METABOLITOS PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS CON POTENCIAL ANTIVIRAL CONTRA EL VIRUS DENGUE.

E. Villalobos Sánchez [a], *J.C. Mateos Díaz* [b], *J.A. Rodríguez González* [b], *M.A. Camacho Ruíz* [b], *D.E. Elizondo Quiroga* [a*]
[a] Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica y Unidad de Biotecnología Industrial [b], CIATEJ A.C., Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, Guadalajara, Jal., CP 44270, México. *delizondo@ciatej.mx

Resumen

La biodiversidad microbiana del suelo, es una fuente potencial de diversos compuestos biológicamente importantes para la industria farmacéutica. A lo largo de las últimas décadas los actinomicetos han adquirido un papel fundamental en el descubrimiento y obtención de metabolitos bioactivos que poseen actividad antagonista contra una gran variedad de virus. Debido a que hasta el momento no se cuenta con una terapia antiviral eficaz contra el virus dengue (DENV), en éste trabajo se realizó una evaluación del potencial antiviral de extractos fermentativos de microorganismos aislados de suelos mexicanos. El actinomiceto denominado 2F-2, mostró un efecto inhibitorio de DENV en cultivo celular de la línea vero CCL-81 mismo que, se observó que al someter simultáneamente tanto el extracto crudo como una fracción >100kDa de la cepa 2F-2 con el DENV serotipos 1,2 y 3, éste no mostro él efecto citopático (CPE) característico producido por estos virus. Los resultados obtenidos sugieren que, el actinomiceto 2F-2, es un candidato potencial para obtener moléculas antivirales de origen natural contra DENV.

Introducción

Los actinomicetos son bacterias aerobias gram positivas, y se encuentran en el suelo formando la mayor parte de población microbiana. Desde hace muchos años, son fuentes ilimitadas de compuestos con aplicaciones terapéuticas antibacterianas, anti-fúngicas, antioxidantes, anticancerígenas, anti-algas, antiinflamatorias, antivirales [2-4], entre otras [5]. Hablando específicamente de la obtención de moléculas antivirales, Kumar y col. reportaron actividad antiviral de *Streptomyces Spp*. contra el virus de la mancha blanca del camarón [4], Mohamed y col. reportaron actividad antiviral en *Streptomyces* halotolerantes contra virus del mosaico del tabaco (TMV) y potivirus Y de la papa [3], Uyeda también reportó actividad antiviral en *Streptomyces microflavus* contra virus herpes (HSV-1), influenza A y B [2], por lo cual los actinomicetos han demostrado su capacidad de producir una variedad de metabolitos bioactivos y por este motivo, cada día es más importante el descubrimiento de nuevas moléculas antivirales a través de los análisis de detección de bioactividad en dichos microorganismos, sobre todo para aquellos virus para los que aún no se cuenta con una terapia antiviral especifica.

El dengue es una enfermedad del tipo viral trasmitida por mosquitos que se ha consolidado a nivel mundial como un problema creciente de salud pública, sobre todo en las zonas tropicales y subtropicales, donde se ha convertido en una enfermedad endemo-epidémica [6]. Las últimas estimaciones sugieren que alrededor del mundo hay aproximadamente unas 350 millones de infecciones por año [7] y unos 2.5 billones de personas viven en zonas de riesgo, propensas a contraer la enfermedad.

El virus del dengue (DENV) es una partícula pequeña, con un diámetro de 50nm que contiene una membrana lipídica derivada del huésped, una cápside y una envoltura, mismos que protegen en su interior la única copia de material genético, la cual consiste en RNA de cadena simple de polaridad positiva. Dicho virus se trasmite a través de la picadura de mosquitos hembra infectadas, siendo *Aedes aegypti* el vector principal y en menor medida, la especie *Ae. albopictus* [8]. Una vez que una persona ha sido infectada, ésta puede experimentar diferentes cuadros clínicos como, fiebre indiferenciada, fiebre por dengue (DF), fiebre hemorragica (DHF) y el grado más severo, síndrome por shock hipovolémico (DSS) que puede conducir a la muerte [8].

© 2016 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
ISBN 978-607-95593-4-2

Con la rápida expansión de la enfermedad es crucial el desarrollo de medidas de prevención y control, incluidos los medicamentos antivirales y las vacunas. Aunque recientemente se aprobó una vacuna contra el virus dengue, la terapia antiviral representa una buena alternativa para el tratamiento de la enfermedad, especialmente cuando existen obstáculos que imposibilitan la obtención de una vacuna segura y efectiva contra los 4 serotipos del dengue [9]. Los investigadores han realizado muchos esfuerzos para encontrar un candidato para el tratamiento antiviral contra estos virus, incluidas la búsqueda de inhibidores de la entrada del virus a la célula hospedera [10] e inhibidores de su ciclo de replicación [11], sin embargo a pesar de ellos, los tratamientos empleados a los enfermos siguen siendo paliativos.

Metodología

Células y virus: Las células vero (African Green Monkey Kidney) (ATCC) usadas en este estudio, fueron cultivadas y propagadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)* suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina, y 1% de glutamina. Las células de mosquito C6/36 (*Ae. albopictus*) fueron cultivadas en medio L-15 (Leibovitz) suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de penicilina–estreptomicina, 1% de glutamina y 10% de FBS. Esta última línea celular fue utilizada para la propagación del virus.

Obtención de metabolitos de actinomicetos: Para los cultivos de actinomicetos, se utilizaron 48 cepas de actinomicetos, previamente identificados morfológicamente como *Streptomyces sp,* pertenecientes a una colección conjunta de microorganismos CIAD-CIATEJ. Dichas cepas fueron aisladas de muestras de suelos del desierto de Sonora y de la ribera de Chapala. Se empleó un medio de cultivo que consiste en 10g/L de harina de soya, 5% de glucosa, 0.5% de peptona, 0.3% de NaCl y 0.3% de $CaCO_3$ manteniendo las siguientes condiciones durante un periodo de 7 días: 30°C, pH 7 y 250 rpm [2]. Para la búsqueda y selección, se utilizó la fracción extracelular del cultivo, separando la biomasa por centrifugación y filtración.

Determinación de actividad antiviral: En el ensayo de determinación de actividad antiviral, se sembraron células de la línea vero-CCL81 en placas de 24 pozos y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 hasta obtener monocapas con un 90-100% de confluencia. Posteriormente se realizó una mezcla del virus con 140,000 UFP/ml (unidades formadoras de placa) con el extracto crudo metabólico extracelular a una dosis máxima no citotóxica (DMNC) en un volumen de 50µl, los cuales se inocularon en las monocapas celulares, se dejaron adsorber durante 2 horas y se añadieron 950µl de DMEM con 2% de FBS. La placa se incubó a 37°C y 5% de CO_2 y se monitoreo el efecto citopático (CPE) bajo el microscopio invertido durante los siguientes 7 días posteriores a la infección (p.i). Una vez que la muestra fué seleccionada como candidato potencial, se procedió a fraccionar el extracto crudo.

Fraccionado del extracto: Se emplearon unidades de ultrafiltración de 3, 10, 30 y 100 kDa. Cada una de las fracciones diafiltradas se sometió nuevamente y de manera individual a determinación de CPE por microscopía, para identificar la fracción responsable de la actividad antiviral.

Cinética de crecimiento microbiano: Se prepararon 14 matraces Erlenmeyer conteniendo 50ml del medio de crecimiento estéril previamente descrito. Los matraces fueron inoculados con 500,000 esporas/ml e incubados a 30°C en agitación constante a 200rpm. Cada día posterior a la inoculación, se recogieron 2 matraces para analizar consumo de glucosa, contenido total de proteínas, biomasa y actividad antiviral mediante los métodos DNS, Bradford, peso seco y cultivo celular respectivamente.

© 2016 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
ISBN 978-607-95593-4-2

Resultados

De los 48 aislados analizados en éste estudio, el actinomiceto 2F-2 fue el único microorganismo que mostro actividad inhibitoria del CPE de DENV en cultivo celular *in vitro.* En la figura 1. Se muestra el ensayo antiviral 7 días p.i en donde se observa una completa inhibición del efecto citopático causado por DENV 1,2 y 3, solo cuando se está en presencia del extracto 2F-2 a una dilución 1:300 (DMNC), tanto para el extracto completo como el fraccionado >100kDa. En la figura 2, se observan los resultados de la cinética de crecimiento del actinomiceto 2F-2, la cual se llevó a cabo durante 7 días. Se analizó la fracción extracelular y se determinó que a partir del segundo día post inoculación (48 horas) se comienza a producir el metabolito antiviral. Algunos autores sugieren también que éstos antivirales se producen a partir del día 2 post inoculación, alcanzando un máximo de producción al dia 4[12].

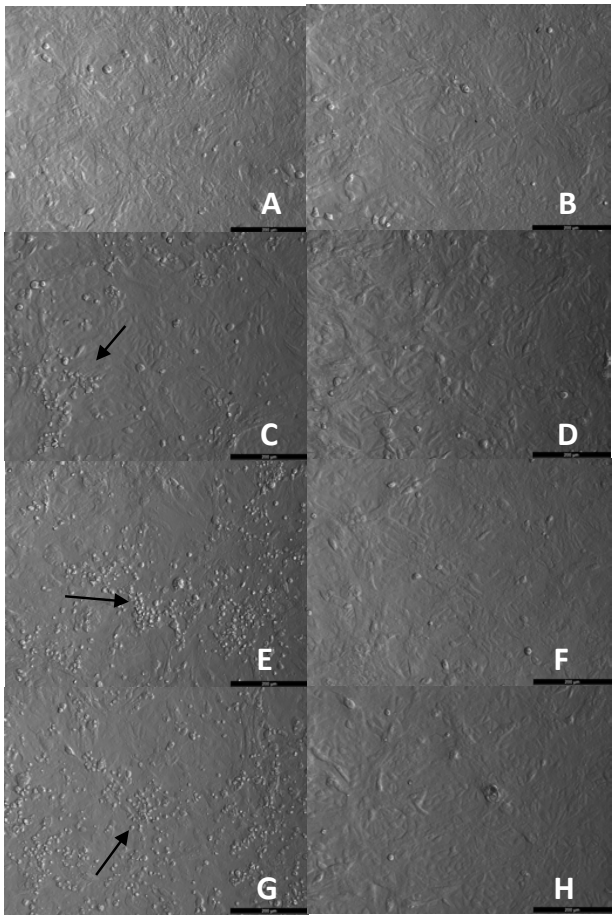

Figura 1.- *Determinación de actividad antiviral por inhibición de CPE de DENV por el extracto 2F-2.* ***A****: Control negativo DMEM 2% FBS,* ***B****: Control negativo 2F-2 1:300,* ***C****: Control positivo DENV1* ***D****: Tratamiento 2F-2 DENV1****E:*** *C+ DENV2* ***F:*** *Tratamiento 2F-2 DENV2* ***G:*** *C+ DENV3* ***H:*** *Tratamiento 2F-2 DENV3(20X). Las flechas señalan el CPE característico de DENV en controles positivos: arredondamiento, formación de aglomerados tipo sincicios y aumento de la permeabilidad de la membrana[1].*

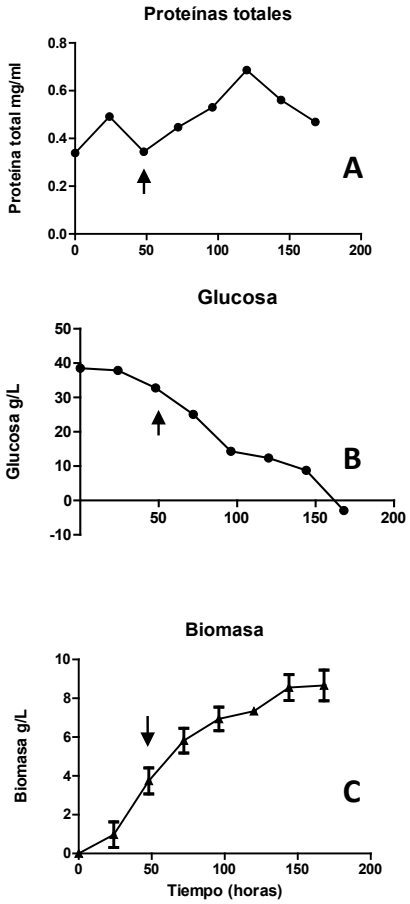

Figura 2.- *Cinética de crecimiento del actinomiceto 2F-2 durante 168hrs.* ***A****: Producción de proteínas totales (mg/ml)* ***B****: Consumo de glucosa (g/L) C: Biomasa (g/L). Las flechas indican la detección de actividad antiviral.*

© 2016 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
ISBN 978-607-95593-4-2

Conclusiones

Los actinomicetos son microorganismos que están distribuidos ampliamente en la naturaleza y juegan un papel muy importante en la degradación de la materia orgánica del suelo, además es bien conocido que son productores de moléculas de interés industrial como antibióticos y anti fúngicos. Éste reporte revela que además, también son productores de moléculas antivirales importantes en la industria farmacéutica. Nuestro análisis de búsqueda y selección muestra que el actinomiceto obtenido (2F-2), es un candidato promisorio potencial para la obtención de una molécula terapéutica antiviral de origen natural, debido a que mediante ensayos *in vitro* se observó que el extracto crudo extracelular 2F-2, es capaz de inhibir el efecto citopático causado por la infección de DENV. Además, el fraccionado de los metabolitos obtenidos demuestra que tanto el extracto completo, como la fracción > 100kDa poseen dicha actividad desde y a partir de las 48 horas post inoculación. La existencia de estos candidatos en la naturaleza sugiere que, los actinomicetos podrían no solo producir moléculas antivirales activas contra dengue, sino también contra otros tipos de virus que circulan en la naturaleza.

Referencias

1. Henchal, E.A. and J.R. Putnak, *The dengue viruses.* Clinical microbiology reviews, 1990. **3**(4): p. 376-396.
2. Uyeda, M., *[Metabolites produced by actinomycetes--antiviral antibiotics and enzyme inhibitors].* Yakugaku Zasshi, 2004. **124**(8): p. 469-79.
3. Mohamed, S.H. and A. Galal, *Identification and antiviral activities of some halotolerant Streptomycetes isolated from Qaroon Lake.* Int J of Agri biol, 2005. **7**: p. 747-753.
4. Kumar, S.S., R. Philip, and C. Achuthankutty. *Antiviral property of marine actinomycetes against white spot syndrome virus in penaeid shrimps*. 2006. Indian Academy of Sciences.
5. Chaudhary, H.S., et al., *Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production.* Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2013. **3**(8 supplement 1): p. S83-S94.
6. Gubler, D.J., *Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century.* Trends in microbiology, 2002. **10**(2): p. 100-103.
7. Bhatt, S., et al., *The global distribution and burden of dengue.* Nature, 2013. **496**(7446): p. 504-7.
8. Organization, W.H., et al., *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. 2009: World Health Organization.
9. Alan L. Rothmana, F.A.E., *Dengue vaccine: the need, the challenges and progress.* Journal of Infectious Diseases Advance, 2016.
10. De La Guardia, C. and R. Lleonart, *Progress in the identification of dengue virus entry/fusion inhibitors.* BioMed research international, 2014. **2014**.
11. Takhampunya, R., et al., *Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin.* Journal of General Virology, 2006. **87**(7): p. 1947-1952.
12. KIM, W.-G., et al., *Benzastatins A, B, C, and D: new free radical scavengers from Streptomyces nitrosporeus 30643. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities.* The Journal of antibiotics, 1996. **49**(1): p. 20-25.

© 2016 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
ISBN 978-607-95593-4-2