferencia si la infección es por virus influenza A o B; sin embargo, los síntomas gastrointestinales, en especial los vómitos son más frecuentes en la infección por virus influenza B³².

3.8 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Se debe realizar el diagnóstico diferencial con algunas enfermedades como el catarro común (Tabla 3)³⁴, la rinitis alérgica, el asma, la pulmonía bacteriana primaria, la bronquitis aguda y el dengue³⁵.

Tabla 3. Diagnóstico diferencial de la influenza y catarro común. Tomado de: Norman, 2003.

Dato clínico	Influenza	Catarro común
Inicio del cuadro	Súbito	Gradual
Fiebre	Frecuentemente entre 37-40 °C	Poco común o febrícula
Mialgias	Frecuentes e intensas	Poco común
Artralgias	Frecuentes e intensas	Poco común
Anorexia	Frecuente	Poco común
Cefalea	Frecuente e intensa	Poco común y leve
Tos seca	Frecuente e intensa	Leve a moderada
Malestar general	Intenso	Leve
Fatiga	Más frecuente, duración 2 a 3 semanas	Leve y periodo corto
Molestias torácicas	Comunes e intensas	Leve a moderada
Congestión nasal	Ocasional	Común
Estornudos	Ocasional	Común
Dolor faríngeo	Ocasional	Común

3.9 DIAGNÓSTICO

Como en todo agente infeccioso, el diagnóstico de infección por virus de influenza, tanto con fines clínicos como epidemiológicos, se pueden realizar mediante la detección del agente o de la respuesta inmune del hospedero. Las técnicas disponibles varían en sensibilidad y especificidad según el método, el laboratorio en donde se realizan y el tipo de muestra utilizado. La búsqueda del agente se realiza

en muestras de secreciones respiratorias y, si bien la muestra ideal depende de la técnica a utilizar, en general el aspirado nasofaríngeo en los niños y el lavado nasal en adultos, por la mayor concentración de virus que en ella se presenta. Para la detección de antígenos se utilizan anticuerpos específicos y un sistema de visualización de la reacción que puede ser una marca fluorescente (inmunofluorescencia) o una reacción enzimática (ensayo inmunoenzimático, ELISA)³⁶.

- Diagnóstico molecular

Para diagnosticar la influenza A (H1N1) linaje porcino (swl) virus (A/California/4/2009 y virus similares) el diagnóstico molecular es el de elección. Primordialmente se emplean el gen de la hemaglutinina específico del virus de la influenza A (H1N1) swl; el gen de la hemaglutinina específico de la influenza estacional A H1/H3, así como otros subtipos, y el gen de matriz de la influenza de tipo A.

Actualmente se usa la PCR convencional específica para influenza tipo A y la RT-PCR en tiempo real; así como el aislamiento y tipificación del virus mediante la inhibición de hemaglutinina o bien la inmunofluorescencia. También se puede aislar el virus de la influenza estacional usando células de MDCK y la inoculación de virus en huevos embrionados, aunque la sensibilidad de este método no se ha determinado. El empleo de los anticuerpos monoclonales anti H1 no debe tomarse como comprobación concluyente y se recomienda realizar una verificación adicional. Debe recalarse que estas pruebas no diferenciarán la influenza estacional de la del virus de influenza de tipo A (H1N1) swl³⁵.

3.10 TRATAMIENTO

El virus de la influenza A (H1N1) detectado en México y en los Estados Unidos es sensible a oseltamivir y zanamivir pero no a amantadina y ramantadina. Para la influenza estacional, el beneficio máximo se obtiene cuando los agentes antivirales se inician dentro de las 48 horas de inicio de los síntomas. No obstante, si se inicia posterior a 48 horas aún se obtiene beneficio en la reducción de la mortalidad y en la duración de la hospitalización. La duración estándar del tratamiento para la influenza

estacional es de 5 días, las dosis deben ajustarse por peso corporal (Tabla 4). El uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos y otros tratamientos sintomáticos reducen las molestias, sin embargo, la aspirina no debe utilizarse en los niños y mujeres embarazadas por el riesgo de presentar el síndrome de Reye. Las interacciones entre los agentes antirretrovirales y el oseltamivir o zanamivir no han sido descritas hasta la fecha³⁷.

Tabla 4. Dosis de antivirales para la influenza (OMS 2009)

Agente, grupo	Tratamiento	Quimioprofilaxis
Oseltamivir		
Adultos	75 mg cápsula dos veces al día por 5 días	75 mg cápsulas una vez al día
Niños (edad, 12 meses o mayores), peso:	15 kg o menos	60 mg por día divididos en 2 dosis
	15-23 kg	90 mg por día divididos en 2 dosis
	24-40 kg	120 mg por día divididos en 2 dosis
	> 40 kg	150 mg por día divididos en 2 dosis
		30 mg una vez al día
		30 mg una vez al día
		60 mg una vez al día
		75 mg una vez al día
Zanamivir		
Adultos	Dos inhalaciones de 5 mg (total 10 mg) dos veces al día	Dos inhalaciones de 5 mg (total 10 mg) una vez al día
Niños	Dos inhalaciones de 5 mg (total 10 mg) dos veces al día	Dos inhalaciones de 5 mg (total 10 mg) una vez al día (edad, 5 años o mayor)

3.11 FARMACOLOGÍA

Existen dos tipos de antivirales, los inhibidores de canales iónicos y los inhibidores de la neuraminidasa (Figura 10).

- Amantadina y la rimantadina: son bloqueadores de los canales iónicos formados por la proteína M2, los cuales son críticos para la liberación de los complejos ribonucleicos al citoplasma. La mayoría de los virus humanos H1N1 y H3N2 que circulan y algunos H5N1; así como los virus porcinos Europeos H1N1, H2N2 y H3N2 son resistentes a amantidina y rimantidina¹³.
- Oseltamivir y el zanamivir: son inhibidores de la neuraminidasa; éstos interfieren con la actividad enzimática de la proteína NA, la cual es crítica para

la liberación eficiente de los nuevos virus sintetizados en la célula infectada¹². Hasta el momento no se han detectado casos de resistencia a zanamivir en pacientes; sin embargo, si para el oseltamivir, en las cepas H3N2 y H1N1 que fueron aislados de niños tratados con Tamiflu® (nombre comercial del Oseltamivir)³⁸. Recientemente, la tasa de los virus resistentes a oseltamivir en los Estados Unidos, ha incrementado desde el 0.7% en el 2006-2007 hasta el 98.5 en el 2008-2009¹².

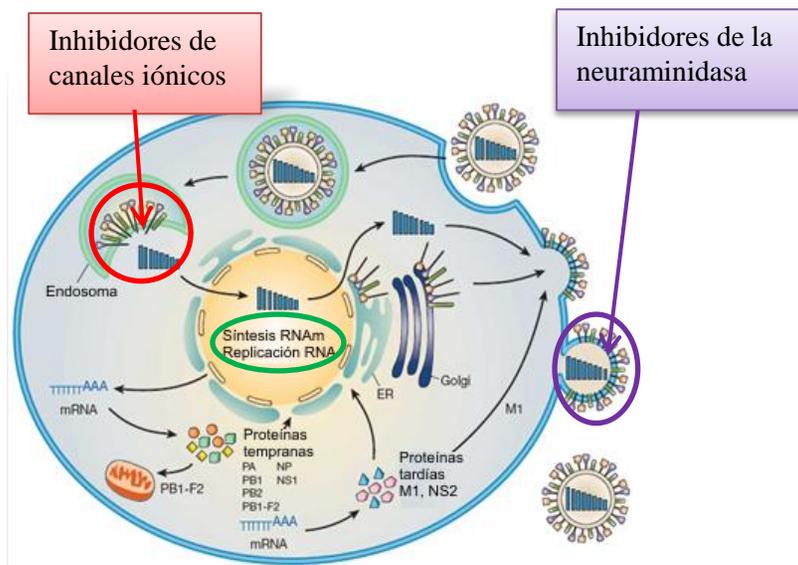


Figura 10. Representación de los sitios blanco para los antivirales vs virus influenza. Tomado de: Neumann y cols, 2009

Para la prevención y control de las infecciones del virus de la influenza, están disponibles vacunas y antivirales; sin embargo, es probable que mundialmente no estemos preparados para una pandemia ya que los medicamentos antivirales, además de ser costosos, pueden no ser los suficientes, o bien que los virus sean resistentes a ellos¹³. Por otro lado, la producción de una vacuna para una cepa emergente podría tomar de 3-6 meses, y durante este periodo el virus podría expandirse y afectar de forma sustancial la economía y la salud mundial¹³. Por esto, se requieren urgentemente enfoques alternativos que incremente la batería de fármacos disponibles para superar estos obstáculos incluyendo la manipulación de determinadas vías de señalización que se sabe que intervienen en la replicación del virus¹⁴. Hay varios fármacos antivirales en fase experimental que tienen como blanco

la NA o la polimerasa. El Peramivir, un inhibidor de la NA que ha sido desarrollado a través del diseño basado en la estructura, es activo en ensayos *in vitro* contra virus de las nueve variantes de la NA. El fármaco T-705 actúa como un análogo de la nucleosidasa que interfiere con la actividad de la polimerasa del virus de la influenza A, B y C, pero también de otros virus de RNA. Los ensayos clínicos de fase II para el uso de T-705 contra los virus de la gripe estacional se han llevado a cabo en Japón y ya se están comenzando la fase III. Además, se están desarrollando los anticuerpos monoclonales contra la HA para el tratamiento de las infecciones por el virus de influenza. En ratones, algunos anticuerpos han demostrado eficacia profiláctica y terapéutica contra el virus H5N1, lo que sugiere que el tratamiento con anticuerpos monoclonales podría ser usado como una estrategia alternativa para el tratamiento de las infecciones por este virus¹². Otra posibilidad que está siendo explorada, es el uso de RNAs de interferencia pequeños o RNAs de doble cadena que son capaces de inhibir la expresión de ciertos genes al inducir la degradación del RNAm. Esta estrategia ha tenido cierto éxito, tanto *in vitro*, como *in vivo* en animales de experimentación^{39,40}. Se han desarrollado RNAs de interferencia contra la nucleoproteína viral, contra la polimerasa y contra genes de matriz, los cuales fueron capaces de suprimir la replicación viral en cultivo celulares, así como reducir la carga viral en animales infectados⁴¹. En la actualidad, existen ya varias compañías de base biotecnológica, produciendo RNAs de interferencia. Sin embargo, a la fecha solo los RNAs de interferencia producidos contra el virus sincicial respiratorio (RSV) se encuentra en fase clínica II⁴¹. Otras dos empresas encabezadas por Novartis, están también conduciendo otros estudios pre-clínicos usando RNAs de interferencia específicos para Influenza. A diferencia de los anticuerpos neutralizantes, la aplicación de esta tecnología en situaciones pandémicas, tendría la gran ventaja de ser de bajo costo y rápida producción masiva. Sin embargo, el principal problema asociado a su aplicación masiva en humanos, deriva del hecho de que varios reportes han demostrado que dichos RNAs pueden inhibir, de manera inespecífica, genes del organismo huésped⁴¹.

4. ANTECEDENTES

Como se puede observar, existen algunas estrategias antivirales que se han enfocado en el desarrollo de fármacos que bloquean actividades específicas del virus; sin embargo, se ha prestado poca atención a aquellos cuyo efecto antiviral pudiera deberse a la modificación de la actividad en la célula huésped, la cual es esencial para la replicación viral o bien para estimular y/o capacitar al sistema inmunológico para responder mejor ante la infección. Una alternativa en esta búsqueda la constituyen metabolitos derivados de las plantas o de otros microorganismos. La herbolaria, uno de los componentes más importantes de la Medicina Tradicional China (MTCh), usa derivados de plantas y usualmente incorpora una o más hierbas como el fármaco o los fármacos base para el tratamiento de algunas enfermedades. Dependiendo de las diferentes causas o síntomas, las hierbas son seleccionadas y mezcladas, siguiendo un proceso particular, para formular la prescripción⁴². Dentro de las especies vegetales más utilizadas para tratar las afecciones respiratorias víricas se pueden mencionar la *Equinácea purpurea*, el *Eucalyptus globulus*, y el *Pinus pinaster Aiton* y *Salix* sp, a partir de los cuales se han elaborado fitofármacos certificados por la ESCOP (The European Scientific Cooperative on Phytotherapy) y por la OMS, como tratamientos alternativos para el anejo sintomático de los resfriados de origen viral⁴³. Pleschka y cols, en el 2009; estudiaron la actividad antiviral de un extracto comercial estandarizado de *Echinacea purpurea* (Echinaforce ®, EF), donde se comprobó su capacidad para inactivar, en cultivos celulares, los virus de influenza tipo H1N1, H5N1 y H7N7, inhibiendo la unión del virus al receptor y su entrada en la célula. A diferencia del Tamiflú ®, no solo las incubaciones sucesivas con EF no desarrollaron cepas virales resistentes, sino que EF fue activo frente a los virus resistentes al oseltamivir¹⁴. Un antecedente directo del uso de estas formulaciones es la recomendación del ministerio de salud chino, en el pasado brote epidémico de influenza aviar ocurrido en el 2005, publicado en un documento titulado “Recomendaciones Diagnósticas Terapéuticas para la gripe Aviar”, el día 23 de noviembre del 2005. El ministerio de salud chino además de usar medicamentos alopáticos, recomendó emplear algunos fitofármacos de la medicina tradicional china,

de patente o en decocción como antivirales, así como para el manejo de la sintomatología⁴⁴. En base a las fórmulas recomendadas, se buscaron productos similares en la herbolaria mexicana, tales como la *spirulina*, la guayaba, el propóleo, el orozuz, la canela y el mentol.

❖ La *Spirulina sp* (o *Arthrospira*) es un alga perteneciente al reino Bacteria, división Cyanobacteria (anteriormente conocido como Cyanophyta o grupo de las algas verdeazules), clase Cyanophyceae, orden Oscillatoriales y género *Spirulina*. Son organismos unicelulares y fotoautótrofos que se agrupan formando tricomas o formas filamentosas⁴⁵. Es una fuente importante de proteína y existen reportes de sus propiedades terapéuticas, las cuales incluyen la prevención e inhibición del cáncer, decremento de niveles de colesterol en sangre, estimulación del sistema inmune, reducción de la nefrotoxicidad de fármacos y metales tóxicos y provee protección contra los efectos perjudiciales de la radiación^{46,47}. También se han observado otras propiedades como modificador de la flora intestinal, pérdida de peso corporal, mejoramiento de estados de malnutrición y actividad antimicrobiana⁴⁸. Otros reportes muestran que la *Spirulina*, tiene un mecanismo preventivo sobre el hígado graso inducido en ratones y ratas después de la administración de una dieta rica en fructosa y que reduce el riesgo de cáncer en las ratas⁴⁷. Se han estudiado la actividad antioxidante de los carotenoides, tocoferoles y extractos fenólicos de la *Spirulina máxima* y se encontró que los compuestos fenólicos responsables de las propiedades antioxidantes fueron los ácidos orgánicos (cafeico, clorogénico, salicílico, sináptico y trans-cinámico) los cuales actúan individual o sinérgicamente^{49,50}. En la tabla 5 se resumen diferentes estudios sobre efectos farmacológicos del alga *Spirulina sp*⁵¹.

Tabla 5. Estudios sobre efectos farmacológicos de alga *Spirulina*. Tomado de Chamorro G y Cols, 2002

Efecto	Modelo	Resumen de datos	Referencias
Antialérgico	Rata	La inoculación intraperitoneal inhibió varios tipos de reacciones alérgicas.	Yang y cols (1997)
		<i>In vitro</i> previno la producción de TNF-alfa por macrófagos peritoneales.	Kim y cols (1998)
Antianémico	Rata	Sola o en combinación con gluten de trigo, aumentó el contenido de hierro y hemoglobina durante la primera semana de la gestación y en lactación.	Kapoor R y cols (1998)
Anticancerígeno	Células	Siete administraciones intravenosas de 100 µg de Ca-SP cada una, obtenido del alga, causaron marcada disminución de tumor pulmonar colonizado con células B15-B6.	Mishima T. y cols (1998)
	Ratón	Redujo el citocromo P450 hepático, inducción de la glutatión-S-transferasa hepática; sin embargo, la actividad de la glutatión-S-transferasa extrahepática, no presentó cambios. Aumentó el tiempo de sobrevida de ratones BALB/c inoculados con el linfosarcoma L517BY.	Mittal A. y cols (1999)
Anticoagulante	Fibroblastos	Un polisacárido aislado del alga <i>Spirulina sp</i> incrementó la producción de activador del plasminógeno, en una línea celular de fibroblastos humanos.	Hayakawa Y., y cols (1996)
Antihepatotóxico	Rata	La <i>Spirulina</i> , el extracto oleoso y la fracción del alga exenta de grasa previnieron del hígado graso inducido por tetracloruro de carbono.	Paz M., (1997)
		La fitocianina, proveniente del alga, protegió contra la hepatotoxicidad producida por tetracloruro de carbono y pulegona.	Torres P., y cols (1998)
Antiinflamatorio	Ratón	La ficocianina, obtenida de <i>Spirulina</i> , redujo la inflamación producida por peróxido.	Vadiraja H., y cols. (1998)
Antiinflamatorio Antiparasitario	Ratón y rata	La ficocianina mostró actividad antiinflamatoria en cinco modelos experimentales.	Romay C. y cols (1998)

Tabla 6. Continuación.

Antiinflamatorio Antiparasitario Antitóxico	Ratón	Extractos de ficocianina inhibieron el edema en oído y las concentraciones de LTB ₄ inducidos por ácido araquidónico.	Romay C. y cols (1999)
	Rata	La ficocianina redujo la actividad de la mieloperoxidasa e inhibió la infiltración celular inflamatoria y el daño en colon.	González R. y cols (1999)
	Ratón	En ratones inoculados con <i>Plasmodium chabaudi</i> no se observó efectos en la parasitemia pero tampoco desarrollaron recrudescencia.	Ramírez C. (1997)
	Rata	Redujo la toxicidad del plomo sobre testículos, peso corporal y diámetro tubular.	Shastri D. y cols (1999)
Antiviral	Células humanas	Un extracto acuoso inhibió en 50% la producción de HIV-1 en líneas de células humanas, células mononucleares y células de Laangerhans.	Ayehunie S. y cols (2001)
Antiviral Cardiovascular	Virus	El Ca-Spirulan inhibió la replicación de HIV-1 Y HSV-1 en líneas de células humanas.	Hayashi K., y cols (1996)
		El reemplazo del ión Ca por iones de Na y K en la molécula de Ca-SP, conservó su actividad antiviral.	Lee J., y cols (2001)
Antiviral Cardiovascular Hipoglicemiante	Anillos aórticos	Administrada durante dos semanas, al 5% en la dieta, mostró efectos sobre las respuestas vasomotoras dependientes del endotelio en anillos de aorta.	Paredes M., y cols (1997)
		Administrada durante seis semanas, al 5% en la dieta, previno los efectos vasomotores de una dieta rica en fructosa (60%) en anillos de aorta.	Paredes M., y cols (1997)
		El extracto alcohólico aumentó la síntesis de NO por el endotelio y de un prostanoides vasoconstrictor por células no endoteliales.	Paredes M. y cols (2001)
	Rata	El extracto metanólico causó disminución del área bajo la curva de glucosa en animales diabéticos, sugiriendo efecto glicemiante. Sin embargo, el extracto diclorometanólico produjo efecto hiperglicemiante en ratones normales y diabéticos, mostrando la existencia de principios antagónicos en el alga.	Torres P., y cols (1998)

Tabla 7. Continuación.

Hipolipidémico	Rata	Disminución del colesterol hepático incrementado por el tetracloruro de carbono.	Hauashi M., y cols (1996)
Inmunoestimulante	Ratón	La incorporación a la dieta de ratones normales mejoró la respuesta de anticuerpos a eritrocitos de carnero. La administración simultánea oral con un antígeno, incrementó la respuesta de IgA en intestino.	Hayashi O., (1998) Qureshi M. y cols (1995)
Inmunoestimulante	Pollo	La administración de un extracto a cultivos de macrófagos peritoneales de pollo aumentó su capacidad fagocítica. La incorporación a la dieta de pollos, mejoró su respuesta secundaria de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero, la respuesta mitogénica a PHA, la actividad fagocítica de macrófagos y la actividad NK.	Qureshi M y cols (1996)
Inmunoestimulante	Gatos	La adición de extracto a cultivos de macrófagos de gato aumentó su capacidad fagocítica.	Qureshi M. y cols (1996)

El Calcium espirulano (Ca-SP) es un polisacárido sulfatado aislado del alga *Spirulina*, potente inhibidor de la replicación de los virus envueltos. Los blancos principales de este polisacárido se ha pensado que son las proteínas que intervienen en los pasos tempranos del anclaje de virus con la célula, la fusión virus-célula o célula-célula. Recientes análisis estructurales de los oligosacáridos derivados del Ca-SP usando espectrometría de masas, indican que se encuentra compuesto por dos tipos de unidades repetidas de disacáridos. Cuando el ion de calcio (Ca^{2+}) se intercambia por el ion sodio (Na^+), la sal de sodio (Na-SP) resultante muestra una actividad antiviral potente contra HSV-1 comparada con Ca-SP, cuando se remueve el Ca^{2+} y se desulfata, se reduce marcadamente la actividad antiviral⁵².

❖ El propóleo es un producto de las abejas derivado de las resinas de las plantas, con una composición química muy compleja el cual ha sido utilizado por la medicina tradicional desde tiempos ancestrales⁵³. Amoros y colaboradores (1992), han descrito que posee una actividad antimicrobial, el propóleo inhibe el crecimiento bacteriano con efectos principalmente sobre las bacterias Gram-positivas y una

acción más limitada contra bacterias Gram-negativas^{53, 54}. También tiene actividad fungicida, principalmente contra las micosis superficiales⁵³. Se conoce poco sobre sus efectos en el sistema inmune; se ha encontrado que el extracto etanólico del propóleo induce la producción de anticuerpos por las células esplénicas del ratón⁵³. *In vivo* e *in vitro* modula la producción por macrófagos de C1q como de la acción del sistema de receptores del complemento en estas mismas células⁵³. Ivanovska y colaboradores en 1995⁵⁵ observaron que el ácido cinámico, uno de los componentes del propóleo, actúa en la defensa del huésped, induciendo la proliferación linfocítica y de la producción de IL-1 e IL-2. Barak y colaboradores (2002), realizaron un estudio para determinar el efecto potenciador sobre el sistema inmune de tres formulaciones, las cuales contenían propóleo, extracto de frambuesa y *Echinacea*, por medio del análisis de su efecto *in vitro* sobre la producción de citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8 y NTF- α) y anti-inflamatorias (IL-10) en monocitos humanos de individuos sanos; encontrándose que la producción de las cinco citocinas se incrementó con los tres compuestos comparados con el control. Cuando se probó la *Equinacea* y el propóleo *in vitro* por separado, se observó que se redujo la producción de citocinas inflamatorias⁵⁶. En el 2006, Kong y colaboradores, investigaron la posibilidad de usar el propóleo como estimulantes del sistema inmune con vacunas activas⁵⁷, determinando los efectos de éstos sobre la proliferación celular de fibroblastos de embriones de pollo en respuesta al virus Newcastle (NVD); los resultados obtenidos sugieren que estos productos tienen un efecto inmunoestimulante así como protector, ya que aumentó la proliferación celular con respecto al grupo control en los embriones infectados por el NVD⁵⁷.

❖ La guayaba o *Psidium guajava* L., pertenece a la clase Magnoliopsida, subclase Rosidae, orden Myrtales, familia Myrtaceae, tribo Myrtae, género *Psidium* del que existen más de 100 especies⁵⁸. Se le considera nativa de México, sin embargo, crece en áreas tropicales y subtropicales del mundo⁵⁹. El principal uso tradicional conocido es como antidiarréico; aunque otros reportes incluyen su uso en gastroenteritis, disentería, gastralgia, y cólicos intestinales. Estudios etnofarmacológicos más recientes muestran que en varias partes del mundo se usa para el tratamiento de numerosas enfermedades como anti-inflamatorio, en pacientes con

diabetes, hipertensión, caries, heridas, analgésico y antipirético⁵⁹ (Tabla 6). El fruto se caracteriza por un bajo contenido en carbohidratos (13.2%), grasas (0.53 %), y proteínas (0.88 %) y un alto contenido en agua (84.9 %). Cien gramos del fruto contienen: 36-50 kcal, 77-86 g de agua, fibra cruda 2.8-5.5 g, calcio 9.1-17 mg, fósforo 17.8-30 mg, hierro 0.30-0.70 mg, vitamina A 200-400 UI, tiamina 0.046 mg, riboflavina 0.03-0.04 mg, niacina 0.6-1.068 mg, ácido ascórbico 100 mg, vitamina B3 40 UI. En la piel del fruto, el principal constituyente es el ácido ascórbico. Con respecto a su actividad biológica, la acción de los agentes anti-alérgicos de la guayaba sobre las células T en ratones ha sido investigada con extractos metanólicos y acuosos, los cuales causaron una potente inhibición de la liberación de histamina por los mastocitos, y bloquearon la inducción *in vitro* de las células T CD4+ mediada por IL-10 en ratón. Los extractos también desplazaron el balance Th1/Th2 a Th1 por atenuación directa de la actividad de las células T⁵⁹.

Tabla 8. Usos etnomédicos de *Psidium guajava*. Tomado de Gutiérrez y cols 2008

Lugar, país	Parte usada	Usos	Preparaciones	Referencias
Colombia, México	Hojas	Gastroenteritis, diarrea, disentería, dolor reumático, heridas, úlceras, dolor dental, tos.	Decocción y cataplasmas	Heinrich et al. (1998), Aguilar et al. (1994).
Indígenas mayas, náhuatl, zapotecas y popolucas de la región Tuxtlas, Veracruz, México	Hojas	Tos, diarrea	Decocción o infusiones	Heinrich et al. (19989, Leonti et al. (2001)
Latinoamérica, Mozambique	Hojas	Diarrea, gastralgia	Infusión o decocción	Pontikis (1996)
México	Brotes, hojas, corteza, fruto	Febrífugo, expulsar la placenta después del nacimiento, resfriados, tos, hipoglicemia, afecciones en la piel, caries, hemorragias vaginales, heridas, deshidratación, enfermedades respiratorias.	Decocción, cataplasma	Martínez y Barajas (1991), Argueta y cols (1994), Linares y Bye (1990), Leonti et al. (2001), Heinrich et al. (1998)
Filipinas	Hojas, corteza, frutos inmaduros, raíces	Astringente, úlceras, heridas, diarrea.	Decocción y cataplasma	Smith and Nigel (1992)
Fiji	Hojas, raíces, fruto maduro	Diarrea, tos, gastralgia, disentería, dolor de dientes, indigestión y constipación.	Jugo, las hojas son exprimidas en agua salada.	World Health Organization (1998)
Brasil	Fruto maduro, flores y hojas	Anorexia, cólera, diarrea, problemas digestivos, disentería, inflamación de las membranas mucosas, laringitis, gingivitis, problemas de piel, faringitis, úlceras, flujo vaginal.	Puré, decocción	Holetz et al.(2002), Cybele et al (1995)

❖ La canela ha sido una de las especias favoritas en el mundo, no solo por su sabor, si no por sus beneficios a la salud. Es nativa del sur de Asia y América pero actualmente también se cultiva en muchos países tropicales como India, China,

Madagascar, Brasil, México y el Caribe. *Cinnamon* (*Cinnamomum cassia*) de la familia de las Lauraceas también es conocida como madera dulce y Gui Zhi⁶⁰, en el este de Asia se considera que tiene efectos medicinales como agente digestivo, antimicrobiano y astringente⁶¹. Posee efectos quimiopreventivos, antiespasmódicos, antiulcerosos, lipolíticos, antisépticos, sedantes, anestésicos, calmantes, hipotérmicos, antifúngicos, antibacterianos, antivirales, antipiréticos, citotóxicos, hipolipidémicos, antiplaquetarios, y también estimula el sistema inmune⁶⁰. Es rica en aceites esenciales y taninos⁶²; muchas de las actividades de la planta, residen en estos aceites, de los cuales el 90% corresponde al cinnamaldehído⁶³, otros son el eugenol, el ácido cinnámico y weitherhina, los cuales son aceites volátiles. Otros constituyentes son el mucilago, diterpenos y proantocianidinas. Los efectos antisépticos, anestésicos, calmantes y citotóxicos se deben al eugenol mientras que los vapores de los aceites cinnamaldehído y cinnamon son potentes antifúngicos. En la medicina oriental se ha usado principalmente en el tratamiento de diarrea, flatulencia, dispepsia, cólicos y resfriados, disminución del apetito, vitalidad disminuida y reumatismo. También se ha usado en influenza, tos, bronquitis, enfermedades febriles, angina artrítica y palpitaciones, estimulante del sistema circulatorio y circulación capilar, espasmos, vómitos, control de infecciones, úlcera gástrica y enfermedades digestivas o gástricas⁶¹. Externamente, es usado como antiséptico en piel para tratar infecciones leves bacterianas y fúngicas⁶⁰. Se ha encontrado una mejor actividad antimicrobiana, contra Gram positivos y negativos, en infusiones acuosas que con decocciones acuosas y aceites esenciales, respectivamente⁶⁰. La canela fue estudiada por Orihara y colaboradores (2008) para observar sus posibles efectos terapéuticos antivirales en gusanos de seda infectados con baculovirus y células Vero infectadas con Herpes virus, encontrándose que la cinnzeilanina (componente detectado en *Cinnamomum cassia* y *zeylancum*) tenía un efecto terapéutico contra la infección con baculovirus, así como inhibición de la proliferación de HSV-1 en células Vero⁶⁴.

La dosis diaria recomendada de la canela cruda es de 2-4 g y del aceite esencial de 0.05-0.2 g dada la actividad antiespasmódica del aldehído cinnámico que conlleva a la disminución de la motilidad intestinal que se ha observado en el ratón⁶³.

❖ El orozuz (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch., *Glycyrrhiza glabra* L.o *Glycyrrhiza inflata* Bat.)⁶⁵, pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Faboideae, tribu Galegeae, género *Glycyrrhiza*⁶⁶. Es comúnmente utilizado por sus propiedades medicinales y para el aparato respiratorio. Se reporta que las afecciones más comunes en las que se observa un efecto benéfico son: el catarro, otitis media, adenitis cervical, laringitis, bronquitis, neumonía, sinusitis, amigdalitis, etc⁶⁷. Se ha demostrado que contiene compuestos con propiedades antiasmáticas como: aceites esenciales (terpinenol), ácidos: ascórbico, glicorrícico, glicorretínico; b-caroteno, glicirricina, quercetina, tetrametil-pirazina. Expectorantes como: ácido benzoico, anetol, astragalina, betaína, camfor, carvacrol, geraniol, glicirricina, guaiacol y timol⁶⁸. Otros estudios muestran que su licor y sus componentes, específicamente la glycyrrhizin, tiene actividad antiviral contra *Herpes simplex* y que son capaces de inactivar irreversiblemente el virus. También ha mostrado inhibir la replicación viral e infectividad del Virus de inmunodeficiencia humana, *Herpes zoster*, *Varicella zoster* y *Citomegalovirus*⁶⁹. El ácido β-Glycyrrhetinico muestra propiedades antiinflamatorias en diferentes modelos animales, su mecanismo de acción aún no se conoce bien, pero se cree que podría ser como el de los glucocorticoides. Kroes y cols (1997), reportan que además de potencializar la actividad de la hidrocortisona, este ácido puede tener un efecto antiinflamatorio directo por inhibición selectiva de la cascada del complemento⁷⁰.

❖ El mentol es una sustancia cristalina con olor picante característico, derivado del aceite de la "*Menta Piperita*" obtenido por arrastre con vapor, congelación y su subsecuente centrifugación para aislar los cristales. La planta pertenece a la familia *Labiatae* que es muy conocida por la volatilidad de los aceites aromáticos del follaje, los cuales son usados en perfumes, productos farmacéuticos, etc⁷¹. También se le conoce como hexahidromitol, metilhidroxiisopropilciclohexano, p-mentan-3-ol o alcanfor de menta. Su fórmula química es $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_9(\text{C}_3\text{H}_7)\text{OH}$ ⁷², se reporta que por inhalación es irritante para las mucosas, por lo que la ingestión a altas dosis puede ser perjudicial, sin embargo, no se reportan efectos específicos en la bibliografía. Puede irritar la piel y causar inflamación ocular⁷².

5. JUSTIFICACIÓN

La influenza es un padecimiento de las vías respiratorias causado por varios virus, entre ellos el subtipo H1N1. En esta patología se observa secreción nasal, odinofagia, fiebre alta, artralgias y en algunos casos puede ser mortal a causa de sus complicaciones. La propagación de esta enfermedad, debido a las características del virus y otros factores, es muy rápida, hasta el punto que puede causar pandemias, como las que se registraron en Estados Unidos en 1918, 1957, 1968⁷³ y recientemente en México en 2009. Con el objetivo de disminuir la transmisión del virus, los gobiernos de diferentes naciones han implementado varias medidas sanitarias^{73,74,75}, entre éstas se encuentra, además de la suspensión de labores, la vacunación y el uso de medicamentos⁷⁵. Los medicamentos, como el oseltamivir, el zanamivir, la amantadina y/o la rimantadina han mostrado que pueden disminuir los síntomas y mortalidad de esta infección, sin embargo, sus altos costos y la alta demanda que pudiera presentarse durante una epidemia, los hacen inaccesibles a algunos sectores de la población⁷³, además, dichos medicamentos han generado resistencia, y tienen algunos efectos secundarios indeseables como náuseas, bronquitis aguda, insomnio, tos, vértigo, entre otros^{73, 74}. Por tal motivo varios grupos de investigación están evaluando la posibilidad de desarrollar nuevos fármacos.

Una de las alternativas médicas más utilizadas por la población la constituye la herbolaria. Para el tratamiento de la influenza se han utilizado algunos fitofármacos que han mostrado tener efectos benéficos a nivel clínico. Sin embargo, pocos estudios se han enfocado en valorarlos en los procesos biológicos a nivel molecular. En este trabajo se realizó, por tanto, la valoración de un fitofármaco que consiste en una mezcla de guayaba, orozuz, canela, alga espirulina, propóleo y mentol, para el tratamiento de la influenza, determinando los procesos histopatológicos e inmunológicos que sustenten los efectos clínicos de esta formulación fitofarmacéutica.

6. OBJETIVOS

❖ Objetivo general:

- Evaluar el efecto terapéutico de una formulación fito farmacológica en un modelo murino de influenza tipo A.

❖ Objetivos específicos:

- Obtener diferentes extractos de la formulación fito farmacológica compuesta por guayaba, orozuz, canela, alga espirulina, propóleos y mentol.
- Estandarizar un modelo murino de influenza estacional.
- Evaluar el efecto del fito fármaco mediante evaluación clínica, histopatológica y molecular.
- Determinar los componentes mayoritarios de la fracción del fito fármaco con actividad antiviral y/o antiinflamatoria.

7. HIPÓTESIS

La formulación fito farmacológica disminuirá los signos clínicos de la infección causada por el virus de la influenza, lo que se relacionará con posibles eventos biológicos en el pulmón, que disminuyan la infección viral y/o el efecto inflamatorio.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Obtención de los extractos con diferente polaridad

8.1.1 Extractos de hexano, acetato de etilo, y agua.

Para los extractos de acetato de etilo y hexano se pesó cada una de las especies de acuerdo a la tabla 7 y después de disminuir el tamaño se colocaron en un matraz de 6 litros junto con 2 litros del disolvente y se dejó la mezcla en maceración por 7 días, se filtró y se llevó al rotavapor a temperatura de 50°C. El proceso se realizó por duplicado.

El extracto obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

Para el extracto acuoso se colocaron las especies en las cantidades descritas en la tabla 8 en 2 litros de agua, dejando a ebullición por 10 minutos, posteriormente se filtró y se liofilizó.

Tabla 9. Especies vegetales utilizadas para el extracto hexánico y acetato de etilo.

Especie	Cantidad (g)
Guayaba	20
Canela	20
Orozuz	20
Alga espirulina	6
Propóleo	3

Tabla 10. Especies y cantidades utilizadas para el extracto acuoso.

Producto	Cantidad (g)
Guayaba	200
Canela	5
Orozuz	5
Alga espirulina	5
Propóleo	5
Mentol	0.250

8.1.2 Obtención del aceite esencial de la formulación fitofarmacéutica.

La obtención del aceite esencial de la formulación se realizó con el método de hidrodestilación, para lo cual, cada uno de los productos se molieron; y se cargaron en un hidrodestilador. El vapor de agua se inyectó mediante un distribuidor interno, y conforme el vapor entró en contacto con los vegetales, se llevó a ebullición y liberó el aceite esencial contenido en forma de vapor. En el condensador, la mezcla de aceite esencial y vapor de agua condensados formó una emulsión líquida la cual fue separada por inmiscibilidad.

8.2 Producción viral.

La replicación de virus de influenza se realizó en cultivos de células MDCK (Madin Darby canine kidney cells) a 33°C, en presencia de suero fetal bovino durante 2 días. Las células se infectaron con el virus de la cepa vacunal H1N1 estacional y se incubaron por 4 días más, al cabo de los cuales las células fueron lisadas para obtener el virus y realizar la titulación viral por el método de Spearman & Kärber⁷⁶, el cual consistió en colocar en una placa de 8 x 12 pozos, 100 µL de medio de mantenimiento, posteriormente se tomaron 100 µL del virus con dilución 1:1000, homogenizando con la micropipeta; de este homogenizado se tomaron 100 µL y se repitió la misma acción en todos los pozos hasta la columna 11; quedando en la columna 1 una dilución de 1:1000, en la 2ª 1:2000, y así respectivamente. Posteriormente se tripsinizó una caja de cultivo celular con una confluencia al 100% y se tomaron 100 µL de ésta para colocarlas en cada uno de los pozos, quedando la columna 12 como el testigo celular. La placa se colocó en la incubadora y se observó diariamente hasta no presentar el efecto citopático en los pozos. Una vez obtenidos estos resultados, se aplicó la fórmula de Spearman & Kärber para obtener el título viral del cultivo en cuestión.

8.3 Estandarización del modelo murino de influenza

Se utilizaron ratones hembras *Balb/C* libres de patógenos, de 4 semanas de edad, las cuales fueron agrupados en cajas de policarbonato con tapas de metal por 5 días

para su adaptación, alimentándose *ad libitum*⁷⁷. De acuerdo con SEA animalario omg (Servicio de Anestesiología HCV-UCM)⁷⁸ se estableció la dosis de ketamina/xilacina para inducir la anestesia durante 20 minutos. Posteriormente, los animales se infectaron instilando intranasalmente 90 μ L de la solución viral con una dosis letal al 100% (LD₁₀₀) de la cepa de vacunal para influenza tipo A estacional H1N1⁷⁹, esto correspondió al primer pase; los animales se pesaron y se observaron diariamente por 4 días, calificándolos con la escala propuesta por Menéndez y cols, tabla 9; al 4º día se sacrificaron para obtener los pulmones de cada uno de ellos, un tercio de un pulmón se colocó en formaldehído al 10% para su estudio histopatológico y el resto se homogenizó con 500 μ L de medio MEM para inocular con 80 μ L de este homogenizado (segundo pase) al otro grupo constituido por 3 ratones, a los cuales después del mismo tiempo se sacrificaron para usar el homogenizado en la misma cantidad en la inoculación de un tercer grupo que correspondió al tercer pase⁸¹.

8.4 Evaluación del efecto del fitofármaco.

Se realizó una prueba de toxicidad de los extractos en los animales sanos, con ello se administraron los extractos de acetato de etilo, hexánico, acuoso y el aceite esencial vía intraperitoneal, así como aceite esencial vía intranasal y los respectivos vehículos: DMSO, y tween 80 al 5% a 25, 50 y 100 mg/kg. Los animales se observaron y se pesaron durante 7 días; al término del ensayo se efectuó la necropsia para evaluar el tejido pulmonar mediante histopatología (células inflamatorias y destrucción del tejido).

Con los animales infectados del tercer pase, se formaron 6 grupos a los cuales se administró una dosis de 100 μ L/kg de aceite esencial, extracto hexánico y de acetato de etilo vía intraperitoneal y como controles se empleó DMSO para los grupos 1, 2 y 3; al cuarto grupo se le administró 100 mg/kg de aceite esencial por vía intranasal en tween 80 al 5%; al quinto 100 μ L de DMSO intraperitoneal y al sexto grupo 30 μ L de tween 80 al 5%. Al séptimo no se le aplicó ningún tratamiento. Se observaron durante 5 días y se les otorgó un puntaje de la escala de Menéndez y cols.⁸¹, al

mismo tiempo se pesaron para establecer el daño y/o la mejoría en el modelo de infección.

Vía de administración oral: Finalmente en otros animales se emplearon oralmente 100 mg/kg de extracto de acetato de etilo en tween 80 al 5%, un segundo grupo 100 mg/kg de extracto hexánico en el mismo vehículo, al tercero 100 mg/kg de extracto acuoso resuspendido en solución salina al 9%; al cuarto, según la recomendación de la OMS sobre la administración del aceite esencial de canela en adulto promedio de 0.05 g/día, lo que correspondió a 0.1452 mg ratón/día; al quinto grupo se le administró tween 80 al 5%; y el sexto grupo constituyó el grupo control enfermo. A estos animales también se les pesó diariamente y se les evaluó según la escala clínica de signos (Tabla 9).

Tabla 11. Puntaje otorgado a los signos clínicos de animales inoculados. Tomado de: Menéndez y col. 2005

PUNTAJE	SIGNOS CLINICOS
1	Sano, sin signo de enfermedad.
2	Erizamiento en la zona del cuello en especial.
3	Erizamiento, respiración agitada, letargo.
4	Respiración forzada, temblores y letargo.
5	Paso o marcha anormal, reducción de la movilidad, respiración forzada, cianosis de la cola y las orejas.
6	Muerte.

Todos los animales fueron sacrificados a los 4 días postinfección, se obtuvo el tejido pulmonar de cada uno de los animales, y se colocaron en formaldehído al 10% para evaluarlos histopatológicamente y otra parte en paraformaldehído al 4% para realizar inmunohistoquímica.

Administración profiláctica: Como se describe posteriormente los resultados obtenidos con el aceite esencial vía intranasal fueron benéficos en el modelo, por lo que se decidió administrar este extracto profilácticamente; para ello, 7 días antes de infectar a los animales se les administró aceite esencial a la dosis descrita

anteriormente mediante vía intranasal como vía nebulizada; después de la infección se les aplicó la misma evaluación que a los grupos anteriores.

8.4.1 Evaluación histopatológica

Para realizar esta evaluación, el tejido pulmonar fue fijado en formaldehído/buffer 10%, posteriormente deshidratado con lavados de etanol al 70, 90 y 100%, aclarado en xileno e infiltrado en parafina a 60°C. Se realizaron cortes de 3 µm de espesor en micrótopo rotatorio (American Optical 820) y se montaron sobre los portaobjetos tratados con gelatina. Los tejidos se tiñeron con hematoxilina y eosina; posteriormente se desparafinaron con xileno, se hidrataron con etanol en graduaciones decrecientes, hasta agua destilada⁸⁰. Posteriormente se tiñeron con hematoxilina de Harris por 2 minutos, se diferenciaron con alcohol ácido al 1% y solución amoniacal, se contrastaron con eosina-floxina por 30 segundos y se deshidrataron con etanol a graduación creciente; se aclararon con xileno y finalmente, se cubrieron utilizando DPX.

8.4.2 Inmunodetección de NF-κB.

Los cortes se fijaron en paraformaldehído al 4%/PBS, pH 7.4 a 4°C hasta su uso. Se impregnaron en sacarosa al 10%/PBS toda la noche, este procedimiento funciona como crioprotector. Los cortes se realizaron en criostato (Leica CM30505), de 5 µm de espesor, se montaron en portaobjetos gelatinizados, y se conservaron en congelación a -20°C.

Los criocortes fueron rehidratados con PBS frío pH 7.4 por 10 min, se realizó un pretratamiento para eliminación de RNA citoplásmico con cloruro de amonio 5mM por 10 minutos y HCl 1M por 2 h a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se permeabilizaron con PBS tritón X-100 al 0.2% y se bloquearon con albúmina bovina libre de IgG al 0.2% por 20 min para eliminar el marcaje inespecífico. Se incubaron con 50 µL del anticuerpo primario (anti NF-κB) a una dilución 1:50 en PBS-T, durante una hora y media, en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario a una dilución 1:60 en

PBS-T durante dos horas a temperatura ambiente, en cámara húmeda y protegidos de la luz. Después se realizó la contratinción con yoduro de propidio ($2.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) por 5 min; finalmente se montaron con medio Vectashield y se sellaron con barniz de uñas. Los cortes se conservaron a 4°C hasta su observación microscópica.

El análisis de las muestras se realizó con el microscopio confocal de barrido láser (ISM 710, Carl Zeiss, Alemania; del Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional). Las adquisición de las imágenes se hicieron en las siguientes condiciones: Modo Best Signal, Modo de escaneo Plane (2D), objetivo Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27, Promedio de imagen 1, Pinhole de $48 \mu\text{m}$, láseres Track 1 488nm al 3% de poder y el Track 2 514nm al 2% de poder y filtros 493-523nm.

Análisis químico de aceite esencial: para la identificación de los componentes del aceite esencial de la formulación fitofarmacéutica se utilizó 1 mL del aceite obtenido y se diluyó en 49 mL de diclorometano para su posterior inyección en el cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard (Palo Alto, California, E.U.) serie II, 5890 acoplado a un espectrómetro de masas de flujo de electrones modelo 5972 de la misma marca. Se utilizó una columna capilar HP-FFAP (Free Fatty Acid Phase) # 19091F-112 de 25 mm de longitud y espesor de película de 0.52 mm, polar y con intervalo de temperatura de $60\text{-}240^{\circ}\text{C}$, el radio de fase de la columna fue de 150:0.32 mm.

9. RESULTADOS

9.1 Obtención y caracterización fitoquímica de la formulación

9.1.1 Extractos de aceite esencial, hexánico, de acetato de etilo y acuoso.

Se obtuvieron el aceite esencial, los extractos de hexano, de acetato de etilo y acuoso de la formulación fitofarmacológica. El rendimiento obtenido fue de 0.031%, 1.17%, 17.47% y 8.558% respectivamente (tabla 10).

Tabla 12. Rendimiento de los diferentes extractos

Extracto	Peso de material vegetal	Extracto obtenido	Rendimiento
Aceite esencial	33.58 kg	10.5 mL	0.031%
Hexánico	69.125 g	0.81 g	1.17%
De Acetato de etilo	69.125 g	12.08 g	17.47%
Acuoso	220.250 g	18.83 g	8.558%

Con respecto al aceite esencial, se pesó un mL de aceite puro en la balanza analítica para calcular la densidad de éste y poder dosificarlo en los animales. Se obtuvo una densidad de 0.8753g/mL a 27°C.

9.2 Producción viral

Una vez recuperado el sobrenadante del cultivo celular infectado con virus de influenza A, el virus se tituló mediante el método de Spearman & Kärber obteniéndose los datos mostrados en la tabla 11.

Tabla 13. Datos de titulación viral

Pozo	Relación pozos con ECP/pozos sin ECP*	Proporción
1	8/8	1
2	8/8	1
3	8/8	1
4	8/8	1
5	5/8	0.6
6	3/8	0.3
7	1/8	0.1
8	0/8	0
9	0/8	0
10	0/8	0
11	0/8	0

* EPC: efecto citopático.

Posteriormente se realizó la suma de las proporciones (s), que en este caso fue de 5 y se sustituyó en la siguiente fórmula:

$$T_{CID50} = L \cdot d^*(s-0.5)$$

En donde T_{CID50} es la concentración infectiva al 50% de cultivos celulares, L es el logaritmo negativo de la dilución más baja, d es el logaritmo del factor de la dilución que en este caso es de 1:1000 y s es la suma de la proporción de pozos positivos.

$$T_{CID50} = \log 1000 - \log 2 * (5-0.5) = 10^4 \text{ partículas virales infectivas.}$$

9.3 Estandarización del modelo murino de Influenza

Los animales sometidos a la infección por el virus de influenza se anestesiaron con 50/5 mg/kg de Ketamina/Xilacina en 100 mL de agua inyectable, para lo cual fueron pesados para calcular la cantidad de la anestesia. Mientras estaban bajo el efecto de la anestesia se observó erizamiento del pelo en la región cervical. Cada animal fue infectado con 66 μ L del virus con título de 1×10^5 (33 μ L en cada narina), administrando lentamente para evitar interrupción del flujo aéreo a las vías respiratorias. Por seguridad biológica, los animales fueron manipulados en una campana de flujo laminar previamente limpia y estabilizada: Una vez que fueron infectados, se mantuvieron bajo la luz de un foco incandescente de 50 watts para

evitar la pérdida de calor. Cada uno de los animales fueron pesados y calificados con la escala de Menéndez⁸¹. Los datos obtenidos se encuentran desglosados en las tablas 12 y 13; en donde se observa que en promedio los animales tienen una ganancia de peso del 1.27% y no mostraron cambios clínicos. Al 4º día postinfección se realizó el sacrificio de estos animales con la finalidad de extraer los pulmones. El análisis histopatológico del tejido de los animales correspondientes al primer pase (figura 11, B) mostró una estructura similar a la normal (Figura 11, A), es decir, con paredes alveolares íntegras y delgadas, sin presencia de células inflamatorias. Otra parte de los pulmones se homogenizó con el fin de realizar el 2º pase en un nuevo grupo de animales.

Tabla 14. Peso de los animales en gramos del primer pase.

Ratón	0 h	24 h	72 h
1	18.69	17.71	19.49
2	13.13	12.76	13.83
3	17.22	15.99	16.27
4	15.78	15.86	15.93
5	19.36	18.83	19.16
6	18.58	17.86	18.24
Promedio	17.13	16.50	17.15
SD	2.34	2.16	2.19

Tabla 15. Puntaje clínico para infección de influenza otorgado a los animales del primer pase.

Ratón	0 h	24 h	72 h
1	1	1	1
2	1	1	1
3	1	1	1
4	1	1	1
5	1	1	1
6	1	1	1

Los datos del peso y el puntaje clínico de los animales del segundo pase se desglosan en las tablas 14 y 15; en donde se observa que en promedio el grupo experimental disminuyó su peso corporal en un 16.51 % y mostraron signos clínicos de enfermedad a las 24 h; como leve erizamiento del pelo en la zona cervical. A las 72 h se observó que el erizamiento del pelo se extendió a la totalidad del cuerpo, pero sin otros cambios clínicos; éste erizamiento se mantuvo hasta las 96 h. Las secciones histológicas del parénquima pulmonar mostraron un patrón intersticial caracterizado por engrosamiento de las paredes alveolares a expensas de infiltrado inflamatorio crónico de predominio linfocitario, además de ruptura de algunas paredes alveolares y confluencia de los espacios aéreos (Figura 11, C). Comparativamente el parénquima pulmonar de los controles presenta arquitectura acinar conservada.

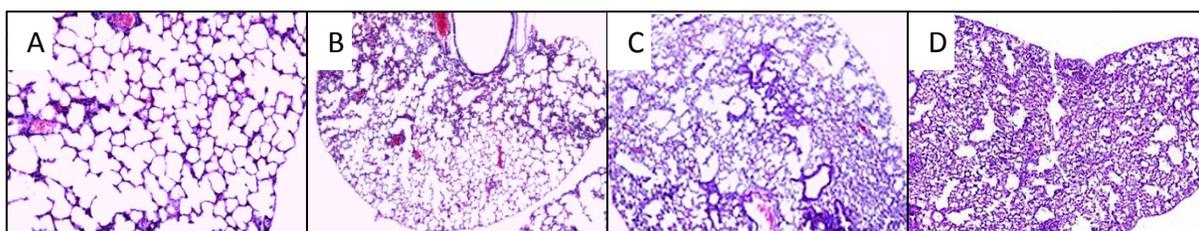


Figura 11. Valoración histológica de cortes pulmonares (Tinción: eosina y hematoxina, 10x). A. Pulmón normal; B. Pulmón primer pase; C. Pulmón segundo pase; D. Pulmón tercer pase.

Tabla 16. Peso de los animales en gramos del segundo pase

Ratón	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	16.78	17.25	16.78	16.31	16.15
2	18.67	17.77	16.42	15.06	14.03
3	18.27	18.64	16.84	15.03	13.88
4	17.58	16.97	17.00	16.42	15.57
5	17.83	16.40	16.50	15.98	14.68
6	19.57	18.59	18.54	17.94	15.57
Promedio	18.12	17.60	17.01	16.12	14.98
SD	0.93	0.86	1.01	1.13	0.92

Tabla 17. Puntaje clínico para infección de influenza otorgado a los animales del segundo pase

Ratón	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	1	2	2	2/3	2/3
2	1	2	2	2/3	2/3
3	1	2	2	2/3	2/3
4	1	2	2	2/3	2/3
5	1	2	2	2/3	2/3
6	1	2	2	2/3	2/3

A un tercer grupo se les aplicó el homogenizado pulmonar de los animales del 2º pase, con la misma técnica de anestesia e infección. Estos animales disminuyeron en promedio 21.35% de su masa corporal y a las 72 h mostraron erizamiento de todo el cuerpo así como letargo pronunciado; la respiración se observó agitada pero sin rastros de insuficiencia respiratoria, por lo que su puntaje a este tiempo fue de 3 de acuerdo a la escala de Menéndez y cols (2009). Las secciones correspondientes al tercer pase mostraron distorsión de la arquitectura normal con engrosamiento importante del intersticio por abundante inflamación crónica, hiperplasia de neumocitos y fibroplasia con disminución de los espacios aéreos (Figura 11, D).

Tabla 18. Peso de los animales en gramos del tercer pase

Ratón	0 h	24 h	72 h	96 h
1	20.15	19.05	15.46	14.47
2	16.51	16.42	13.30	12.78
3	18.50	17.37	14.15	13.52
4	18.46	18.65	17.92	17.21
5	19.41	19.51	15.74	13.61
6	15.22	14.90	12.74	11.05
Promedio	18.04	17.65	14.89	13.77
SD	1.73	2.27	1.96	2.04

Tabla 19. Puntaje clínico para infección de influenza otorgado a los animales del tercer pase

Ratón	0 h	24 h	72 h	96 h
1	1	2	3	3
2	1	2	3	3
3	1	2	3	3
4	1	2	3	3
5	1	2	3	3
6	1	2	3	3

Para demostrar que la disminución de la masa corporal tuvo diferencia estadísticamente significativa, y aceptar esta técnica como adecuada para establecer nuestro modelo animal, se analizaron los datos con el paquete estadístico GraphPad Prism en una prueba de ANOVA de una vía y un test de comparación múltiple de Tukey, en donde se demuestra una diferencia entre los animales control y los animales del segundo y tercer pase; así como el primer pase con el segundo y tercer pase, con una $p \leq 0.05$. Individualmente, los animales del grupo control y los del primer pase no tienen diferencia estadísticamente significativa en el cambio de sus pesos al inicio y al final, mientras que los del segundo y tercer pase sí mostraron esta diferencia. En la figura 12 se encuentra graficado, el cambio neto de los pesos de los animales correspondientes a los diferentes grupos, en donde se observa que los animales del segundo y tercer grupo presentaron una disminución de peso mayor que los del primer pase, los cuales se comportaron de manera similar a los animales control.

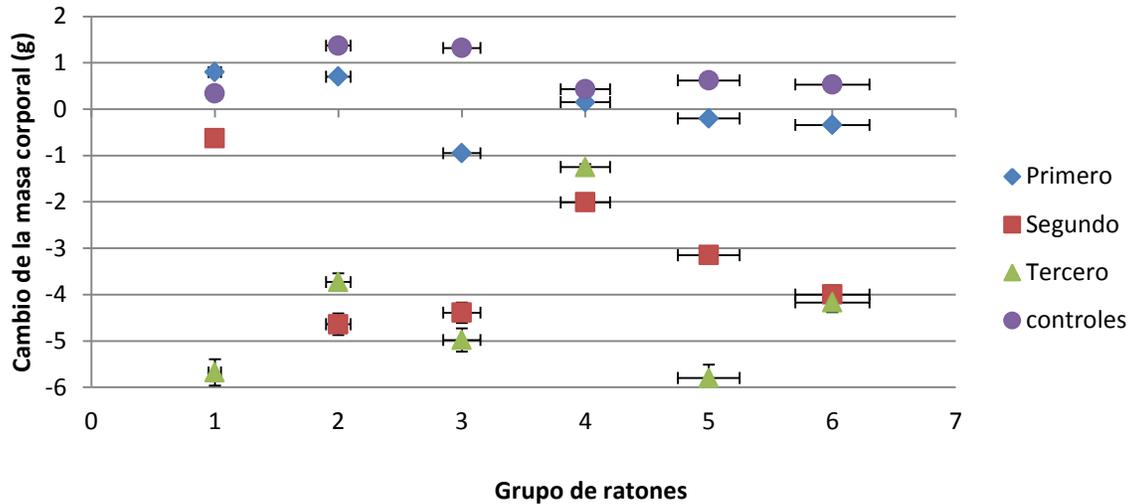


Figura 12. Cambio ponderal de los animales en el establecimiento del modelo de infección por influenza A. Azules: primer pase, rojos: segundo pase, verdes: tercer pase, morados: controles

Para obtener un “stock” suficiente de virus adaptado a los pulmones murinos, se infectaron 6 animales con el virus obtenido en cultivo de células MDCK, los cuales se sacrificaron a los 4 días postinfección, se realizó un homogenizado de pulmón y con él se inocularon a 14 animales más que correspondieron al 2º pase; éstos se sacrificaron al 5º día y se volvió a preparar homogenizado pulmonar para inocular a 24 animales más, de los cuales al 5º día se obtuvo el “stock” del virus altamente infectivo para utilizar en los experimentos de evaluación del fitofármaco.

9.4 Evaluación del efecto del fitofármaco

Una vez que se obtuvo una cantidad viral suficiente para los ensayos, se inició la evaluación experimental del efecto del fitofármaco con un grupo de 30 ratones, con un rango de peso entre 14.92 y 20.19 g, después de 5 días de adaptación, se calculó la dosis de anestesia para cada uno de ellos, y posterior a esta aplicación se inoculó el virus por vía intranasal como se describió anteriormente; 24 horas posinfección los animales se pesaron nuevamente y se calculó la cantidad de extracto para dosificar 100 mg/kg/día a cada animal, de acuerdo al grupo perteneciente mostrado en la figura 13.

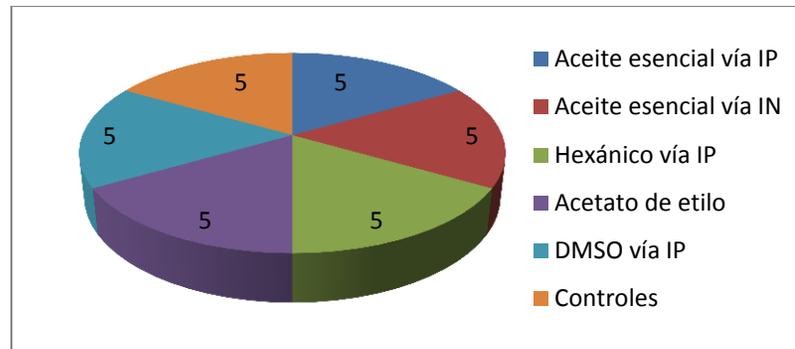


Figura 13. Distribución del primer grupo infectado con tratamiento

Cada animal se pesó y se calificó diariamente según la escala de signos clínicos⁸¹. Con los datos obtenidos se realizó una prueba de hipótesis mediante t-Student para observaciones pareadas con la finalidad de probar si existe alguna diferencia en la media de los pesos de los ratones al iniciar y al finalizar el tratamiento. Se consideró una $p \leq 0.05$ y un nivel de confianza de 95%. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 18, observándose que en los seis grupos existe una diferencia significativa. Cabe mencionar que se tomaron únicamente los datos de la 0 h a las 72 h, con la finalidad que los diferentes grupos se encontraran en las mismas condiciones de tiempo y tamaño de muestra.

Tabla 20. Diferencia del peso de los ratones al inicio y al final del tratamiento con diferentes extractos de la formulación fitofarmacéutica vía intraperitoneal.

Grupo experimental	Valor <i>p</i>	Interpretación
Aceite esencial 100 mg/kg en DMSO	0.0001	Si hay diferencia
Hexano 100 mg/kg en DMSO	0.0026	Si hay diferencia
Acetato de Etilo 100 mg/kg en DMSO	0.0069	Si hay diferencia
Aceite Esencial 1 mg vía INTRANASAL	0.0007	Si hay diferencia
Vehículo DMSO	0.0003	Si hay diferencia
Control Infectados sin ningún tratamiento	0.0003	Si hay diferencia
Control negativo	0.8763	No hay diferencia

*Valores obtenidos en la prueba t-Student para muestras pareadas al 95% de confianza.

Posteriormente, se realizó una prueba de hipótesis mediante t-Student para comparar la diferencia de medias finales en los pesos de los ratones entre los diferentes extractos de la formulación fito farmacéutica por vía intraperitoneal. De acuerdo a la tabla 19, se observa que no hay diferencia entre éstos, considerando un nivel de confianza de 95% y una $p \leq 0.05$.

Tabla 21. Diferencia en las medias finales de los pesos de los animales tratados con los diferentes extractos de la formulación fitofarmacéutica, vía intraperitoneal.

Grupo experimental	Valor <i>p</i>	Interpretación
Aceite esencial 100 mg/kg en DMSO vs Hexano 100 mg/kg en DMSO	0.9843	No hay diferencia
Aceite esencial 100 mg/kg en DMSO vs Acetato de Etilo 100 mg/kg en DMSO	0.7369	No hay diferencia
Aceite esencial 100 mg/kg en DMSO vs Aceite esencial 1 mg vía INTRANASAL	0.2122	No hay diferencia
Aceite esencial 100 mg/kg en DMSO vs Vehículo DMSO	0.0861	No hay diferencia

Tabla 19. Continuación.

Aceite esencial 100 mg/kg en DMSO vs Control Infectados sin ningún tratamiento	0.3986	No hay diferencia
Hexano 100 mg/kg en DMSO vs Acetato de Etilo 100 mg/kg en DMSO	0.8190	No hay diferencia
Hexano 100 mg/kg en DMSO vs Aceite esencial 1 mg vía INTRANASAL	0.5923	No hay diferencia
Hexano 100 mg/kg en DMSO vs Vehículo DMSO	0.3440	No hay diferencia
Hexano 100 mg/kg en DMSO vs Control Infectados sin ningún tratamiento	0.5927	No hay diferencia
Acetato de Etilo 100 mg/kg en DMSO vs Aceite esencial 1 mg vía INTRANASAL	0.7675	No hay diferencia
Acetato de Etilo 100 mg/kg en DMSO vs Vehículo DMSO	0.4698	No hay diferencia
Acetato de Etilo 100 mg/kg en DMSO vs Control Infectados sin ningún tratamiento	0.7651	No hay diferencia
Aceite esencial 1 mg vía INTRANASAL vs Vehículo DMSO	0.4844	No hay diferencia
Aceite esencial 1 mg vía INTRANASAL vs Control Infectados sin ningún tratamiento	0.9779	No hay diferencia
Vehículo DMSO vs Control Infectados sin ningún tratamiento	0.6303	No hay diferencia
Control negativo Vs Todas las demás condiciones	0.0000	Si hay diferencia

*Valores obtenidos en la prueba t-Student para la diferencia de medias al 95% de confianza.

Posteriormente, se analizaron los cortes histopatológicos observando que en los animales tratados con los diferentes extractos, no hubo diferencia con los animales infectados sin tratamiento (controles); por lo que se decidió probar los extractos por una vía diferente; en el caso del aceite esencial se cambió la dosis, en esta ocasión nos basamos en la recomendación de la OMS de 0.05 g/día de aceite esencial de canela vía oral en un adulto promedio (70 kg); que corresponde 7.14×10^{-4} g/kg humano/día; para adaptarlo al metabolismo de los ratones (*Mus musculus*) se le administró diez veces más la dosis adecuándolo al peso del animal⁸², y de acuerdo a la densidad del aceite, la posología del aceite fue de 8.15×10^{-3} µl de aceite/g ratón/día. Se observaron diariamente y se les otorgó la puntuación de la escala de Menéndez y cols (2009). Como en el caso anterior, a los datos obtenidos se les aplicó el mismo modelo estadístico, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 20; en donde se observa que en los seis grupos, independientemente del extracto administrado, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los pesos iniciales y finales de los ratones con el 95% de confianza y una $p \leq 0.005$, lo que sugiere que la infección prosiguió su evolución como en los animales no tratados. Se precisa mencionar que se tomaron los datos únicamente hasta las 120 h con la finalidad de uniformizar las condiciones para los diferentes extractos.

Tabla 22. Diferencia del peso de los animales al inicio y al final del tratamiento con diferentes extractos de la formulación fitofarmacéutica, vía oral.

Grupo experimental	Contraste	Nivel de confianza	α	Valor p	Interpretación
Aceite esencial 8.15×10^{-3} ml/g en tween al 5%	Peso de los ratones al inicio vs Peso de los ratones al final	95%	0.05	0.0000	Existe diferencia
Hexano 100 mg/kg en tween 80 al 5%	Peso de los ratones al inicio vs Peso de los ratones al final	95%	0.05	0.0000	Existe diferencia
Acetato de Etilo 100 mg/kg en tween 80 al 10%	Peso de los ratones al inicio vs Peso de los ratones al final	95%	0.05	0.0000	Existe diferencia
Agua 100 mg/kg en sol. Salina	Peso de los ratones al inicio vs Peso de los ratones al final	95%	0.05	0.0000	Existe diferencia
Vehículo tween al 5%	Peso de los ratones al inicio vs Peso de los ratones al final	95%	0.05	0.0000	Existe diferencia
Control Infectados sin ningún tratamiento	Peso de los ratones al inicio vs Peso de los ratones al final	95%	0.05	0.0079	Existe diferencia

*Resultados obtenidos en la prueba t-Student para muestras pareadas al 95% de confianza

Como en el ensayo anterior, también se compararon las medias de los pesos finales entre cada uno de los grupos con los diferentes tratamientos, de lo cual se observó que no hubo diferencia estadísticamente significativa; lo que sugiere que ninguno de los extractos influyó en la evolución de la patología estudiada (tabla 21).

Tabla 23. Diferencia en las medias finales de los pesos de los animales tratados con los diferentes extractos de la formulación fitofarmacéutica, vía intraperitoneal,.

Grupo experimental	Nivel de confianza	α	Valor p	Interpretación
Aceite esencial 8.15x10 ⁻³ ml/g en tween al 5% Hexano 100 mg/kg en tween 80 al 5%	95%	0.05	0.5430	No hay diferencia
Aceite esencial 8.15x10 ⁻³ ml/g en tween al 5% vs Acetato de Etilo 100 mg/kg en tween 80 al 10%	95%	0.05	0.4875	No hay diferencia
Aceite esencial 8.15x10 ⁻³ ml/g en tween al 5% vs Agua 100 mg/kg en sol. Salina	95%	0.05	0.1690	No hay diferencia
Aceite esencial 8.15x10 ⁻³ ml/g en tween al 5% vs Vehículo tween al 5%	95%	0.05	0.6724	No hay diferencia
Aceite esencial 8.15x10 ⁻³ ml/g en tween al 5% vs Control Infectados sin ningún tratamiento	95%	0.05	0.4067	No hay diferencia
Hexano 100 mg/kg en tween 80 al 5% vs Acetato de Etilo 100 mg/kg en tween 80 al 10%	95%	0.05	0.9246	No hay diferencia
Hexano 100 mg/kg en tween 80 al 5% vs Agua 100 mg/kg en sol. Salina	95%	0.05	0.5839	No hay diferencia
Hexano 100 mg/kg en tween 80 al 5% vs Vehículo tween al 5%	95%	0.05	0.7591	No hay diferencia
Hexano 100 mg/kg en tween 80 al 5% vs Control Infectados sin ningún tratamiento	95%	0.05	0.9160	No hay diferencia
Acetato de Etilo 100 mg/kg en tween 80 al 10% vs Agua 100 mg/kg en sol. Salina	95%	0.05	0.4106	No hay diferencia

Tabla 21. Continuación.

Acetato de Etilo 100 mg/kg en tween 80 al 10% vs Vehículo tween al 5%	95%	0.05	0.7697	No hay diferencia
Acetato de Etilo 100 mg/kg en tween 80 al 10% vs Control Infectados sin ningún tratamiento	95%	0.05	0.8022	No hay diferencia
Agua 100 mg/kg en sol. Salina vs Vehículo tween al 5%	95%	0.05	0.2843	No hay diferencia
Agua 100 mg/kg en sol. Salina vs Control Infectados sin ningún tratamiento	95%	0.05	0.6207	No hay diferencia
Vehículo tween al 5% vs Control Infectados sin ningún tratamiento	95%	0.05	0.6181	No hay diferencia
Controles negativos Vs Todas las condiciones	95%	0.05	0.0000	Existe diferencia

* Valores obtenidos en la prueba t-Student para la diferencia de medias al 95% de confianza.

La tabla 22 se muestra la comparación de las medias finales de los pesos de los animales administrados como tratamiento o profilaxis vía intranasal o mediante nebulizaciones. Como se puede apreciar, las medias de los pesos finales de los animales tratados con aceite esencial vía intranasal y los animales tratados profilácticamente con aceite esencial nebulizado; así como en los animales tratados con aceite esencial intranasal comparados con los tratados profilácticamente con aceite esencial vía intranasal, muestran diferencias estadísticamente significativas

Tabla 24. Diferencia en las medias finales de los pesos de los animales administrados con los diferentes extractos como tratamiento o profilaxis vía intranasal o mediante nebulizaciones.

Grupo experimental	Valor p	Decisión
Tween 80 vapor profiláctico vs Aceite vapor profiláctico	0.4395	No hay diferencia
Profiláctico tween 80 neb. vs Profiláctico tween 80 IN	0.7211	No hay diferencia
Profiláctico tween 80 neb. vs Profiláctico aceite IN	0.2333	No hay diferencia
Profiláctico tween 80 neb. vs Infectados sin tratamiento	0.0993	No hay diferencia
Profiláctico tween 80 neb. vs Tratados con Tween 80 IN	0.1688	No hay diferencia
Profiláctico tween 80 neb. vs Tratados con tween 80 neb.	0.3912	No hay diferencia
Profiláctico tween 80 neb. vs Infectados, aceite neb.	0.0524	No hay diferencia
Profiláctico tween 80 neb. vs Tratados con antiviral	0.5296	No hay diferencia
Profiláctico aceite neb. vs Profiláctico tween 80 IN	0.9239	No hay diferencia
Profiláctico aceite neb. vs Profiláctico aceite IN	0.4942	No hay diferencia
Profiláctico aceite neb. vs Infectados sin tratamiento	0.1374	No hay diferencia
Profiláctico aceite neb. vs tratados con tween 80 IN	0.3068	No hay diferencia
Profiláctico aceite neb. vs Tratados con aceite IN	0.0048	Si hay diferencia
Profiláctico aceite neb. vs Infectados, tween 80 neb.	0.9682	No hay diferencia
Profiláctico aceite neb. vs Infectados, aceite neb.	0.0459	No hay diferencia
Profiláctico aceite neb. vs Tratados con antiviral	0.7358	No hay diferencia
Profiláctico tween 80 IN vs Profiláctico aceite IN	0.7155	No hay diferencia
Profiláctico tween 80 IN vs Infectados sin tratamiento	0.4976	No hay diferencia
Profiláctico tween 80 IN vs Tratados con tween 80 IN	0.6468	No hay diferencia
Profiláctico tween 80 IN vs Tratados con aceite IN	0.2000	No hay diferencia
Profiláctico tween 80 IN vs Tratados con tween 80 neb.	0.9108	No se rechaza H_0

Tabla 22. Continuación.

Profiláctico tween 80 IN vs Infectados, aceite neb.	0.3721	No se rechaza H_0
Profiláctico tween 80 IN vs Tratados con antiviral	0.9811	No se rechaza H_0
Profiláctico aceite IN vs Infectados sin tratamiento	0.3600	No se rechaza H_0
Profiláctico aceite IN vs Tratados con tween 80 IN	0.7763	No se rechaza H_0
Profiláctico aceite IN vs Tratados con aceite IN	0.0099	Se rechaza H_0
Profiláctico aceite IN vs Tratados con tween 80 neb.	0.4062	No se rechaza H_0
Profiláctico aceite IN vs Tratados con aceite neb.	0.1230	No se rechaza H_0
Profiláctico aceite IN vs Tratados con antiviral	0.2485	No se rechaza H_0

* Resultados obtenidos en la prueba t-Student para la diferencia de medias al 95% de confianza.

Al finalizar el ensayo, se sacrificaron los animales y se obtuvieron las muestras correspondientes para analizarlas mediante histopatología, observándose lo siguiente: En la figura 14, A, se aprecia la microfotografía de la histología de un pulmón normal, mostrando alvéolos con paredes delgadas e íntegras formadas por neumocitos tipos I y II, no se presentaron datos de inflamación ni de daño alveolar. En la microfotografía 14,B se muestra un pulmón de un animal infectado sin tratamiento (control positivo), observándose que la estructura que forman los alvéolos está substituida por tejido inflamatorio en más del 80% de su extensión; quedando alvéolos confluentes con paredes engrosadas y células inflamatorias. La figura 14, C corresponde a la microfotografía del corte de un pulmón infectado y tratado con el Tamiflú, en donde se observó un tejido con características histopatológicas muy similares a los animales sin tratamiento, con inflamación y destrucción alveolar entre el 90 y 95% de su extensión. La muestra del panel D que corresponde a los animales tratados con el vehículo administrado en nebulizaciones (Tween 80 al 5%), en la cual se observa el 50% del parénquima afectado, el tejido inflamatorio se dispone alrededor de los bronquiolos y vasos sanguíneos; algunos alvéolos se encuentran confluentes (parte superior derecha), con paredes gruesas y

hay presencia de células inflamatorias. La figura 14, E muestra la microfotografía del pulmón de un animal tratado con el aceite administrado mediante nebulizaciones; entre el 50 y el 60% de los alvéolos están destruidos, y muchos de ellos están confluentes. La figura 14,F corresponde a la microfotografía de los pulmones de los animales tratados con Tween 80 al 5%, en ellos se aprecia entre el 70 y el 80% de los alvéolos conservados, la mayor parte de ellos hacia la parte izquierda del corte; al centro se encuentran alvéolos confluentes, con paredes gruesas y hacia el límite derecho de la preparación se observa gran cantidad de tejido inflamatorio y destrucción de los alvéolos. En el tejido de los animales tratados con aceite esencial vía intranasal (Figura 14, G); el 70% de los alvéolos están conservados pero confluyen entre ellos y existe una gran cantidad de tejido inflamatorio. Mientras que en los animales a los cuales se les administró el aceite por medio de nebulizaciones o vía intranasal profilácticamente (Figura 14, H e I respectivamente); se observa en el tejido pulmonar el 80% y el 90% de los alvéolos conservados, sus paredes son delgadas y con mínimas células inflamatorias (lucocitos o linfocitos); y encontrándose entre el 90 y el 100% de los alvéolos respetados.

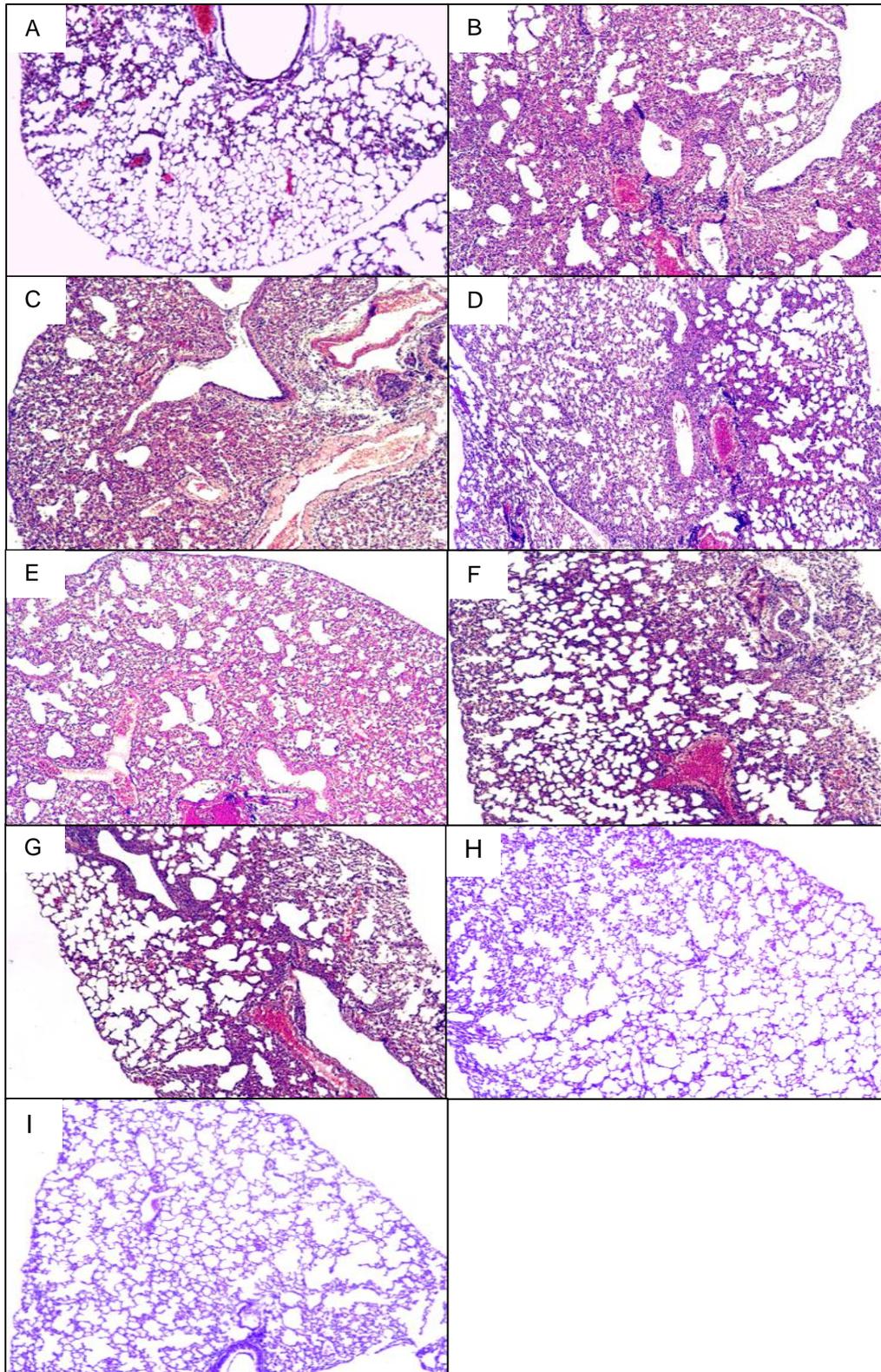


Figura 14. Histopatología pulmonar. (B-I: animales infectados con diversos tratamientos) A. pulmón normal, B. control positivo, C. Con tratamiento antiviral, D. Con tween 80 al 5% nebulizados, E. Con aceite esencial nebulizado, F. Con tween 80 al 5% intranasal, G. Con aceite esencial intranasal, H. Con aceite nebulizado profiláctico, I. Con aceite IN profiláctico.

En base a la diferencia en la histología observada en el último ensayo, realizamos un experimento en donde los animales no fueron infectados para investigar si el aceite por sí mismo generaba algún estado que exacerbara el daño pulmonar y no permitiera que se presentara la recuperación del parénquima; al igual que en los demás ensayos, los datos de peso corporal se sometieron a un análisis estadístico mediante una t-Student, el cual nos reportó que no había diferencia estadísticamente significativa entre el peso inicial de los animales y su peso final. En cuanto a la histopatología, no se observaron diferencias entre los animales tratados con aceite esencial y los animales normales (Figura 15).

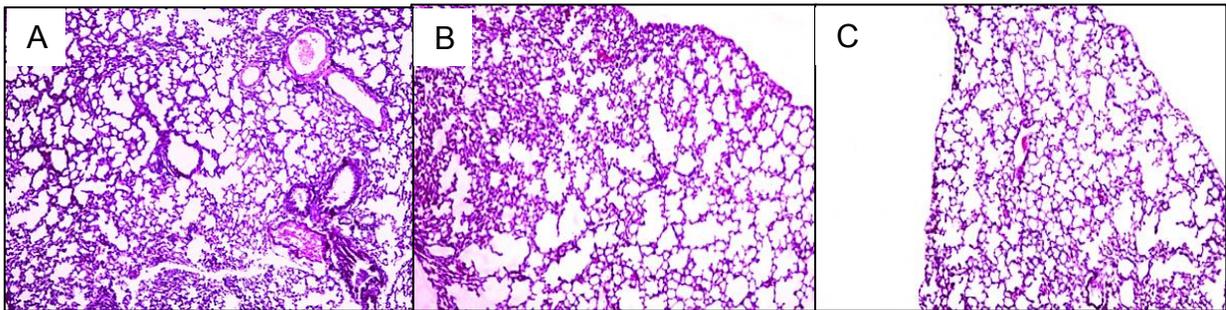


Figura 15. Histología pulmonar de animales no infectados. A. pulmón tratado con extracto acuoso vía oral, B. pulmón tratado con aceite esencial nebulizado, C. pulmón tratado con aceite esencial intranasal.

Con el objetivo de definir la vía por la cual el proceso inflamatorio disminuye en los animales tratados con el aceite esencial, se evaluó por inmunohistoquímica la inmunoreactividad de NF- κ B. En los pulmones de los animales sin infectar y sin tratamiento con el fitofármaco, la inmunoreactividad de NF- κ B se distribuyó en menos del 5% de las células epiteliales, con localización citoplásmica, sin marcaje nuclear (Figura 16, B). En el panel C, que corresponde a una imagen representativa de un animal infectado sin tratamiento, la inmunodetección de NF- κ B se observó en un 90-100% de las células epiteliales en el citoplasma. En el panel D se muestra el corte histológico del pulmón de un animal infectado y tratado con aceite esencial vía intranasal. Las células epiteliales se encontraron distribuidas como en los pulmones de animales sanos, formando espacios alveolares. De manera interesante el NF- κ B se observó solamente en un 5-10% del corte histológico principalmente a nivel citoplásmico; estudios preliminares complementarios mostraron una colocalización

parcial de la fluorescencia de NF-kB en zonas cercanas a algunos de los núcleos celulares. Por último, en el panel E se muestra el corte pulmonar de un ratón infectado, tratado profilácticamente con aceite esencial vía intranasal, observándose una disposición del epitelio pulmonar similar a los animales sin infectar, la inmunorreactividad de NF-kB se apreció en menos del 5% de la muestra, localizándose en el citoplasma.

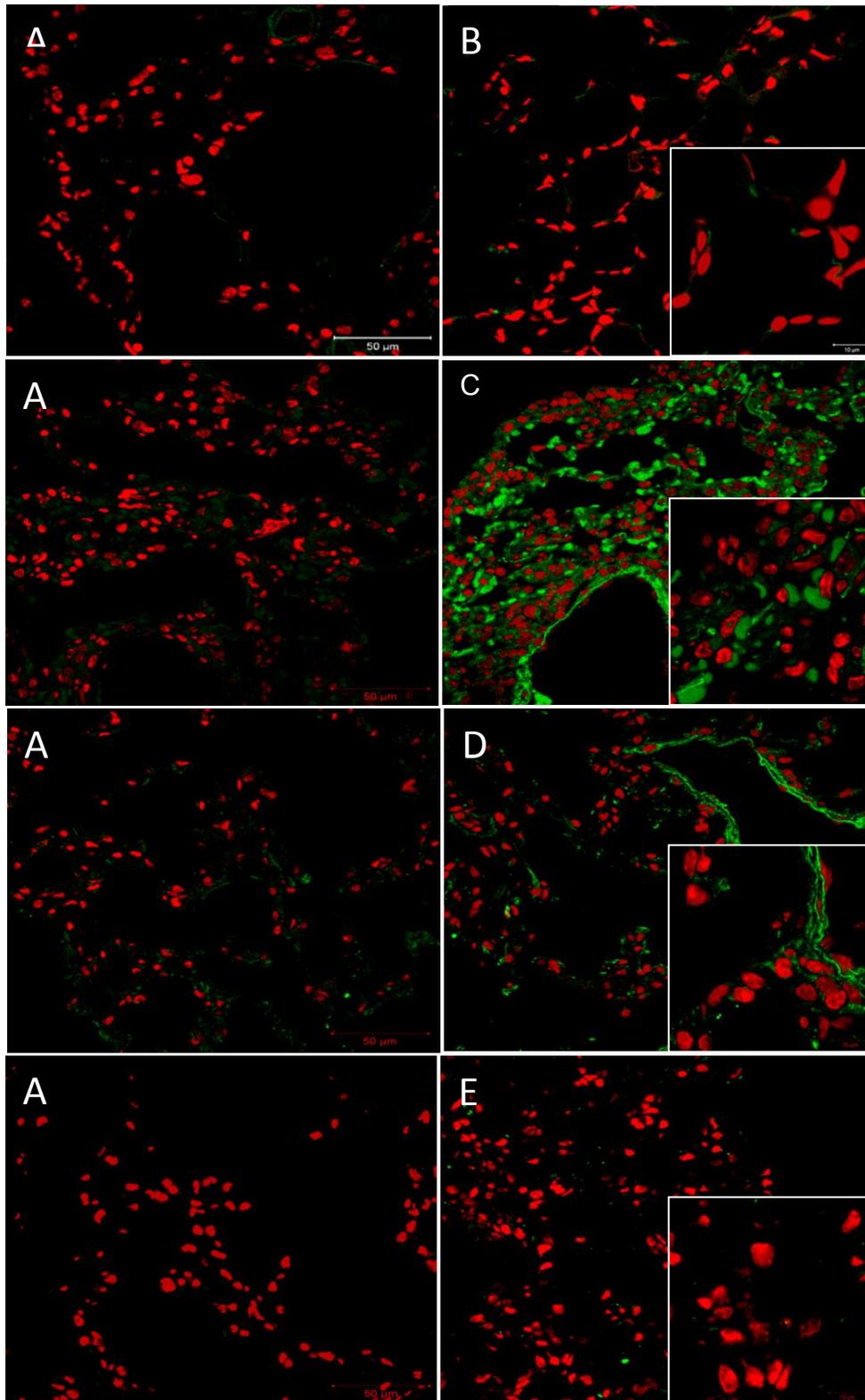


Figura 16. Inmunohistoquímicas. A. Pulmón normal; B. Pulmón infectado; C. Pulmón infectado y tratado con aceite IN; D. Pulmón infectado y tratado profilácticamente con aceite IN.

Debido a que el aceite esencial mostró tener el efecto benéfico, se procedió a realizar su caracterización química mediante el análisis por GC-MS. En la tabla 23 se muestran los componentes presentes, con una pureza mayor o igual al 50%, en donde se observa en la primera columna el tiempo de retención, en la segunda abundancia expresada en porcentaje, en la tercera el porcentaje de pureza y en la última el o los sinónimos de cada compuesto identificado, mediante el uso del software de análisis AMDIS 32. En resumen pudimos identificar como componentes mayoritarios, el mentol (30.56%), el cinnamaldehído (5%), el linalool (4.8%), el ácido acético (4.7), el cariofileno (3.8%) y el isolimonelo (0.8%) los cuales suman 49,66% del total y, cuyas estructuras químicas se observan en los picos correspondientes a cada uno de ellos en el cromatograma de la figura 17.

Tabla 25. Componentes del aceite esencial identificados por GC-MS

Compuesto	Sinónimo(s)	Tiempo de retención	Abundancia (%)	Pureza	Peso molecular (g/mol)
Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	Ethyl a-methylbutyrate	3.32	0.098902	81%	130
Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester		3.599	0.035723	71%	130
Hexanal	Caproic aldehyde	3.886	0.266888	84%	100
3-methylene-1,6-heptadiene	3-methylene-,6 hexadiene	4.235	0.060544	50%	108
1-butanol,3-methyl-,acetate	Isopentyl alcohol, acetate	4.748	0.164828	85%	130
α -phellandrene	p-menthadiene	5.699	0.43789353	85%	136
β -phellandrene	Cyclohexene, 3-methylene-6	7.018	3.61944928	69%	136
2-hexenal	leaf aldehyde	7.53	0.08648216	77%	98
hexanoic acid, ethyl ester	ethyl caproate	8.077	0.71618155	73%	144
2-buten-1-ol,3-methyl-,acetate	prenyl acetate; 3-methyl-2-buten-1-ol, acetate; 3,3-dimethylallyl acetate	8.673	1.85716357	83%	128
2-buten-1-ol,3-methyl-,acetate		8.83	0.20450536	73%	128
benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)	m-cymene	9.209	0.99064163	85-96%	134
3-hexenoic acid, ethyl ester	ethyl 3-hexenoate	10.722	0.29038297	86-90%	142

Tabla 23. Continuación.

propanoic acid, 2-penten-1-yl ester		11.073	0.58128521	75%	142
2-buten-1-ol, 2 methyl		11.301	0.77864667	87%	86
2-heptanone, 6-methyl-5-methylene	thujaketone	11.893	0.12079736	70%	140
1-pentanol, 4-methyl	isohexanol	12.48	0.1901424	87%	102
3-hexen-1-ol	3-hexen-1-ol	13.697	0.07488521	74%	100
benzene, 1-propenyl-, e	B-methylstyrene	14.474	0.59779492	91%	118
1-hepten-3-ol		16.441	0.07308753	75%	114
benzaldehyde	phenylmethanal	19.366	0.69873915	91%	106
linalool	1,6-Octadien-3-ol,3,7-dimethyl-	20.629	3.89657431	89%	154
caryophyllene		22.065	3.84796076	85%	204
menthol		24.048	30.5659584	90%	156
caryophyllene		24.378	3.37812634	81%	204
α-terpineol		25.151	0.60502037	100%	154
acetic acyd, phenylmethyl ester		26.067	2.46538466	94%	150
naphtalene 1,2,4a,5,8,8a hexahydro 4,7 dimethyl 1		26.254	1.01664711		204
naphtalene 1,2,4a,5,8,8a hexahydro 4,7 dimethyl 1		26.776	3.96058607	89%	204
patchoulene		27.81	0.45692052	76%	206
acetic acid, 2-phenylethyl ester	b-phenethy acetate	28.297	4.67301999	93%	164
naphtalene 1,2,3,4-tetrahydro-1,6 dimethyl 4	calamenene	28.459	0.9639139	84%	202
cyclohexane, (3-ethoxy-1-propenyl)		29.169	0.00754474	94%	168
benzenepropanoic acid, ethyl ester	ethyl dihydrocinnamate	29.788	1.49426499	100%	178
cadala-1(10),3,8-triene		30.368	0.56330439	85%	202
phenylethyl alcohol	Benzene etanol	30.668	0.04298109	91%	122
phenyl-1-propanol, acetate	benzenepropyl acetate	31.155	0.18487968	88%	178
butanoic acid, 3 methyl-, 2-phenylethyl ester	isovaleric acid, phenethyl ester	31.781	0.2860276	86%	206
butanoic acid, 3 methyl-, 2-phenylethyl ester		32.172	0.0535427	91%	206
cinnamaldehyde		33.419	4.99655588	92%	132
guaial	champaca camphor	33.968	0.66994887	92%	222
2-propen-1-ol,3-phenyl-,acetate	acetic acid cinnamyl ester; acetic acid cinnamyl ester	35.183	1.32158965	92%	176
2-naphtalenemethanol	eudesmol	35.282	0.7166331	82%	222

Tabla 23. Continuación.

phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)	isoeugenol	35.396	0.57662296	89%	164
1-naphthalenol	s-cadinol	35.532	0.17758456	85%	144
5-azulenemethanol	Bulnesol	35.904	0.28533158	82%	222
2-naphtalenemethanol	α -eudesmol	36.052	0.4811659	85%	222
2-naphtalenemethanol	β -eudesmol	36.175	0.50675511	91%	222
Total					

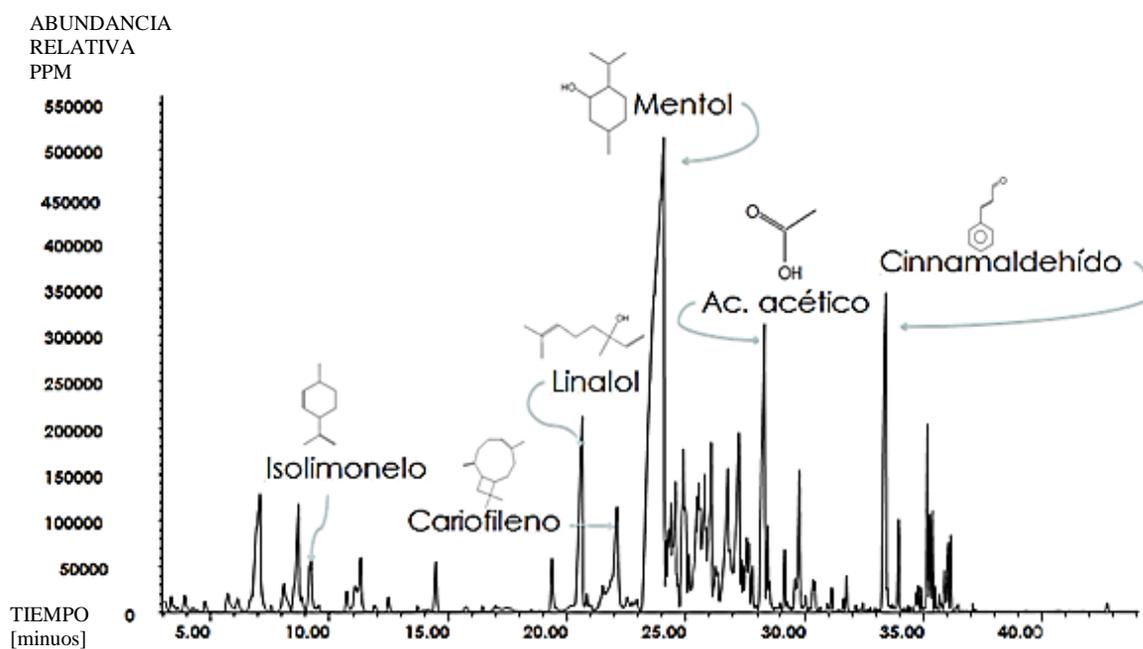


Figura 17. Cromatograma del aceite esencial de la formulación fitofarmacéutica

10. DISCUSIÓN

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda, generalmente autolimitada, pero dada su fisiopatología puede complicarse hasta llevar al paciente a la muerte¹. Esta enfermedad puede afectar a un importante número de personas de todos los grupos etarios durante la aparición de epidemias; frecuentemente requiere atención médica y la hospitalización, contribuyendo sustancialmente a pérdidas económicas, exceso en el número de hospitalizaciones y muertes⁸³. Su propagación, debido a las características del virus, es muy rápida hasta el punto de provocar pandemias. Debido a que el virus sufre constantes mutaciones año tras año, han aparecido resistencias a los antivirales, por lo que se requiere de la investigación de nuevos fármacos⁷⁵; los ratones han resultado ser buenos biomodelos para estudiar el virus de la Influenza H1N1, H2N2 y H3N3 de humanos, ya que la patología observada en sus pulmones, cuando son infectados, es muy similar a la encontrada en humanos⁸¹. Sin embargo, durante el proceso infectivo, el virus debe adaptarse previamente para infectar y proliferar en una especie diferente debido a las diferencias en los receptores celulares que emplea el virus. Nuestro modelo, después de tres pases, mostró una infección adecuada y reproducible, lo que se confirmó al observar el deterioro gradual en el estado de salud de los animales valorado con la escala propuesta de signos clínicos y la disminución del peso, efectos que se acentuaron a la medida que aumentó el número de pases seriados del virus. Muy probablemente esto podría estar originado por la adaptación del virus al tejido pulmonar del roedor y por el aumento en la infectividad de la muestra viral, lo cual habla a favor de la aparición de la sintomatología clínica descrita por otros autores⁸¹. En nuestro trabajo el promedio de la variación en el peso corporal de los animales entre el primer pase y el 2º fue de 2.97 g y entre el primer pase y el tercero de 3.6 g similar a lo reportado por otros autores que manifiestan una variación entre los 2 y 3 g, sugiriendo que la pérdida de peso corporal es un indicador crucial de las alteraciones en el desarrollo normal de los animales infectados con el virus de influenza⁸¹. En la literatura, la histopatología de la neumonía primaria provocada por la influenza en humanos describe una congestión vascular intensa, la dilatación y el engrosamiento del

tabique alveolar. Al interior de los alvéolos también se describe la presencia de neutrófilos, escasos macrófagos alveolares y eritrocitos; presentándose la pared de los alvéolos revestida por membranas eosinofílicas gruesas y hialinas⁸⁴. En este trabajo observamos en los cortes de los animales infectados características histopatológicas muy semejantes a dicha descripción, pero con mucho mayor grado de daño al parénquima pulmonar; sugiriendo que el virus adaptado al pulmón murino, es altamente virulento. Otro factor que pudo haber ayudado el desarrollo de un efecto más agresivo pudiera estar relacionado con el hecho de que el virus no se purificó y fue instilado con detritus celulares lo que pudo haber provocado una inflamación aún mayor que la que se hubiera presentado sólo con la infección viral; sin embargo, en los animales del primer pase que tampoco se purificó el virus, no se observó esta inflamación, por lo que sugerimos que el desarrollo grave de la enfermedad se dio porque el virus se volvió más virulento con los pases al tejido pulmonar murino. Esta destrucción se ve de igual manera importante en los pulmones de los animales infectados y tratados con un antiviral. Sin embargo, es importante mencionar que aún y cuando se presentó un proceso neumónico importante por la alta virulencia del virus del tercer pase, dicho proceso histológico disminuyó en aquellos animales que fueron sometidos a tratamiento con aceite esencial vía intranasal y mediante nebulizaciones. Interessantemente, esta disminución se potenció en aquellos animales a los cuales se les administró profilácticamente el aceite por las mismas vías. En cuanto a las características observadas en los pulmones de los animales a los cuales se les administró el tratamiento con el Tamiflú, podemos hipotetizar que la cepa utilizada en el presente trabajo pudiera ser resistente a dicho antiviral, por lo que los animales no se vieron beneficiados con este fármaco; resistencia que se ha demostrado en diversos estudios con diferentes cepas de virus de influenza³⁸.

Varios estudios han mostrado que existen diversas vías de señalización del hospedero implicadas en la replicación viral, una de las más importantes lo constituye la vía del NF- κ B cuya expresión se ha demostrado en fases tempranas de la infección, donde las células producen INF- α/β y otras citocinas proinflamatorias activadas por este factor de transcripción¹¹. Se ha observado, que derivado de la sobreexpresión descontrolada de NF- κ B se presenta una inflamación exacerbada en

el pulmón de los hospederos. Con el objetivo de definir la vía por la cual el proceso inflamatorio disminuye en los animales tratados con la administración del aceite esencial, se evaluó mediante inmunohistoquímica la inmunorreactividad de NF-kB. Los hallazgos del análisis histopatológico concuerdan con los encontrados por inmunofluorescencia observando: i) que en los pulmones normales existió una leve inmunorreactividad de esta molécula, sin ser observado intranuclearmente; ii) que en los animales infectados sin tratamiento, esta molécula se encontró en casi el 100% de las células epiteliales presentes en el corte, lo que demuestra que la infección por el virus de influenza propicia un aumento dramático en la expresión del NF-kB. Este hecho explica el aumento del estado inflamatorio del hospedero. En contraparte, la inmunorreactividad de NF-kB se encontró disminuida en aquellos tejidos pulmonares de los animales infectados sometidos al tratamiento con el aceite esencial de la formulación fitofarmacéutica, hecho que se observa con mayor grado en los animales tratados profilácticamente con dicha sustancia, lo que nos sugiere que la activación de NF-kB por la infección viral pudiera estar siendo limitada por algunos de los componentes del aceite esencial del fitofármaco. Nuestros datos correlacionan con otros estudios realizados *in vitro*, por diferentes grupos, que han demostrado un efecto antiinflamatorio para algunos de los compuestos detectados en el aceite⁸⁵⁻⁹¹.

Tomando en consideración la valoración clínica, histopatológica e inmunohistoquímica, sugerimos que a pesar de que la infección inducida en el modelo desarrolla un estado patológico exacerbado, se presentó un beneficio terapéutico importante del aceite esencial administrado por vía intranasal, sin embargo, consideramos que el efecto terapéutico del fármaco pudiera ser mucho más importante en estados menos severos de la enfermedad. Por otra parte, se puede proponer que al administrar el aceite profilácticamente, obtenemos efectos inmunoestimulantes y de este modo regula al sistema inmunológico para evitar la instalación viral en el hospedero¹⁶ o bien, evitar la tormenta de citocinas que se presenta en esta infección en particular^{23, 24}.

En lo que respecta a los resultados de la inmunohistoquímica, la cual se usó para valorar la inmunorreactividad del NF-kB en los animales infectados y sometidos a los diferentes tratamientos con el aceite esencial tanto profilácticamente como

terapeuticamente, observamos que en los animales infectados y tratados con aceite esencial vía intranasal, dicha molécula se aprecia en un porcentaje similar al observado en aquellos tejidos de los animales no infectados; este hecho se observó más evidentemente en aquellos animales que se les administró el aceite esencial profilácticamente por la misma vía; mientras que en los animales control, el porcentaje de inmunorreactividad de NF-kB estuvo exacerbado; estos resultados los podemos explicar con los estudios realizados por Kumar y cols, 2008, que demuestran que la activación de la vía de señalización de esta molécula está dada por la sobre expresión de proteínas virales como la HA, NP y M1 durante la infección del virus de la influenza A¹⁵.

En cuanto al análisis cromatográfico acoplado a espectrometría de masas del aceite esencial de la formulación, encontramos como compuestos mayoritarios el mentol, el cinnamaldehído, el linalool, el ácido acético, el cariofileno e isolimoneno (Figura 17). Juegens y cols. (1998); estimularon monocitos de voluntarios humanos con lipopolisacárido (LPS) observando que el mentol suprimió significativamente la producción de LTB₄, PGE₂ e IL-1 β por éstas células⁸⁵; resultados similares fueron observados en un análisis del efecto del cinnamaldehído (CNA) sobre macrófagos murinos estimulados con LPS o ácido lipoteicoico (LTA), en donde el compuesto en cuestión, administrado a dosis bajas (μ M) inhibió la secreción de IL-1 β y FNT α , además se encontró que redujo la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS)⁸⁶. Kim y cols. (2007), examinó la modulación molecular del CNA en la activación inflamatoria del NF-kB vía redox, a través de la reducción del estrés oxidativo, observando la inhibición de esta vía por medio de 3 vías de transducción, NIK/IKK, ERK y MAPK p38⁸⁷. Con respecto al Linalool se ha demostrado que éste y su acetato correspondiente tienen una función importante en la actividad antiinflamatoria de los aceites esenciales en los cuales se encuentran, al ser usado como tratamiento en un modelo de inflamación en ratas usando carragenina para inducir edema⁸⁸. El cariofileno administrado a una dosis de 12.5 y 25 mg/kg mostró una analgesia significativa acompañada de una actividad anti-inflamatoria⁸⁹. Para finalizar, encontramos que el limoneno tiene un efecto inhibitor del Óxido Nítrico (NO) inducido por LPS y producción de prostaglandina E(2) en macrófagos, al igual

que la secreción de citocinas como TNF- α , IL- β e IL-6 medidas mediante ELISA⁹⁰; y al ser investigado sobre células humanas eosinofílicas de leucemia HL-60, se observó que a concentraciones bajas (7.34 mmol/L) inhibió la producción de ROS y que a 14.68 mmol/L disminuyó la producción de MCP-1 vía activación NF- κ B⁹¹. Todo lo que se ha mencionado acerca de los análisis de los compuestos mayoritarios de la formulación nos explica en parte el efecto del aceite esencial sobre el modelo animal usado en este estudio, ya que no se evitó la infección viral, pero si se disminuyó la respuesta inflamatoria al virus, lo que permitió una mayor recuperación en los animales tratados con este tipo de extracto.

11. CONCLUSIONES

- Se estandarizó un modelo murino de influenza estacional tipo A (H1N1).
- Se evaluó el efecto de las diferentes fracciones de la formulación sobre el modelo y se determinó que el aceite esencial y la fracción acuosa son las que poseen efectos benéficos sobre la infección, administradas profilácticamente.
- El aceite esencial de la formulación, administrado por vía intranasal, mostró tener un efecto anti-inflamatorio en el modelo murino de Influenza A, mientras que los extractos de acetato de etilo, de hexano y de agua no presentaron dicho efecto.
- En el tejido pulmonar de los animales tratados profilácticamente con el aceite esencial, vía intranasal, la expresión de NF- κ B se observó similar a los animales no infectados.
- Los compuestos mayoritarios del aceite esencial de la formulación fitofarmacéutica, identificados mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, fueron el mentol, el cinnamaldehído, el linalool, el ácido acético, el cariofileno y el isolimonelo.

12. PERSPECTIVAS

- Ya que observamos que el aceite esencial de la formulación tiene un efecto benéfico sobre la respuesta inflamatoria del hospedero (sistema inmunológico), entonces se propone buscar el tiempo de protección después de ser administrado al modelo.
- Realizar RT-PCR en búsqueda de partículas virales en los diferentes grupos experimentales con el objetivo de saber si el cambio en sistema inmunológico está ayudando a eliminar los virus.
- Analizar el panel de citocinas completo.
- Realizar los mismos ensayos del estudio con un virus menos virulento para no generar una respuesta inmunológica tan exacerbada.
- Con la finalidad de evitar más mutaciones en el virus al momento de aumentar el stock viral, se propone realizar la producción en células MDCK adheridas a microacarreadores en suspensión.
- Realizar pruebas de los compuestos mayoritarios por separado para saber cuál es el que tiene el efecto benéfico sobre el modelo.

13. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Wiselka M., **Influenza: diagnosis, management and prophylaxis**, BMJ, 1994, 308(6940):1341-45.
- 2 Carrillo Esper R, Peña Pérez C, Muciño Bermejo J, Carrillo Córdova JR, Carrillo Córdova LD., **Severe sepsis, septic shock and secondary multiple organ dysfunction in infection by Kluyvera ascorbata**, Gac Med Mex. 2011 Jul-Aug;147(4):355-60.
- 3 Luchsinger, V. **Características del virus influenza y diagnóstico de laboratorio**. 2010. <http://www.neumología-pediátrica.cl> Recuperado en febrero del 2010.
- 4 Roxas M., Jurenka J., **Colds and Influenza: A Review of Diagnosis and Conventional, Botanical, and Nutritional Considerations**; Altern Med Rev, 2007, 12(1): 25-48.
- 5 McNeil D., From Edgar, 5, coughs heard round the worl; NYTimes, abril 28, 2009.
- 6 Valadez B., **Te mostramos la cronología de la aparición del virus de la Influenza en México**; Milenio; 01 Mayo de 2009.
- 7 Bin C, Xingwang L, Yuelong S, Nan J, Shijun C, Xiayuan X, Chen W, **Clinical and Epidemiologic Characteristics of 3 Early Cases of Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 Virus Infection, People's Republic of China, 2009**; Emerg Infect Dis; 2009, 15(9): 1418-22.
- 8 Fukuda K., et al; preparación y respuesta ante una pandemia de influenza; Documento de orientación de la OMS; 2009. http://www.who.int/csr/swine_flu/Preparacion_Pand_ESP.pdf
- 9 Wright PF, Webster P, **Orthomyxoviruses**. Fields virology. 4th Ed. Lippincott: Williams & Wilkins, 2002(1):1533-79.
- 10 WHO Memorandum. **A revised system of nomenclature for influenza viruses**. Bull WHO 1980;58:585-591.
- 11 Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, Ronni T, Melén K, Matikainen S., **Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression**. Citokine and growth Factor Rev. 2001, 12(2-3):171-80.
- 12 Palladino G, Mozdzanowska K, Washko G, Gerhard W, **Virus neutralizing antibodies of immunoglobulin g (IgG) but not IgM or IgA isotypes can cure influenza virus pneumonia in acid mice**. J Virol. 1995, 69(4):2075-81.

-
- 13 Neumann G, Noda T, Kawaoka Y., **Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus.** Nature, 2009, 459(7): 931-9.
 - 14 Pleschka S, Stein M, Schoop R, Hudson J, **Anti-viral properties and mode of action of standardized Echinacea purpurea extract against highly pathogenic avian influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV);** Virology Journal, 2009, 6:196-97.
 - 15 Kumar N, Xin ZT, Liang Y, Ly H, Liang Y., **NF- κ B signaling differentially regulates influenza virus RNA synthesis.** J Virol. 2008; 82(20):9880-9.
 - 16 Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Berberich-Siebelt F, Wolff T, Walczak H, Planz O, Ludwig S., **Nf- κ B-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) AND Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation.** J Biol Chem, 2004, 279(30): 30931-7.
 - 17 Kuri P. Cravioto P., Galván F., Cortés M., Ruíz a., Montiel MA., Manual para la vigilancia epidemiológica de la Influenza., Secretaria de Salud, México, 2007. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/DOCSAL7729.pdf>
 - 18 Collado, VM., Porrás, R., Cutull, MT., Gómez, L., **The innate immune system I: its mechanisms.** Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, 2008, 2(1): 1-16.
 - 19 Taubenberger, JK., Morens DM., **The Pathology of Influenza virus infections.** Ann Rev Pathol Mech Dis. 2008. 3:499-522.
 - 20 Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS, Grenfell BT., **Host species barriers to influenza virus infections.**, Science, 2006, 21; 312(5772):394-7
 - 21 Bahgat MM, Błazejewska P, Schughart K., **Inhibition of lung serine proteases in mice: a potentially new approach to control influenza infection.** Virol J., 2011, 20; 8:27.
 - 22 Vlahos R., Stambas J., Bozinovski S., Broughton B., Grant R., Drummond G., Selemidis S., **Inhibition of NOX2 oxidase activity ameliorates influenza A virus-induced lung inflammation.** Plos Pathog, 2011, 3; 7(2):e1001271
 - 23 Aldridge JR., Moseley CE., Boltz DA, Negoveticha NJ, Reynoldsb C, Franksa J, Brownb SA, Dohertyb PC, Webstera RG, Thomasb PG, **TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection.** PNAS. 2009, 106 (13):5306-5311.
 - 24 SunJ, Madan R, Karp R, Braciale T, **Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10.** Nat Med. 2009, 15(3):277-84.

-
- 25 Chan MC, Cheung CY, Chui WH, Tsao SW, Nicholls JM, Chan YO, Chan RW, Long HT, Poon LL, Guan Y, Peiris JS., **Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells.** *Respir Res.* 2005, 11(6):135-47.
- 26 Moran TM, Park H, Fernandez-Sesma A, Schulman JL, **Th2 responses to inactivated influenza virus can be converted to Th1 responses and facilitate recovery from heterosubtypic virus infection.** *J. Infect. Dis.* 1999, 180(3):579-85.
- 27 Mellman I, Steinman RM., **Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines.** *Cell.* 2001, 106(3):255-258.
- 28 Ramos I., Bernal D., Durham N., Belicha A., Lowen A., Steel J., Sesma A., **Effects of receptor binding specificity of avian influenza virus on the human innate immune response.** *J Virol*, 2011, 85(9):4421-4431.
- 29 Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu YJ., Pulendran B., Palucka K., **Immunobiology of dendritic cells.** *Annu. Rev. Immunol.* 2000, 18:767-811.
- 30 Banchereau J, Steinman RM., **Dendritic cells and the control of immunity.** *Nature.* 1998, 392(6673):245-252
- 31 Hui k., SM Lee., Cheung C., Ng I., Poon L., Guan Y., Ip N., Lau A., Malik J., **Induction of proinflammatory cytokines in primary human macrophages by influenza A virus (H5N1) is selectively regulated by IFN regulatory factor 3 and p38 MAPK.** *J Immunol.* 2009, 82(2):1088-98.
- 32 Moore D, Vaudry W, Scheifele D, Halperin S, Déry P, Ford-Jones E, Arishi H, Law B, Lebel M, Saux N, Grimsrud K, Tam T. **Surveillance for Influenza Admissions Among Children Hospitalized in Canadian Immunization Monitoring Program Active Centers, 2003-2004.** *Pediatrics* 2006; 118; 610-619.
- 33 Zamorano J. **Manifestaciones clínicas de la infección por virus influenza en niños inmunocompetetes.** *Neum Ped.*, 2010, 6(3):103-13.
- 34 Montalto NJ., Byrd R., **An Office-Based Approach to Influenza: Clinical Diagnosis and Laboratory Testing.** *Am Fam Physician* 2003; 67(1):111-8
- 35 Shao H, Ye J, Vincent AL, Song H, Hickman D, Qin A, Lamichhane C, Perez DR., **A monoclonal antibody-based ELISA for differential diagnosis of 2009 pandemic H1N1, Influenza Other Respi Viruses.** 2011; 5(1):138-41.

-
- 36 Luchsinger V., Características del virus de influenza y diagnóstico de laboratorio; disponible en <http://www.neumologia-pediatrica.cl>.
- 37 Clin Inf Dis 2009,48:1003-32 www.censida.salud.gob.mx/descargas/influHIV_es.pdf
- 38 Kiso, M., Mitamura, K., Sakai-Tagawa, Y., Shiraiishi, K., Kaeakami, C., Kimura, K., (2004) **Resistant influenza A viroses in children treated with oseltamivir: descriptive study**. Lancet. 364:759-65.
- 39 Bumcrot D., Manoharan M., Koteliansky V., W y San D.; **RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drug**. Nat chem, Biol. 2006, 2:711-9
- 40 Ge Q, McManus MT, Nguyen T, Shen CH, Sharp PA, Eisen HN, Chen J.; **RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibition all viral RNA transcription**. Proc Natl Acad Sci USdA. 2003, 100(5): 2718-23
- 41 Leung R., Whittaker P., **RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics**; Pharm and Therap; 2005, 107:222-39
- 42 Chen XY, Wu T, Liu GJ, Wang Q, Zheng J, Wei J, Ni J, Zhou L, Duan X, Qiao J.; **Chinese medicinal herbs for influenza: a systematic review**; J Altern Complement Med. 2006 Mar;12(2):171-80.
- 43 Johnston, B.A. **One third of nation's adults use herbal remedies: marked estimated at USD 3.24 billion**. HerbalGram 1997, 40:49.
- 44 Ministerio de Salud de China <http://www.chinacdc.cn/n272442/n272530/n273736/n273781/n305111/n332418/9620.html> , Mayo 2010
- 45 Margulis, L. y Sagan, D. **Acquiring genomes. A theory of the origins of species**. Perseus Books Group, Boston 2002.
- 46 Colla, M; Badiale, E; Vieira, A; **Antioxidant Properties of *spirulina* (Arthospira) plantensis Cultivated Under Different Temperatures and Nitrogen Regimes**; Brazilian Archives of Biology and Technology, an International Journal; 2007, 50(1):161-67.
- 47 Torres P, Ferreira A, Juarez M; **Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina* maxima in an open sample of Mexican population: a preliminary report**. Lipids in Health and Disease. Lipids in Health and Disease, 2007, 6:33.
- 48 Bin-Meferij, M; **Immunohistochemical Study Effects of *Spirulina* Algae on the Induced Mammary Tumor in Rats**; Saudi Journal of Biological Sciences, 2008; 15(1) 129-35.

-
- 49 Miranda, M.S., Cintra R.G., Barros S.B., Mancini J.; **Antioxidant activity of the microalga *Spirulina Maxima*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 1998; 31:1075-79
- 50 Estrada J., Bermejo P., Villar A.; **Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina plantensis* protean extract**. *Il farmaco*, 2001; 56(5), 497-500.
- 51 Chamorro G, Salazar M, Gomez K, Pereira C, Ceballos G, Fabila L; **Actualización en la farmacología de *Spirulina (Arthrospira)*, un alimento no convencional**; Archivos Latinoamericanos de nutrición; 2002, 52(3):232-40.
- 52 Jung-Bum L., Srisomporn P., Hayashi K., Tanaka T., Sankawa U., Hayashi T.; **Effects of Structural Modification of Calcium Spirulan, a Sulfated Polysaccharide from *Spirulina Plantesis*, on Antiviral Activity.**, *Chem. Pharm. Bull.*, 200, 149(1)108-110.
- 53 Grange, J., Davey R.; **Antibacterial properties of propolis (bee glue)**; *Soc Med.*, 1990, 83(3), 159-164
- 54 Amoros M., Sauvager F., Girre L., Cornier M., ***In vitro* antiviral activity of propolis**; *Apidologie*, 23, 231-240 (1992)
- 55 Ivanoska N., Heychev H., Stefanova Z., Bankova v., Popov s.; **Influence of cinnamic acid on lymphocyte proliferation, cytokine release and *klebsiella* infection in mice**; *Apidologie*, 1995, 26(2):73-81.
- 56 Barak V., Birkenfeld S., Halperin T., Kalickman I.; **The effect of herbal remedies on the production of human inflammatory and anti-inflammatory cytokines**; *IMAJ* 2002; 4 (Suppl):919-922.
- 57 Kong XF, Hu YL, Yin YL, Wu GY, Rui R, Wang DY, Yang CB.; **Chinese herbal ingredients are effective immune stimulators for chickens infected with the Newcastle disease virus**; *Poul Sci*, 2006; 85(12):2169-75.
- 58 Quattrocchi, U., *CRC World Dictionary of Plant Names. III M-Q-Q-C*. CRC Press. P. 2203. (ISBN 9780849326776. <http://books.google.com/books?id=kaN-hLL-3qEC&>)
- 59 Pérez R., Mitchell S., Vargas S.; ***Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology**; *Journal of Ethnopharmacology*; 2008, 17:1-27

-
- 60 Masood A., Chaudhry, Tariq P; **Anti-microbial activity of Cinnamomum Cassia against diverse microbial flora with its nutritional and medical impacts**; Pak. J. Bot., 2006, 38(1):169-174.
- 61 Lee, H.S. and Ahn, Y.J., **Growth-inhibiting effects of Cinnamomum cassia bark-derived materials on human intestinal bacteria**. J Agric Food Chem, 1998, 46:8-12.
- 62 Morimoto, S., Nonaka, G. and Nishioka, I., **Tannins and related compounds XXXVIII. Isolation and characterization of flavan-3-ol glucosides and procyanidin oligomers from Cassia bark (Cinnamomum cassia Blume)**. Chem Pharm Bull, 1986, 34:633-642.
- 63 WHO monographs on selected medicinal plants; <http://whqlibdoc.who.int/publications/1999/9241545178.pdf> , Mayo 2010.
- 64 Orihara Y, Hamamoto H, Kasuga H, Shimada T, Kawaguchi Y, Sekimizu K.; **A silkworm-baculovirus model for assessing the therapeutic effects of antiviral compounds: characterization and application to the isolation of antivirals from traditional medicines**; Journal of general virology, 2008, 89(1), 188-94.
- 65 González R., Lozano F., Instituto Biomédico Shuangyi, <http://www.bimedico.com.mx/moodle/mod/resource/view.php?id=460> (Mayo 2020)
- 66 Heikens J, Fliers E, Endert E, Ackermans M, van Montfrans G., **Liurice and hypertension**; Neth J Med; 2005, 63(4):230-4.
- 67 Herrarte JE., **Informe de diagnóstico centro de agricultura tropical Bulbuxyá-Catbul, San Miguel Panán, Suchitepequez**; Guatemala, 2005, http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2205.pdf (Mayo 2010)
- 68 Waizel J. Waizel S.; **Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma**; An Orl Mex 2009; 54(4): 145-71.
- 69 Numazaki K, Umetsu M, Chiba S. **Effect of glycyrrhizin in children with liver dysfunction associated with cytomegalovirus infection**. Tohoku J exp Med 1994; 172:147-153.
- 70 Kroes B., Beukelman A., Vanderberg G., Wolbik H., Labadie.; **Inhibition of human complement by b-glycyrrhetic acid**; Immunology, 1997, 90:115-120.
- 71 Report on Menthol Crystal; National Multi-Commodity exchange of India Limited. <http://www.nmce.com/files/study/menthol.pdf> (Mayo 2010)
- 72 <http://www.corquiven.com.ve/PDF/MSDS-MENTOL.pdf> Corporación química Venezolana (Mayo 2010)

-
- 73 Potter, C.; **A history of influenza**; Journal of Applied Microbiology, 2001, 91:572-579.
- 74 Zarychanski R., Stuart T., Kumar A., Doucette S., Elliot L., Kettner J., Plummer F.; **Correlates of severe disease in patients with 2009 pandemic influenza /H1N1) virus infection**. CMAJ, 2010, 182(3):257-64.
- 75 Rubin JL, McGarry LJ, Klugman KP, Strutton DR, Gilmore KE, Weinstein MC.; **Public health and economic impact of vaccination with 7-valent pneumococcal vaccine (PCV7) in the context of the annual influenza epidemic and severe influenza pandemic**. BMC Infect Dis; 2010, 21:10-14
- 76 Hamilton M., Russo R., Thurston R.; **Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays**; Environmental Science & Technology; 1997, 11(7);714-19.
- 77 Barnard DL, Wong MH, Bailey K, Day CW, Sidwell RW, Hickok SS, Hall TJ.; **Effect of oral gavage treatment with ZnAL42 and other metallo-ion formulations on influenza A H5N1 and H1N1 virus infections in mice**; Antivir Chem Chemother. 2007;18(3):125-32.
- 78 IAGS, MAM, RCA, MRC; **Rotación Anestesia Pequeños Animales**, Servicio de Anestesia HCV UCM; 2005.
- 79 Galabov, A.S., Simeonova, L., Gegova, G. **Rimantadine and oseltamivir demonstrate synergistic combination effect in an experimental infection with type A (H3N2) influenza virus in mice**. Antiviral Chemistry and Chemotherapy; USA 2006, 17:251-258
- 80 Magariños, G., **Técnica histológica**; <http://www.dermato101.com.ar/tecnica.pdf> (Mayo 2011)
- 81 Menéndez A., Peña B., Hernández E.; **Aspectos clínicos y virológicos útiles en la implementación de un modelo de Influenza A en líneas de ratones Balb/C**; Acta Farm. Bonaerense 2005, 24 (3): 395-401
- 82 Krasovskii GN; **Extrapolation of experimental data from animals to man**; Environmental health perspectives; 1976, 13:51-58.
- 83 Franco, C., Rodríguez A., Santos J.; **Aspectos clínicos y epidemiológicos de la influenza**; CIMEL 2006, 11(1): 27-34.
- 84 Carrada T.; **Influenza humana: avances recientes en la patogenia e histopatología. Descripción del brote pandémico en México 2009-2010**; Rev Mex Patol Clin, 2011; 58(2): 60-101

-
- 85 Juergens UR, Stöber M, Vetter H.; **The anti-inflammatory activity of L-menthol compared to mint oil in human monocytes in vitro: a novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases**; Eur J Med Res; 1998, 3(12): 539-45
- 86 Chao LK, Hua KF, Hsu HY, Cheng SS, Lin IF, Chen CJ, Chen ST, Chang ST.; **Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling**; food Chem Toxicol, 2008; 46(1):220-31
- 87 Kim DH, Kim CH, Kim MS, Kim JY, Jung KJ, Chung JH, An WG, Lee JW, Yu BP, Chung HY.; **Suppression of age-related inflammatory Nf-kB activation by cinnamaldehyde**; Biogerontology, 2007; 8(5):545-54
- 88 Peana A., D'aquila P., Panin F., Serra G., Pippia P., Moretti M.; **Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils**; Phytomedicine, 2002, Dec; 9(8): 721-6.
- 89 Chavan MJ, Wakte PS, Shinde DB.; **Analgesia and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from Annona squamosal L. bark**; Phytomedicine, 2010; 17(2):149-51
- 90 Yoon WJ, Lee NH, Hyun CG; Limonene suppresses lipopolysaccharide induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages; J. Oleo Sci; 2010; 59(8):415-21
- 91 Hirota R, Roger NN, Nakamura H, Song HS, Sawamura M, Suganuma N.; **Anti-inflammatory effects of limonene from yuzu (Citrus junus Tanaka) essential oil on eosinophils**; J Food Sc; 2010; 75(3):87-92