

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



“EFECTO DEL EXTRACTO DE LA *Mentha spicata* FRENTE AL COXSACKIEVIRUS B4 EN LA LINEA CELULAR HEP-2”

Tesis presentada por la bachiller:
Ortiz Torres, Vanessa Stefani

Para optar el Título Profesional de:
Química Farmacéutica

Asesor:
PhD Villanueva Salas, José Antonio

AREQUIPA – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20170000048841

N° Trámite en Fac. 1739-2017

Fecha 21-11-2017

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

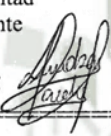
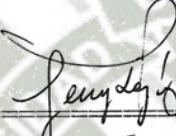
DE: **ORTIZ TORRES, Vanessa Stefani**

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"EFECTO DEL EXTRACTO DE LA *Mentha spicata* FRENTE AL COXSACKIE-VIRUS B4 EN LA LINEA CELULAR HEP-2"

DICTAMINADORES: 1) Dra. Yenny López Valencia 2) Mgter. Julitza Paredes Fuentes

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad
Atentamente

Firmas :   (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha 06/12/2017

ASESOR: Dr. José Villanueva Salas

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el título debe cambiar a: **"EFECTO DEL EXTRACTO DE LA *Mentha spicata* FRENTE AL COXSACKIE-VIRUS B4 EN LA LINEA CELULAR Hep-2"** y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.
Atentamente

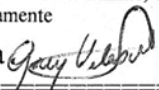
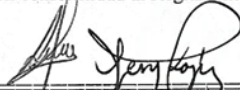
Firma  Fecha 14/05/18

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dra. Gaby Velasco Lozano** 3) **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**
2) **Dra. Yenny López Valencia**

DICTAMEN DE BORRADOR:


Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por la recurrente, debiendo cambiar el título a: **"EFECTO DEL EXTRACTO DE LA *Mentha spicata* FRENTE AL COXSACKIEVIRUS B4 EN LA LINEA CELULAR Hep-2"**, y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente

Firma   (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 25/05/18

JURADOS: Presidente **Dra. Gaby Velasco Lozano**
Vocal **Dra. Yenny López Valencia**
Secretario **Mgter. Julitza Paredes Fuentes.**

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 08/06/18 Hora: 19.00 • Local: C- 402 (SUM)


DECANO 04/06/18

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a personas muy especiales en mi vida, que son el motivo y la razón de todo mi esfuerzo y logros obtenidos, ya que desde siempre han estado a mi lado para apoyarme y no dejarme caer y si lo hice, estuvieron para darme su mano y salir adelante juntos.

Para mis padres Néstor y Angélica, gracias por todo su esfuerzo y dedicación para darme lo mejor en cada momento, no hay palabras de agradecimiento por todo lo que ustedes hacen por mí, cada paso, cada logro es para ustedes, porque siempre están en el momento indicado para darme aliento y fuerza para seguir adelante, y sé que yo también estaré para ustedes apoyándolos, los amo papitos.

Christian, mi hermano mayor, gracias por tus consejos, tu apoyo, sin ti nada sería igual, eres mi mejor amigo, y mi inspiración por ser siempre un ejemplo para mí.

Agradecimientos

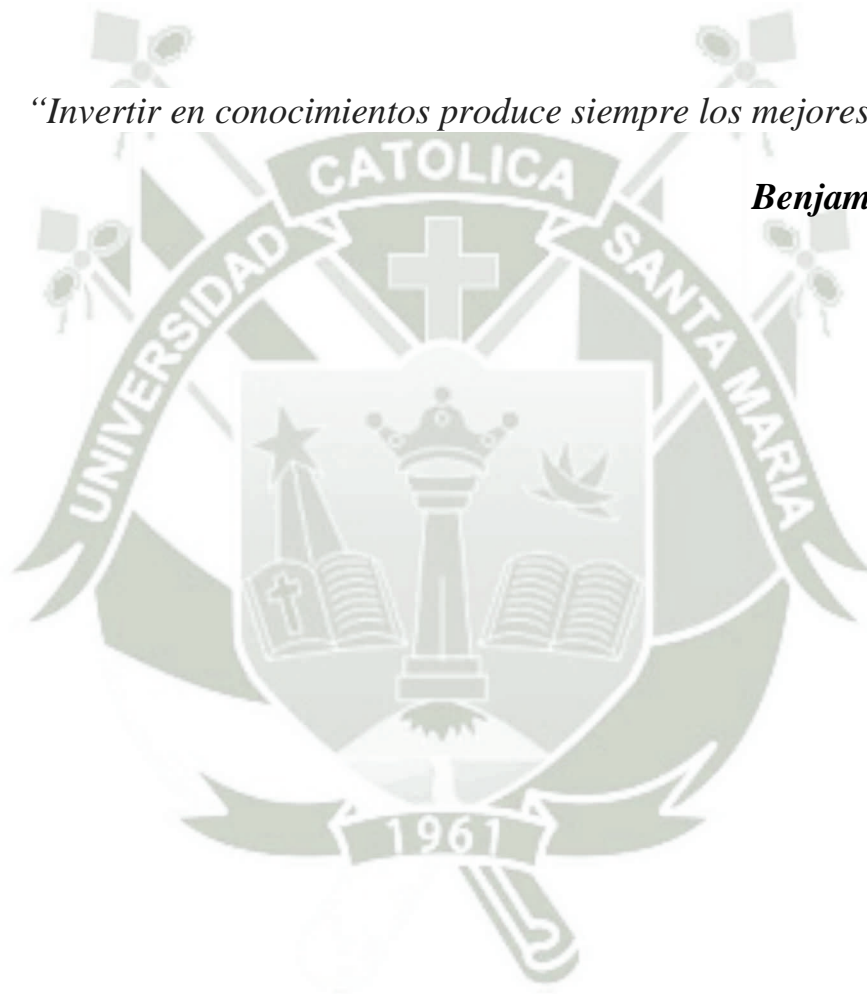
Gracias a la Universidad Católica Santa María por acogerme en su seno todos estos años, gracias al equipo de docentes que impartieron los conocimientos en las diversas materias de mi carrera profesional.

Gracias a la Universidad Lille 2 - Francia por darme la oportunidad de este proyecto de tesis en la persona de Mdm. María Benedicte Romond y a todo su equipo de trabajo Farmara, Ángelo, Frederic, quienes me apoyaron en todo brindándome su disponibilidad y paciencia.

De manera especial al PhD. José Villanueva Salas, por aceptar ser mi guía en la realización de esta tesis, por su colaboración y orientación en el desarrollo de esta investigación sino también por apoyarme en la formación como profesional.

“Invertir en conocimientos produce siempre los mejores beneficios”

Benjamin Franklin



ÍNDICE

RESUMEN.....	VII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN	XI
HIPÓTESIS	XII
OBJETIVOS.....	XIV
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO	1
1. DIABETES TIPO 1	1
1.1. Etiología y Patogénesis	1
1.2. Epidemiología	2
1.3. Factores implicados en la patogenia de DT1	3
1.3.1. Enterovirus	4
1.3.2. Genoma	5
1.4. Coxsackievirus B4 (CV-B4) y diabetes tipo 1	7
1.4.1. Estudios retrospectivos.....	7
1.4.2. Estudios prospectivos.....	7
1.4.3. Síntesis de los principales mecanismos de destrucción de las células beta	10
1.4.3.1. Infección de células beta	10
1.4.3.2. Mimetismo molecular	11
1.4.3.3. “Activación espectador” o “asesinato inocente”.....	13
1.4.3.4. Persistencia de enterovirus (Coxsackievirus B).....	14
1.5. Diagnostico	17
1.6. Tratamiento	17
1.6.1. Alimentación.....	18
1.6.2. Insulinoterapia.....	19
1.7. Complicaciones	20
2. <i>MENTHA SPICATA</i>	21
2.1. Generalidades	21
2.1.1. Aspecto botánico.....	22
2.1.1.1. Clasificación taxonómica.....	22
2.1.1.2. Características botánicas	23
2.1.1.3. Composición química	24
2.2. Aspecto geográfico.....	25
2.3. Usos.....	25
2.3.1. Medicina.....	25
2.3.2. Alimentación	26
2.3.3. Industria.....	26
CAPÍTULO II	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	28

1.1.	<i>Material Biológico y otros</i>	28
1.1.1.	Células.....	28
1.1.2.	Virus.....	28
1.1.3.	Extracto de <i>Mentha spicata</i>	28
1.2.	Reactivos	29
1.3.	Equipos.....	29
2.	MÉTODOS.....	30
2.1.	<i>Cultivo celular</i>	30
2.1.1.	Acondicionamiento celular	30
2.1.2.	Ensayo de exclusión celular	31
2.2.	<i>Coxsackievirus B4</i>	31
2.3.	<i>Extracto acuoso de Mentha spicata</i>	32
2.3.1.	Protocolo de las diluciones del extracto acuoso de <i>Mentha spicata</i> ..	33
2.4.	<i>Diseño experimental</i>	35
2.4.1.	Viabilidad celular frente al extracto.....	35
2.4.2.	Evaluación del efecto del Coxsackievirus B4 sobre las células Hep-2 en función al tratamiento con extracto de <i>Mentha spicata</i>	36
2.5.	<i>Cuantificación del efecto citopático (ECP) y patogenia</i>	38
2.6.	<i>Análisis del efecto citotóxico del Coxsackievirus B4 frente al extracto acuoso de Mentha spicata</i>	39
2.7.	<i>Análisis estadístico</i>	40
	CAPÍTULO III.....	41
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
1.	OBTENCIÓN DEL CULTIVO CELULAR	41
1.1.	<i>Células Hep-2</i>	41
2.	EXCLUSIÓN DE VIABILIDAD CELULAR	42
2.1.	<i>Exclusión celular y porcentaje de células viables en la suspensión celular</i> 42	
3.	VIABILIDAD CELULAR FRENTE AL EXTRACTO.....	43
3.1.	<i>Cuantificación del efecto citopático (ECP) y patogenia</i>	43
3.2.	<i>Análisis del efecto citotóxico del extracto de Mentha spicata en células Hep-2</i> 45	
4.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL COXSACKIEVIRUS B4 SOBRE LAS CÉLULAS HEP-2 EN FUNCIÓN AL TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE <i>MENTHA SPICATA</i>	51
4.1.	<i>Cuantificación del efecto citopático (ECP) y patogenia</i>	51
4.2.	<i>Análisis del efecto citotóxico del Coxsackievirus B4 frente al extracto acuoso de Mentha spicata en células Hep-2</i>	52
	CONCLUSIONES.....	76
	SUGERENCIAS.....	77
	BIBLIOGRAFÍA.....	78
	ANEXOS	86

RESUMEN

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune que representa el 5-10% de todos los casos de diabetes, se caracteriza por la destrucción de células β de los islotes pancreáticos, se cree que los virus juegan un papel importante en la iniciación o aceleración de esta enfermedad en particular los Cocksackievirus tipo B.

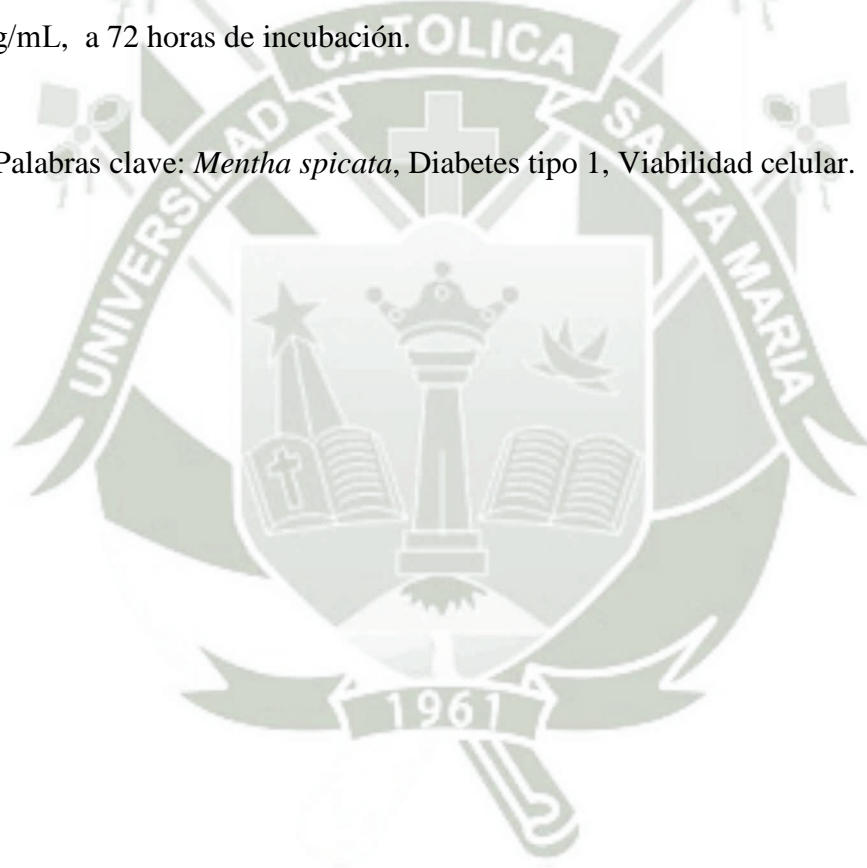
El presente estudio se realizó en un laboratorio de virología EA3610 Lille-Francia en la Universidad de Lille 2; tuvo como objetivo evaluar el efecto del extracto acuoso de *Mentha spicata* a diferentes concentraciones (1,6 $\mu\text{g/mL}$ a 0,003125 $\mu\text{g/mL}$) en la infección de células Hep-2 por Cocksackievirus B4 (CV-B4), mediante la determinación de la viabilidad celular y cuantificación del efecto citopático relacionado a su absorbancia, mediante la cuantificación del efecto citopático (% ECP) y el método cristal violeta.

El extracto de *Mentha spicata* produjo una significativa disminución del efecto citopático del Cocksackievirus B4 en células Hep-2 ($p < 0.05$), dependiente de la concentración, a partir de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ a 0.0125 $\mu\text{g/mL}$ se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) a 48 horas de incubación, a la concentración 0.025 $\mu\text{g/mL}$ se produjo una significativa disminución del efecto citopático del Cocksackievirus B4 ($p < 0.05$) en células Hep-2 a 72 horas de incubación, esto se confirmó en todas las repeticiones.

Además, el efecto inhibitorio del extracto de *Mentha spicata* frente a Coxsackievirus B4 en células Hep-2 fue evidenciado mediante la cuantificación del efecto citopático ECP con microscopía óptica invertida, observándose alteraciones del crecimiento celular que incluye la disminución de la citólisis de la población de células y el daño estructural evidenciado por la pérdida de la morfología y el tapiz celular.

Se concluye que el extracto de *Mentha spicata* produce una significativa disminución del efecto citopático del Coxsackievirus B4 en las células Hep-2 a concentraciones de 0.1 µg/mL a 0.0125 µg/mL a 48 horas de incubación y 0.025 µg/mL, a 72 horas de incubación.

Palabras clave: *Mentha spicata*, Diabetes tipo 1, Viabilidad celular.



ABSTRACT

Type 1 diabetes is an autoimmune disease that represents 5-10% of all cases of diabetes. This sickness characterized by the destruction of pancreatic islet beta cells; it is believed that viruses play an important role in the initiation or acceleration of this disease in particular the Coxsackievirus type B.

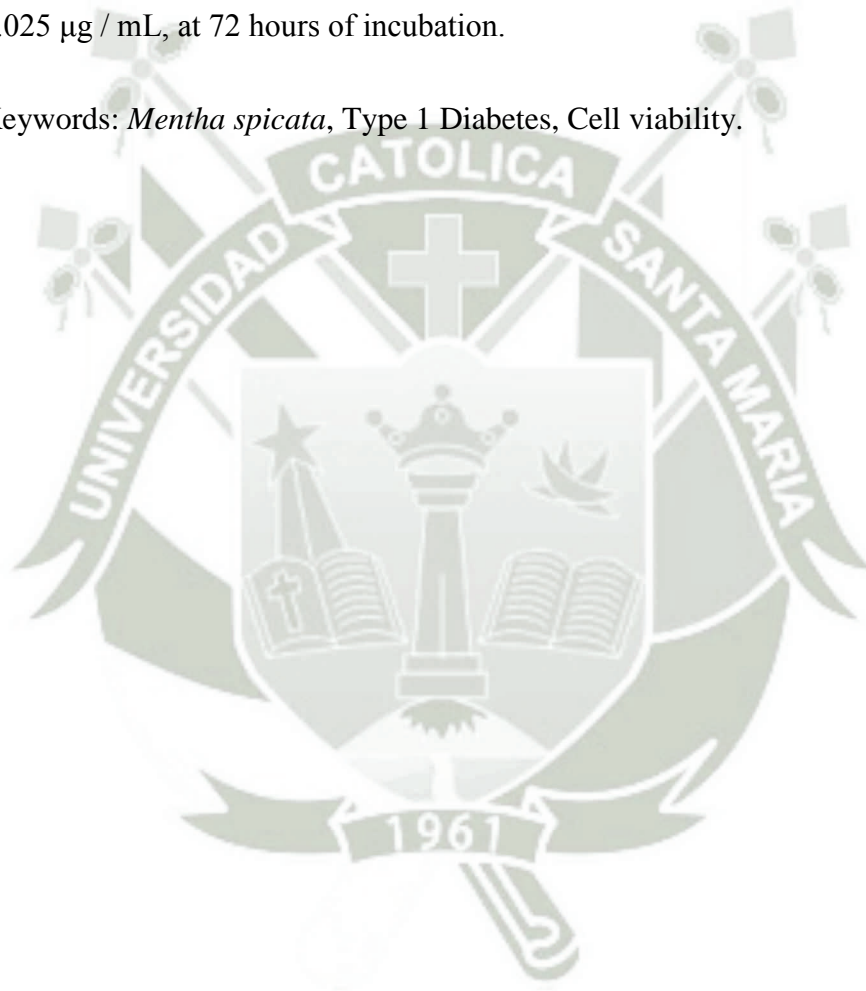
In the present study it was carried out in laboratory of virology EA3610 Lille-France of the University of Lille 2; The objective was to evaluate the effect of the aqueous extract of *Mentha spicata* at different concentrations (1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.003125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was evaluated in the infection of Hep-2 cells by Coxsackievirus B4 (CV-B4), determining the cell viability and quantification of the cytopathic effect related to its absorbance, through of the quantification of the cytopathic effect ECP (%) and the crystal violet method.

The extract of *Mentha spicata* produced a significant decrease in the cytopathic effect of Coxsackievirus B4 on cell viability ($p < 0.05$), depending on the concentration, from 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a significant decrease was observed ($p < 0.05$) variable by repetition, at the 0.025 $\mu\text{g} / \text{mL}$ concentration there was a significant decrease in the cytopathic effect of Coxsackievirus B4 ($p < 0.05$) in Hep-2 cells, this was confirmed in all replicates.

In addition, the inhibitory effect of the extract of *Mentha spicata* against Coxsackievirus B4 in Hep-2 cells was evidenced by the quantification of the cytopathic effect ECP with inverted optical microscopy, observing alterations of cell growth that includes the decrease of the cell population cytolysis and the structural damage evidenced by the loss of morphology and the cellular tapis.

It is concluded that the extract of *Mentha spicata* produce a significant decrease in the cytopathic effect of Coxackievirus B4 in Hep-2 cells at concentrations of 0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ to 0.0125 $\mu\text{g} / \text{mL}$ at 48 hours of incubation and 0.025 $\mu\text{g} / \text{mL}$, at 72 hours of incubation.

Keywords: *Mentha spicata*, Type 1 Diabetes, Cell viability.



INTRODUCCIÓN

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune caracterizada por la alteración de las células productoras de insulina pancreáticas, que resulta en hiperglucemia.¹ La enfermedad se asocia con complicaciones graves que afectan la calidad de vida de las personas.¹ La causa de diabetes tipo 1 es desconocida.¹ El desarrollo de la enfermedad es el resultado de interacciones entre factores inmunológicos, genéticos y ambientales.² Se cree que los virus juegan un papel importante en la iniciación o aceleración de la enfermedad. Este es un tema importante ya que abre la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias preventivas y terapéuticas para combatir la enfermedad.^{3, 4, 5}

El papel de los enterovirus en el desarrollo de la diabetes tipo 1, en particular los Coxsackievirus tipo B, se ve respaldado por observaciones epidemiológicas.^{6, 7} Se ha demostrado que las infecciones por enterovirus fueron significativamente más comunes en pacientes diabéticos recientemente diagnosticados, en comparación con los sujetos control. Se pueden detectar RNA y / o proteínas enterovirales en muestras de sangre y biopsias intestinales de pacientes con diabetes tipo 1. La hipótesis de una relación entre enterovirus y la enfermedad se ha visto reforzada por la presencia de componentes enterovirales o partículas infecciosas en el páncreas de pacientes con diabetes tipo 1.^{8, 9}

El aumento de la incidencia de diabetes tipo 1 es del 3 a 5% por año; este incremento es mayor en el grupo preescolar. Aproximadamente el 4% de los niños con diabetes tipo 1 tienen menos de 2 años al momento del diagnóstico.¹⁰

De acuerdo a esta problemática, el presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar el efecto *in vitro* del extracto acuoso de *Mentha spicata* en la infección de células Hep-2 por Cocksackievirus B4 (CV-B4).



HIPÓTESIS

Previos estudios han demostrado que el Cocksackievirus B4 tiene una asociación significativa con el origen de la diabetes tipo 1, razón por la cual antecedentes investigativos plantean efectos inhibitorios con extractos acuosos de la familia Lamiaceae para diversas enfermedades producidas por virus; es probable que el extracto acuoso de *Mentha spicata* disminuya la actividad inhibitoria del Cocksackievirus B4 frente a las células Hep-2.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Efecto del extracto de la *Mentha spicata* frente al coxsackievirus B4 en la línea celular Hep-2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Inducir el virus Coxsackievirus B4 en la línea Celular Hep-2.
- Determinar la viabilidad de las células Hep-2 frente a diferentes concentraciones del extracto *Mentha spicata*.
- Determinar el efecto antiviral de la *Mentha spicata* sobre el Coxsackievirus B4 en la línea celular Hep-2.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1, también denominada "diabetes mellitus insulino dependiente" (IDDM) o "diabetes juvenil",¹¹ es una enfermedad autoinmune que representa el 5-10% de todos los casos de diabetes.¹² Esta enfermedad crónica con complicaciones graves que afectan la calidad de vida de las personas y tiene enormes repercusiones en términos de gasto en salud.¹²

En la diabetes tipo 1, las células β de los islotes pancreáticos se destruyen o deterioran de manera selectiva y masiva (80-90%) ,¹³ lo que da como resultado un defecto en la producción de insulina que es característico de la enfermedad. Antes del inicio de las manifestaciones clínicas de la diabetes, en la fase subclínica los autoanticuerpos circulan en la sangre periférica de las personas. Estos autoanticuerpos se dirigen a los autoanticuerpos de células β de islote pancreáticos [auto anticuerpos de insulina (IAA)], glutamato decarboxilasa (anticuerpos GAD65) y tirosina fosfatasa [auto anticuerpos asociados a insulinoma (IA-2)].¹¹

La incidencia de diabetes tipo 1 alcanza su punto máximo a los 2, 4 a 6 y 10 a 14 años y generalmente ocurre antes de los 40 años.¹³ Se ha observado una tasa de incidencia creciente durante las últimas décadas, especialmente en individuos jóvenes (menores de cinco años). La incidencia anual mundial varía de 1 por 100,000 en Asia a 14 por 100,000 en Estados Unidos y más de 30 por 100,000 en Escandinavia.¹²

1.1. Etiología y Patogénesis

Se observó que menos del 5% de los sujetos diabetes tipo 1 genéticamente predispuestos a desarrollar la enfermedad, y la tasa de

concordancia en los gemelos monocigóticos es de sólo 30 a 50%. El sorprendente incremento en la incidencia de diabetes tipo 1 en las últimas décadas no puede ser explicado por un aumento de la susceptibilidad genética de la población. Por lo tanto se sospecha fuertemente que los factores ambientales tales como fármacos, toxinas, nutrientes y virus desempeñan un papel en la patogénesis de la enfermedad en sujetos predispuestos genéticamente.¹⁴

El papel de algunas bacterias de la flora normal o bacterias patógenas tales como *Mycobacterium tuberculosis*, también se han reportado como agentes patógenos en diabetes tipo 1.^{14, 15}

Entre los virus que se encuentran entre los más sospechosos son la rubéola o parotiditis, citomegalovirus, retrovirus y rotavirus. Pero las más fuertes presunciones pesan sobre enterovirus, especialmente Coxsackievirus B4.¹⁶

1.2. Epidemiología

En los últimos 25 años las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) están teniendo una prevalencia incrementada, particularmente en países en desarrollo, impactando en la morbi-mortalidad, costos sanitarios y productividad. La enfermedad cardiovascular (CV), cáncer, enfermedad pulmonar crónica y diabetes mellitus representan más del 50% de las muertes a nivel mundial con excepción de la región del África subsahariana y la Organización Mundial de la Salud (OMS) proyecta que la diabetes será la séptima causa de mortalidad a nivel mundial el 2030.¹⁷

Se estima que hay 387 millones de personas con diabetes mellitus en el mundo, 25 millones de los cuales viven en Sudamérica y el caribe.¹⁸

En el Perú, la probabilidad de muerte por una de las principales ECNT es 11% y estas enfermedades causan el 66% del total de muertes en nuestro país.⁹ En 2014 la Federación Internacional de Diabetes (IDF) estima un prevalencia de 6.1% de DM en Perú en adultos entre 20 y 79 años de edad. Esto corresponde a 1, 143,600 millones de personas, 317,700 de las cuales no están diagnosticadas.¹⁸

La incidencia de diabetes tipo 1 fue estimada en un estudio incluido en el proyecto DiaMond de la OMS, encontrándose en niños ≤ 14 años de edad para el periodo de 1990-1991 una tasa de 0.4/1000,000 por año para niñas. El estimado de certeza fue de 88%. Esta incidencia es una de las más bajas reportadas a nivel mundial debidas probablemente al mestizaje de la población o factores ambientales.²⁰

La incidencia anual de diabetes tipo 1 varía ampliamente de un país a otro (de menos de 1 por 100.000 habitantes en Asia a aproximadamente 14 por cada 1000,000 en los Estados Unidos y más de 30 por 100,000 en Escandinavia), pero esta, sin embargo, en constante aumento en todo el mundo (aproximadamente 3% por año entre 1969 y 2000), especialmente entre niños menores de cinco años. En Francia, la incidencia es de aproximadamente 10 casos nuevos por cada 1000 000 habitantes por año, y 150 000 personas son víctimas de la enfermedad.²¹

1.3. Factores implicados en la patogenia de DT1

La prevención de diabetes tipo 1 sigue siendo un desafío en parte porque la causa exacta aún se desconoce. De hecho, no hay un solo factor implicado como la única causa; diabetes tipo 1 parece ser el resultado de las interacciones de múltiples de factores.²²

Se ha observado que menos del 5% de las personas genéticamente predispuestas desarrollan la enfermedad, y la tasa de concordancia es solo

30-50% entre gemelos monocigóticos.²² Además, es claro que el aumento alarmante de la incidencia de diabetes tipo 1 sobre las últimas décadas no puede ser el resultado de un aumento en la susceptibilidad genética dentro de la población. Esto ha llevado a la hipótesis de que el proceso podría ser desencadenado en sujetos genéticamente predispuestos por factores ambientales tales como drogas, toxinas,²³ nutrientes como la leche de vaca²⁴ y, más recientemente, virus²⁵ como el virus de la rubéola, virus de la parotiditis, citomegalovirus, retrovirus, rotavirus y especialmente enterovirus.^{26, 27}

La participación del virus es apoyado por la incidencia variable de diabetes tipo 1 de un país a otro y de una temporada a otra, así como por observaciones sobre la relación entre inmigración y desarrollo de la enfermedad.^{26, 27}

1.3.1. Enterovirus

Los enterovirus afectan a millones de personas en todo el mundo cada año, y se encuentran en las secreciones respiratorias (saliva, esputo o moco nasal) y en las heces de las personas infectadas. Las infecciones por enterovirus generalmente son benignas, pero también se encuentran manifestaciones graves como meningitis, encefalitis, miocarditis y sepsis neonatal.²⁸

Los enterovirus pertenecen a la familia Picornaviridae, que incluye los géneros Rhinovirus, Hepatovirus, Parechovirus, Cardiovirus, Kobuvirus, Aftovirus, Erbovirus y Teschovirus. Los enterovirus humanos se clasifican tradicionalmente, en la base de los criterios serológicos, en 64 serotipos distribuidos en cuatro subgéneros: Poliovirus (PV); Coxsackievirus A (CVA); Coxsackievirus B (CV-B); Echovirus (E-V). Una nueva clasificación de enterovirus humanos fue propuesto por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus

(ICTV), basado en homologías de secuencia, e incluido solo cinco especies: PV; y enterovirus humano (HEV) -A, -B, -C y -D. De acuerdo con esta nueva clasificación, pertenece CV-B a la especie HEV-B, y el género Enterovirus abarca 89 serotipos hasta el momento.²⁹

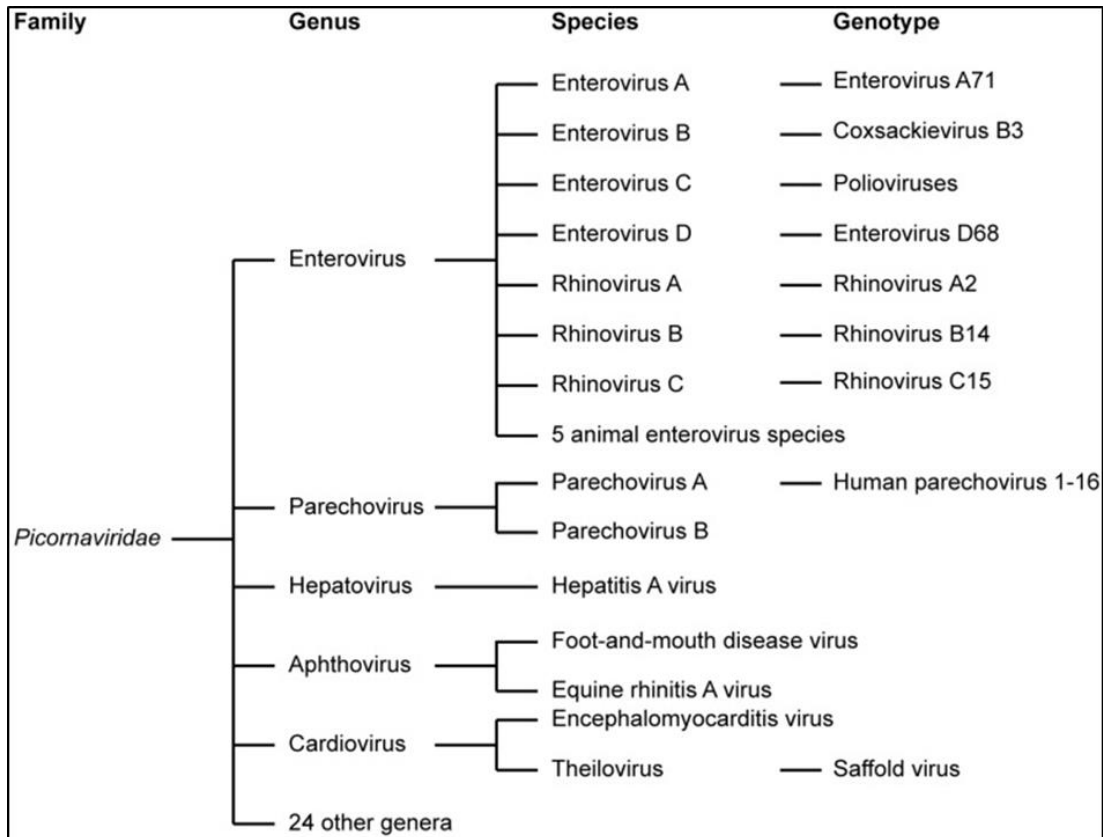


Fig. 1 Clasificación de Enterovirus y Picomaviridae.³⁰

1.3.2. Genoma

El genoma del virus consiste en una molécula de ARN de polaridad positiva. Las proteínas virales se sintetizan como una proteína grande (poliproteína) a partir de un único marco de lectura abierto. La poliproteína contiene tres regiones principales, la región P1 produce las proteínas de la cápside, P2 y P3 regiones producen las proteínas necesarias: procesamiento de las funciones de poliproteína, la replicación del ARN y de reducción de la célula infectada. La poliproteína comprende 2 secuencias correspondientes a enzimas

proteolíticas. P2A escinde proteínas no estructurales. Las proteínas de la cápside se denominan VP1, VP2, VP3 y VP4 (Fig. 2).³¹

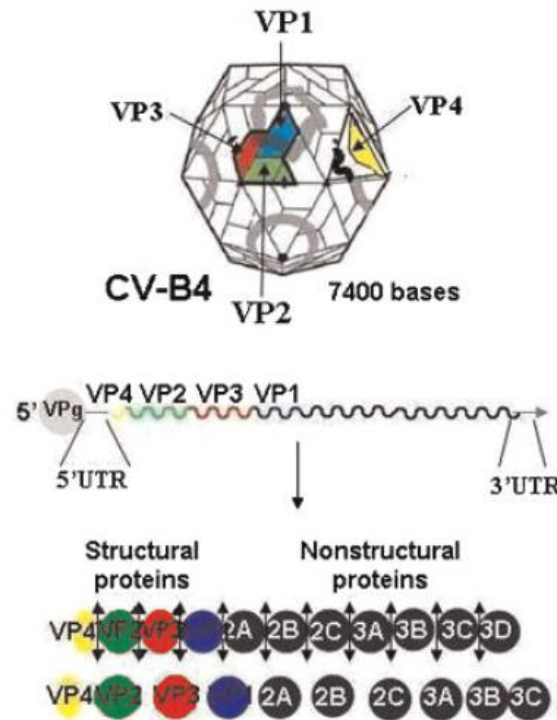


Fig. 2 Estructura *Coxsackievirus B4* (CV-B4).³¹

La proteína VP4 es la primera producida durante la escisión P1 cuando los nuevos viriones están listos para la encapsidación al final del proceso de maduración. Esto se debe principalmente a su localización, dentro de la cápside en contacto con el ARN viral. Las proteínas VP2, VP3 y VP1 se producen en este orden después de la producción de VP4 y se localizan en la superficie de la cápside. El ensamblaje de estas proteínas estructurales forma una cápside de forma icosaédrica. Las secuencias del genoma entre los diversos enterovirus están bien conservadas, con la excepción del enterovirus 72 (Hepatitis A), cuya clasificación como enterovirus es equívoca, especialmente dado que se ha demostrado su tropismo hepático; los enterovirus son pequeños (alrededor de 25-30 nm de diámetro).³¹

1.4. Coxsackievirus B4 (CV-B4) y diabetes tipo 1

Estudios epidemiológicos retrospectivos y prospectivos se han llevado a cabo para investigar una asociación entre infecciones por enterovirus y diabetes tipo 1.^{31,32}

1.4.1. Estudios retrospectivos

Estudios realizados en varios países mostraron que los anticuerpos anti-enterovirus y el enterovirus ARN se encuentran con mayor frecuencia en la sangre de pacientes diabéticos recientemente diagnosticados que en controles sanos.^{32, 33, 34, 35}

Los enterovirus más frecuentes son CV-B, y en particular CV-B4.^{36, 37, 38, 39} Un estudio demostró que IFNa se encuentra a altas tasas en plasma, asociado con la presencia de ARN CV-B en sangre del 75% de pacientes diabéticos tipo 1 en diversas etapas de la enfermedad, pero no en los controles.³⁹ Las investigaciones más recientes informaron la detección, mediante hibridación in situ (ISH) de células positivas para el ARN de enterovirus en el páncreas post mortem muestras de pacientes diabéticos tipo 1, pero no en los de los controles,⁴⁰ así como la detección de enterovirus por microscopía electrónica e inmunohistoquímica tinción de la proteína de la cápside VP1, en células-B de tres de seis donantes de órganos diabéticos, pero no en 26 donantes de control. En este último estudio, el enterovirus aislado del tejido pancreático endocrino de uno de los diabéticos donantes fue un CV-B4, como se muestra mediante genotipado.⁴¹

1.4.2. Estudios prospectivos

Estudios prospectivos basados en el seguimiento de niños que no eran diabéticos hasta que se inicio de la enfermedad tiene la ventaja de

revelar información sobre los procesos patogénicos que surgen durante la fase preclínica de la enfermedad. Sin embargo, a gran escala los estudios son lentos y caros.⁴²

Por esta razón los investigadores han centrado su atención en la aparición de los primeros marcadores inmunológicos, en particular, los autoanticuerpos dirigidos contra antígenos de islotes (ICA, IAA, GADA y IA-2A) como los puntos finales de sus estudios. Este enfoque permite el número de cohortes y la duración del seguimiento sea reducido, al tiempo que permite el análisis de la relación temporal entre las infecciones virales y el inicio de procesos autoinmunes correspondiente a la aparición de autoanticuerpos.⁴²

Los resultados de tres estudios prospectivos finlandeses. El estudio Childhood Diabetes in Finland (DiMe) fue el primera serie prospectiva para incluir a los hermanos de niños diabéticos. Se tomaron muestras de sangre de estos sujetos cada seis meses.^{43, 44} El diagnóstico de infección por enterovirus fue basado en un aumento significativo del título de anticuerpos anti-enterovirus en suero, según lo determinado por radioinmunoensayo (RIA) y métodos de inmunoensayo enzimático (EIA). Este estudio encontró que las infecciones por enterovirus fueron más frecuentes en los niños. Además, se observó que las infecciones por enterovirus se agruparon en el período inmediatamente anterior a la aparición de autoanticuerpos.⁴⁴

Estos datos serológicos fueron confirmados más tarde por detecciones más frecuente de ARN de enterovirus en el suero de niños prediabéticos en comparación con los controles.⁴⁵

El ensayo finlandés de Predicción y Prevención de la Diabetes (DIPP) fue un estudio de seguimiento de recién nacido genéticamente

predispuestos (de acuerdo con su perfil alélico HLA-DQ).⁴⁶ Varios usaron métodos para diagnosticar infecciones por enterovirus (incluida la EIA y la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa [RT-PCR]), y los intervalos entre los muestreos fueron más cortos que en el estudio DiMe (cada 3-6 meses para el suero y cada mes para las heces) para maximizar los resultados del estudio. Por lo tanto, se demostró que las infecciones por enterovirus eran más frecuentes en niños que se volvieron positivos para autoanticuerpos que en los controles. Estas infecciones también se agruparon en el período inmediatamente anterior a la aparición de autoanticuerpos dirigida contra células beta.^{47, 48}

Finalmente, el ensayo para reducir IDDM genéticamente en riesgo (TRIGR) fue un estudio en el que la presencia de autoanticuerpos se determinó en niños de dos años que fueron genéticamente predispuesto a desarrollar diabetes tipo 1, y que fueron alimentados hasta la edad de 6-8 meses con una fórmula de caseína hidrolizada. Una relación entre infecciones por enterovirus (diagnosticadas por seroneutralización, EIA y RT-PCR) y se observó la inducción de la autoinmunidad en contra células beta.⁴⁹

En estos estudios prospectivos, los controles fueron el recién nacido, hermanos de pacientes con diabetes tipo 1, o recién nacidos genéticamente predispuestos, que fueron emparejados por edad, ubicación, sexo y haplotipo HLA (en los estudios de recién nacidos genéticamente predispuestos).⁴⁹

Sin embargo, a diferencia de los estudios citados anteriormente, otros estudios han informado de ninguna asociación entre las infecciones por enterovirus y diabetes tipo 1. Sin embargo, es importante recordar que estos estudios se basaron en ensayos

serológicos tradicionales que buscan en un rango limitado de enterovirus.⁵⁰

En general, parece que una relación entre infección de enterovirus y DT1 pueden sospecharse; sin embargo, más estudios clínicos basados en series más grandes deben realizarse para confirmar estas teorías.

Un estudio multicéntrico, multinacional y epidemiológico: Determinantes ambientales de la diabetes en los jóvenes (TEDDY), está en progreso para identificar los agentes infecciosos, factores dietéticos y otros factores ambientales asociados con un mayor riesgo de autoinmunidad y diabetes tipo 1. TEDDY es un estudio de cohorte observacional en el que los recién nacidos menores de cuatro meses y con los alelos HLA de alto riesgo en población general, o con parientes de primer grado que tienen diabetes tipo 1, será inscrito, el reclutamiento tendrá lugar durante un período de cinco años período en seis centros clínicos en los Estados Unidos y Europa, y los niños participantes tendrán seguimiento hasta la edad de 15 años.⁵¹

1.4.3. Síntesis de los principales mecanismos de destrucción de las células beta

1.4.3.1. Infección de células beta

La hipótesis es que hay lisis celular directa inducida por virus después de la infección (**Fig. 3**). En CD-1 ratones, CV-B4 infecta las células de los islotes e induce la autoinmunidad en contra de las células beta.⁵² Insulinitis y autoanticuerpos contra islotes son el resultado de la persistencia del ARN viral en islotes durante varios meses, que parece es fundamental para el desarrollo de diabetes en estos animales. Infección de ratones SJL / J con un CVB4 Cepa JVB, adaptada de antemano por pasajes sucesivos en cultivos de células \

beta murinas, también provoca diabetes con replicación viral dentro de células β , según lo confirmado por la detección de antígeno viral utilizando inmunofluorescencia indirecta.⁵³

Esta teoría está respaldada por estudios en humanos que describen la presencia de antígenos de enterovirus en células β , así como la destrucción de células de islotes en pacientes que murieron por enterovirus en infecciones sistémicas.⁴² Los investigadores, con la ayuda de ISH, han encontrado evidencia de la presencia de ARN enterovirus en islotes pancreáticos de recién nacidos que murieron de infecciones fulminantes de CV-B, en los islotes pancreáticos de adolescentes y adultos con diabetes tipo 1.⁵⁴ Además, la presencia de ARN enterovirus y / o el virus en sí, en particular, CV-B4 en islotes pancreáticos de sujetos con diabetes tipo 1 ha sido reportado.⁵⁵

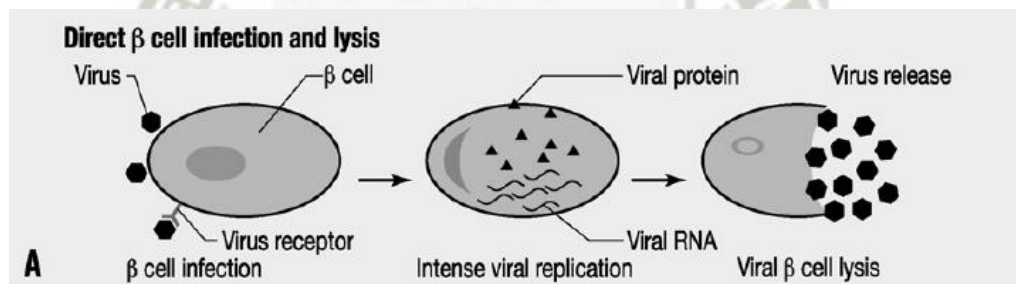


Fig. 3 Infección de células beta⁵⁶

1.4.3.2. Mimetismo molecular

La idea del mimetismo molecular es en base a la homología de secuencia parcial entre un antígeno viral y una proteína de células β que constituye un autoantígeno diana en patología diabetes tipo 1. La respuesta inmune dirigida contra el virus puede conducirse al antígeno, por reacción cruzada, a la producción de CitotoxicTlymphocytes (Tc) y / o anticuerpos que son capaces atacar el tejido pancreático y, por lo tanto, participar en la patogénesis de DT1 (**Fig. 4**). Esta hipótesis ha sido investigada utilizando suero y /

o células T de animales inmunizados contra péptidos sintéticos de autoantígenos de células β , así como suero y/o células T de pacientes diabéticos o individuos con infección CV-B.⁵⁷

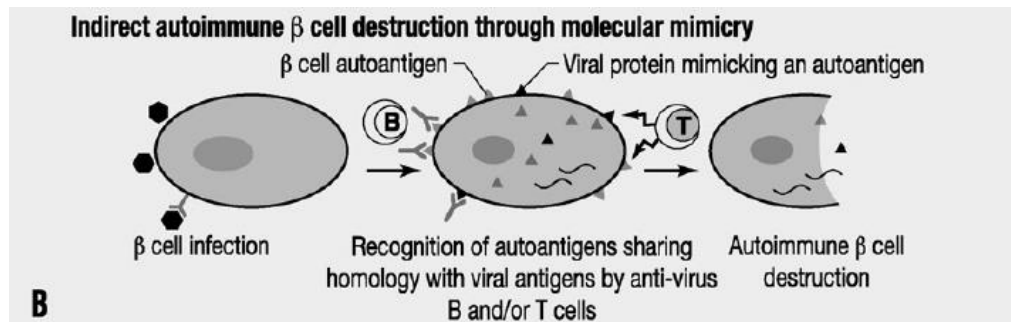
El modelo más conocido implica la proteasa viral 2C y GAD65 comparte una secuencia de aminoácidos común conocida como 'PEVREK'.⁵⁸ Aunque el fenómeno de la reactividad cruzada ha sido descrito,⁵⁹ esto no siempre se encuentra con ninguno Linfocitos Tc o anticuerpos.⁶⁰ Por lo tanto, el papel de esta la homología en la patogénesis de diabetes tipo 1 aún no se ha demostrado.⁶¹

La reactividad cruzada podría restringirse a algunos MHC alelos como HLA-DR1 (que no predispone a priori a DT1) o HLADR3 en humanos o I-Anod en ratones (ambos predisponiendo a DT1), por presentación efectiva del epítipo inmunogénico.^{58, 62, 63}

Hay una homología entre la proteína de la cápside VP1 o el precursor VP0 y la tirosina fosfatasa IAR / IA-2 también, con evidencia de una respuesta inmune humoral y celular dirigida contra la parte C-terminal de esta fosfatasa. La región tiene una secuencia idéntica de 5 aa, seguida de una analogía de 5 aa, con el motivo de enterovirus VP1 preservado (PALTAVETGA / HT) que es un epítipo fuertemente inmunogénico para las células B y T en las respuestas inmunes inducidas por infecciones por enterovirus. Los resultados obtenidos en sueros humanos recogidos durante una infección por enterovirus indican que tal infección ocasionalmente puede conducir a una respuesta humoral que reacciona con IA-2 / IAR.⁶⁴

También se ha encontrado homología entre la proteína de choque térmico HSP60, un autoantígeno presente en células beta y regiones de proteínas de la cápsida de enterovirus, una en VP1 y la otra en el

precursor VP0. En el último ejemplo, el mimetismo molecular es asociado con la reactividad cruzada mediada por anticuerpos.⁶⁴



B
Fig. 4 Mimetismo molecular⁵⁶

1.4.3.3. “Activación espectador” o “asesinato inocente”

Infección puede inducir inflamación del páncreas endocrino con producción de radicales de óxido nítrico, citocinas y otras toxinas, por lo tanto, destruir células beta indirectamente.⁵⁰ Las células beta pueden ser destruidas por linfocitos Tc autorreactivos preexistentes también.⁵⁰

De hecho, los ratones que no desarrollan diabetes espontáneamente, pero sobre expresan un transgén de TCR específico de un autoantígeno de islote, desarrollan diabetes entre 2 y 4 semanas después de la inoculación con CV-B4. En este modelo, la infección CV-B4 induce, después de la inflamación del páncreas, activación de células T autoreactivas preexistente a través de un efecto 'espectador'.⁶⁵

Otro estudio mostró que, en Ratones NOD, CV-B4 puede acelerar el desarrollo espontáneo de la diabetes a través de este efecto espectador, pero solo en presencia de un número suficiente de células T autorreactivas preexistentes.⁶⁶

La patogénesis viral de diabetes tipo 1 puede derivarse de una infección localizada de células beta que provocan mayor inflamación con destrucción de tejido y liberación por los islotes de antígenos secuestrados.⁶⁶

Entre las células reclutadas, linfocitos T autorreactivos dirigidos contra estos antígenos liberados se estimulan y pueden participar en el desarrollo de la enfermedad (**Fig. 5**).^{67, 68} En este caso, Las células efectoras presentes en el tejido pancreático están dirigidas contra autoantígenos y no son reactivos a los antígenos virales.⁶⁹

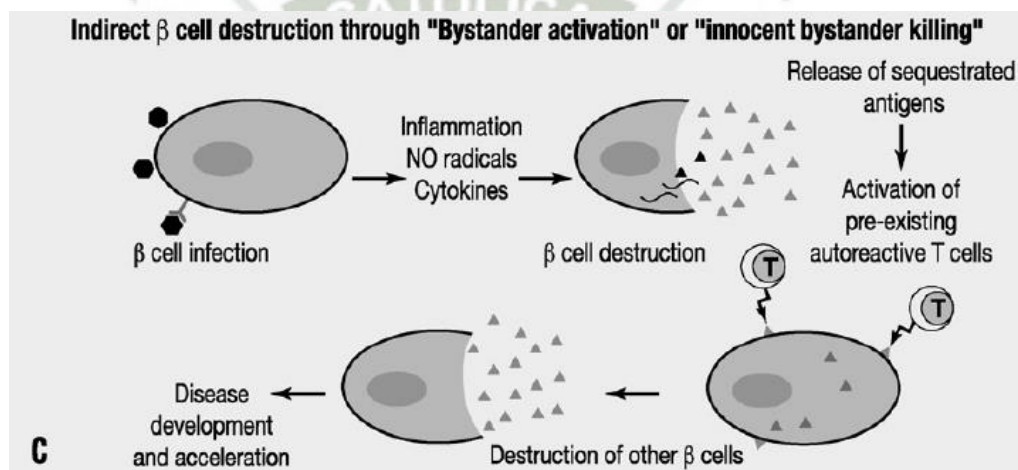


Fig. 5 Activación espectador o asesinato inocente⁵⁶

1.4.3.4. Persistencia de enterovirus (Coxsackievirus B)

CV-B son capaces de provocar infecciones persistentes, una propiedad necesaria para desencadenar o agravar patologías crónicas, en particular diabetes tipo 1.

La idea de la posible participación de CV-B persistencia en la destrucción de células está respaldado por la detección mediante RT-PCR de ARN CV-B4 E2 hasta seis meses en islotes de ratón CD-1 con destrucción de células \ beta y aparición de diabetes,⁵² pero también por la detección de ARN enterovirus por ISH en el tejido

pancreático de pacientes con diabetes tipo 1 diagnosticada recientemente o previamente.⁵⁴

En otra investigación, el enterovirus VP1 y las inclusiones fueron observados en el páncreas en células beta de un donante multiorgánico que murió accidentalmente nueve meses después del inicio de la diabetes.⁵⁵

La infección persistente de los islotes podría inducir la destrucción de células beta a través de varios mecanismos (**Fig. 6**).

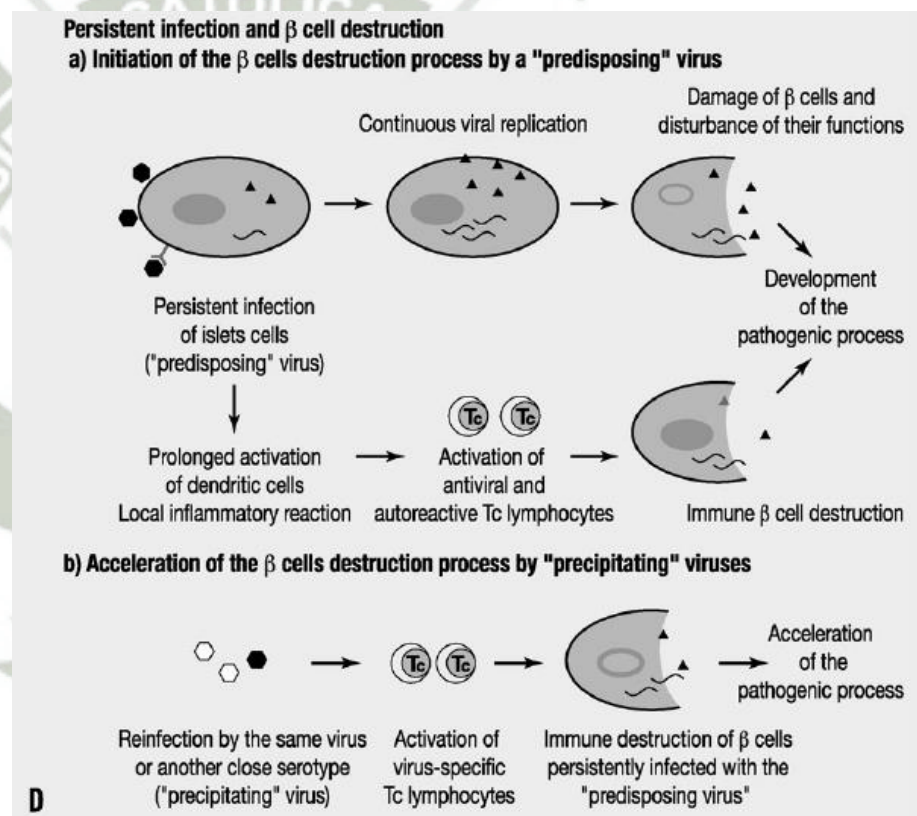


Fig. 6 Persistencia de enterovirus (*Coxsackievirus B*)⁵⁶

La replicación viral continua podría dañar e interrumpir las funciones de las células beta, la infección persistente podría conducir a una activación prolongada de las células dendríticas, con presencia persistente de antígenos virales y autoantígenos a Linfocitos T, y una consecuente inducción de un antiviral y respuesta autoinmune que

podría provocar lisis celular.⁴² Así las infecciones por enterovirus pueden iniciar el proceso de destrucción de células y también acelerarlo más tarde, debido a la reinfección que provoca una respuesta de linfocitos Tc específicos del virus en el tejido linfoide del tracto digestivo (el sitio primario de replicación). Linfocito T antivirales o cualquiera que sea el serotipo de enterovirus que condujo a su proliferación: puede, mediante reactividad cruzada, participar en la agravación de la situación mediante la destrucción células beta persistentemente infectadas por otro serotipo.⁴² Replicación viral persistente, y el reacción inflamatoria localizada que lo acompaña, también puede conducir al reclutamiento en islotes de linfocitos Tc autorreactivos, tales como los dirigidos contra GAD65 y que llevan el alfa 4 beta 7 integrina, un receptor de localización de la mucosa que se encuentra en los infiltrados de los islotes y en sangre periférica.⁴²

Esta hipótesis está respaldada por los resultados de los experimentos en ratones infectados por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV). Los autores de estas pruebas apoyan la idea de *déjà-vu* viral, en el cual la inmunidad innata elimina el ('predisponer') virus excepto en un sitio del cuerpo, después del cual infecciones por el mismo virus o virus similares ('precipitantes') activan Linfocitos Tc dirigidos contra el epítipo viral inicial. De esta forma, la diabetes tipo 1 podría ser provocada por linfocitos Tc dirigidos contra un epítipo compartido tanto por el "precipitar" como por el "predisponer" del virus (*déjà-vu*) que persisten en los tejidos diana, en este caso, células beta pancreáticas. En apoyo de esta proposición y en luz de los resultados de los estudios epidemiológicos, CV-B4 u otro enterovirus bien pueden ser candidatos para actuar como el "predisponer" virus, con el mismo u otros enterovirus desempeñando el papel del virus 'precipitante', en la patogénesis de diabetes tipo 1.⁷⁰

La capacidad de las cepas CV-B4 para establecer una infección persistente puede deberse a la sustitución de aminoácidos ubicados en la superficie de la proteína estructural VP1. La infección también puede dañar la liberación de insulina; de hecho, islotes infectados con CV-B4 en 11-17 días después de la infección no respondieron a los altos niveles de glucosa.⁷¹

1.5. Diagnóstico

La diabetes es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia. Según los criterios de la Asociación Americana de Diabetes y de la Organización Mundial de la Salud, el diagnóstico puede llevarse a cabo en las tres situaciones siguientes:

- Presencia de síntomas clínicos y glucemia plasmática ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L), independientemente de la hora de extracción en relación con las comidas.
- Glucemia plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L).
- Glucemia plasmática a los 120 minutos, en la prueba de tolerancia oral a la glucosa ≥ 200 mg/dL.

Cada una de las tres situaciones es suficiente para hacer el diagnóstico de diabetes. Un resultado anormal debe confirmarse con la repetición de la medición en dos ocasiones en dos días diferentes.^{72, 73}

1.6. Tratamiento

En el tratamiento de los niños diabéticos, son importantes la alimentación, el ejercicio físico, la insulinoterapia y el autocontrol, al cual se llega mediante una educación diabetológica intensa.⁷⁴

La terapia debe permitir al niño llevar una vida prácticamente normal, con ausencia de sintomatología y de complicaciones agudas de su enfermedad; debe garantizar el desarrollo somato psíquico normal e impedir la aparición de complicaciones crónicas.⁷⁴

El objetivo específico del tratamiento para cada niño con diabetes tipo 1 será el de alcanzar el nivel más bajo de hemoglobina glucosilada HbA1c (menor a 7.5%), sin inducir hipoglucemias severas.⁷⁴

Para ello cualquier esquema terapéutico debe plantearse en forma individualizada, adaptado a cada caso; el papel de la familia es tanto mayor cuanto menor es el niño diabético.⁷⁴

El equipo diabetológico pediátrico debe estar integrado por un endocrinólogo pediátrico, una enfermera especialista en diabetes, un nutricionista, un trabajador social y un psicólogo.⁷⁵

1.6.1. Alimentación

El plan de alimentación debe ser individualizado, preferentemente bajo la guía de un nutricionista con experiencia en el tratamiento de pacientes diabéticos; se tomarán en cuenta las preferencias alimentarias conteo de carbohidratos es un requisito para adaptar de cada niño, las influencias culturales, la actividad física y el horario de alimentación familiar. En la insulino terapia a la ingesta alimentaria.⁷⁶

En los adolescentes con diabetes tipo 1, el mantener un patrón regular de alimentación (horario), la ingesta de fibra, el mayor consumo de frutas y verduras, además de la menor ingestión de bebidas azucaradas, se asocia con un mejor control glucémico.⁷⁷

El mayor riesgo de aterosclerosis en niños y adolescentes con diabetes tipo 1, se ha relacionado al mayor consumo de alimentos, especialmente de grasas saturadas, además de la ingesta escasa de fibra, frutas y vegetales.⁷⁷

1.6.2. Insulinoterapia

La insulina constituye la principal base terapéutica de la diabetes tipo 1, aunque insuficiente por sí misma para conseguir normalizar los trastornos metabólicos de la enfermedad.⁷⁴

La administración de análogos de insulina de acción ultrarrápida (insulina aspartato, insulina glulisina e insulina lispro) inmediatamente antes de las comidas y de análogos de acción prolongada (insulina glargina e insulina detemir), para cubrir los requerimientos basales, representa el esquema intensivo de insulinoterapia más frecuentemente indicado.^{74, 78}

En muchos países, el uso de análogos de insulina está aprobado sólo para mayores de seis años; sin embargo, ya los han utilizado en niños de uno a cinco años de edad.⁸⁵

Se ha obtenido un mejor control glucémico con insulina glargina combinada con insulinas de acción rápida, respecto al esquema de insulina NPH en combinación con insulinas de acción rápida.⁷⁹

Por otro lado, la bomba de infusión continua de insulina subcutánea, desde hace algunos años, se ha constituido en un método de insulinoterapia común en pacientes diabéticos pediátricos; es flexible y la liberación de la insulina es más precisa; además, en general, produce menos eventos de hipoglucemia, en comparación al método de múltiples inyecciones diarias de insulina.⁸⁰ Algunos autores no han reportado diferencias, en niños diabéticos menores de seis años, en el control metabólico (hemoglobina glucosilada) ni en el número de eventos hipoglucémicos, al comparar, la

terapia con bomba de insulina y el tratamiento con múltiples inyecciones diarias.^{81, 82}

La administración de análogos de insulina en niños diabéticos y el uso de la bomba de insulina han disminuido el número de hipoglucemias severas en los pacientes, sin embargo no en la magnitud que se esperaba.⁸³

Respecto a la dosis diaria de insulina que requiere un niño diabético, ésta es variable. Se ha descrito como el percentil 50 de la dosis a los tres años de edad, 0.67 U / kg de peso y a los 13 años, 0.93 U /kg; el requerimiento aumenta a mayor edad, desde la infancia hasta la adolescencia.⁸³

Hoy en día se están investigando con nuevas terapias como son: la pramlintida, análogo sintético de la amilina, mejora la hiperglucemia postprandial, la insulina inhalada y el trasplante de células de islotes y al de células madre.⁸⁴

1.7. Complicaciones

Las complicaciones crónicas de la diabetes tipo 1 pueden dividirse en microangiopáticas, que incluyen: nefropatía, retinopatía y neuropatía; y macroangiopáticas, las cuales son la afectación coronaria, cerebrovascular y vascular periférica.

La complicación microvascular o macrovascular son raras en el niño e incluso en el adolescente con larga evolución de la enfermedad; pero, es precisamente en estas edades cuando empieza a instaurarse, por lo que es de gran importancia reconocerla; las primeras fases pueden detectarse de dos a cinco años después del diagnóstico de diabetes tipo 1. El mejor control glucémico es el patrón de oro para prevenir las complicaciones.⁸⁴

2. *Mentha spicata*

2.1. Generalidades

Las plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae se usan tradicionalmente en muchos aspectos en Medio Oriente y en todo el mundo, lo que les dio un gran valor para estudiar su uso durante el manejo de enfermedades infecciosas.⁸⁶

Los extractos acuosos de hojas secas de especies bien conocidas de familiares Lamiaceae se examinaron para su potencial actividad inhibitoria contra modelos de virus de ARN, como, sarampión, paperas, virus de la estomatitis vesicular (VSV) y modelo de ADN; Herpes simple tipo 2.⁸⁶

Los datos registrados revelaron que la salvia (*Salvia Officinalis*) a concentración de 1500 µg / ml, Romero (*Rosmarinus officinalis*) a una concentración de 500 µg / ml y Tomillo (*Thymus vulgaris*) en concentración de 2250 µg / ml son potenciales antivirales.⁸⁶

Los datos registrados revelaron los potenciales antivirales de la prueba los extractos contra el ARN se pueden organizar en el orden de salvia seguido de romero y tomillo. Por otro lado utilizando virus de la estomatitis vesicular (VSV) como modelo de virus de ARN animal, el romero mostró el mayor potencial antiviral seguido de tomillo y finalmente salvia. Mientras que el potencial antiviral contra el modelo de virus de ADN; HSV-II fue detectado y arreglado en el orden del romero seguido de tomillo mientras que la salvia no mostró potencial antiviral.⁸⁶

Los resultados obtenidos indican una actividad inhibitoria prometedora de extractos de plantas contra varios modelos de virus.⁸⁶

2.1.1. Aspecto botánico

2.1.1.1. Clasificación taxonómica

Según el sistema de clasificación de A. Cronquist (1988) citado por Mamani (2003),⁸⁷ la especie vegetal *Mentha spicata* tiene la siguiente clasificación taxonómica:

- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Sub clase: Asteridae
- Orden: Lamiales
- Familia: Lamiaceae
- Género: *Mentha*
- Especie: *Mentha spicata*
- Nombre vulgar: “mentha”



Fig. 7 *Mentha spicata*

2.1.1.2. Características botánicas

Según Resquín et al. (2011)⁸⁸ la descripción botánica de la *Mentha spicata* es la siguiente:

- Planta perenne, de 30-50 cm altura, ascendente, suavemente aromática, rizomatosa.
- Tallos ramificados, principalmente a partir de la zona media con pubescencia rala de coloración rojizo morado.
- Hojas subsésiles con pecíolos de 1-1,5 mm de longitud, de 2-4 x 1-2 cm, lanceoladas u ovado-lanceoladas, glabras o glabrescentes, con pelos simples ralos en ambas caras o principalmente sobre las nervaduras en la cara abaxial.
- Inflorescencia terminal, cónica, de 3-5 cm x 5-8 mm, alargada y estrecha.
- Brácteas foliáceas; bractéolas filiformes, de borde ciliado, las del ápice de la inflorescencia por lo general mayores que las flores.
- Flores lilas o violáceas, claras, pediceladas; pedicelos de 1-2 mm, pubescentes.
- Cáliz de 1,5-3 mm, persistente, infundibuliforme, dientes iguales o desiguales, los 3 inferiores más largos, glabros o ciliados en el borde.
- Corola de 2,5- 4 mm, lóbulo dorsal más ancho, glabra o con pelos cortos, pocos pelos peltados.
- Filamentos estaminales de 4 mm, generalmente exertos; anteras elipsoides.
- Estilo de 3 mm, ramas estigmáticas desiguales.

2.1.1.3. Composición química

Table 3. Main components of *M. spicata* L. var. *viridis* EO yield (g kg⁻¹)

	Fresh leaves		Dried leaves	
	MGH	HD	MGH	HD
α -Pinene	8.2	7.3	–	–
Sabinene	9.2	8.2	–	–
β -Pinene	16.2	12.4	6.3	5.3
2-Thujene	10.2	–	–	–
3-Octanol	10.9	10.5	–	–
Limonene	158.3	14.21	78.0	63.9
1,8-Cineole	109.9	106.6	78.6	76.7
(E)- β -Ocimene	6.8	5.8	–	–
γ -Terpinene	5.1	5.7	3.7	5.5
c-Sabinene hydrate	11.9	7.6	13.0	9.3
t-Sabinene hydrate	11.7	–	–	–
Thujone	3.8	–	–	–
D-Camphor	4.6	–	–	–
Borneol	23.8	2.1	3.3	–
δ -Terpineol	–	4.3	3.2	–
(–)-4-Terpineol	11.1	13.8	–	1.03
p-Menth-1-en-8-ol	4.2	4.6	4.2	.57
Dihydrocarveol	18.9	16.3	4.4	13.0
t-Carveol	12.8	15.5	5.3	7.5
Pulegone	4.3	5.2	6.0	6.2
D-Carvone	379.4	482.1	383.1	584.9
Bornyl acetate	2.4	–	7.6	–
Dihydrocarvyl acetate	3.2	2.9	4.2	–
t-Carveyl acetate	1.5	1.7	2.4	–
β -Bourbonene	25.2	22.1	52.6	32.0
β -Elemene	3.2	3.4	13.4	7.8
c-Jasmone	2.2	3.3	4.0	4.2
β -Caryophyllene	46.6	34.4	93.4	56.1
β -Cubenene	–	3.2	6.5	4.2
Germacrene D	4.0	–	10.1	5.9
α -Caryophyllene	7.9	2.1	6.2	–
γ -Muurolene	2.4	2.6	–	2.8
β -Cubebene	29.3	31.8	88.2	53.7
Bicyclogermacrene	9.8	10.6	25.4	13.3
γ -Cadinene	0.9	1.6	3.1	–
Calamenene	3.1	2.8	8.8	5.4
Caryophyllene oxide	1.1	–	15.6	4.5
1,4-Cadinadiene	0.8	–	5.9	–
Total	965.0	972.4	936.5	977.6

Fig. 8 Composición química de la *Mentha spicata*⁸⁹

2.2. Aspecto geográfico

La mentha una importante planta medicinal y aromática, comprenden un grupo de 25-30 especies del género mentha (comúnmente conocido como mentha o pudina) que pertenece a la familia 'Lamiaceae'. El género crece bien en el clima tropical y subtropical a lo largo de los bancos de arroyos, jardines, montañas, etc. de América, Europa, China, Brasil, India, etc. India es el principal productor, consumidor y exportador de aceite de mentha en el mundo con alrededor de 14000 t de producción anual (seguido de China y Brasil).⁸⁶

2.3. Usos

2.3.1. Medicina

La *Mentha spicata* tiene las siguientes propiedades medicinales reconocidas:

Tabla N° 1 *Propiedades de la Mentha spicata.*

Sistema	Acción farmacológica
Digestivo	Antiespasmódico Carminativo
Respiratorio	Antiséptico Antiinflamatorio
Piel y mucosas	Antiséptico

Fuente: INFOMED (2003)

Además la mentha es una de las plantas más conocidas y utilizadas entre las plantas medicinales. Sus hojas contienen un aceite esencial cuyo compuesto principal es el mentol. Sus propiedades principales son: antiespasmódica, antiséptica, calma la pared interna del estómago, ayuda a acelerar la digestión y estimula la secreción de la bilis. La menta ayuda a calmar los cólicos o espasmos intestinales, las náuseas y

las flatulencias. Es también una buena ayuda contra los parásitos intestinales (vermífugo) y estimula el sistema nervioso.⁹⁰

También existen estudios del efecto antimicrobiano y antiviral del extracto de hojas de la *Metha spicata*.⁸⁶

2.3.2. Alimentación

Su uso está bastante extendido como saborizante y aromatizante en la gastronomía mundial. Siendo típico su uso en la culinaria local por su aroma característico.⁹⁰

2.3.3. Industria

Utilizada como agente saborizante en las industrias farmacéutica, alimentaria y de bebidas. El aceite o algunos de sus componentes se utilizan en la preparación de productos de perfumería y cosméticos.⁹⁰

La composición química de las hojas de mentha y de su aceite varía con la naturaleza de la planta, variedad, región geográfica y condiciones de procesamiento.⁹¹

El contenido de polifenoles totales de hojas en mentha es de aproximadamente 19-23 % (flavonoides 12 por ciento), que incluye 59-67 % eriocitrina y ácido rosmarínico, 7-12 % luteolina 7-O-rutinósido, 6-10 % hesperidina.⁹¹

La *Mentha spicata* contiene aceites volátiles, resinas, taninos, cumarinas, flavonoides, esteroides, alcaloides. El constituyente principal es la carvona junto con algunos otros componentes monoterpenos como limoneno, felendreno, dihidrocarveol, cetato, cineol, alfa pineno y linalol. Por lo que posee propiedades antieméticas

también utilizados como analgésico, estimulante, expectorante y carminativo, para la digestión / ingestión. Puede también actuar como refrigerante, analgésico, afrodisíaco, estimulante, expectorante y anti inflamatorio. Antiséptico, antiespasmódico, diurético y además la menta verde se ha estudiado por su actividad antifúngica en aceite esencial se encontró que tenía actividad antifúngica.⁹⁰



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales, reactivos y equipos

1.1. Material Biológico y otros

1.1.1. Células

Las células Hep-2, suministradas por BioWhittaker (Vervier, Bélgica) crecen en Medio Mínimo Esencial (Gibco®), suplementado con suero de bovino fetal al 10% (SFB, Gibco®), 1% de L-glutamina y 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco®).

1.1.2. Virus

La cepa viral E2 Coxsackievirus B4 diabética (CV-B4 E2) proporcionada por cortesía de JW Yoon, Julia McFarlane Diabetes Research Center, Calgary, Alberta, Canadá) y una variante de la cepa prototipo Coxsackievirus B3 (cepa viral CV-B3) se propagan en células Hep-2.

1.1.3. Extracto de *Mentha spicata*

El extracto de *Mentha spicata* fue proporcionada por el laboratorio de virología EA3610 Lille-Francia de procedencia isla Quíos-Grecia.



Fig. 9 *Mentha spicata* de isla Quíos-Grecia.
Fuente: elaboración propia.

1.2. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron, Medio Mínimo Esencial (MEM Gibco®), L-Glutamina (Gibco®), aminoácidos no esenciales (AANE, Gibco BRL), suero de bovino fetal (SFB, Gibco®).

Tripsina, dodecilsulfato sódico (SDS 1%), fosfato salino (PBS), Cristal violeta (1X), agua esteril (VERSYLENE).

1.3. Equipos

Para llevar a cabo este trabajo de investigación, se utilizó un microscopio invertido Olympus®CKX41, un Lab Armor Bead Baths (Baño digital para descongelar reactivos biológicos), el equipo Ultrasonic Cleaners de la casa VWR® Symphony™ (sonicador), un Vortex Genie 2 de Fisher Brand®, una refrigeradora -20°C de la casa, un Thermo Scientific Multiskan EX (lector de placas) de la casa como se muestra en la **Fig. 10**, un incubadora The Heraeus® HERAccl® by Thermo Electron como se muestra en la **Fig. 10** y el equipo Centrifuge de la casa Dynac (centrifugador).



Fig. 10 Thermo Scientific Multiskan EX (lector de placas), incubadora The Heraeus® HERAccl® by Thermo Electron.

Fuente: elaboración propia.

2. Métodos

2.1. Cultivo celular

2.1.1. Acondicionamiento celular

Se adquirió un flask con células Hep-2 (laboratorio de virología EA3610 Lille -Francia) contenido en Medio Mínimo Esencial (MEM suplementado con un 10% de suero de bovino fetal (SFB, Gibco®), 1% de Lglutamina y 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco®).

Se realizó cambio de medio para renovar los nutrientes evitar la acumulación de células muertas, primero se eliminó el medio del flask, colocamos 5 mL de tripsina dejando expandir sobre toda la superficie, enseguida se retiró 4 mL de tripsina, luego se incubo a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂ por 5 minutos, se recuperó las células con 5mL de MEM suplementado, en un nuevo flask se colocó los 5 mL de la suspensión celular y se completó con MEM suplementado a un volumen de 10mL, luego se dejó incubar a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂ por 3 días para realiza el nuevo cambio de medio.

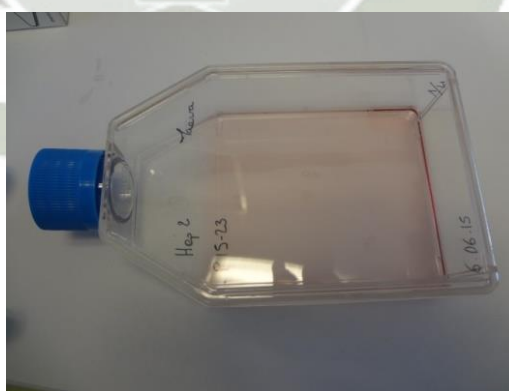


Fig. 11 Células Hep-2 en el Medio Mínimo Esencial MEM.
Fuente: Elaboración propia.

2.1.2. Ensayo de exclusión celular

En un tubo eppendorf se colocó 20 μL de azul de tripán y 20 μL de la suspensión celular previamente obtenida, luego se mezcló, seguidamente se sacó 20 μL de esta mezcla y se colocó en la cámara de recuento celular desechable (CRCD). Posteriormente se colocó la CRCD en el Cellometer Auto T4 (contador automático de células) y utilizando el software del equipo con los parámetros correspondientes al tipo de células a contar, se colocó el factor de disolución que en nuestro caso fue de 1/1. Finalmente, el equipo mostró el número de células vivas y muertas, el promedio del diámetro de las células, la concentración de células vivas (células/mL) y el porcentaje de viabilidad que debió ser mayor al 90% para proseguir con los siguientes ensayos.

2.2. Coxsackievirus B4

La cepa viral E2 Coxsackievirus B4 diabética (CV-B4 E2 proporcionada por cortesía de JW Yoon, Julia McFarlane Diabetes Research Center, Calgary, Alberta, Canadá) y una variante de la cepa prototipo Coxsackievirus B3 (cepa viral CV-B3) se propagan en células Hep-2. Células Hep-2 infectadas son sometidas a tres ciclos de congelación-descongelación con el fin de liberar partículas virales. Estos se recogen por centrifugación durante 10 minutos a una velocidad de 2000 rpm y a una temperatura de 40°C. Los sobrenadantes de cultivo que contienen partículas de virus se hace un alícuota y se congelan a -80°C.

Se trabajó a una concentración de virus final, 10^3 TCID₅₀/mL, multiplicidad de infección (MOI) = 0.004.



Fig. 12 *Cabina de Bioseguridad clase II tipo A2, donde se realizaron los ensayos experimentales con el Coxsackievirus B4.*
Fuente: Elaboración propia.

2.3. Extracto acuoso de *Mentha spicata*

El extracto acuoso de *Mentha spicata* fue proporcionada por el laboratorio de virología EA3610 Lille - Francia.

La extracción fue mediante la técnica de hidrodestilación, se colocó una alícuota de 300 g de hojas secas en el sistema de destilación de vapor. Cada destilación duró ~105 min, que incluyó 45 minutos en los que las hojas fueron cocidas al vapor por el agua hirviendo en el globo de vidrio. El tiempo de destilación de 45 minutos comenzó cuando la primera gota de líquido, condensada en el enfriamiento de la columna, cayó en la bureta graduada.

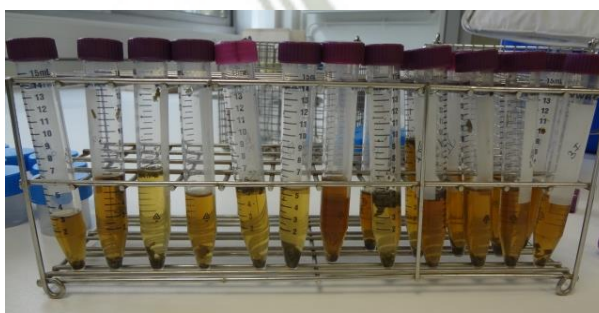


Fig. 13 *Extracto acuoso de Mentha spicata antes de su filtración.*
Fuente: Elaboración propia.

2.3.1. Protocolo de las diluciones del extracto acuoso de *Mentha spicata*

El extracto se reconstituyó en MEM que carece de SFB, 1% de L – Glutamida, 1% de AANE.

El cálculo se realizó de acuerdo con la concentración deseada, que oscila entre [1,6 µg/mL] por pocillo y [0,003125 µg/mL] por pocillo.

Cálculo

Paso 1: concentración extracto de *Mentha spicata* (MS) = 1 mg/mL

(D1) primera dilución a 1/10 => 0.1 mg /mL

(D2) segunda dilución a 1/10 => 10 µg/mL

Paso 2:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

$$10 \mu\text{g/mL} * V_i = 9.6 \mu\text{g/mL} * 1000 \mu\text{L}$$

$$V_i = 960 \mu\text{L de la 2}^{\text{a}} \text{ dilución, D2; [10 } \mu\text{g/mL].}$$

Enfoque práctico:

- 1) 100µl extracto MS [1mg / mL] se disolvió en 900 µL de MEM / SFB -.
- 2) De este 1 mL de extracto MS [0.1 mg/mL] se diluyó 100 µL en 900 µL de MEM/ SFB -.
- 3) Para llegar a la concentración 9.6 µg/mL, se agregó en un tubo 960 µL de D2 a 40 µL MEM/ SFB -.
- 4) Se agregó 1mL de extracto MS [9.6 µg/mL] a un tubo (T1) que contenía 1mL de MEM/SFB 20% y se hizo 10 diluciones con factor ½.
- 5) Nota: en cada tubo (T1.....T10) había 1mL de MEM/SFB 20% como la **Fig.14**:

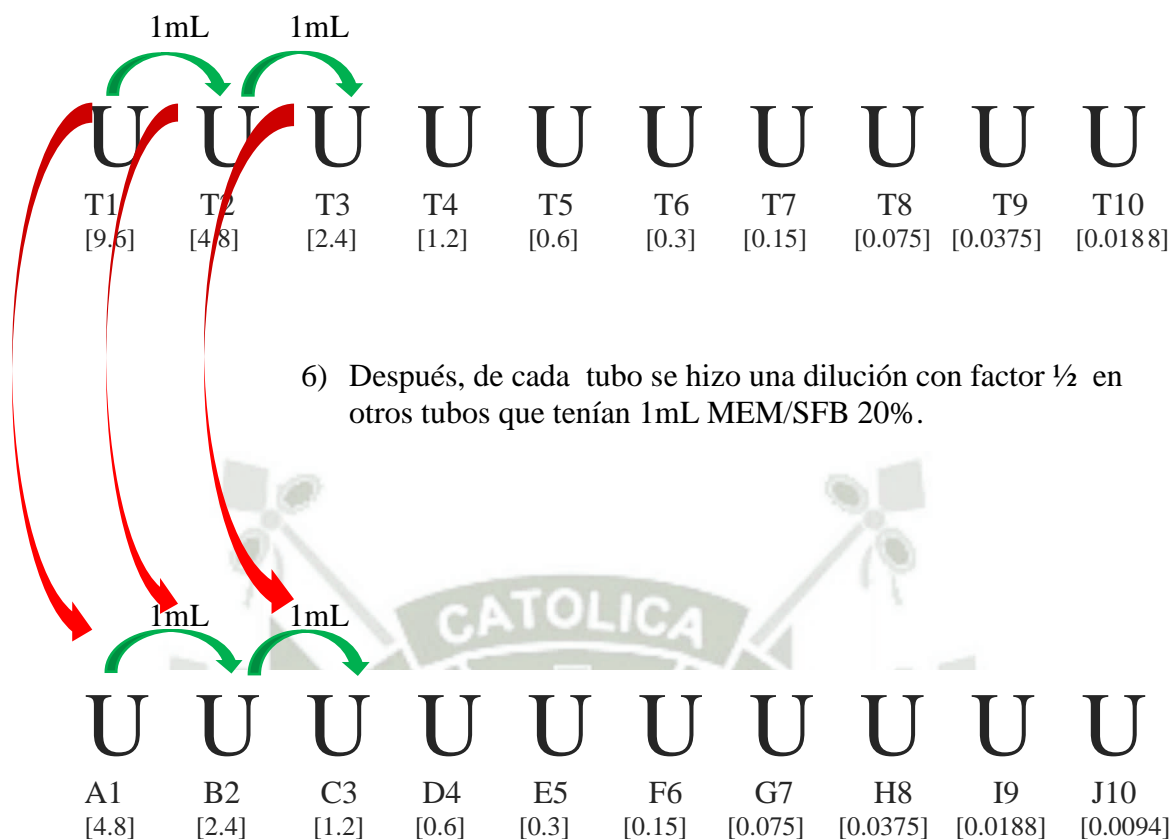


Fig. 14 Esquema de diluciones del extracto de *Mentha spicata*.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2 Esquema de las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ del extracto de *Mentha spicata*.

T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
9.6	4.8	2.4	1.2	0.6	0.3	0.15	0.075	0.0375	0.0188

*T1-T10 tubos con la primera dilución.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3 Esquema de las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ por pocillo del extracto de *Mentha spicata*.

A1	B2	C3	D4	E5	F6	G7	H8	I9	J10
4.8	2.4	1.2	0.6	0.3	0.15	0.075	0.0375	0.0188	0.0094
1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.00625	0.003125

* A1-J10 tubos con la segunda dilución, las concentraciones marcadas con rojo, son las concentraciones por pocillo ($4.8/3v=1.6$) 3 volúmenes = 50 μL MS + 50 μL CvB4 + 50 μL Hep-2

Fuente: Elaboración propia

2.4. Diseño experimental

2.4.1. Viabilidad celular frente al extracto

- Preparación de las placas de 96 pocillos circulares (BD Difco™), tamaño de 12,7 cm x 8,5 cm, con una distribución con números (1-12) y letras (A-H) que ayudan a identificar cada muestra. **Fig. 15, 16**

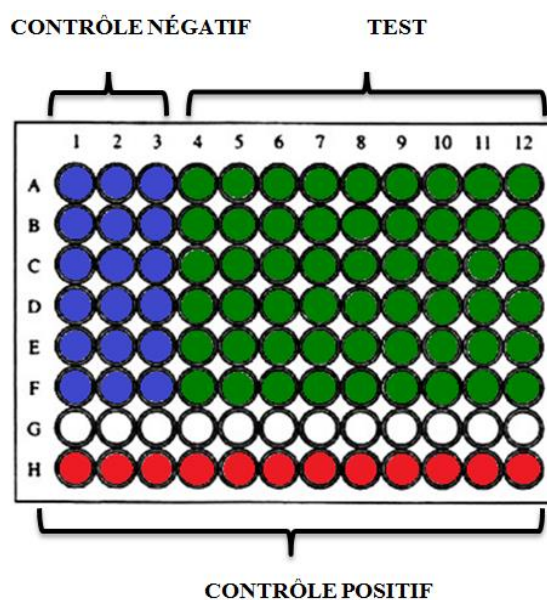


Fig. 15 Esquema de distribución de la placa de 96 pocillos para el estudio de la toxicidad del extracto de *Mentha spicata*.
Fuente: Elaboración propia.

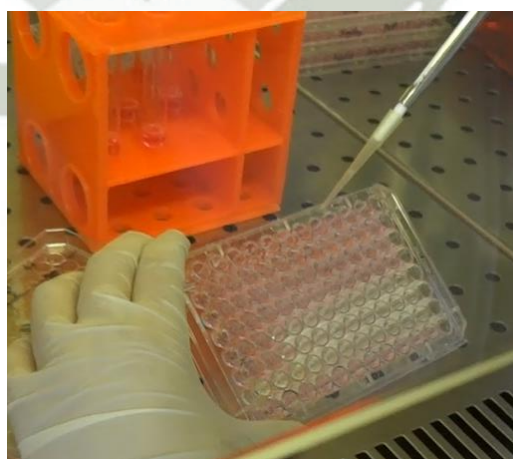


Fig. 16 Células Hep-2 en una placa de 96 pocillos (BD Difco™)
Fuente: Elaboración propia.

La distribución de las placas fueron en tres partes un control positivo, un control negativo y el test.

- 1) Se distribuyó 50 μL de la suspensión celular Hep-2 ($1,25 \times 10^4$ células/pocillo) por pocillo al control positivo, negativo y test e incubamos a 37°C con una atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas.
- 2) Después se adicionó 50 μL del extracto acuoso de *Mentha spicata* en los pocillos de test.
- 3) Para el control negativo se agregó 100 μL de MEM SFB 20%.
- 4) Para el control positivo se agregó 50 μL de Coxsackievirus B4 y 50 μL de MEM SFB 20%.
- 5) Se dejó incubar a 37°C con una atmosfera de 5% de CO_2 durante 24, 48 y 72 horas.
- 6) Se hizo la cuantificación del efecto citopatico (EPC) y patogénico.
- 7) Finalmente se hizo el análisis del efecto citotóxico del extracto acuoso de *Mentha spicata*.

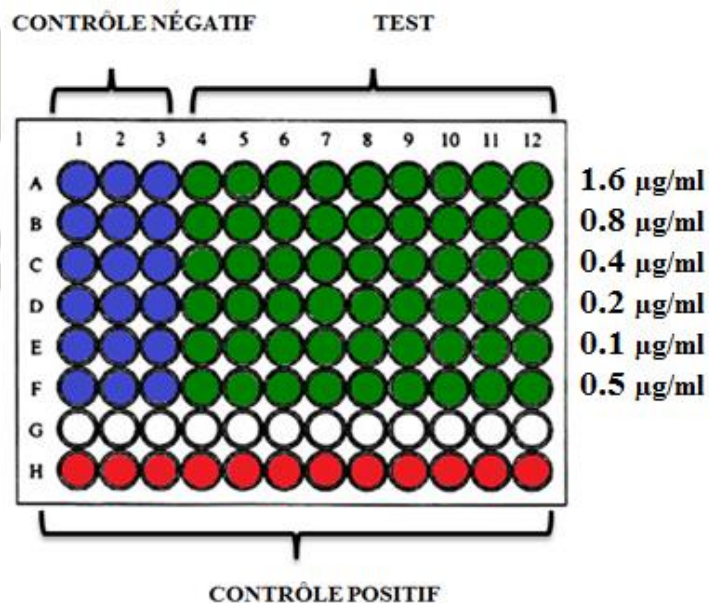
2.4.2. Evaluación del efecto del Coxsackievirus B4 sobre las células Hep-2 en función al tratamiento con extracto de *Mentha spicata*

- Preparación de placa

La distribución de las placas fueron en tres partes un control positivo, un control negativo y el test.

- 1) Se distribuyó 50 μL de la suspensión celular Hep-2 ($1,25 \times 10^4$ células/ pocillo) por pocillo al control positivo, negativo y test se incubó a 37°C con una atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas.

- 2) Se adicionó 50 μL de Cocksackievirus B4 a las células Hep-2 en los pocillos del test y el control positivo, dejamos incubar a 37°C con una atmosfera de 5% de CO_2 por 2 horas.
- 3) Se adicionó 50 μl del extracto acuoso de *Mentha spicata* en las diferentes concentraciones de 1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,003125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ una fila por concentración, como se muestra en la **Fig. 17**.
- 4) Se adicionó 100 μL de MEM a los pocillos correspondientes al control negativo.
- 5) Se dejó incubar a 37°C con una atmosfera de 5% de CO_2 durante 24, 48 y 72 horas.
- 6) Se hizo la cuantificación del efecto citopático (EPC) y patogenia.
- 7) Finalmente el análisis del efecto citotóxico del Cocksackievirus B4 frente al extracto acuoso de *Mentha spicata*.



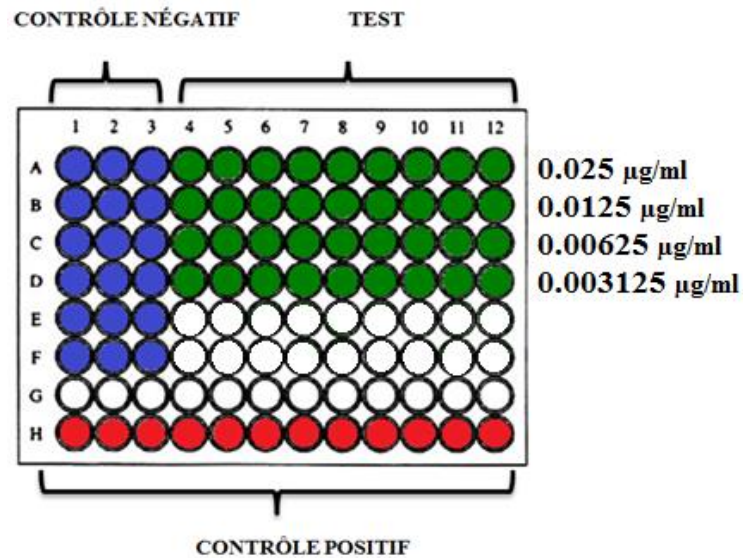


Fig. 17 Esquema de distribución de dos placas de 96 pocillos para el estudio del efecto del Coxsackievirus B4 sobre las células Hep-2 en función al tratamiento con extracto de *Mentha spicata*.
Fuente: Elaboración propia.

2.5. Cuantificación del efecto citopático (ECP) y patogenia

El efecto citopático del virus se analizó mediante observación con un microscopio invertido (Olympus CKX41) a 10X de células Hep-2 infectadas con Coxsackievirus B4. Una semicuantificación se realizó de acuerdo con el siguiente principio: la cuadrícula celular aparece en el pocillo en forma circular y se dividió virtualmente en cuatro cuadrantes. Luego, de acuerdo con los cuadrantes destruidos donde hay una citólisis (destrucción del tapis celular), el ECP se puntuó según los cuadrantes donde hay una citólisis con destrucción del tapis celular y se expresó, en porcentaje. Por ejemplo, cuando se anotó una puntuación de 25%, esto indicó una muerte celular y que en un cuadrante de cada cuatro se destruyó y esto aparece por (desaparición del tapis celular y deformación de las células Hep-2). Se leyó al menos un triplicado para la misma concentración y la misma cepa analizada.

La lectura se realizó 24, 48 y 72 horas después de la incubación de las células Hep-2 con el virus, que se llevó a cabo a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.



Fig. 18 *microscopio invertido Olympus®CKX41.*
Fuente: Elaboración propia.

2.6. Análisis del efecto citotóxico del Cocksackievirus B4 frente al extracto acuoso de *Mentha spicata*

El efecto citotóxico se confirmó después de 3 días de incubación a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%, y el título viral se calculó utilizando el método de Cristal Violeta en un lector de placas.

- Protocolo método Cristal Violeta
 - 1) Se vació los pocillos que contenían el cultivo celular infectado, por succión utilizando una pipeta de volumen 200 o 100µL.
 - 2) Se lavó cada pocillo con 150 µL de PBS.
 - 3) Agregamos 250 µL de Cristal Violeta (CV) (1X).
 - 4) llevamos a incubación la placa durante 15 minutos a 37 °C y en una atmósfera de CO₂ al 5%.
 - 5) Retiramos el CV con ayuda de una pipeta de volumen 200 o 100µL y se elimina.
 - 6) Hicimos 2 lavados consecutivos por pocillo con 250 µL de agua destilada estéril.
 - 7) Agregamos 250µl de SDS (1% - reconstituido en PBS) por pocillo.
 - 8) Finalmente se leyó la placa a una absorbancia de 595 nm en el lector de placas Thermo Scientific Multiskan EX.
- * Cristal Violeta se diluye en agua destilada estéril.



Fig. 19 Método Cristal Violeta en la determinación de viabilidad de células Hep-2.

Fuente: Elaboración propia.

2.7. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como promedio de las absorbancias de la viabilidad celular \pm SEM. Además, los datos fueron analizados por la prueba de análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 13.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención del cultivo celular

1.1. Células Hep-2

Bajo las condiciones descritas en la metodología de obtención del primer pasaje (incubación a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂), condiciones que fueron utilizadas por diversos autores que emplearon esta línea celular,^{92, 93, 94} se obtuvo un desarrollo y comportamiento de la línea celular Hep-2 óptimo, también la confluencia deseada mayor al 80% y la viabilidad celular esperada mayor a 90%, debido a que se le brindó las condiciones adecuadas. Su crecimiento fue favorecido por el Medio Mínimo Esencial (MEM suplementado con un 10% de suero de bovino fetal (SFB, Gibco®), 1% de L-glutamina y 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco®)).

El crecimiento de las células Hep-2 mostradas en la **Fig. 20**, se observa la proliferación; evidenciándose un cambio morfológico y aumento del número de células con el paso del tiempo. Por lo que una incubación de 24 horas fue suficiente para obtener células maduras que pudieron ser usadas en los siguientes cultivos y ensayos experimentales empleando estas células.

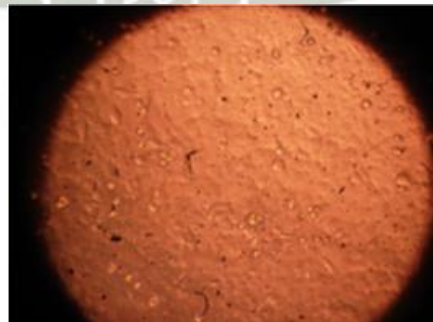


Fig. 20 células Hep-2 tras 24 horas de incubación se observa el tapis celular bien formado (observado en microscopio invertido a 10x).

Fuente: Elaboración propia.

Con estos resultados se dedujo que el medio de cultivo Mínimo Esencial MEM suplementado con un 10% de suero de bovino fetal, 1% de L-glutamina y 1% de aminoácidos no esenciales, utilizado permitió un adecuado crecimiento de estas células tal como lo reportan otras investigaciones.⁹⁵

2. Exclusión de viabilidad celular

2.1. Exclusión celular y porcentaje de células viables en la suspensión celular

Para el conteo de células viables en la suspensión celular descrito en la metodología, se utilizó el colorante azul de tripán, el cual permite diferenciar las células vivas de las muertas como lo refieren muchos investigadores.⁹⁶ La diferenciación se da debido a que las células vivas presentan una membrana celular intacta que impide su coloración, mientras que las otras no responden de forma similar.⁹⁷

El conteo celular se realizó mediante el uso del cellometer® Auto T4, el cual brindó el número de células vivas y muertas, así como la concentración de células vivas en la suspensión instrumento utilizado en otros estudios.⁹⁸
⁹⁹ Las células Hep-2 se desarrollaron al cabo de 24 horas y se puede observar una confluencia mayor al 80%, la cual es óptima para realizar la suspensión celular y determinar la cantidad de células vivas de las muertas como muchas investigaciones lo refieren y lo recalcan como parámetro en todas las determinaciones con células.¹⁰⁰

Se observa de la misma manera en la **Tabla 4** la concentración de células en las suspensiones estuvieron en un rango de $6.54 \times 10^5 - 9.73 \times 10^5$ células/mL para las células Hep-2, estas concentraciones fueron empleadas para determinar el volumen necesario de la suspensión celular con el objetivo de transferir $1,25 \times 10^4$ células a cada pocillo de la placa de ensayo como lo declaran algunos antecedentes.⁹⁵

Tabla N° 4 Conteo celular y porcentaje de viabilidad de las células Hep-2.

Línea celular Hep-2	
Células/MI	% Células viables
8.96×10^5	93%
9.53×10^5	96%
8.53×10^5	94%
7.45×10^5	97%
6.64×10^5	94%
8.39×10^5	95%
7.31×10^5	93%
6.54×10^5	97%
9.73×10^5	97%
6.96×10^5	94%
Desviación Estándar	2%

Fuente: Elaboración propia

3. Viabilidad celular frente al extracto

3.1. Cuantificación del efecto citopático (ECP) y patogenicidad

Primero se evaluó el efecto del extracto de *Mentha spicata* frente a células Hep-2 (toxicidad de la *Mentha spicata*), mediante el método de estimación del efecto citopático inducido por el extracto de *Mentha spicata* (ECP), a diferentes concentraciones del extracto de *Mentha spicata* (1,6 µg/mL por pocillo a 0,003125 µg/mL por pocillo), durante 24, 48 y 72 horas.

La **Tabla 5** resume los resultados de ECP (expresados en %) obtenidos durante el contacto de las células Hep-2 y el extracto de *Mentha spicata*, la lectura semicuantitativa de ECP en un microscopio invertido a 10x, a las 24 horas de incubación no presenta alguna diferencia con el control positivo y negativo, a lo que no podemos definir la toxicidad del extracto, debido a que el virus necesita adaptarse al medio por lo que es necesario ser incubado 48 horas con las células Hep-2 para poder ver su efecto; a las 48 y 72 horas de incubación se observó que el resultado de ECP es de 0% para el test de las distintas concentraciones y el control negativo (crecimiento de células sin el extracto), lo que nos indica que no se observa deformación de las células ni ruptura del tapis celular, por el contrario el control positivo (crecimiento de

células con el virus) observamos que a las 48 y 72 horas de incubación presenta 100% de ECP (citólisis celular).

Tabla 5 Evaluación del efecto citopático del extracto de *Mentha spicata* sobre las células Hep-2.

Concentración del extracto MS	Tiempo de cultivo		
	24 horas	48 horas	72 horas
C+	30%	100%	100%
CN	0%	0%	0%
1.6 µg/mL	0%	0%	0%
0.8 µg/mL	0%	0%	0%
0.4 µg/mL	0%	0%	0%
0.2 µg/mL	0%	0%	0%
0.1 µg/mL	0%	0%	0%
0.05 µg/mL	0%	0%	0%
0.025 µg/mL	0%	0%	0%
0.0125 µg/mL	0%	0%	0%
0.00625 µg/mL	0%	0%	0%
0.003125 µg/mL	0%	0%	0%

Fuente: elaboración propia.

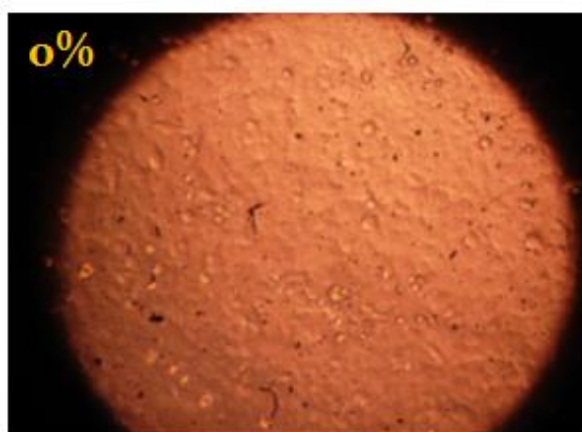


Fig. 21 Control negativo tras 72 horas de incubación se observa el tapis celular bien formado (observado en microscopio invertido a 10x).

Fuente: Elaboración propia.

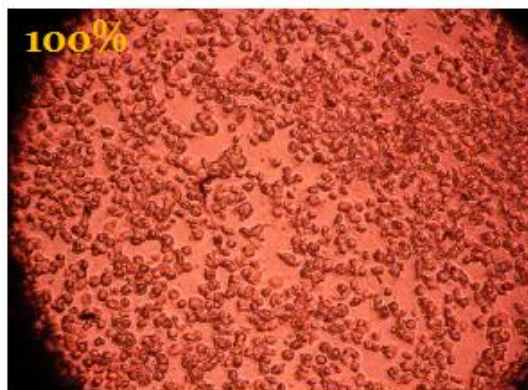


Fig. 22 Control positivo tras 48 horas de incubación se observa citólisis completa ruptura del tapis celular (observado en microscopio invertido a 10x).

Fuente: Elaboración propia.

3.2. Análisis del efecto citotóxico del extracto de *Mentha spicata* en células Hep-2

La lectura semicuantitativa de ECP sugiere el uso de un método para controlar con mayor precisión el efecto del extracto de *Mentha spicata* sobre la viabilidad celular, es por eso que finalmente se utilizó la técnica de coloración con cristal violeta.

Se evaluó el efecto tóxico del extracto de *Mentha spicata* a diferentes concentraciones del extracto (1.6 $\mu\text{g/mL}$ - 0.003125 $\mu\text{g/mL}$) frente a las células Hep-2, durante 24, 48 y 72 horas.

La **Fig. 23** muestra que no hay un efecto citopático en ninguna de la concentraciones (1.6 $\mu\text{g/ml}$ - 0.003125 $\mu\text{g/ml}$) ni en el control (crecimiento de células con Cocksackievirus B4) sobre las células Hep-2 luego de 24 horas de exposición al extracto. Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con post-hoc test 50 de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que en todas las concentraciones no existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el control (crecimiento de células con Cocksackievirus B4).

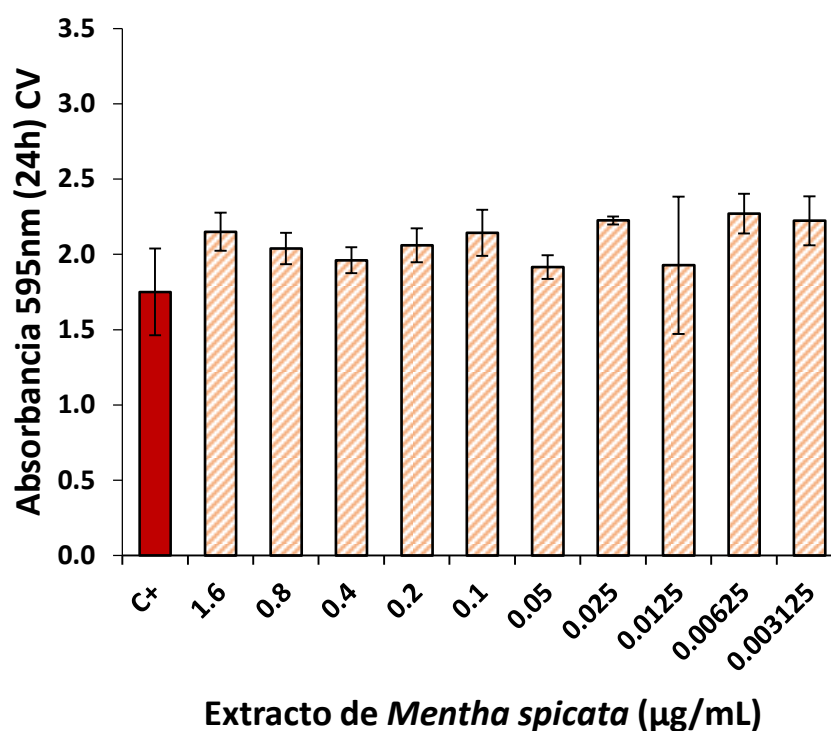


Fig. 23 Células Hep-2, luego de la exposición con diferentes concentraciones de extracto de *Mentha spicata* (1.6 µg/mL-0.003125 µg/mL) durante 24 horas. Los valores representan el promedio ± σ * ($p < 0.05$). ANOVA

La **Tabla 6 y 7.** resume los resultados que fueron expresados como promedio de las absorbancias de la viabilidad celular ± SEM. Además, los resultados del análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) utilizando el software SigmaPlot 13.

Tabla 6. ANOVA de los grupos experimentales de extracto de *Mentha spicata* a 24 horas de exposición en células Hep-2

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	cuadrado medio	F	P
Entre grupos	10	0.773	0.0773	2.062	0.076
Dentro de grupos	22	0.825	0.0375		
Total	32	1.598			

Fuente: elaboración propia.

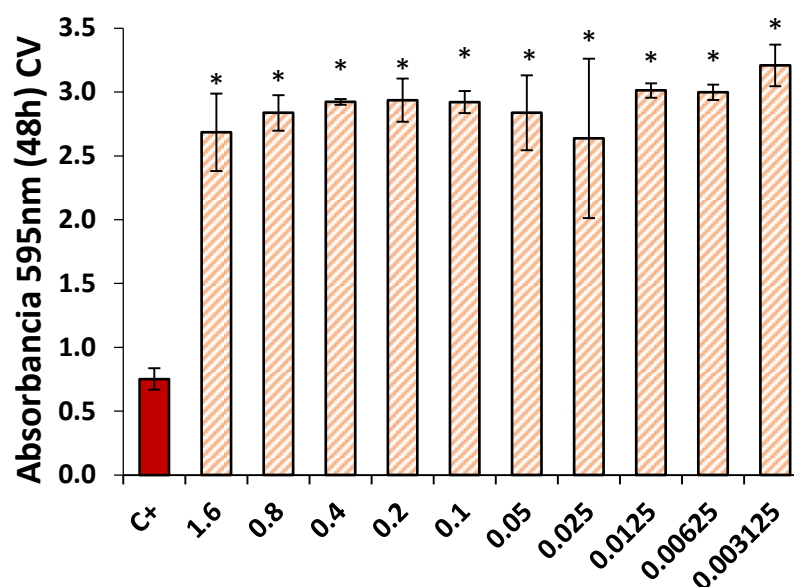
Tabla 7. Resumen estadístico de la medida del efecto tóxico del extracto de *Mentha spicata* a 24 horas de exposición en células Hep-2.

Nombre de grupo	Repeticiones	Promedio de absorbancias	Desviación estándar
C+	3	1.751	0.288
1.6 µg/mL	3	2.150	0.126
0.8 µg/mL	3	2.039	0.103
0.4 µg/mL	3	1.961	0.086
0.2 µg/mL	3	2.060	0.112
0.1 µg/mL	3	2.143	0.154
0.05 µg/mL	3	1.915	0.078
0.025 µg/mL	3	2.225	0.027
0.0125 µg/mL	3	1.928	0.457
0.00625 µg/mL	3	2.271	0.132
0.003125 µg/mL	3	2.223	0.162

Fuente: elaboración propia.

La **Fig. 24** muestra que no hay un efecto citopático en ninguna de las concentraciones del extracto (1.6 µg/mL - 0.003125 µg/mL) sobre las células Hep-2 luego de 48 horas de exposición al extracto. Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con post-hoc test 50 de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 1.6 µg/mL a 0.003125 µg/mL de extracto existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el control (crecimiento de células con Coxsackievirus B4), lo que indica que a estas concentraciones no hay una citólisis en las células Hep-2.

La **Fig. 24** también nos muestra que a las 48 horas de incubación el crecimiento celular fue más homogéneo en todo el test, en comparación con las 24 y 72 horas de incubación, esto nos permitió evaluar mejor los resultados.



Extracto de *Mentha spicata* (µg/mL)

Fig. 24 Células Hep-2, luego de la exposición con diferentes concentraciones de extracto de *Mentha spicata* (1.6 µg/mL - 0.003125 µg/mL) durante 48 horas. Los valores representan el promedio ± σ * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.

Fuente: elaboración propia.

La **Tabla 8, 9 y 10**, resume los resultados que fueron expresados como promedio de las absorbancias de la viabilidad celular ± SEM. Además, los resultados del análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 13.

Tabla 8 Resumen estadístico de la medida del efecto toxico del extracto de *Mentha spicata* a 48 horas de exposición en células Hep-2.

Nombre de grupo	Repeticiones	Promedio de absorbancias	Desviación estándar
C+	3	0.753	0.084
1.6 µg/mL	3	2.685	0.304
0.8 µg/mL	3	2.836	0.140
0.4 µg/mL	3	2.923	0.022
0.2 µg/mL	3	2.936	0.170
0.1 µg/mL	3	2.921	0.087
0.05 µg/mL	3	2.837	0.292
0.025 µg/mL	3	2.637	0.624
0.0125 µg/mL	3	3.012	0.057
0.00625 µg/mL	3	2.998	0.059
0.003125 µg/mL	3	3.208	0.163

Fuente: elaboración propia.

Tabla 9 ANOVA de los grupos experimentales de extracto de *Mentha spicata* a 48 horas de exposición en células Hep-2.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	cuadrado medio	F	P
Entre grupos	10	13.294	1.329	22.009	<0.001
Dentro de grupos	22	1.329	0.0604		
Total	32	14.623			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 10 Test de Dunnett de los grupos experimentales de extracto de *Mentha spicata* a 48 horas de exposición en células Hep-2.

Comparación	Dif. de promedios	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 11	2.455	12.234	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	2.259	11.259	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 10	2.245	11.189	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	2.183	10.878	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 4	2.170	10.815	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	2.168	10.805	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	2.084	10.387	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 3	2.084	10.383	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 2	1.932	9.629	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	1.884	9.388	<0.001	Yes

Fuente: elaboración propia.

La **Fig. 25** muestra que tampoco hay un efecto citopático en ninguna de las concentraciones del extracto (1.6 µg/mL - 0.003125 µg/mL) sobre las células Hep-2 luego de 72 horas de exposición al extracto. Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con post-hoc test 50 de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 1.6 µg/mL hasta 0,003125 µg/mL por pocillo de extracto existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el control (crecimiento de células con Coxsackievirus B4), lo que indica que a estas concentraciones no hay una citólisis en las células Hep-2.

La **Tabla 11, 12 y 13.** resume los resultados que fueron expresados como promedio de las absorbancias de la viabilidad celular \pm SEM. Además, los resultados del análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 13.

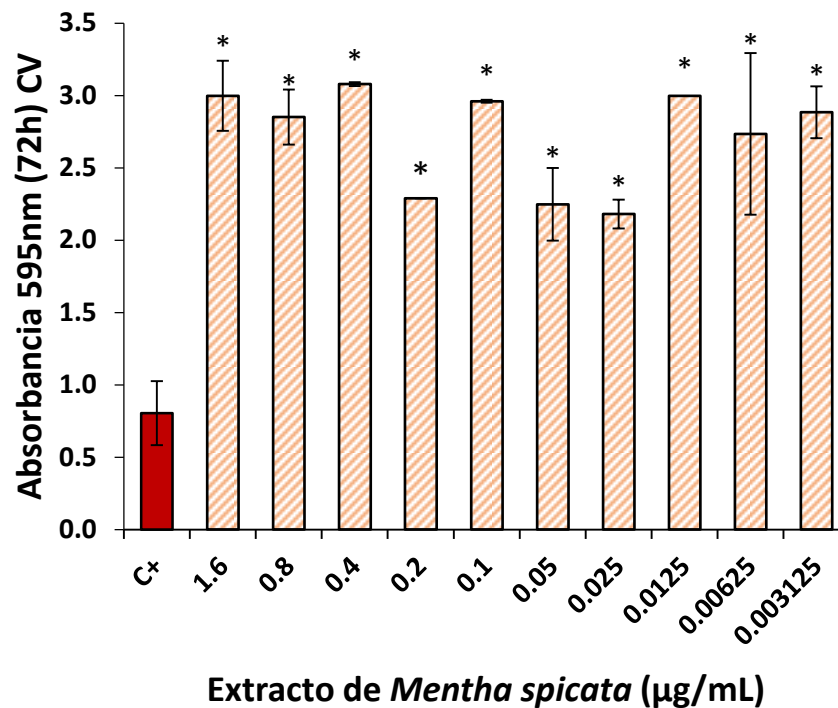


Fig. 25 Células Hep-2, luego de la exposición con diferentes concentraciones de extracto de *Mentha spicata* (1.6 µg/mL - 0.003125 µg/mL) durante 72 horas. Los valores representan el promedio ± σ * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.

Fuente: elaboración propia.

Tabla 11 Resumen estadístico de la medida del efecto toxico del extracto de *Mentha spicata* a 72 horas de exposición en células Hep-2.

Nombre de grupo	Repeticiones	Promedio de absorbancias	Desviación estándar
CN	3	0.805	0.221
1.6 µg/mL	3	2.997	0.242
0.8 µg/mL	3	2.851	0.191
0.4 µg/mL	3	3.079	0.012
0.2 µg/mL	3	2.290	0.000
0.1 µg/mL	3	2.960	0.009
0.05 µg/mL	3	2.248	0.250
0.025 µg/mL	3	2.180	0.100
0.0125 µg/mL	3	2.998	0.000
0.00625 µg/mL	3	2.734	0.559
0.003125 µg/mL	3	2.883	0.179

Fuente: elaboración propia.

Tabla 12 ANOVA de los grupos experimentales de extracto de *Mentha spicata* a 72 horas de exposición en células Hep-2.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	cuadrado medio	F	P
Entre grupos	10	13.276	1.328	26.009	<0.001
Dentro de grupos	22	1.123	0.0510		
Total	32	14.398			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 13 Test de Dunnett de los grupos experimentales de extracto de *Mentha spicata* a 72 horas de exposición en células Hep-2.

Comparación	Dif. de promedios	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 4	2.274	12.329	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	2.193	11.888	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 2	2.192	11.885	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	2.155	11.684	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 11	2.078	11.267	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 3	2.046	11.090	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 10	1.929	10.457	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	1.485	8.050	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	1.443	7.823	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	1.375	7.456	<0.001	Yes

Fuente: elaboración propia.

4. Evaluación del efecto del Coxsackievirus B4 sobre las células Hep-2 en función al tratamiento con extracto de *Mentha spicata*

4.1. Cuantificación del efecto citopático (ECP) y patogenicidad

Primero se evaluó el porcentaje de inhibición tras la exposición de las células Hep-2 mediante la estimación del efecto citopático inducido por CV-B4 (ECP), a diferentes concentraciones del extracto de *Mentha spicata* (1,6 µg/mL por pocillo a 0,003125 µg/mL por pocillo), durante 24,48 y 72 horas, por tres repeticiones.

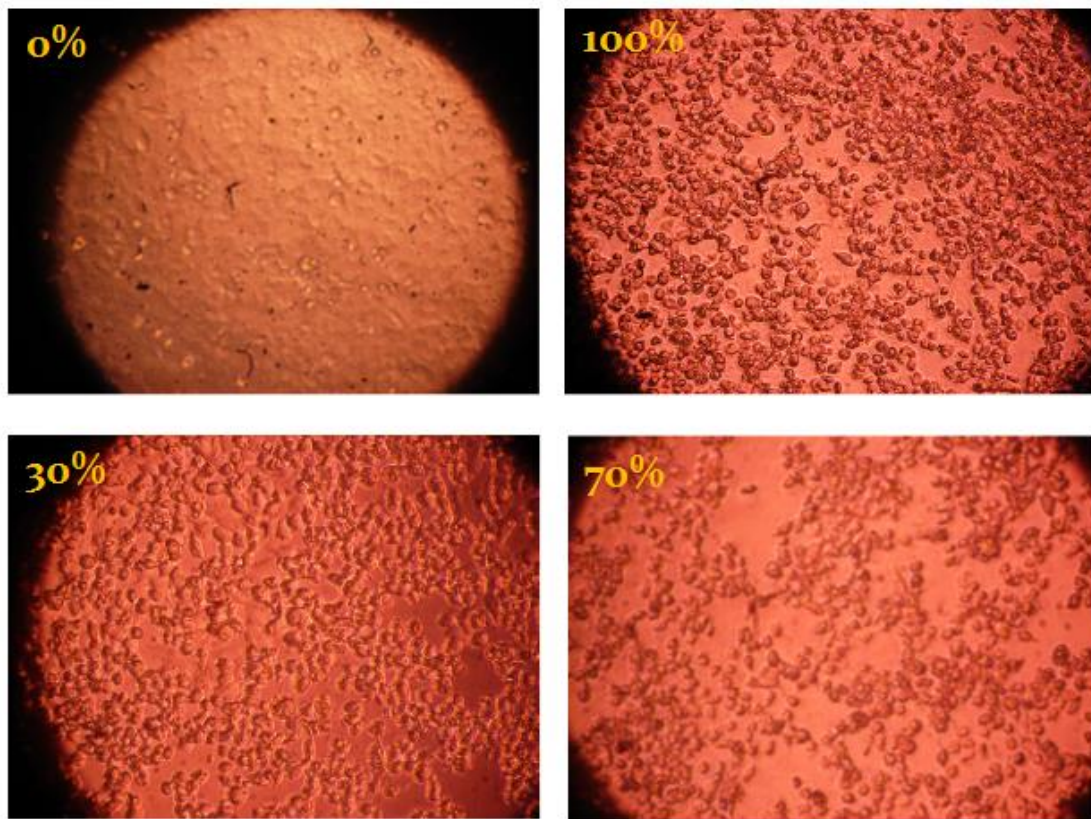


Fig. 26 Efecto del Cocksackievirus B4 sobre las células Hep-2 en función al tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 48 horas de incubación observado en microscopio invertido (10x).

Fuente: elaboración propia.

4.2. Análisis del efecto citotóxico del Cocksackievirus B4 frente al extracto acuoso de *Mentha spicata* en células Hep-2

La lectura semicuantitativa de ECP sugiere el uso de un método para controlar con mayor precisión el efecto del extracto de *Mentha spicata* sobre la viabilidad celular. Además, la gran variabilidad de la respuesta de ECP de 24, 48 y 72 horas requiere mejorar la reproducibilidad de la cinética de la infección; es por eso que finalmente se utilizó la técnica de la coloración con Cristal Violeta.

Se evaluó el efecto de inhibición tras la exposición del Cocksackievirus B4 con el extracto de *Mentha spicata* en células Hep-2 mediante la técnica de coloración Cristal Violeta, a diferentes concentraciones del extracto de *Mentha spicata* (1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por pocillo a 0,003125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por pocillo), durante 24, 48 y 72 horas, por tres repeticiones.

- Primer ensayo

La **Tabla 14** resume los resultados de ECP (expresados en%) obtenidos durante el contacto de las células Hep-2 infectadas con Coxsackievirus B4 en tratamiento con el extracto de *Mentha spicata*.

Tabla 14 Resumen de ECP (expresado en %) obtenidos durante el contacto de las células Hep-2 infectadas con Coxsackievirus B4 en tratamiento con el extracto de *Mentha spicata*.

Concentración del extracto MS	Tiempo de cultivo		
	24 horas	48 horas	72 horas
C+	30%	100%	100%
CN	0%	0%	0%
1.6 µg/mL	30%	80%	100%
0.8 µg/mL	30%	80%	100%
0.4 µg/mL	30%	80%	100%
0.2 µg/mL	30%	80%	100%
0.1 µg/mL	30%	70%	100%
0.05 µg/mL	0%	50%	100%
0.025 µg/mL	0%	25%	80%
0.0125 µg/mL	0%	30%	100%
0.00625 µg/mL	0%	100%	100%
0.003125 µg/mL	0%	100%	100%

Fuente: elaboración propia.

La **Fig. 27** muestra el efecto citotóxico concentración-dependiente del extracto de *Mentha spicata* (1,6 µg/mL a 0,003125 µg/mL) sobre las células Hep-2 luego de 24 horas de exposición al Coxsackievirus B4. Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con post-hoc test 50 de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 0.050 µg/mL a 0.003125 µg/mL de extracto de *Mentha spicata* existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el control (crecimiento de células con Coxsackievirus B4), lo que indica que a estas concentraciones hay una inhibición de la citólisis que produce en Coxsackievirus B4 en las células Hep-2.

La **Tabla 15, 16 y 17.** resume los resultados que fueron expresados como promedio de las absorbancias de la viabilidad celular \pm SEM. Además, los resultados

del análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 13.

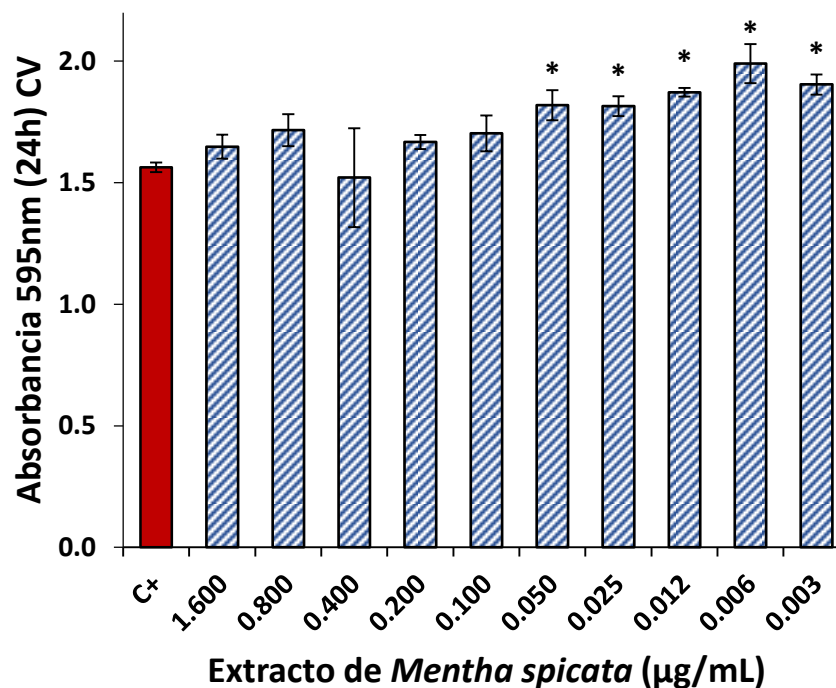


Fig. 27 Citotoxicidad inducida por *Coxsackievirus B4* en células Hep-2, luego de la exposición con diferentes concentraciones de extracto de *Mentha spicata* (1,6 µg/mL-0,003125 µg/mL) durante 24 horas. Los valores representan el promedio ± σ * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.

Fuente: elaboración propia.

Tabla 15 Resumen estadístico a 24 horas de incubación de las células Hep-2 infectadas con *Coxsackievirus B4* en tratamiento con extracto de *Mentha spicata*.

Nombre de grupo	Repeticiones	Promedio de absorbancias	Desviación estándar
C+	3	1.563	0.0196
1.6 µg/mL	3	1.648	0.0491
0.8 µg/mL	3	1.716	0.0661
0.4 µg/mL	3	1.521	0.2030
0.2 µg/mL	3	1.667	0.0291
0.1 µg/mL	3	1.703	0.0743
0.05 µg/mL	3	1.819	0.0621
0.025 µg/mL	3	1.815	0.0407
0.0125 µg/mL	3	1.872	0.0177
0.00625 µg/mL	3	1.990	0.0807
0.003125 µg/mL	3	1.904	0.0417

Fuente: elaboración propia.

Tabla 16 ANOVA de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 24 horas de incubación.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	cuadrado medio	F	P
Entre grupos	10	0.638	0.0638	10.181	<0.001
Dentro de grupos	22	0.138	0.00627		
Total	32	0.776			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 17 Test de Dunnett de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 24 horas de incubación.

Comparación	Dif. de promedios	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 4	0.426	6.596	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	0.340	5.266	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 2	0.308	4.771	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	0.256	3.961	0.005	Yes
Col 1 vs. Col 11	0.251	3.889	0.006	Yes
Col 1 vs. Col 3	0.152	2.357	0.165	No
Col 1 vs. Col 10	0.139	2.156	0.236	No
Col 1 vs. Col 5	0.103	1.599	0.543	No
Col 1 vs. Col 7	0.0847	1.310	0.743	No
Col 1 vs. Col 8	0.0420	0.650	0.994	No

Fuente: elaboración propia.

La **Fig. 28** muestra el efecto citotóxico concentración-dependiente del extracto de *Mentha spicata* (1,6 $\mu\text{g/mL}$ a 0,003125 $\mu\text{g/mL}$) sobre las células Hep-2 luego de 48 horas de exposición al Coxsackievirus B4. Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con post-hoc test 50 de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ a 0.0125 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de *Mentha spicata* existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el control (crecimiento de células con Coxsackievirus B4), lo que indica que a estas concentraciones hay una inhibición de la citólisis que produce en Coxsackievirus B4 en las células Hep-2.

La **Tabla 18, 19 y 20.** resume los resultados que fueron expresados como promedio de las absorbancias de la viabilidad celular \pm SEM. Además, los resultados del análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-

hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 13.

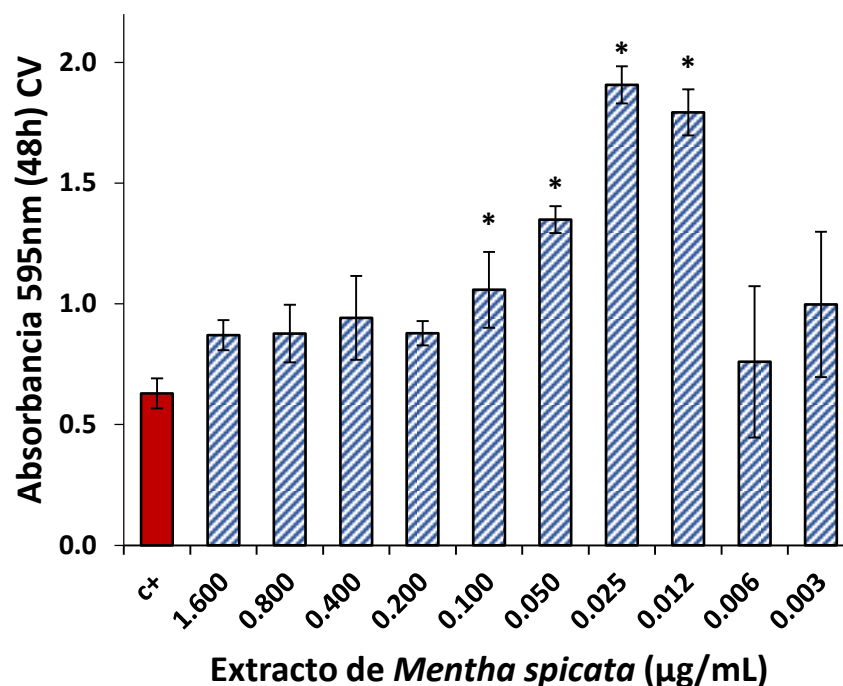


Fig. 28 Citotoxicidad inducida por Coxsackievirus B4 en células Hep-2, luego de la exposición con diferentes concentraciones de extracto de *Mentha spicata* (1,6 µg/mL-0,003125 µg/mL) durante 48 horas. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$ * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.

Fuente: elaboración propia.

Tabla 18 Resumen estadístico a 48 horas de incubación de las células Hep-2 infectadas con Coxsackievirus B4 en tratamiento con extracto de *Mentha spicata*.

Nombre de grupo	Repeticiones	Promedio de absorbancias	Desviación estándar
C+	3	0.629	0.0870
1.6 µg/mL	3	0.870	0.0620
0.8 µg/mL	3	0.877	0.1190
0.4 µg/mL	3	0.942	0.1740
0.2 µg/mL	3	0.878	0.0503
0.1 µg/mL	3	1.058	0.1570
0.05 µg/mL	3	1.349	0.0557
0.025 µg/mL	3	1.907	0.0766
0.0125 µg/mL	3	1.793	0.0955
0.00625 µg/mL	3	0.760	0.3140
0.003125 µg/mL	3	0.997	0.3010

Fuente: elaboración propia.

Tabla 19 ANOVA de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 48 horas de incubación.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	cuadrado medio	F	P
Entre grupos	10	5.161	0.516	19.578	<0.001
Dentro de grupos	22	0.580	0.0264		
Total	32	5.741			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 20 Test de Dunnett de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 48 horas de incubación.

Comparación	Dif. de promedios	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 8	1.278	9.640	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	1.164	8.783	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	0.720	5.434	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	0.429	3.236	0.027	Yes
Col 1 vs. Col 11	0.368	2.778	0.073	No
Col 1 vs. Col 4	0.314	2.366	0.162	No
Col 1 vs. Col 5	0.249	1.878	0.369	No
Col 1 vs. Col 3	0.248	1.871	0.373	No
Col 1 vs. Col 2	0.241	1.820	0.402	No
Col 1 vs. Col 10	0.131	0.988	0.922	No

Fuente: elaboración propia.

La **Fig. 29** muestra el efecto citotóxico concentración-dependiente del extracto de *Mentha spicata* (1,6 µg/mL a 0,003125 µg/mL) sobre las células Hep-2 luego de 72 horas de exposición al Coxsackievirus B4. Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con post-hoc test 50 de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que a concentración de 0.025 µg/mL de extracto de *Mentha spicata* existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el control (crecimiento de células con Coxsackievirus B4), lo que indica que a estas concentraciones hay una inhibición de la citólisis que produce en Coxsackievirus B4 en las células Hep-2.

La **Tabla 21, 22 y 23.** resume los resultados que fueron expresados como promedio de las absorbancias de la viabilidad celular \pm SEM. Además, los resultados del análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 13.

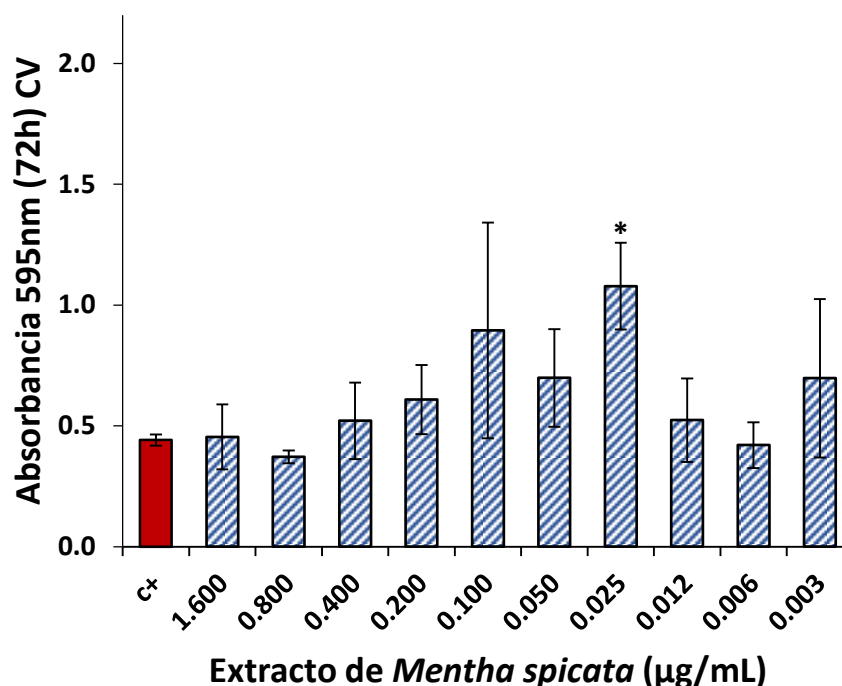


Fig. 29 Citotoxicidad inducida por *Coxsackievirus B4* en células Hep-2, luego de la exposición con diferentes concentraciones de extracto de *Mentha spicata* (1,6 µg/mL-0,003125 µg/mL) durante 72 horas. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$ * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.

Fuente: elaboración propia.

Tabla 21 Resumen estadístico a 72 horas de incubación de las células Hep-2 infectadas con *Coxsackievirus B4* en tratamiento con extracto de *Mentha spicata*.

Nombre de grupo	Repeticiones	Promedio de absorbancias	Desviación estándar
C+	3	0.441	0.023
1.6 µg/mL	3	0.454	0.134
0.8 µg/mL	3	0.371	0.026
0.4 µg/mL	3	0.521	0.158
0.2 µg/mL	3	0.609	0.143
0.1 µg/mL	3	0.895	0.446
0.05 µg/mL	3	0.698	0.202
0.025 µg/mL	3	1.078	0.180
0.0125 µg/mL	3	0.524	0.173
0.00625 µg/mL	3	0.420	0.095
0.003125 µg/mL	3	0.697	0.328

Fuente: elaboración propia.

Tabla 22 ANOVA de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 72 horas de incubación.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	cuadrado medio	F	P
Entre grupos	10	1.430	0.143	3.255	0.010
Dentro de grupos	22	0.967	0.0440		
Total	32	2.397			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 23 Test de Dunnett de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 72 horas de incubación.

Comparación	Dif. de promedios	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 8	0.637	3.719	0.009	Yes
Col 1 vs. Col 6	0.454	2.650	0.094	No
Col 1 vs. Col 7	0.257	1.501	0.611	No
Col 1 vs. Col 11	0.256	1.494	0.616	No
Col 1 vs. Col 5	0.168	0.979	0.925	No
Col 1 vs. Col 9	0.0823	0.481	0.999	No
Col 1 vs. Col 4	0.0793	0.463	1.000	No
Col 1 vs. Col 3	0.0703	0.411	1.000	No
Col 1 vs. Col 10	0.0210	0.123	1.000	No
Col 1 vs. Col 2	0.0130	0.0759	1.000	No

Fuente: elaboración propia.

○ Segunda ensayo

La **Tabla 24** resume los resultados de ECP (expresados en%) obtenidos durante el contacto de las células Hep-2 infectadas con Coxsackievirus B4 en tratamiento con el extracto de *Mentha spicata* en la segunda repetición.

Tabla 24 Resumen de ECP (expresado en %) obtenidos durante el contacto de las células Hep-2 infectadas con Coxsackievirus B4 en tratamiento con el extracto de *Mentha spicata*.

Concentración del extracto MS	Tiempo de cultivo		
	24 horas	48 horas	72 horas
C+	0%	100%	100%
CN	0%	0%	0%
1.6 µg/mL	0%	100%	90%
0.8 µg/mL	0%	100%	90%
0.4 µg/mL	0%	100%	100%
0.2 µg/mL	0%	100%	100%
0.1 µg/mL	0%	50%	90%
0.05 µg/mL	0%	25%	100%
0.025 µg/mL	0%	25%	70%
0.0125 µg/mL	0%	25%	100%
0.00625 µg/mL	0%	100%	100%
0.003125 µg/mL	0%	100%	100%

Fuente: elaboración propia.

La **Fig. 30** muestra el efecto citotóxico concentración-dependiente del extracto de *Mentha spicata* (1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,003125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre las células Hep-2 luego de 24 horas de exposición al Coxsackievirus B4. Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con post-hoc test 50 de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que a 24 horas de incubación no se encontró una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el control (crecimiento de células con Coxsackievirus B4), lo que indica que a estas concentraciones hay una inhibición de la citólisis que produce en Coxsackievirus B4 en las células Hep-2.

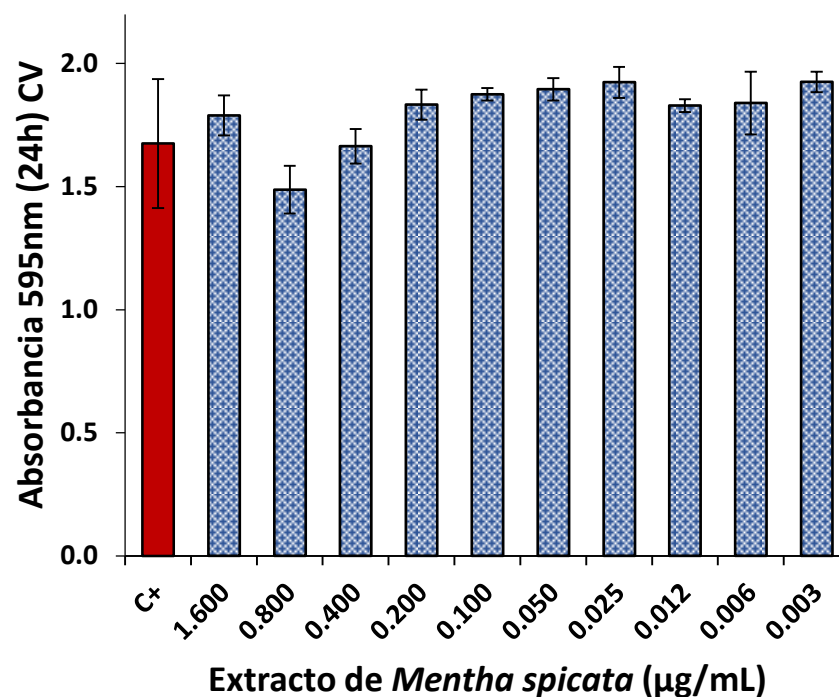


Fig. 30 Citotoxicidad inducida por Coxsackievirus B4 en células Hep-2, luego de la exposición con diferentes concentraciones de extracto de *Mentha spicata* (1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -0,003125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 horas. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$ * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.

Fuente: elaboración propia.

La **Tabla 25, 26 y 27**. resume los resultados que fueron expresados como promedio de las absorbancias de la viabilidad celular \pm SEM. Además, los resultados del análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-

hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 13.

Tabla 25 Resumen estadístico a 24 horas de incubación de las células Hep-2 infectadas con Cocksackievirus B4 en tratamiento con extracto de *Mentha spicata*.

Nombre de grupo	Repeticiones	Promedio de absorbancias	Desviación estándar
C+	3	1.675	0.2620
1.6 µg/mL	3	1.789	0.0818
0.8 µg/mL	3	1.487	0.0970
0.4 µg/mL	3	1.664	0.0702
0.2 µg/mL	3	1.833	0.0609
0.1 µg/mL	3	1.875	0.0250
0.05 µg/mL	3	1.896	0.0456
0.025 µg/mL	3	1.923	0.0635
0.0125 µg/mL	3	1.829	0.0259
0.00625 µg/mL	3	1.839	0.1270
0.003125 µg/mL	3	1.926	0.0416

Fuente: elaboración propia.

Tabla 26 ANOVA de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 24 horas de incubación.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	cuadrado medio	F	P
Entre grupos	10	0.543	0.0543	5.034	<0.001
Dentro de grupos	22	0.237	0.0108		
Total	32	0.780			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 27 Test de Dunnett de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 24 horas de incubación.

Comparación	Dif. de promedios	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 11	0.250	2.953	0.050	No
Col 1 vs. Col 8	0.248	2.925	0.054	No
Col 1 vs. Col 7	0.220	2.599	0.104	No
Col 1 vs. Col 6	0.200	2.355	0.165	No
Col 1 vs. Col 3	0.188	2.217	0.212	No
Col 1 vs. Col 10	0.164	1.934	0.339	No
Col 1 vs. Col 5	0.158	1.860	0.379	No
Col 1 vs. Col 9	0.154	1.816	0.404	No
Col 1 vs. Col 2	0.114	1.345	0.720	No
Col 1 vs. Col 4	0.0117	0.138	1.000	No

Fuente: elaboración propia.

La **Fig. 31** muestra el efecto citotóxico concentración-dependiente del extracto de *Mentha spicata* (1,6 $\mu\text{g/mL}$ a 0,003125 $\mu\text{g/mL}$) sobre las células Hep-2 luego de 48 horas de exposición al Coxsackievirus B4. Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con post-hoc test 50 de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ a 0.0125 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de *Mentha spicata* existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el control (crecimiento de células con Coxsackievirus B4), lo que indica que a estas concentraciones hay una inhibición de la citólisis que produce en Coxsackievirus B4 en las células Hep-2.

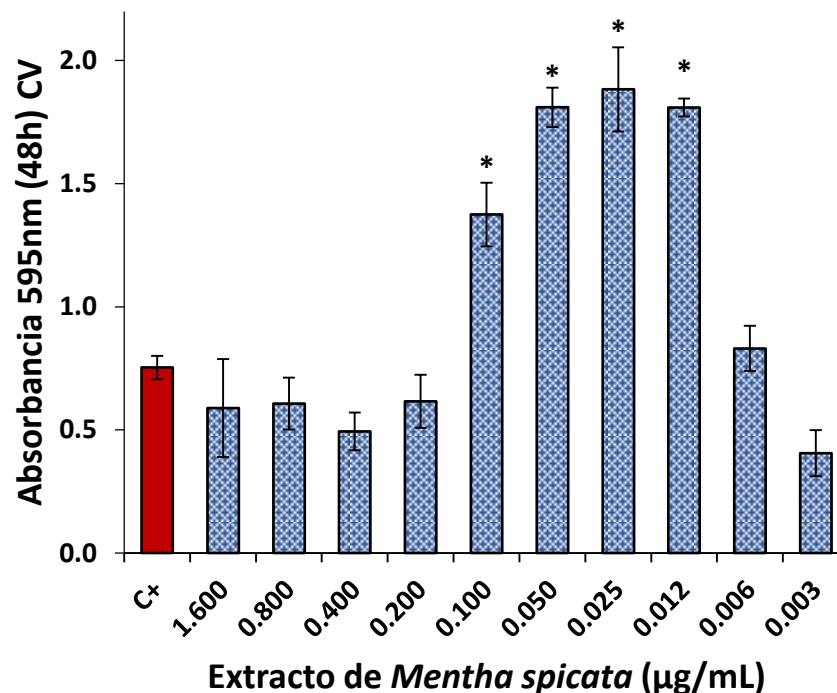


Fig. 31 Citotoxicidad inducida por Coxsackievirus B4 en células Hep-2, luego de la exposición con diferentes concentraciones de extracto de *Mentha spicata* (1,6 $\mu\text{g/mL}$ -0,003125 $\mu\text{g/mL}$) durante 48 horas. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$ * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.

Fuente: elaboración propia.

La **Tabla 28, 29 y 30**. resume los resultados que fueron expresados como promedio de las absorbancias de la viabilidad celular \pm SEM. Además, los resultados del análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-

hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 13.

Tabla 28 Resumen estadístico a 48 horas de incubación de las células Hep-2 infectadas con Cocksackievirus B4 en tratamiento con extracto de *Mentha spicata*.

Nombre de grupo	Repeticiones	Promedio de absorbancias	Desviación estándar
C+	3	0.753	0.048
1.6 µg/mL	3	0.589	0.199
0.8 µg/mL	3	0.607	0.105
0.4 µg/mL	3	0.494	0.077
0.2 µg/mL	3	0.616	0.107
0.1 µg/mL	3	1.375	0.130
0.05 µg/mL	3	1.810	0.080
0.025 µg/mL	3	1.883	0.171
0.0125 µg/mL	3	1.809	0.036
0.00625 µg/mL	3	0.831	0.092
0.003125 µg/mL	3	0.406	0.094

Fuente: elaboración propia.

Tabla 29 ANOVA de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 48 horas de incubación.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	cuadrado medio	F	P
Entre grupos	10	10.197	1.020	79.427	<0.001
Dentro de grupos	22	0.282	0.0128		
Total	32	10.480			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 30 Test de Dunnett de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 48 horas de incubación.

Comparación	Dif. de promedios	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 8	1.130	12.211	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	1.057	11.425	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	1.056	11.414	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	0.622	6.720	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 11	0.347	3.754	0.008	Yes
Col 1 vs. Col 4	0.260	2.807	0.068	No
Col 1 vs. Col 2	0.164	1.776	0.428	No
Col 1 vs. Col 3	0.147	1.585	0.553	No
Col 1 vs. Col 5	0.137	1.484	0.622	No
Col 1 vs. Col 10	0.0773	0.836	0.969	No

Fuente: elaboración propia.

La **Fig. 32** muestra el efecto citotóxico concentración-dependiente del extracto de *Mentha spicata* (1,6 $\mu\text{g/mL}$ a 0,003125 $\mu\text{g/mL}$) sobre las células Hep-2 luego de 72 horas de exposición al Coxsackievirus B4. Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con post-hoc test 50 de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que a concentración de 1.6 $\mu\text{g/mL}$, 0.8 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.025 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de *Mentha Spicata* existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el control (crecimiento de células con de Coxsackievirus B4), lo que indica que a estas concentraciones hay una inhibición de la citólisis que produce en Coxsackievirus B4 en las células Hep-2.

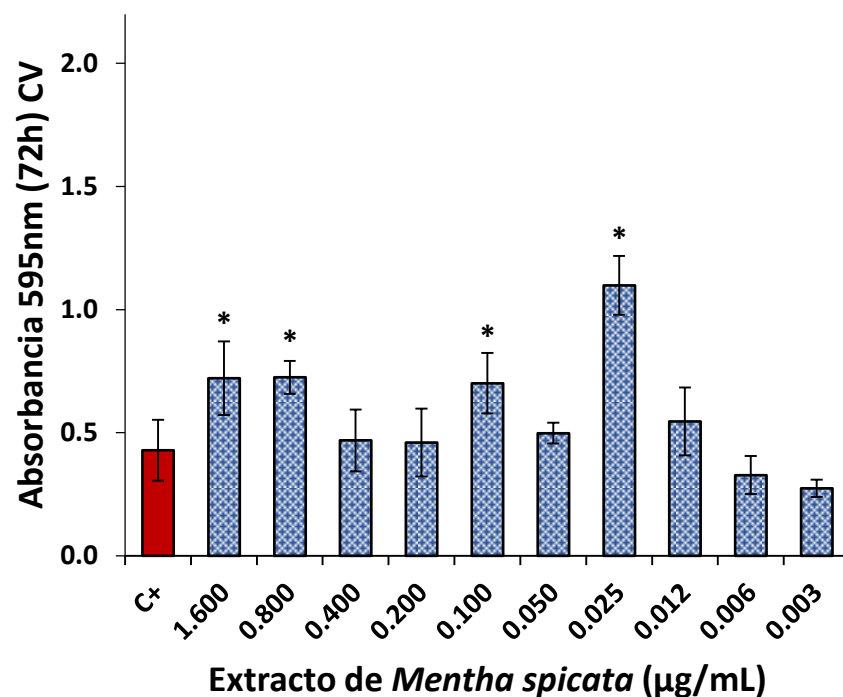


Fig. 32 Citotoxicidad inducida por Coxsackievirus B4 en células Hep-2, luego de la exposición con diferentes concentraciones de extracto de *Mentha spicata* (1,6 $\mu\text{g/mL}$ -0,003125 $\mu\text{g/mL}$) durante 72 horas. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$ * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.

Fuente: elaboración propia.

La **Tabla 31, 32 y 33**. resume los resultados que fueron expresados como promedio de las absorbancias de la viabilidad celular \pm SEM. Además, los

resultados del análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 13.

Tabla 31 Resumen estadístico a 72 horas de incubación de las células Hep-2 infectadas con Cocksackievirus B4 en tratamiento con extracto de *Mentha spicata*.

Nombre de grupo	Repeticiones	Promedio de absorbancias	Desviación estándar
C+	3	0.428	0.124
1.6 µg/mL	3	0.721	0.149
0.8 µg/mL	3	0.725	0.067
0.4 µg/mL	3	0.469	0.126
0.2 µg/mL	3	0.460	0.138
0.1 µg/mL	3	0.701	0.123
0.05 µg/mL	3	0.498	0.042
0.025 µg/mL	3	1.098	0.120
0.0125 µg/mL	3	0.546	0.138
0.00625 µg/mL	3	0.328	0.078
0.003125 µg/mL	3	0.274	0.035

Fuente: elaboración propia.

Tabla 32 ANOVA de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 72 horas de incubación.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	cuadrado medio	F	P
Entre grupos	10	1.612	0.161	13.214	<0.001
Dentro de grupos	22	0.268	0.0122		
Total	32	1.881			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 33 Test de Dunnett de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 72 horas de incubación.

Comparación	Dif. de promedios	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 8	0.670	7.428	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 3	0.297	3.289	0.024	Yes
Col 1 vs. Col 2	0.293	3.248	0.027	Yes
Col 1 vs. Col 6	0.272	3.019	0.044	Yes
Col 1 vs. Col 11	0.154	1.711	0.469	No
Col 1 vs. Col 9	0.118	1.305	0.747	No
Col 1 vs. Col 10	0.100	1.112	0.864	No
Col 1 vs. Col 7	0.0700	0.776	0.980	No
Col 1 vs. Col 4	0.0403	0.447	1.000	No
Col 1 vs. Col 5	0.0313	0.347	1.000	No

Fuente: elaboración propia.

○ Tercera ensayo

La **Tabla 34** resume los resultados de ECP (expresados en%) obtenidos durante el contacto de las células Hep-2 infectadas con Coxsackievirus B4 en tratamiento con el extracto de *Mentha spicata*, en la tercera repetición.

Tabla 34 Resumen de ECP (expresado en %) obtenidos durante el contacto de las células Hep-2 infectadas con Coxsackievirus B4 en tratamiento con el extracto de *Mentha spicata*.

Concentración del extracto MS	Tiempo de cultivo		
	24 horas	48 horas	72 horas
C+	50%	100%	100%
CN	0%	0%	0%
1.6 µg/mL	60%	100%	100%
0.8 µg/mL	60%	100%	100%
0.4 µg/mL	0%	100%	100%
0.2 µg/mL	0%	90%	100%
0.1 µg/mL	0%	50%	100%
0.05 µg/mL	0%	50%	100%
0.025 µg/mL	0%	50%	80%
0.0125 µg/mL	0%	40%	100%
0.00625 µg/mL	0%	100%	100%
0.003125 µg/mL	0%	100%	100%

Fuente: elaboración propia.

La **Fig. 33** muestra el efecto citotóxico concentración-dependiente del extracto de *Mentha spicata* (1,6 µg/mL a 0,003125 µg/mL) sobre las células Hep-2 luego de 24 horas de exposición al coxsackievirus B4. Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con post-hoc test 50 de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 0.4 µg/mL a 0.003125 µg/mL de extracto de *Mentha spicata* existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el control (crecimiento de células con Coxsackievirus B4), lo que indica que a estas concentraciones hay una inhibición de la citólisis que produce en Coxsackievirus B4 en las células Hep-2.

La **Tabla 35, 36 y 37.** resume los resultados que fueron expresados como promedio de las absorbancias de la viabilidad celular \pm SEM. Además, los resultados

del análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 13.

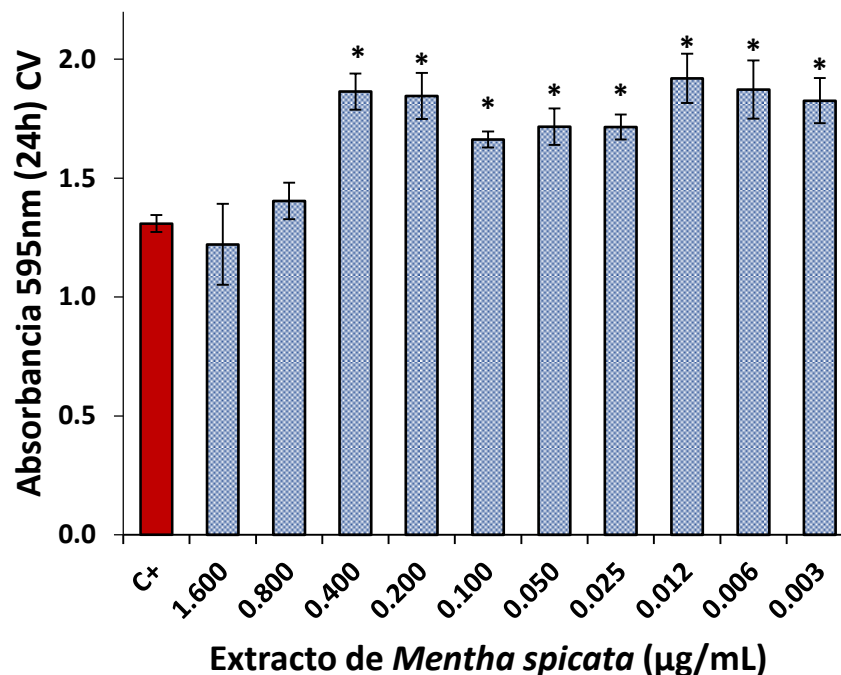


Fig. 33 Citotoxicidad inducida por *Coxsackievirus B4* en células Hep-2, luego de la exposición con diferentes concentraciones de extracto de *Mentha spicata* (1,6 µg/mL-0,003125 µg/mL) durante 24 horas. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$ * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.

Fuente: elaboración propia.

Tabla 35 Resumen estadístico a 24 horas de incubación de las células Hep-2 infectadas con *Coxsackievirus B4* en tratamiento con extracto de *Mentha spicata*.

Nombre de grupo	Repeticiones	Promedio de absorbancias	Desviación estándar
C+	3	1.309	0.0360
1.6 µg/mL	3	1.221	0.1710
0.8 µg/mL	3	1.404	0.0762
0.4 µg/mL	3	1.864	0.0766
0.2 µg/mL	3	1.846	0.0970
0.1 µg/mL	3	1.663	0.0337
0.05 µg/mL	3	1.717	0.0770
0.025 µg/mL	3	1.715	0.0520
0.0125 µg/mL	3	1.919	0.1030
0.00625 µg/mL	3	1.873	0.1220
0.003125 µg/mL	3	1.826	0.0951

Fuente: elaboración propia.

Tabla 36 ANOVA de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 24 horas de incubación.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	cuadrado medio	F	P
Entre grupos	10	1.808	0.181	20.715	<0.001
Dentro de grupos	22	0.192	0.00873		
Total	32	2.000			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 37 Test de Dunnett de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 24 horas de incubación.

Comparación	Dif. de promedios	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 9	0.610	8.002	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 10	0.564	7.390	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 4	0.555	7.272	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	0.537	7.040	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 11	0.517	6.774	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	0.408	5.345	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	0.406	5.323	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	0.354	4.637	0.001	Yes
Col 1 vs. Col 3	0.0950	1.246	0.785	No
Col 1 vs. Col 2	0.0877	1.149	0.843	No

Fuente: elaboración propia.

La **Fig. 34** muestra el efecto citotóxico concentración-dependiente del extracto de *Mentha spicata* (1,6 µg/mL a 0,003125 µg/mL) sobre las células Hep-2 luego de 48 horas de exposición al coxsackievirus B4. Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con post-hoc test 50 de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 0.2 µg/mL a 0.125 µg/mL de extracto de *Mentha spicata* existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el control (crecimiento de células con Coxsackievirus B4), lo que indica que a estas concentraciones hay una inhibición de la citólisis que produce en Coxsackievirus B4 en las células Hep-2.

La **Tabla 38, 39 y 40.** resume los resultados que fueron expresados como promedio de las absorbancias de la viabilidad celular \pm SEM. Además, los resultados del análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 13.

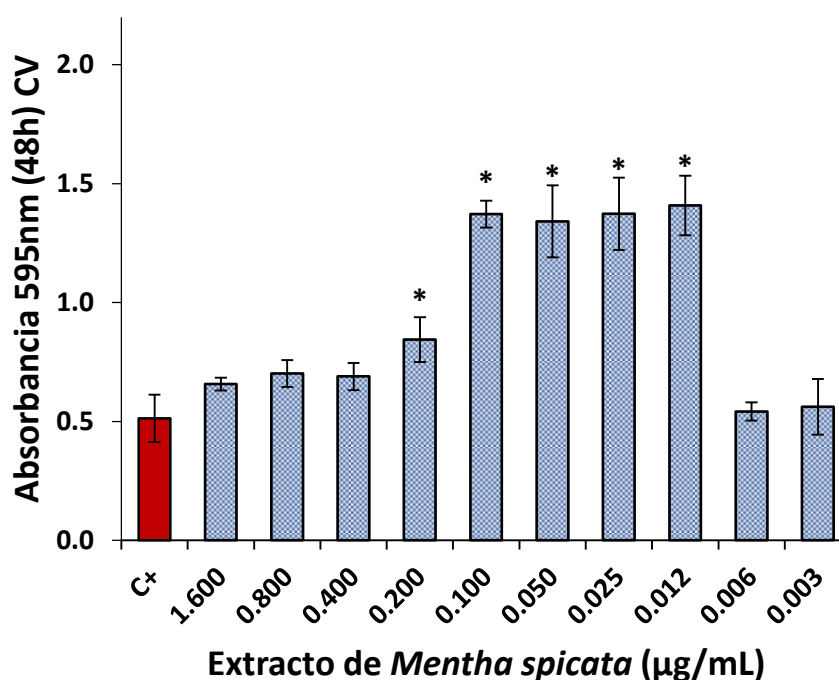


Fig. 34 Citotoxicidad inducida por *Coxsackievirus B4* en células Hep-2, luego de la exposición con diferentes concentraciones de extracto de *Mentha spicata* (1,6 µg/mL-0,003125 µg/mL) durante 48 horas. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$ * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.

Fuente: elaboración propia.

Tabla 38 Resumen estadístico a 48 horas de incubación de las células Hep-2 infectadas con *Coxsackievirus B4* en tratamiento con extracto de *Mentha spicata*.

Nombre de grupo	Repeticiones	Promedio de absorbancias	Desviación estándar
C+	3	0.513	0.0997
1.6 µg/mL	3	0.657	0.0266
0.8 µg/mL	3	0.701	0.0565
0.4 µg/mL	3	0.689	0.0572
0.2 µg/mL	3	0.844	0.0940
0.1 µg/mL	3	1.372	0.0567
0.05 µg/mL	3	1.341	0.1510
0.025 µg/mL	3	1.373	0.1530
0.0125 µg/mL	3	1.408	0.1250
0.00625 µg/mL	3	0.542	0.0387
0.003125 µg/mL	3	0.562	0.1170

Fuente: elaboración propia.

Tabla 39 ANOVA de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 48 horas de incubación.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	cuadrado medio	F	P
Entre grupos	10	4.312	0.431	44.653	<0.001
Dentro de grupos	22	0.212	0.00966		
Total	32	4.525			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 40 Test de Dunnett de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 48 horas de incubación.

Comparación	Dif. de promedios	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 9	0.895	11.159	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	0.860	10.722	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	0.859	10.706	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	0.829	10.328	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	0.332	4.134	0.003	Yes
Col 1 vs. Col 3	0.188	2.343	0.169	No
Col 1 vs. Col 4	0.176	2.198	0.219	No
Col 1 vs. Col 2	0.144	1.799	0.415	No
Col 1 vs. Col 11	0.0490	0.611	0.996	No
Col 1 vs. Col 10	0.0290	0.361	1.000	No

Fuente: elaboración propia.

La **Fig. 35** muestra el efecto citotóxico concentración-dependiente del extracto de *Mentha spicata* (1,6 $\mu\text{g/mL}$ a 0,003125 $\mu\text{g/mL}$) sobre las células Hep-2 luego de 72 horas de exposición al coxsackievirus B4. Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con post-hoc test 50 de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 0.025 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de *Mentha spicata* existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el control (crecimiento de células con Coxsackievirus B4), lo que indica que a estas concentraciones hay una inhibición de la citólisis que produce en Coxsackievirus B4 en las células Hep-2.

La **Tabla 41, 42 y 43.** resume los resultados que fueron expresados como promedio de las absorbancias de la viabilidad celular \pm SEM. Además, los resultados del análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 13.

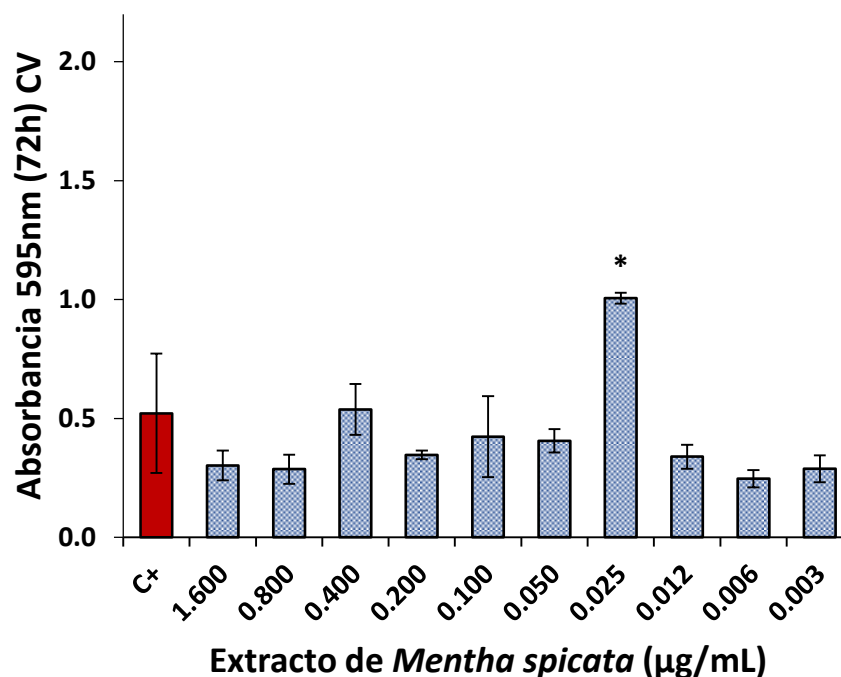


Fig. 35 Citotoxicidad inducida por *Coxsackievirus B4* en células Hep-2, luego de la exposición con diferentes concentraciones de extracto de *Mentha spicata* (1,6 µg/mL-0,003125 µg/mL) durante 72 horas. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$ * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.

Fuente: elaboración propia.

Tabla 41 Resumen estadístico a 72 horas de incubación de las células Hep-2 infectadas con *Coxsackievirus B4* en tratamiento con extracto de *Mentha spicata*.

Nombre de grupo	Repeticiones	Promedio de absorbancias	Desviación estándar
C+	3	0.521	0.2510
1.6 µg/mL	3	0.302	0.0621
0.8 µg/mL	3	0.286	0.0613
0.4 µg/mL	3	0.538	0.1070
0.2 µg/mL	3	0.346	0.0184
0.1 µg/mL	3	0.423	0.1710
0.05 µg/mL	3	0.406	0.0492
0.025 µg/mL	3	1.006	0.0229
0.0125 µg/mL	3	0.339	0.0508
0.00625 µg/mL	3	0.247	0.0365
0.003125 µg/mL	3	0.288	0.0565

Fuente: elaboración propia.

Tabla 42 ANOVA de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 72 horas de incubación.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	cuadrado medio	F	P
Entre grupos	10	1.375	0.137	12.456	<0.001
Dentro de grupos	22	0.243	0.0110		
Total	32	1.618			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 43 Test de Dunnett de los grupos experimentales del tratamiento con extracto de *Mentha spicata* a 72 horas de incubación.

Comparación	Dif. de promedios	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 8	0.485	5.650	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 10	0.275	3.202	0.030	Yes
Col 1 vs. Col 3	0.235	2.739	0.079	No
Col 1 vs. Col 11	0.233	2.716	0.082	No
Col 1 vs. Col 2	0.219	2.557	0.113	No
Col 1 vs. Col 9	0.183	2.129	0.246	No
Col 1 vs. Col 5	0.175	2.040	0.286	No
Col 1 vs. Col 7	0.116	1.348	0.717	No
Col 1 vs. Col 6	0.0983	1.146	0.845	No
Col 1 vs. Col 4	0.0163	0.190	1.000	No

Fuente: elaboración propia.

En trabajos de investigación realizados por Sara I. y colaboradores en el año 2014, datos registrados en su estudio sobre acción potencial antiviral del extracto acuoso registran que el romero, salvia y tomillo perteneciente a la familia Lamiaceae que también se conoce como la familia de la mentha.¹⁰¹

La preparación del extracto acuoso: se añadieron 10 g de hojas secas a 100 ml de agua destilada previamente hervida y se dejaron durante 15 minutos a temperatura ambiente para enfriar y luego se filtraron usando papel de filtro Whatman®. El filtrado luego se esterilizó usando un filtro de jeringa de 0,2 µm (Millique, EE. UU.). Se extrajeron alícuotas de extractos acuosos estériles en tubos criogénicos Grenier® de 2 ml y se conservaron a -40°C (congelador biomédico Sanyo, Japón).¹⁰¹

Se evaluó la actividad antiviral de los extractos de la planta usando el ensayo MTT: se utilizó 2 x 10 células/pocillo se decantó el medio de

crecimiento y se añadieron 100 HI /pocillo de las concentraciones no citotóxicas de los extractos así como interferón y se incubaron durante 24 horas. Se incluyeron varias diluciones de virus distribuidas con 100 HLUwell de control de negativo y controles virales. Las placas se incubaron hasta que la célula mostró el efecto citopático (ECP). Se calcularon los porcentajes de células protegidas en comparación con los alcanzados bajo el efecto del interferón.¹⁰¹

El método MTT medida de OD y la viabilidad celular mostraron que la viabilidad celular se asemeja a la del control (celulas) y no se registraron cambios morfológicos la actividad antiviral de los tres extractos acuosos contra las paperas y el sarampión frente a la actividad del interferón es casi la misma para el romero a 1000, 500, 250 y 125 ug / ml; Salvia a 3000, 1500, 750 y 375 ug / ml y Tomillo a 4500, 2250, 1125 y 560 ug / ml Las diluciones más altas mostraron actividades limitadas comparadas con el interferón para las paperas y el sarampión respectivamente. Los datos registrados mostraron que tres extractos producen una pérdida notable en el título de infectividad del virus en el caso del pretratamiento de la célula Vero con el extracto antes de la infección con el virus de las paperas o el sarampión.¹⁰¹

Al igual que en esta investigación las concentraciones mas altas del extracto de *Mentha spicata* no mostraron actividad antiviral frente al Coxsackievirus B4, el extracto de *Mentha spicata* presenta actividad a menor concentración (0.025 µg /mL), en comparación con los extractos de romero, salvia, tomillo.

En otras investigaciones realizadas por ChoonSeok Oh y Jason Price en el año 2011, informan que la familia de la menta (Lamiaceae) produce una amplia variedad de constituyentes con propiedades medicinales.¹⁰²

Se ha informado que varios miembros de la familia tienen actividad antiviral, incluido el melisa (*Melissa officinalis* L.), salvia (*Salvia* spp.),

menta (*Mentha × piperita* L.), hisopo (*Hyssopus officinalis* L.), albahaca (*Ocimum* spp.) y selfheal (*Prunella vulgaris* L.). Para caracterizar aún más las actividades antientivirales de *Prunella vulgaris*, extractos con agua y etanol fueron probados su capacidad para inhibir la infección por VIH-1.¹⁰²

La extracción de agua: se vertió agua hirviendo libre de endotoxinas sobre *P. vulgaris* en una proporción de 100 ml / 6 g de tejido seco. El material vegetal se remojó, con agitación constante, durante 1 hora y se filtra a través de un círculo de fibra de vidrio G6 (Fisher Scientific) en un embudo Buchner. El filtrado fue centrifugado a 10.000 rpm durante 20 minutos para eliminar cualquier particulados. El extracto fue liofilizado, pesado, y redissuelto en DMSO o endotoxina libre estéril agua. La extracción de etanol: se extrajeron 6 g de *P. vulgaris* seco con 500 ml de etanol al 95% a través de Soxhlet durante 6 horas. El extracto fue filtrado, secado por evaporación rotativa a <math><40\text{ }^\circ\text{C}</math> y luego liofilizado, los extractos fueron resuspendidos en DMSO.¹⁰²

Estudios de preincubación, el extracto (0.1 a 50 μg / mL) se incubó en crecimiento media a 37 $^\circ\text{C}$ con 2×10^4 células / pocillo de células HeLa37 en un formato de 48 pozos durante 1 hora. Al final de la incubación, los medios que contienen el extracto se eliminaron, las células se lavaron con PBS 1x dos veces, y se agregó medios de crecimiento. Aproximadamente 250 partículas infecciosas de VIH-1 se agregaron a las células tratadas resultando en una MOI de 0.012. Las células se fijaron a las 40 horas después de la infección e inmunoteñido como se describió anteriormente.¹⁰²

Estudios de preincubación de extractos/viriones aproximadamente 4×10^4 partículas infecciosas de VIH-1 fueron combinado con extractos (0.3 a 30 μg / mL) e incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos. La mezcla fue diluida 100 veces con medio para reducir las concentraciones de extracto a niveles irrelevantes y se agregó a 2×10^4 células / pocillo de células HeLa37 en formato de 48 pocillos, lo que da como resultado una MOI de 0.02. Las

células se fijaron a las 40 horas siguientes infección e inmunoteñida como se describió anteriormente.¹⁰²

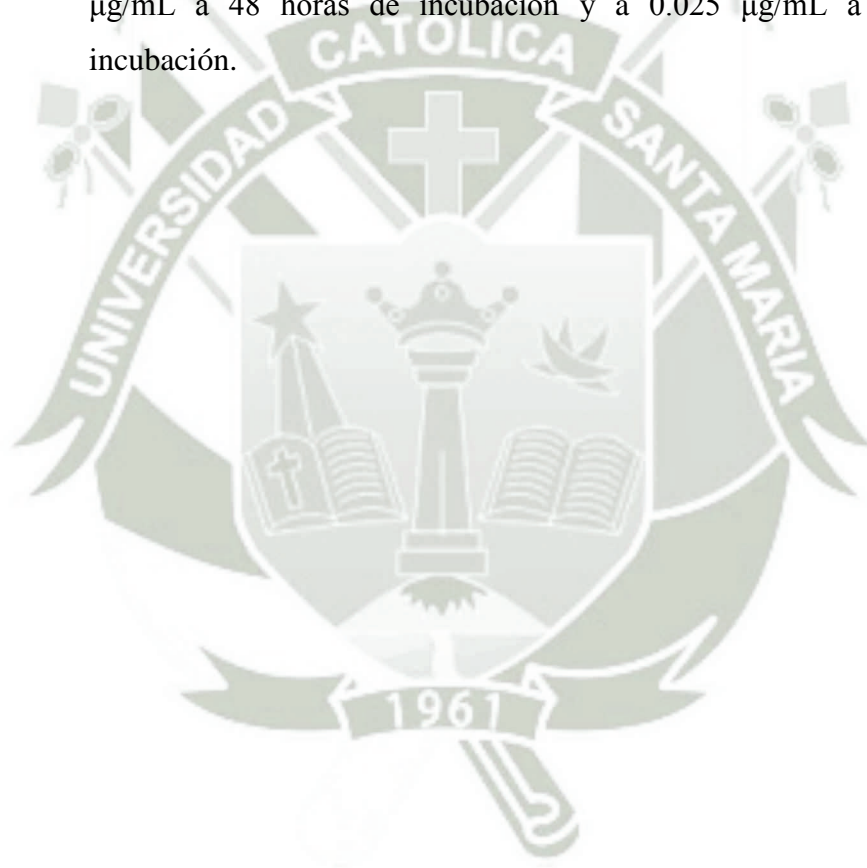
En este estudio ambos extractos de etanol y agua demostraron alguna inhibición, los cuatro extractos de agua contenía significativamente más actividad antiviral que la que sus respectivas contrapartes de etanol. En las concentraciones probadas, todos los extractos tuvieron poca o ninguna citotoxicidad. Inhibió las tres cepas de VIH-1 con concentraciones similares inhibir el 50% de la infectividad del virus ($IC_{50} = \sim 0.8 \mu\text{g} / \text{mL}$). Concentraciones que inhibieron el 90% de infectividad (IC_{90}) varió algo desde alrededor de $3 \mu\text{g} / \text{mL}$ y $11 \mu\text{g} / \text{ml}$.¹⁰²

Lo que nos confirma que la familia Lamiaceae si tiene un efecto antiviral, siendo el extracto acuoso de *Mentha spicata* mas potente que el de *P. vulgaris* ya que a una menor concentración ($0.025 \mu\text{g} / \text{mL}$) presenta un efecto antiviral frente al Cocksackievirus B4. El extracto de *Mentha spicata* no mostro ninguna toxicidad frente a las células Hep-2, indica que la toxicidad de las diferentes especies de la familia Lamiaceae puede variar según la especie.

El extracto acuoso de *Mentha spicata* presento actividad antiviral frente al Cocksackievirus B4, al igual que los extractos acuosos de romero, salvia, tomillo y *P. vulgaris*, al igual que las investigaciones realizadas por Sara I. en el 2014, ChoonSeok Oh y Jason Price en el año 2011 ya descritas, lo que indica que hay un efecto antiviral mas potente de los extractos acuosos que los extractos etanolicos.

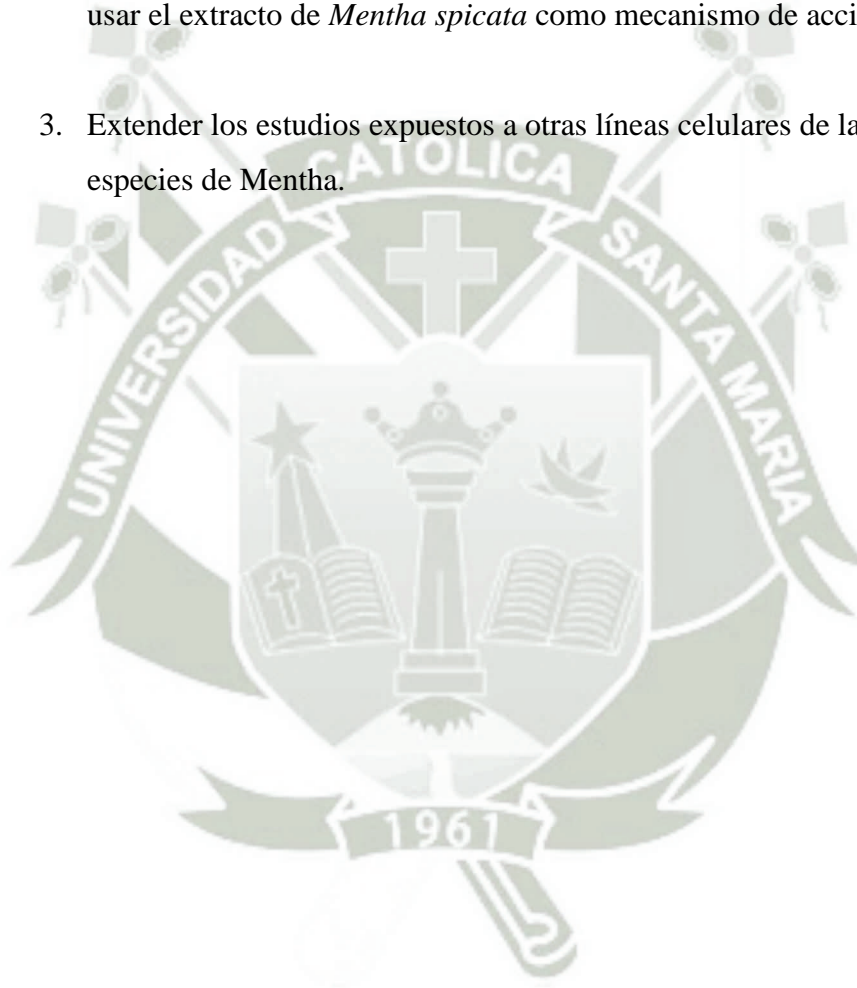
CONCLUSIONES

1. La línea celular Hep-2 permitio inducir el Coxsackievirus B4 mediante las condiciones brindadas.
2. El extracto de *Mentha spicata* no produce toxicidad en células Hep-2.
3. El extracto de *Mentha spicata* produce una significativa disminución de la citotoxicidad que produce el Coxsackievirus B4 ($p < 0.05$) en las células Hep-2 dependiente de la concentración, a partir de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ a 0.0125 $\mu\text{g/mL}$ a 48 horas de incubación y a 0.025 $\mu\text{g/mL}$ a 72 horas de incubación.



SUGERENCIAS

1. Ampliar los estudios expuestos en esta tesis para dilucidar el efecto inhibitorio del extracto de *Mentha spicata* frente al Cocksackievirus B4 en células Hep-2.
2. Analizar con mayor detenimiento y buscar las vías alternativas que podría usar el extracto de *Mentha spicata* como mecanismo de acción.
3. Extender los estudios expuestos a otras líneas celulares de las distintas especies de *Mentha*.



BIBLIOGRAFÍA

1. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*. 2009 Apr; 5(4):219.
2. Hober D, Sauter P. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nature Reviews Endocrinology*. 2010 May; 6(5):279.
3. Jaidane H, Hober D. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes & metabolism*. 2008 Dec 1; 34(6):537-48.
4. Tauriainen S, Oikarinen S, Oikarinen M, Hyöty H. Enteroviruses in the pathogenesis of type 1 diabetes. In *Seminars in immunopathology* 2011 Jan 1 (Vol. 33, No. 1, pp. 45-55). Springer-Verlag.
5. Yeung WC, Rawlinson WD, Craig ME. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *Bmj*. 2011 Feb 3; 342:d35.
6. Hober D, Sauter P. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nature Reviews Endocrinology*. 2010 May; 6(5):279.
7. Jaïdane H, Sauter P, Sane F, Goffard A, Gharbi J, Hober D. Enteroviruses and type 1 diabetes: towards a better understanding of the relationship. *Reviews in medical virology*. 2010 Sep 1; 20(5):265-80.
8. Gamble DR, Kinsley ML, FitzGerald MG, Bolton R, Taylor KW. Viral antibodies in diabetes mellitus. *Br Med J*. 1969 Sep 13; 3(5671):627-30.
9. Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. Virus-induced diabetes mellitus: isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *New England Journal of Medicine*. 1979 May 24; 300(21):1173-9.
10. Hayes Dorado JP. Diabetes mellitus tipo 1. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*. 2008 Jun; 47(2):90-6.
11. Notkins AL. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Nov 15; 277(46):43545-8.
12. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte RO, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group*. *Diabetes care*. 2000 Oct 1; 23(10):1516-26.
13. Jaïdane H, Sauter P, Sane F, Goffard A, Gharbi J, Hober D. Enteroviruses and type 1 diabetes: towards a better understanding of the relationship. *Reviews in medical virology*. 2010 Sep 1; 20(5):265-80.
14. Redondo MJ, Rewers M, Yu L, Garg S, Pilcher CC, Elliott RB, Eisenbarth GS. Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes: prospective twin study. *Bmj*. 1999 Mar 13; 318(7185):698-702.

15. Wilson GL, LeDoux SP. The role of chemicals in the etiology of diabetes mellitus. *Toxicologic pathology*. 1989 Feb; 17(2):357-63.
16. Yoon JW. A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 1995 Jul 1; 11(2):83-107.
17. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*. 2006 Nov 28; 3(11):e442.
18. da Rocha Fernandes J, Ogurtsova K, Linnenkamp U, Guariguata L, Seuring T, Zhang P, Cavan D, Makaroff LE. IDF Diabetes Atlas estimates of 2014 global health expenditures on diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2016 Jul 1; 117:48-54.
19. del Carpio Ancaya L. Situación de la mortalidad materna en el Perú, 2000-2012. *Revista peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2013 Jul; 30(3):461-4.
20. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte RO, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes care*. 2000 Oct 1; 23(10):1516-26.
21. Hayes Dorado JP. Diabetes mellitus tipo 1. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*. 2008 Jun; 47(2):90-6.
22. Redondo MJ, Rewers M, Yu L, Garg S, Pilcher CC, Elliott RB, Eisenbarth GS. Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes: prospective twin study. *Bmj*. 1999 Mar 13; 318(7185):698-702.
23. Wilson GL, LeDoux SP. The role of chemicals in the etiology of diabetes mellitus. *Toxicologic pathology*. 1989 Feb; 17(2):357-63.
24. Kostraba JN, Cruickshanks KJ, Lawler-Heavner J, Jobim LF, Rewers MJ, Gay EC, Chase HP, Klingensmith G, Hamman RF. Early exposure to cow's milk and solid foods in infancy, genetic predisposition, and risk of IDDM. *Diabetes*. 1993 Feb 1; 42(2):288-95.
25. Hyöty H, Taylor K. The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia*. 2002 Oct 1; 45(10):1353-61.
26. Jaidane H, Hober D. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes & metabolism*. 2008 Dec 1; 34(6):537-48.
27. Haverkos HW, Battula N, Drotman DP, Rennert OM. Enteroviruses and type 1 diabetes mellitus. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2003 Nov 1; 57(9):379-85.
28. Hober D, Sane F. Enteroviral pathogenesis of type 1 diabetes. *Discovery medicine*. 2010 Aug 27; 10(51):151-60.
29. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press; 2005 Jul 15.
30. Linden LV, Wolthers KC, van Kuppeveld FJ. Replication and inhibitors of enteroviruses and parechoviruses. *Viruses*. 2015 Aug 10; 7(8):4529-62.

31. Sané F, Mounna I, Hober D. Group B coxsackieviruses and autoimmunity: focus on Type 1 diabetes. *Expert review of clinical immunology*. 2011 May 1; 7(3):357-66.
32. Viskari H, Ludvigsson J, Uibo R, Salur L, Marciulionyte D, Hermann R, Soltesz G, Füchtenbusch M, Ziegler AG, Kondrashova A, Romanov A. Relationship between the incidence of type 1 diabetes and enterovirus infections in different European populations: results from the EPIVIR project. *Journal of medical virology*. 2004 Apr 1; 72(4):610-7.
33. Haverkos HW, Battula N, Drotman DP, Rennert OM. Enteroviruses and type 1 diabetes mellitus. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2003 Nov 1; 57(9):379-85.
34. Helfand RF, Gary Jr HE, Freeman CY, Anderson LJ, Pittsburgh Diabetes Research Group, Pallansch MA. Serologic evidence of an association between enteroviruses and the onset of type 1 diabetes mellitus. *Journal of Infectious Diseases*. 1995 Nov 1; 172(5):1206-11.
35. Elfaitouri A, Berg AK, Frisk G, Yin H, Tuvemo T, Blomberg J. Recent enterovirus infection in type 1 diabetes: evidence with a novel IgM method. *Journal of medical virology*. 2007 Dec 1; 79(12):1861-7.
36. Nairn C, Galbraith DN, Taylor KW, Clements GB. Enterovirus variants in the serum of children at the onset of type 1 diabetes mellitus. *Diabetic medicine*. 1999 Jun 1; 16(6):509-13.
37. Maha MM, Ali MA, Abdel-Rehim SE, Abu-Shady EA, El-Naggar BM, Maha YZ. The role of coxsackieviruses infection in the children of insulin dependent diabetes mellitus. *The Journal of the Egyptian Public Health Association*. 2003; 78(3-4):305-18.
38. Moya-Suri V, Schlosser M, Zimmermann K, Rjasanowski I, Gürtler L, Mentel R. Enterovirus RNA sequences in sera of schoolchildren in the general population and their association with type 1-diabetes-associated autoantibodies. *Journal of medical microbiology*. 2005 Sep 1; 54(9):879-83.
39. Chehadeh W, Weill J, Vantghem MC, Alm G, Lefèbvre J, Wattré P, Hober D. Increased level of interferon- α in blood of patients with insulin-dependent diabetes mellitus: relationship with coxsackievirus B infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2000 Jun 1; 181(6):1929-39.
40. Ylipaasto P, Klingel K, Lindberg AM, Otonkoski T, Kandolf R, Hovi T, Roivainen M. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia*. 2004 Feb 1; 47(2):225-39.
41. Elliott AC, Rappuoli R, Roep BO, Marchetti P, Dionisi S, Mosca F, Boggi U, Muda AO, Del Prato S, Dotta JF, Censini S. Coxsackie B4 virus infection of {beta} cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset.
42. Peng H, Hagopian W. Environmental factors in the development of Type 1 diabetes. *Reviews in endocrine and metabolic disorders*. 2006 Sep 1; 7(3):149-62.
43. Hyöty H, Hiltunen M, Knip M, Laakkonen M, Vähäsalo P, Karjalainen J, Koskela P, Roivainen M, Leinikki P, Hovi T, Åkerblom HK. A prospective

- study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes*. 1995 Jun 1; 44(6):652-7.
44. Jaidane H, Hober D. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes & metabolism*. 2008 Dec 1; 34(6):537-48.
 45. Lönnrot M, Salminen K, Knip M, Savola K, Kulmala P, Leinikki P, Hyypiä T, Åkerblom HK, Hyöty H. Enterovirus RNA in serum is a risk factor for beta-cell autoimmunity and clinical type 1 diabetes: A prospective study. *Journal of medical virology*. 2000 Jun; 61(2):214-20.
 46. Kupila A, Muona P, Simell T, Arvilommi P, Savolainen H, Hämäläinen AM, Korhonen S, Kimpimäki T, Sjöroos M, Ilonen J, Knip M. Feasibility of genetic and immunological prediction of type I diabetes in a population-based birth cohort. *Diabetologia*. 2001 Mar 1; 44(3):290-7.
 47. Lönnrot M, Korpela K, Knip M, Ilonen J, Simell O, Korhonen S, Savola K, Muona P, Simell T, Koskela P, Hyöty H. Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetes*. 2000 Aug 1; 49(8):1314-8.
 48. Sadeharju K, Lönnrot M, Kimpimäki T, Savola K, Erkkilä S, Kalliokoski T, Savolainen P, Koskela P, Ilonen J, Simell O, Knip M. Enterovirus antibody levels during the first two years of life in prediabetic autoantibody-positive children. *Diabetologia*. 2001 Jul 1; 44(7):818-23.
 49. Sadeharju K, Hämäläinen AM, Knip M, Lönnrot M, Koskela P, Virtanen SM, Ilonen J, Åkerblom HK, Hyöty H, Finnish TRIGR Study Group. Enterovirus infections as a risk factor for type I diabetes: virus analyses in a dietary intervention trial. *Clinical & Experimental Immunology*. 2003 May; 132(2):271-7.
 50. Haverkos HW, Battula N, Drotman DP, Rennert OM. Enteroviruses and type 1 diabetes mellitus. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2003 Nov 1; 57(9):379-85.
 51. TEDDY Study Group. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) study: study design. *Pediatric diabetes*. 2007 Oct; 8(5):286-98.
 52. See DM, Tilles JG. Pathogenesis of virus-induced diabetes in mice. *Journal of infectious diseases*. 1995 May 1; 171(5):1131-8.
 53. Yoon JW, Onodera T, Notkins AL. Virus-induced diabetes mellitus. XV. Beta cell damage and insulin-dependent hyperglycemia in mice infected with coxsackie virus B4. *Journal of Experimental Medicine*. 1978 Oct 1; 148(4):1068-80.
 54. Ylipaasto P, Klingel K, Lindberg AM, Otonkoski T, Kandolf R, Hovi T, Roivainen M. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia*. 2004 Feb 1; 47(2):225-39.
 55. Elliott AC, Rappuoli R, Roep BO, Marchetti P, Dionisi S, Mosca F, Boggi U, Muda AO, Del Prato S, Dotta JF, Censini S. Coxsackie B4 virus infection of {beta} cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset.

56. Jaidane, H., and D. Hober. "Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes." *Diabetes & metabolism* 34.6 (2008): 537-548.
57. Oldstone MB, Nerenberg M, Southern P, Price J, Lewicki H. Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell*. 1991 Apr 19; 65(2):319-31.
58. Vreugdenhil GR, Geluk A, Ottenhoff TH, Melchers WJ, Roep BO, Galama JM. Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule. *Diabetologia*. 1998 Jan 1; 41(1):40-6.
59. Lönnrot M, Hyöty H, Knip M, Roivainen M, Kulmala P, Leinikki P, Åkerblom HK, Childhood Diabetes in Finland Study group. Antibody cross-reactivity induced by the homologous regions in glutamic acid decarboxylase (GAD65) and 2C protein of coxsackievirus B4. *Clinical & Experimental Immunology*. 1996 Jun; 104(3):398-405.
60. Schloot NC, Willemen SJ, Duinkerken G, Drijfhout JW, De Vries RR, Roep BO. Molecular mimicry in type 1 diabetes mellitus revisited: T-cell clones to GAD65 peptides with sequence homology to Coxsackie or proinsulin peptides do not crossreact with homologous counterpart. *Human immunology*. 2001 Apr 1; 62(4):299-309.
61. Vreugdenhil GR, Batstra MR, Aanstoot HJ, Melchers WJ, Galama JM. Analysis of antibody responses against coxsackie virus B4 protein 2C and the diabetes autoantigen GAD65. *Journal of medical virology*. 1999 Oct; 59(2):256-61.
62. Marttila J, Juhela S, Vaarala O, Hyöty H, Roivainen M, Hinkkanen A, Vilja P, Simell O, Ilonen J. Responses of coxsackievirus B4-specific T-cell lines to 2C protein—characterization of epitopes with special reference to the GAD65 homology region. *Virology*. 2001 May 25; 284(1):131-41.
63. Tian J, Lehmann PV, Kaufman DL. T cell cross-reactivity between coxsackievirus and glutamate decarboxylase is associated with a murine diabetes susceptibility allele. *Journal of Experimental Medicine*. 1994 Nov 1; 180(5):1979-84.
64. Härkönen T, Paananen A, Lankinen H, Hovi T, Vaarala O, Roivainen M. Enterovirus infection may induce humoral immune response reacting with islet cell autoantigens in humans. *Journal of medical virology*. 2003 Mar 1; 69(3):426-40.
65. Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvennick N. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nature medicine*. 1998 Jul; 4(7):781.
66. Serreze DV, Ottendorfer EW, Ellis TM, Gauntt CJ, Atkinson MA. Acceleration of type 1 diabetes by a coxsackievirus infection requires a preexisting critical mass of autoreactive T-cells in pancreatic islets. *Diabetes*. 2000 May 1; 49(5):708-11.

67. Horwitz MS, Fine C, Ilic A, Sarvetnick N. Requirements for viral-mediated autoimmune diabetes: β -cell damage and immune infiltration. *Journal of autoimmunity*. 2001 May 1; 16(3):211-7.
68. Horwitz MS, Ilic A, Fine C, Rodriguez E, Sarvetnick N. Presented antigen from damaged pancreatic β cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 2002 Jan 1; 109(1):79-87.
69. Horwitz MS, Sarvetnick N. Viruses, host responses, and autoimmunity. *Immunological reviews*. 1999 Jun 1; 169(1):241-53.
70. Merkler D, Horvath E, Bruck W, Zinkernagel RM, del la Torre JC, Pinschewer DD. "Viral déjà vu" elicits organ-specific immune disease independent of reactivity to self. *The Journal of clinical investigation*. 2006 May 1; 116(5):1254-63.
71. Yin H, Berg AK, Westman J, Hellerström C, Frisk G. Complete nucleotide sequence of a Coxsackievirus B-4 strain capable of establishing persistent infection in human pancreatic islet cells: Effects on insulin release, proinsulin synthesis, and cell morphology. *Journal of medical virology*. 2002 Dec 1; 68(4):544-57.
72. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2010 Jan; 33(Suppl 1):S62.
73. Calliari LE, Monte O. Abordagem do diabetes melito na primeira infância. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008; 52(2):243-9.
74. Siguero JP, Gea IL. Insulina aspart en población pediátrica. *Avances en Diabetología*. 2012 Jun 1; 28:22-6.
75. Dejkhamron P, Menon RK, Sperling MA. Childhood diabetes mellitus: Recent advances & future prospects. *Indian Journal of Medical Research*. 2007 Mar 1; 125(3):231.
76. Danne T, Becker D. Paediatric diabetes: achieving practical, effective insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes. *Acta Paediatrica*. 2007 Nov 1; 96(11):1560-70.
77. Øverby NC, Margeirsdottir HD, Brunborg C, Andersen LF, Dahl-Jørgensen K. The influence of dietary intake and meal pattern on blood glucose control in children and adolescents using intensive insulin treatment. *Diabetologia*. 2007 Oct 1; 50(10):2044-51.
78. Steck AK, Klingensmith GJ, Fiallo-Scharer R. Recent advances in insulin treatment of children. *Pediatric diabetes*. 2007 Oct 1; 8(s6):49-56.
79. Goykhman S, Drincic A, Desmangles JC, Rendell M. Insulin Glargine: a review 8 years after its introduction. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2009 Mar 1; 10(4):705-18.
80. Van den Driessche A, Eenkhoorn V, Van Gaal L, De Block C. Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review. *Neth J Med*. 2009 Dec 1; 67(11):376-87.
81. Rabbone I, Bobbio A, Di Gianni V, Sacchetti C, Cerutti F. Intensive insulin therapy in preschool-aged diabetic children: from multiple daily injections to

- continuous subcutaneous insulin infusion through indwelling catheters. *Journal of endocrinological investigation*. 2008 Mar 1; 31(3):RC193-5.
82. Jakisch BI, Wagner VM, Heidtmann B, Lepler R, Holterhus PM, Kapellen TM, Vogel C, Rosenbauer J, Holl RW, German/Austrian DPV Initiative and the Working Group for Paediatric Pump Therapy. Comparison of continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) and multiple daily injections (MDI) in paediatric Type 1 diabetes: a multicentre matched-pair cohort analysis over 3 years. *Diabetic Medicine*. 2008 Jan; 25(1):80-5.
83. Wiegand S, Raile K, Reinehr T, Hofer S, Näke A, Rabl W, Holl RW, DPV-Wiss Study Group. Daily insulin requirement of children and adolescents with type 1 diabetes: effect of age, gender, body mass index and mode of therapy. *European journal of endocrinology*. 2008 Apr 1; 158(4):543-9.
84. Gallego PH, Wiltshire E, Donaghue KC. Identifying children at particular risk of long-term diabetes complications. *Pediatric diabetes*. 2007 Oct 1; 8(s6):40-8.
85. Danne T, Becker D. Paediatric diabetes: achieving practical, effective insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes. *Acta Paediatrica*. 2007 Nov 1; 96(11):1560-70.
86. El-Awady SI, Essam T, Hashem A, Boseila AA, Mohammed AF. Assessment of Antiviral Activity for Lamiaceae Family Members Against Rna and Dna Virus Models Using Cell-Culture: in Vitro Study. *World Journal of Medical Sciences*. 2014; 11(1):111-9.
87. Curazi M, Ivan B. Actividad antibacteriana de aceite esencial de *Mentha spicata* L. sobre flora mixta salival.
88. Salvá Mamani ED. Estabilidad oxidativa y microbiológica de un embutido cocido de vísceras rojas de *Cavia porcellus* con extracto etanólico de *Mentha spicata*.
89. Orío L, Cravotto G, Binello A, Pignata G, Nicola S, Chemat F. Hydrodistillation and in situ microwave-generated hydrodistillation of fresh and dried mint leaves: a comparison study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012 Dec 1; 92(15):3085-90.
90. Salvá Mamani ED. Estabilidad oxidativa y microbiológica de un embutido cocido de vísceras rojas de *Cavia porcellus* con extracto etanólico de *Mentha spicata*.
91. McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy research*. 2006 Aug 1; 20(8):619-33.
92. Stephenson AP, Schneider JA, Nelson BC, Atha DH, Jain A, Soliman KF, Aschner M, Mazzió E, Reams RR. Manganese-induced oxidative DNA damage in neuronal SH-SY5Y cells: attenuation of thymine base lesions by glutathione and N-acetylcysteine. *Toxicology letters*. 2013 Apr 26; 218(3):299-307.
93. Hirst RA, Lambert DG. Adenylyl cyclase in SH-SY5Y human neuroblastoma cells is regulated by intra-and extracellular calcium. *Biochemical pharmacology*. 1995 May 26; 49(11):1633-40.

94. Chetty CS, Vemuri MC, Campbell K, Suresh C. Lead-induced cell death of human neuroblastoma cells involves GSH deprivation. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2005 Jan 1; 10(3):413.
95. El Kfoury KA, Romond MB, Scuotto A, Alidjinou EK, Dabboussi F, Hamze M, Engelmann I, Sane F, Hober D. Bifidobacteria-derived lipoproteins inhibit infection with coxsackievirus B4 in vitro. *International journal of antimicrobial agents*. 2017 Aug 1; 50(2):177-85.
96. Bautista E, Vergara P, Segovia J. Iron-induced oxidative stress activates AKT and ERK1/2 and decreases Dyrk1B and PRMT1 in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2016 Mar 1; 34:62-9.
97. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*. 2001 May: A3-B.
98. Rounbehler RJ, Li W, Hall MA, Yang C, Fallahi M, Cleveland JL. Targeting ornithine decarboxylase impairs development of MYCN-amplified neuroblastoma. *Cancer research*. 2009 Jan 15; 69(2):547-53.
99. Polet F, Corbet C, Pinto A, Rubio LI, Martherus R, Bol V, Drozak X, Grégoire V, Riant O, Feron O. Reducing the serine availability complements the inhibition of the glutamine metabolism to block leukemia cell growth. *Oncotarget*. 2016 Jan 12;7(2):1765.
100. Kang JH, Lee YY, Yu BY, Yang BS, Cho KH, Yoon DK, Roh YK. Adiponectin induces growth arrest and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cell. *Archives of pharmacal research*. 2005 Nov 1;28(11):1263-9.
101. El-Awady SI, Essam T, Hashem A, Boseila AA, Mohmmed AF. Assessment of Antiviral Activity for Lamiaceae Family Members Against RNA and DNA Virus Models Using Cell-Culture: in Vitro Study. *World Journal of Medical Sciences*. 2014;11(1):111-9.
102. Oh C, Price J, Brindley MA, Widrlechner MP, Qu L, McCoy JA, Murphy P, Hauck C, Maury W. Inhibition of HIV-1 infection by aqueous extracts of *Prunella vulgaris* L. *Virology journal*. 2011 Dec;8(1):188.



ANEXOS



Anexo 1

Resumen de absorbancias del análisis del efecto citotóxico del extracto acuoso de *Mentha spicata* en células Hep-2

Mentha [$\mu\text{g/mL}$]		CN	CN	CN	Mentha + CvB4 / Hep-2			Mentha + CvB4 / Hep-2			Mentha + CvB4 / Hep-2		
1.6	A	2.723	2.189	2.802	2.004	2.231	2.214	2.336	2.888	2.831	2.718	3.152	3.122
0.8	B				1.979	1.979	2.158	2.802	2.990	2.717	2.919	2.998	2.635
0.4	C	3.558	3.011	2.904	1.941	2.055	1.886	2.947	2.904	2.918	3.071	3.073	3.094
0.2	D				2.173	1.949	2.059	3.127	2.877	2.803	2.290	2.290	2.290
0.1	E	2.966	3.045	2.985	1.971	2.266	2.193	2.864	2.878	3.021	2.966	2.966	2.949
0.05	F				1.880	2.005	1.861	2.500	3.023	2.988	2.522	2.031	2.191
	G												
C+	H	1.489	2.060	1.703	1.489	0.824	0.774	0.660	0.584	0.767	0.605	1.043	0.497

24h

48h

72h

CN = Hep-2 + MEM

C+ = Hep-2+ CvB4

Mentha R1[$\mu\text{g/mL}$]		CN			Mentha R1+CvB4 / Hep-2			Mentha R1+CvB4 / Hep-2			Mentha R1+CvB4 / Hep-2		
0.025	A	2.723	2.189	2.802	2.256	2.205	2.215	1.919	3.055	2.936	2.218	2.256	2.067
0.0125	B				1.998	1.440	2.345	2.953	3.067	3.016	2.998	2.998	2.998
0.00625	C	3.558	3.011	2.904	2.228	2.419	2.165	2.931	3.017	3.046	2.992	3.117	2.093
0.003125	D				2.184	2.401	2.084	3.302	3.302	3.019	3.010	2.962	2.678
	E	2.966	3.045	2.985									
	F												
	G												
C+	H	1.489	2.060	1.703	1.489	0.824	0.774	0.660	0.584	0.767	0.605	1.043	0.497

24h

48h

72h

CN = Hep-2 + MEM
C+ = Hep-2+ CvB4

Anexo 2

Resumen de absorbancias del análisis del efecto citotóxico del Coxsackievirus B4 frente al extracto acuoso de *Mentha spicata* en células Hep-2 (primer ensayo)

Mentha R1[$\mu\text{g/mL}$]		CN	CN	CN	Mentha R1+CvB4 / Hep-2			Mentha R1+CvB4 / Hep-2			Mentha R1+CvB4 / Hep-2		
1.6	A	1.386	1.248	1.185	1.644	1.699	1.601	0.852	0.939	0.819	0.590	0.322	0.451
0.8	B				1.726	1.776	1.645	0.944	0.739	0.947	0.397	0.372	0.344
0.4	C	2.098	2.530	2.300	1.650	1.287	1.627	1.109	0.956	0.762	0.530	0.358	0.674
0.2	D				1.646	1.654	1.700	0.931	0.871	0.831	0.521	0.532	0.774
0.1	E	2.808	2.913	2.773	1.724	1.764	1.620	1.238	0.952	0.983	0.388	1.070	1.227
0.05	F				1.883	1.816	1.759	1.399	1.359	1.289	0.897	0.705	0.493
	G												
C+	H	1.547	1.558	1.585	1.457	0.575	0.582	0.729	0.584	0.440	0.419	0.451	0.497

24h

48h

72h

CN = Hep-2 + MEM

C+ = Hep-2+ CvB4

Mentha R1[$\mu\text{g/mL}$]		CN			Mentha R1+CvB4 / Hep-2			Mentha R1+CvB4 / Hep-2			Mentha R1+CvB4 / Hep-2		
0.025	A	1.386	1.248	1.185	1.769	1.828	1.847	1.832	1.903	1.985	0.907	1.062	1.265
0.0125	B				1.892	1.860	1.863	1.890	1.790	1.699	0.337	0.555	0.679
0.00625	C	2.098	2.530	2.300	2.021	2.050	1.898	0.869	1.004	0.406	0.342	0.393	0.526
0.003125	D				1.895	1.949	1.867	0.959	1.315	0.717	0.338	0.771	0.982
	E	2.808	2.913	2.773									
	F												
	G												
C+	H	1.547	1.558	1.585	1.457	0.575	0.582	0.729	0.584	0.440	0.419	0.451	0.497

24h

48h

72h

CN = Hep-2 + MEM
C+ = Hep-2+ CvB4

Anexo 3

Resumen de absorbancias del análisis del efecto citotóxico del Coxsackievirus B4 frente al extracto acuoso de *Mentha spicata* en células Hep-2 (segundo ensayo)

Mentha R2[$\mu\text{g/mL}$]		CN			Mentha R2+CvB4 / Hep-2			Mentha R2+CvB4 / Hep-2			Mentha R2+CvB4 / Hep-2		
1.6	A	1.890	1.814	1.846	1.856	1.814	1.698	0.500	0.450	0.817	0.893	0.651	0.620
0.8	B				1.599	1.439	1.424	0.541	0.728	0.551	0.782	0.742	0.651
0.4	C	2.173	2.770	2.966	1.740	1.649	1.602	0.472	0.430	0.579	0.567	0.512	0.327
0.2	D				1.764	1.856	1.879	0.739	0.568	0.541	0.306	0.572	0.501
0.1	E	2.900	3.159	2.890	1.900	1.850	1.875	1.248	1.507	1.370	0.721	0.569	0.812
0.05	F				1.892	1.852	1.943	1.760	1.768	1.903	0.456	0.540	0.499
	G												
C+	H	1.543	1.506	1.977	1.457	0.765	0.701	0.794	0.584	0.392	0.566	0.327	0.497

24h

48h

72h

CN = Hep-2 + MEM

C+ = Hep-2+ CvB4

Mentha R2[$\mu\text{g/mL}$]		CN			Mentha R2+CvB4 / Hep-2			Mentha R2+CvB4 / Hep-2			Mentha R2+CvB4 / Hep-2		
0.025	A	1.890	1.814	1.846	1.960	1.850	1.960	1.985	1.978	1.686	1.100	0.978	1.217
0.0125	B				1.839	1.800	1.849	1.778	1.849	1.801	0.499	0.438	0.701
0.00625	C	2.173	2.770	2.966	1.853	1.706	1.959	0.934	0.759	0.799	0.243	0.395	0.346
0.003125	D				1.939	1.879	1.959	0.456	0.464	0.298	0.287	0.234	0.301
	E	2.900	3.159	2.890									
	F												
	G												
C+	H	1.543	1.506	1.977	1.457	0.765	0.701	0.794	0.584	0.392	0.566	0.327	0.497

24h

48h

72h

CN = Hep-2 + MEM
C+ = Hep-2+ CvB4

Anexo 4

Resumen de absorbancias del análisis del efecto citotóxico del Coxsackievirus B4 frente al extracto acuoso de *Mentha spicata* en células Hep-2 (tercer ensayo)

Mentha R3[$\mu\text{g/mL}$]		CN	CN	CN	Mentha R3+CvB4 / Hep-2			Mentha R3+CvB4 / Hep-2			Mentha R3+CvB4 / Hep-2		
1.6	A	1.706	1.530	1.743	1.025	1.304	1.335	0.685	0.654	0.632	0.231	0.346	0.329
0.8	B				1.316	1.450	1.446	0.757	0.701	0.644	0.248	0.254	0.357
0.4	C	1.977	1.804	1.808	1.801	1.949	1.841	0.629	0.695	0.743	0.449	0.657	0.507
0.2	D				1.744	1.857	1.937	0.856	0.932	0.745	0.351	0.326	0.362
0.1	E	3.193	2.725	2.673	1.638	1.701	1.649	1.431	1.318	1.366	0.591	0.250	0.428
0.05	F				1.645	1.707	1.798	1.340	1.493	1.191	0.457	0.401	0.359
	G												
C+	H	1.345	1.273	1.309	1.457	0.444	0.627	0.467	0.584	0.687	0.644	0.233	0.687

24h

48h

72h

CN = Hep-2 + MEM

C+ = Hep-2+ CvB4

Mentha R3[$\mu\text{g/mL}$]		CN			Mentha R3+CvB4 / Hep-2			Mentha R3+CvB4 / Hep-2			Mentha R3+CvB4 / Hep-2		
0.025	A	1.706	1.530	1.743	1.655	1.745	1.745	1.489	1.200	1.430	1.026	1.011	0.981
0.0125	B				1.800	1.980	1.978	1.277	1.527	1.420	0.280	0.370	0.366
0.00625	C	1.977	1.804	1.808	1.931	1.732	1.955	0.546	0.578	0.501	0.245	0.284	0.211
0.003125	D				1.875	1.716	1.886	0.657	0.597	0.431	0.228	0.340	0.297
	E	3.193	2.725	2.673									
	F												
	G												
C+	H	1.345	1.273	1.309	1.457	0.444	0.627	0.467	0.584	0.687	0.644	0.233	0.687

24h

48h

72h

CN = Hep-2 + MEM
C+ = Hep-2+ CvB4