

Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotechnología
y Bioingeniería A.C.

Año 2021 Volumen 25, Número 2
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotechnología y Bioingeniería



MESA DIRECTIVA

2020 – 2022

Dr. Jaime Ortega López
Presidente

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Vicepresidenta

Dr. Álvaro R. Lara Rodríguez
Secretario

Dra. Angélica Meneses Acosta
Tesorero

Dra. Beatriz Ruiz Villafán
Subsecretaria

Dr. Gerardo Reséndiz Cardiel
Vocal Profesional

P. Biol. Teresa Elizabeth Martínez Oropeza
Vocal Estudiante

EDITORA

Dra. María Soledad Córdova Aguilar
UNAM

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Silvia Armenta Jaime
Dr. Adelfo Escalante Lozada
Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
Dr. Pablo Gortáres Moyoroqui
Dr. Jorge Gracida
Dr. Daniel Guillén Santos
Dra. Claudia Patricia Larralde Corona
Dra. Itzel López Rosas
Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta
Dr. Jaime Ortega López
Dra. Andrea Sabido Ramos
Dra. Georgina Sandoval
Dra. Elda Patricia Segura Cenicerros
Dra. Isadora Martínez Arellano
Dra. María Eugenia de la Torre
Dra. Virginia Villacruz
Dra. Beatriz Ruiz Villafán

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM), en LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), los artículos se encuentran en Google Académico. Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México. o a la siguiente dirección electrónica revista_biotecnologia@smbb.mx.

Índice

Instrucciones para los autores	4
Editorial	8
Artículos	
Algas extremófilas: estrategias de supervivencia y uso potencial Mayra Anzures, Martha Gaytán y Estela Cuna	9
Estabilidad de la hemaglutinina H5N1 del virus de la Influenza Aviar en semillas de tabaco Yanaysi Ceballo, Alina López, Kenia Tiel, Osmany Ramos, Yamilka Rosabal, Carlos, E. González y Abel Hernández	22
Bioremediation of lead in water by two pure microorganisms and bacteria-yeast consortium Marisol Espinoza-C., Ana Victoria Selene Gómez, María Rita Valladares, Erasmo Flores y María Teresa Castañeda	33
Proceso continuo con reciclaje: cultivos de alta densidad celular María Cristina Rubio y Antonieta Gordillo	47
Current and alternative therapeutic options for Multiple Sclerosis N.N Valdovinos-Knolle y E. García-Vences	55

Instrucciones para los autores

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original, así como de revisión en los campos de la Biotecnología y Bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas en los que se puede publicar en la revista son el español y el inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Para evitar errores innecesarios se recomienda usar el corrector de gramática y ortografía del procesador de palabras. Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, μ l), de peso (kg, g, mg, μ g), ADN, ARN y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde aspectos fundamentales hasta sus aplicaciones, incluyendo: Enzimas y Biocatálisis, Microbiología, Biotecnología Agrícola y Vegetal, Biotecnología Marina, Alimentos y bebidas, Biotecnología farmacéutica, Biotecnología Ambiental, Bioingeniería y fermentaciones, Bioenergía y biocombustibles, Biología de sistemas y bioinformática, Biología sintética, Nanobiotecnología y biomateriales, Ingeniería metabólica, Omicas, Bioseguridad y Bioética.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito se escribirá en negritas con letra Arial o equivalente tamaño 14. El título deberá estar centrado y ser conciso e informativo. Evite el uso de abreviaciones y fórmulas.

Instrucciones para los autores

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño 12. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como la dirección de correo del autor corresponsal. Si el responsable fuera un estudiante, deberá incluir una carta del tutor o director del trabajo autorizándolo.
3. Se deberá añadir un Resumen de no más de 250 palabras en español y el correspondiente Abstract en inglés.
4. Se incluirán entre 3 a 6 Palabras clave: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en español y en inglés (Key words).
5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste de pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño 10. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño 10. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras.
7. Las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto, pero se anexarán en hojas separadas y al igual que las figuras, al final del manuscrito.
8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribirá como sigue: “Gutiérrez et al. (2003), han demostrado...” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado...”

Instrucciones para los autores

Si la cita es una página de Internet, la dirección URL deberá escribirse completa y entre paréntesis directamente en el texto.

9. La lista de Referencias se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) y con sangría francesa de acuerdo con el siguiente formato:

Artículos:

Bayegan AH, Clote P (2020) RNAmountAlign: Efficient software for local, global, semiglobal pairwise and multiple RNA sequence/structure alignment. PLoS ONE 15(1): e0227177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227177>.

Libros:

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

Capítulos de libros:

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Congresos y reuniones:

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solís S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus HL*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Instrucciones para los autores

Sitios en internet:

CAZY, Carbohydrate-Active Enzymes Database. (<http://www.cazy.org/>)

Tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de safranal. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos se someten en línea en la página electrónica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología, en la dirección <https://smbb.mx/publicaciones/publicacion-de-articulo/>. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor correspondiente. La dirección para mantener comunicación con el editor es: revista_biotecnologia@smbb.mx y marisol.cordova@icat.unam.mx.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC <http://www.smbb.com.mx/>.

Editorial

Los movimientos anti vacunas son tan antiguos como la vacunación. Éstos, muchas veces se debían a superstición, creencias religiosas o ignorancia. Sin embargo, recientemente estos grupos han crecido de tal manera que enfermedades creídas erradicadas han reaparecido. Las razones para resistirse a las vacunas varían entre oponerse a ciertos componentes, la relación con la posible aparición de enfermedades, motivos religiosos, libertad o preferencia de medicina alternativa.

Sean cuales sean las razones de los movimientos anti vacunas, lo cierto es que son grupos muy activos y reivindicativos ya que han logrado bajar los índices de vacunación en algunos países como Estados Unidos. Esta alerta llevó a la Organización Mundial de la Salud a catalogar a dichos grupos como una de las principales amenazas a la salud mundial. Además, se han vuelto importantes no solo por los efectos que tienen sobre la salud pública, sino por el efecto que tienen sobre la economía. Los individuos sanos contribuyen al crecimiento económico por lo que la vacunación tiene el potencial de contribuir sustancialmente a mejorar la salud de la población y, por lo tanto, el crecimiento económico. Otro gran obstáculo, principalmente hoy en día y en especial para la vacunación contra la COVID-19, es la desinformación. Actualmente existe mucha información y proliferan los mitos inexactos sobre las vacunas que se difunden a través de diversos canales y redes sociales, provocando miedo en la población. Nos corresponde a nosotros como miembros de la SMBB, asociación científica y profesional con personas preparadas, coadyuvar en las campañas de vacunación y buscar informar veraz y certeramente. Nuestro papel es ayudar a desterrar las dudas sobre la seguridad y eficacia de las vacunas así como promover la inmunización y transmitir información honesta, veraz y comprobable.

Es así como en el marco de la décima novena edición del Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, se tiene a la COVID-19 como una de las quince áreas temáticas y se invitó a la Prof. María Elena Bottazzi, de Baylor College of Medicine con la conferencia inaugural: *Innovaciones para el fortalecimiento del desarrollo de vacunas en el mundo, aprovechando las lecciones de COVID-19* y al Prof. Peter Hotez, también de Baylor College of Medicine, con la conferencia: *Preventing the next pandemic: Vaccine Diplomacy in a Time of Anti-Science*. Ambos invitados de reconocido prestigio internacional.

El Comité Organizador ha propuesto un ambicioso programa para esta emisión virtual del Congreso, con el objetivo de propiciar el debate crítico sobre las nuevas tendencias y avances en todas las áreas de la biotecnología y la bioingeniería en México y a nivel internacional. El programa consiste en quince conferencias magistrales, quince simposios, varias charlas técnicas, además de las sesiones de trabajos libres, que en esta ocasión serán presentadas en forma de ePosters. Destacan en esta edición varias áreas temáticas nuevas con invitados de gran prestigio internacional y nacional. Los invitamos a visitar el portal electrónico de la SMBB y sus redes sociales para conocer la información actualizada y el programa del evento. ¡Nos vemos del 27 de septiembre al 1° de octubre de este año!

Dra. María Soledad Córdova Aguilar
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología-UNAM
marisol.cordova@icat.unam.mx

Algas extremófilas: estrategias de supervivencia y uso potencial

Mayra Anzures*, Martha Gaytán y Estela Cuna.

División de Investigación. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. de los Barrios No.1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Edo. Mex. C.P. 54090.

mayanz268@gmail.com

Resumen

Esta investigación recopila la información bibliográfica sobre las estrategias de supervivencia que han llevado a tener éxito ecológico a las algas y cianoprocariontes extremófilas, con la finalidad de aportar al conocimiento y aprovechamiento de estos organismos. Se realizó una síntesis de cada estrategia documentada para los valores extremos de los siguientes factores ambientales: temperatura, pH, salinidad, luz y nutrientes. Se enlistaron los principales taxones extremófilos reportados en la bibliografía consultada y se incluyó información sobre los posibles usos médicos y biotecnológicos de las moléculas orgánicas producto de sus estrategias de supervivencia, si había información disponible. Las algas termófilas y psicrófilas presentan adaptaciones de supervivencia a estos ambientes extremos principalmente a nivel membrana y enzimas. Las alcalófilas, acidófilas y halófilas presentan modificaciones a nivel membrana y estructuras celulares, así como mecanismos para las deficiencias en estos ambientes (presencia de sideróforos, mecanismo para la captación de CO₂ para las acidófilas y síntesis de soluto compatible en las halófilas). Las que habitan en ambientes de irradiación extrema modifican la cantidad de carotenos para protegerse del daño oxidativo en alta luminosidad o aumentan la cantidad de clorofila, ficocianina y ficoeritrina para eficientizar la captación de luz, cuando escasea la misma. La presencia de estructuras especializadas (gránulos de cianoficinas, polifosfato y carboxisomas), permite su almacenamiento cuando existe exceso de nutrientes. Cuando hay escasez de ellos, se activan vías metabólicas alternas para almacenar alimentos. Las enzimas presentes en los extremófilos se usan en la industria productora de detergentes, la alimentaria, la textil, la peletera, la papelería y la farmacéutica, en tanto que sus moléculas orgánicas (pigmentos, antioxidantes, vitaminas, proteínas, alcaloides, etc) se utilizan profusamente en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. La capacidad de almacenar nutrientes y la producción de agentes quelantes son utilizados para procesos de bio-remediación. Los usos potenciales (generación de hidrógeno y biodiesel, degradación de plásticos, etc) son muy diversos.

Palabras clave: Algas extremófilas, cianoprocariontes, estrategias de supervivencia, biotecnología.

Abstract

This research compiles the bibliographic information on the survival strategies that have led to the ecological success of the extremophilic algae and cyanoprokaryotes, in order to contribute to the knowledge and use of these organisms. A synthesis of each documented strategy was made for the extreme values of the following environmental factors: temperature, pH, salinity, light, and nutrients. The main extremophilic taxa reported in the consulted bibliography were listed and information on the possible medical and biotechnological uses of organic molecules because of their survival strategies was included if information was available. Thermophilic and psychrophilic algae show survival adaptations to these extreme environments, mainly at the membrane and enzyme levels. Alkalophilic, acidophilic and halophilic have modifications at the membrane level and cellular structures, as well as mechanisms for deficiencies in these environments (presence of siderophores, mechanism for CO₂ uptake for acidophilic plants and synthesis of compatible solute in halophiles). Those that live in

environments of extreme irradiance modify the number of carotenes to protect themselves from oxidative damage in high light or increase the amount of chlorophyll, phycocyanin and phycoerythrin to make light capture more efficient, when it is scarce. The presence of specialized structures (cyanoficin granules, polyphosphate and carboxysomes) allows their storage when there are excess nutrients. When there is a shortage of them, alternate metabolic pathways are activated to store nutrients. The enzymes present in the extremophiles are used in the detergent, food, textile, fur, paper and pharmaceutical industries, while their organic molecules (pigments, antioxidants, vitamins, proteins, alkaloids, etc.) are They are widely used in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. The ability to store nutrients and the production of chelating agents are used for bio-remediation processes. The potential uses (generation of hydrogen and biodiesel, degradation of plastics, etc.) are very diverse.

Key words: Extremophilic algae, cyanoprokaryotes, survival strategies, biotechnology.

Introducción

Las algas, junto con las cianoprocariotas, son los principales productores primarios en los ecosistemas acuáticos; producen la materia orgánica que ingresa a las cadenas tróficas (Wehr et al., 2015; Sigee, 2005) a través del proceso de fotosíntesis, siendo responsables del 80 % del oxígeno atmosférico (Bravo et al., 2014). Las podemos encontrar también en ambientes terrestres húmedos y en ambientes considerados extremos.

Un ambiente extremo es aquél cuyas condiciones son hostiles para la mayoría de los seres vivos, en ellos encontramos los rangos extremos de los factores ambientales como la temperatura, la desecación, la radiación y la presencia de especies reactivas de oxígeno (Granada, 2010; Rothschild y Mancinelli, 2001), algunas de estas condiciones extremas pueden causar oxidación en los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, ocasionando graves daños a los organismos. Los organismos que sobreviven en estos ambientes extremos, entre ellos algunas algas, son llamados extremófilos, del griego "philos" que significa amante, por lo tanto, son "amantes de lo extremo", es decir, su crecimiento óptimo se da en ambientes que presentan una característica extrema (Hernández, 2012).

Los organismos extremófilos son nombrados dependiendo del o de los parámetros físicos o químicos involucrados, por ejemplo: los termófilos crecen a temperaturas mayores de 55° C, con crecimiento óptimo entre los 55 - 65° C, los

termo-acidófilos crecen a un pH inferior o igual a 4.0 y a temperaturas óptimas igual o mayores a 60° C, los hipertermófilos crecen a temperaturas óptimas igual o mayores a 80° C, etc. (Sigee, 2005; Jaenicke y Sterner, 2006; Ferrera y Louise, 2007).

Es importante diferenciar las algas extremófilas y las algas extremo-tolerantes. Las extremófilas han adaptado sus genotipos y fenotipos para sobrevivir a estas condiciones inusuales y por ello las condiciones no son "extremas" para ellas, por lo que su sobrevivencia depende exclusivamente de la selección sobre la variabilidad genética ya existente. Las extremo-tolerantes, si bien pueden encontrarse en ambientes extremos, están presentes en formas latentes de resistencia (López et al., 2009; Hernández, 2012).

Algunas algas extremófilas son estrictamente dependientes de su entorno y no sobreviven incluso a una corta exposición a condiciones "normales", como las cianoprocariotas del género *Spirulina*, el cual es un taxón alcalófilo cuyas células se lisan cuando se exponen a un pH neutro (Seckbach, 2007).

Las cianoprocariotas generalmente toleran más los ambientes extremos que las algas, por lo que son los microorganismos extremófilos predominantes y en algunos casos, los únicos. Son las responsables de los cambios más drásticos que ha sufrido la evolución de la vida en la tierra y presentan una versatilidad metabólica de sumo interés en biotecnología, agricultura y medio ambiente (Granada, 2010).

Las algas y las cianoprocarotas de los ecosistemas extremos han desarrollado mecanismos (estrategias de supervivencia y adaptación) que les permiten producir una serie de moléculas orgánicas como son: 1) pigmentos naturales -ficocianina, ficoeritrina, carotenoides liposolubles, clorofilas, β carotenos, cantaxantina y astaxantina-; 2) antioxidantes naturales -vitaminas C, E y superoxidismutasa-; 3) ácidos grasos poli-insaturados -EPA, DHA-; 4) proteínas -aminoácidos, proteínas selénicas-; 5) vitaminas; 6) oligoelementos; 7) alcaloides y terpenos, entre otras. Muchas de estas sustancias se emplean en la industria farmacéutica y cosmética, por sus propiedades antiinflamatorias, cicatrizantes, desinfectantes, antifúngicas, antioxidantes, de protección solar, antivirales, nutritivas y antiestrés (Harvey, 2000; Nascimbene et al., 2011). Además, las microalgas son fácilmente cultivables y crecen muy rápido, por lo que proveen una alternativa como fuente de materia prima para la producción masiva de estas sustancias (Freile, 2001).

En general los ambientes extremos han sido poco estudiados y su población microbiológica es poco conocida. Hoy en día estos ambientes han cobrado gran importancia no solo por la necesidad de entender la estructura de las comunidades microbianas que allí habitan, sino por el potencial biotecnológico que representan (Granada, 2010).

En esta investigación se recopila la información bibliográfica sobre las estrategias de supervivencia que han llevado a tener éxito ecológico a las algas y cianoprocarotas extremófilas, así como el uso médico y biotecnológico de las moléculas orgánicas producto de dichas estrategias, con la finalidad de aportar al conocimiento y aprovechamiento de estos organismos. Si bien en las últimas décadas ha aumentado el número de investigaciones sobre estos organismos extremófilos, aún falta información sobre el tema, existiendo especies con alto potencial biotecnológico que han sido poco estudiadas y desaprovechadas.

Material y métodos

Para la realización de este trabajo se recopiló información de distintas fuentes bibliográficas (artículos, tesis, libros especializados y base de datos). Se elaboró una breve síntesis de cada estrategia de

supervivencia documentada en la bibliografía y los datos sobre sus posibles usos médicos y biotecnológicos fueron resumidos en un listado que incluyó a los taxones más estudiados.

Resultados y discusión

Estrategias de supervivencia para cada factor ambiental extremo.

Temperatura

Tiene efecto sobre el crecimiento y la supervivencia de las algas (Seckbach, 2000). A medida que aumenta, se aceleran las reacciones enzimáticas, implicando un desarrollo más rápido del organismo, hasta llegar a una temperatura máxima en la que ciertos componentes celulares se degradan de forma irreversible, el crecimiento cesa y sobreviene la muerte celular (Granada, 2010). A temperaturas bajas se desacelera el metabolismo, sin embargo, el mayor peligro en estos ambientes es el congelamiento y descongelamiento del agua, pues los cristales resultantes pueden romper las membranas (Rothschild y Mancinelli, 2001).

Los organismos termófilos poseen proteínas y enzimas termorresistentes y termo activas (extremoenzimas), su estabilidad térmica es debida principalmente a redes de interacciones iónicas, (Ramírez et al., 2006; Granada, 2010), modificaciones en su membrana plasmática les confiere mayor adaptabilidad (Ramírez et al., 2006).

Estas proteínas termófilas adquieren estabilidad por mecanismos intrínsecos, como son: 1) mayor compactación intramolecular de la proteína, reducción en la relación superficie/volumen; 2) disminución del número y tamaño de las cavidades superficiales; 3) formación de núcleos altamente polares; 4) disminución de glicina para evitar el giro libre de la proteína; 5) optimización de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas; 6) intercambio de aminoácidos para incrementar la hidrofobicidad interna y promover la hélice de los residuos en la alfa hélice y 7) la sustitución de aminoácidos sensibles a cambiar su estructura (cisteína), a desaminarse (asparagina y glutámico) o a sufrir un daño oxidativo, por ejemplo en la metionina. También se incluyen procesos

extrínsecos que implican acumulación de solutos orgánicos como inositol y bifosfoglicerato y algunos iones inorgánicos como potasio y sodio (Suárez et al, 2002).

La membrana celular de las algas termófilas tiene un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados con elevados puntos de fusión, al incrementar la temperatura incrementa la proporción de ácidos grasos insaturados, lo que le confiere una gran flexibilidad y estabilidad térmica (Rubiano, 2006).

Los ácidos grasos pueden ser aprovechados para la generación de energías limpias como biodiesel. Organismos termófilos generan compuestos antimicrobianos y antitumorales a los que se les puede asignar un uso terapéutico. Moléculas extremófilas como DNA-polimerasas, amilasas, xilanasas y proteasas, se usan como enzimas para biología molecular (PCR), en los biosensores, en el procesamiento textil y de papel (Granada, 2010), en prácticas de biorremediación que incluyen remoción de nutrientes, en efluentes termales y el manejo enzimático de lípidos y de afluentes industriales ricos en aceites. Las principales industrias que se han beneficiado con el uso de extremo-enzimas son las productoras de detergentes, la alimentaria, la textil, la papelera y la farmacéutica, dado que las extremo-enzimas son termoestables, generalmente resistentes a la acción de agentes caotrópicos, desnaturalizantes, detergentes y solventes orgánicos (Oliart-Ros et al., 2016, Tabla 1).

En el caso de las algas psicrófilas (que viven en temperaturas por debajo de 15°C) su membrana celular tiene un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados para evitar su congelación, así mantiene su estado fluido, característica que les permite transportar los nutrimentos. Las proteínas muestran disminución en las interacciones iónicas y enlaces del hidrógeno, poseen menos grupos hidrofóbicos y más grupos cargados en su superficie, por lo que pierden su rigidez (Ramírez et al., 2006). Estas algas también recurren a la eliminación del agua intracelular para evitar el rompimiento de membranas por formación de cristales de agua (Rothschild y Mancinelli, 2001).

Las enzimas psicrófilas son catalizadores eficientes por debajo de los

40°C y se asocian a menudo con una alta termo-sensibilidad, no requieren de cofactores, su especificidad por el sustrato es baja con un bajo costo energético. Funcionan en ambientes fríos y en invierno, evitando calentamiento en los procesos y minimizan reacciones indeseables que pueden ocurrir a temperaturas altas. Las lipasas son biocatalizadores empleados en síntesis de polímeros, biopolímeros y biodiesel (Granada, 2010; Hernández, 2012). Las algas psicrófilas contienen astaxantina y ácidos grasos, producen flavonoides que sirven como filtros solares (Seckbach, 2015).

pH

Cada especie necesita un valor de pH que le permita un crecimiento óptimo y 8 es el más indicado para la mayoría de ellas; por encima o debajo del mismo, se presenta un descenso en la productividad. En valores altos de pH las algas se ven afectadas por la reducción del carbono disponible, que tiende a precipitarse como carbonato. Entre las mayores adversidades para la fotosíntesis en pH ácidos es la baja concentración de carbono inorgánico, pues a pH 2 los bicarbonatos se convierten en CO₂ que representa el 99.995 % del carbono y cuya baja disponibilidad (aproximadamente 0.015 mmol L⁻¹), puede ser limitante para el desarrollo algal (Díaz y Maberly, 2009; Pedrozo et al., 2010). Bajo estas condiciones, existe transporte activo que concentra CO₂ en torno de la rubisco (Merino-Moya et al., 2014; Shiraiwa et al., 1992). El aporte de ácido sulfúrico y nítrico a través de la lluvia ácida, la extracción minera o la actividad volcánica acidifican el agua llevándola a valores de pH <4 (Pedrozo et al., 2010), lo que facilita la solubilidad de los cationes metálicos, es especial aluminio y otros metales como Zn, Fe, Cu, Mn (Aguilera, 2013; Edding et al., 2006) originando así, concentraciones tóxicas por la cantidad de protones y metales presentes (Pick, 1998).

Las algas alcalófilas utilizan procesos altamente especializados para sobrevivir ante pH elevados; estos incluyen: 1) La composición de los lípidos en la membrana celular y en la relación lípido / proteína, a menudo asociada con niveles muy altos de componentes de la cadena respiratoria, 2) capacidad de mantener la homeostasis del pH intracelular, 3) posesión de antiportadores

exclusivos de Na^+ / H^+ , 4) presencia de portadores de Na^+ / soluto operados a través de un ciclo de Na^+ , y 5) una composición de aminoácidos generalmente más ácida de las proteínas que se exponen o excretan en el medio externo (Seckbach, 2000).

A pH alcalinos el hierro forma hidróxidos insolubles, provocando su deficiencia. La limitación de este nutriente puede afectar al fitoplancton reduciendo su tasa de divisiones diarias y su biomasa. Por otro lado, los cultivos pobres en hierro también pueden causar que las microalgas sean más sensibles a la foto inhibición. El hierro también es necesario para la síntesis de ferroproteínas, las cuales son esenciales en procesos clave como: fotosíntesis, respiración, asimilación y fijación de nitrógeno (Robles et al., 2007), por lo que las cianoprocaritas han desarrollado sideróforos para la adquisición del hierro, y son capaces de sustituir proteínas que contienen hierro por otras con diferentes cofactores, como flavinas (Peleato, 2011).

Las enzimas de las alcalófilas se emplean en la industria alimenticia para producir almidón y en la elaboración de detergentes (Ramírez, 2006). Algunas enzimas, como xilanasas, lipasas y proteasas, se producen a gran escala para ser utilizadas en el depilado del cuero, y en la recuperación de plata a partir de rayos X (Oliart-Ros et al., 2016). Los extractos multifuncionales de la alcalófila *Spirulina platensis* tienen múltiples usos (Tabla 1): la ficocianina se adiciona a productos alimenticios como colorante, antioxidante y emulsionante (Papadaki et al., 2017), se emplea como colorante, con la ficoeritrina, en la industria cosmética. Esta alga se usa como alimento por su composición de proteínas, raros aminoácidos esenciales, lípidos, minerales y un amplio rango de vitaminas incluyendo la vitamina B_{12} (Kumari, et al., 2015a).

Para evitar el daño por el oxígeno reactivo (generado en medio ácido), como el deterioro del metabolismo celular y de los componentes celulares, las algas acidófilas utilizan mecanismos que incluyen la utilización de antioxidantes no enzimáticos como son: la clorofila, carotenoides, ficobiliproteínas, compuestos fenólicos y antioxidantes enzimáticos (Mostafa et al., 2016). Para mantener la integridad de sus moléculas

lábil en ácido (clorofilas, ADN y ATP), estas algas deben mantener neutro el pH del citoplasma (Messerli et al., 2005; Pedrozo et al., 2010; Aguilera, 2013), lo que consiguen evitando la entrada de iones de hidrógeno desarrollando una permeabilidad selectiva de la membrana o excluyéndolos a través de una fuerte actividad de bomba de protones o (Seckbach, 2000; Messerli et al, 2005).

El alga *Dunaliella acidophila* emplea una combinación de factores para reducir la entrada de protones y facilitar su salida desde la célula. Estos incluyen una carga superficial positiva, y la existencia de una ATPasa en la membrana. Puede haber una diferencia entre el medio interno y externo de 5 unidades (Seckbach, 2000), como sucede en *Chlamydomonas* sp., que puede crecer a pH 2, con un pH en el citoplasma de 6.6 (Messerli et al., 2005).

Las algas acidófilas son de interés por su capacidad de recuperar drenajes de minas abandonadas, pues sus enzimas les confieren resistencia a los metales (Hernández, 2012), sin embargo, es necesario ampliar el conocimiento sobre los procesos y las rutas fisiológicas ligadas a estos procesos en ambientes contaminados (Hernández, 2012). La alga *Cyanidioschyzon merolae* puede ser utilizada en biorremediación ya que puede convertir el cadmio en sulfuro de cadmio, y al ser este de baja solubilidad es menos disponible ocasionando una menor toxicidad (Seckbach, 2000).

Salinidad

Las algas halófilas han desarrollado estrategias para compensar la salida de agua dada la alta concentración de sales del exterior y mantener el citoplasma de hiposmótico a iso-osmótico (González y Peña, 2002). Una de ellas es acumular principalmente K^+ y Cl^- , eliminando sodio al medio extracelular a través de un bombeo o también por intercambio de iones de Na^+ por K^+ (Sahoo y Seckbach, 2015). También sintetizan compuestos llamados “extremolitos” o solutos compatibles, como el glicerol, arabinitol y las betaínas, los cuales son solubles en agua, sin carga a un pH fisiológico (González y Peña, 2002) y cuya función es mantener el balance de agua y proteger a las macromoléculas biológicas equilibrando la

presión osmótica externa (González y Peña, 2002; Sahoo y Seckbach, 2015). En el caso particular del glicerol, este actúa como: 1) osmorregulador, 2) soluto protector de la actividad enzimática y 3) fuente de reserva (González y Peña, 2002).

Otros solutos compatibles son: 1) azúcares y sus derivados (sacarosa, trehalosa, glucosilglicerol, manitol) y 2) aminoácidos y derivados de aminas cuaternarias como la glicina betaína. El manitol es uno de los más comunes y se encuentra particularmente en las algas marinas (González y Peña, 2002).

El género *Dunaliella* acumula grandes cantidades de glicerol como respuesta a las altas concentraciones de NaCl del exterior. *Dunaliella* responde al shock hiperosmótico por una rápida contracción, que inicia con la síntesis masiva de glicerol. Esta acumulación de glicerol intracelular recupera el volumen celular (Pick, 1998; González y Peña, 2002; Sahoo y Seckbach, 2015).

Dunaliella salina bajo estrés acumula β -caroteno, que se utiliza en la industria alimenticia y médica (Pick, 1998; Xu et al., 2016), como promotor de la coloración de carnes y yemas de huevo y como precursor de la vitamina A (Arrieta, 2008); también como colorante y/o antioxidante en cosméticos y productos farmacológicos (Hossein y Shariati, 2008; Mongra, 2014). Otros productos potenciales son las xantofilas (antioxidantes), el glicerol, polifosfatos y ácidos grasos especiales, que pueden generar biodiesel. Los genes asociados con tolerancia a la sal, resistencia a los ácidos o evitación de la fotoinhibición en *Dunaliella* abren una nueva vía para generar plantas más resistentes a varios tipos de estrés (Pick, 1998).

Luz

La fotosíntesis se incrementa con el aumento de la intensidad lumínica, hasta alcanzar la máxima tasa de crecimiento específica para cada especie en el punto de saturación por luz. Pasado este punto, se alcanza el punto de fotoinhibición (mayor a $1500 \text{ fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; Xiu et al, 2016), se acelera el flujo de fotones en la cadena oxidativa lo cual provoca la formación de

radicales libres, con resultados perjudiciales para la misma célula e incluso la muerte (Hernández y Labbé, 2014). Cuanto más corta sea la longitud de onda más dañina será la radiación, la radiación ultravioleta (UV-A: 320-400 nm; UV-B:290-320 nm; UV-C:200-290 nm) es la más peligrosa (Seckbach, 2007). En ambientes de baja intensidad lumínica la realización de fotosíntesis genera altos costos energéticos para el metabolismo basal (Zerriouh, 2013).

El aparato fotosintético es muy vulnerable a la acumulación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno debido a la presencia de ácidos grasos poli-insaturados en las membranas tilacoidales (Freile, 2001), por lo que las algas han desarrollado mecanismos de protección (Zerriouh, 2013), los cuales incluyen: 1) foto-protección dinámica, en la que se evita el daño al FSII a través de la disipación de la energía como energía termal; 2) actividad del ciclo de las xantofilas, que consiste en la conversión de violaxantina a zeaxantina, pasando por el intermedio anteroxantina para absorber el exceso de energía de la clorofila en el cloroplasto y disiparla como fluorescencia; el ciclo se presenta en algas verdes (*Chlorophytas*) y pardas (*Phaeophyceae*); 3) movimiento de cloroplastos hacia posiciones paralelas con respecto a la luz, disminuyendo el daño; 4) síntesis de compuestos pantallas o protectores: fenoles y carotenoides, como astaxantina, fucoxantina y β -caroteno (Edding et al., 2006), este último presente en todos los grupos algales, y que por sus abundantes enlaces dobles tienen capacidad de absorber el exceso de energía de los fotosistemas I y II (FSI y FSII) y clorofilas, disipándola. La producción de β -caroteno puede ser maximizada en condiciones particulares, tales como alta salinidad, deficiencia de nitrógeno, la inhibición de la división celular y más eficientemente, altas irradiancias junto a altas temperaturas (Zerriouh, 2013).

Otro mecanismo implicado en la protección por elevada irradiación incluye la reparación del daño (Sahoo y Seckbach, 2015). La proteína D1 forma parte del centro de reacción del fotosistema II y funciona como un fusible que se quema con estrés lumínico; entonces se traslada a las lamelas estomáticas tilacoidales para su fosforilación, ya reparada se reincorpora nuevamente al fotosistema II (De las Rivas, 2013).

Algunos grupos algales poseen flagelos que les sirven para desplazarse en busca de alimento y suelen también tener en la parte anterior de la célula un órgano foto-receptivo que contiene caroteno. A través de él pueden detectar la dirección e intensidad de la luz y desplazarse en dirección contraria a la misma, cuando hay un exceso de radiación (foto-taxis negativa), o acercarse cuando no es suficiente para la fotosíntesis (foto-taxis positiva; (Lee, 2008). Este es otro mecanismo para evitar la alta luminosidad.

Altas concentraciones de materia particulada (fitoplancton y detritus), de material orgánico disuelto (v.g. pigmentos fotosintéticos) o capas de hielo superficiales en lagos polares reducen severamente la luz (Edding et al., 2006), obstaculizando la fotosíntesis, involucrando altos costos energéticos para el mantenimiento y la reparación. A baja irradiación, las algas modifican el número de unidades fotosintéticas y la composición cualitativa de pigmentos (reflejada en aumento de clorofilas, presencia de ficocianinas, ficoeritrinas), elevando su eficiencia (α) y capacidad fotosintética (P_{max}) (Bermúdez et al., 2002); también intensifican la actividad de las enzimas involucradas en la fijación de carbono. Algunas especies recurren a la heterotrofia, cuando son capaces de incorporar materia orgánica disuelta en el agua, o hacer fagotrofia ingiriendo bacterias, es decir, son mixótrofas (Allende, 2004).

La clorofila producida en altas concentraciones puede ser usada en la industria alimenticia como saborizante y la ficocianina como antioxidante. Los mixótrofos tienen una amplia gama de usos como se muestra en la Tabla 1.

Nutrientes

En general, la cantidad total de fósforo o de nitrógeno regula la cantidad y tipo de algas presentes en los sistemas acuáticos; una concentración elevada de ellos, condición conocida como eutrofia, produce un crecimiento algal excesivo, disminución de la diversidad y condiciones desfavorables para la biota, como turbiedad en el agua y deficiencia de oxígeno. En contraste, en lagos oligotróficos, donde la cantidad de estos dos nutrientes es muy escasa, es el carbono,

presente en diferentes formas, y el nitrógeno en forma de amonio los nutrientes que marcan la dinámica y abundancia algal (Edding et al., 2006; Hernández y Labbé, 2014).

Muchas cianoprocariotas están bien adaptadas a condiciones de eutrofia, porque contienen varios cuerpos de almacenamiento, incluyendo gránulos de glucógeno, que almacena carbón; gránulos de cianoficinas, que son reservas de nitrógeno en forma de arginina y ácido aspártico; gránulos de polifosfato que almacenan fosfato y, por último, carboxisomas que son compuestos de ribulosa 1,5- bifosfato carbolixilasa/oxigenasa (Vincent, 2009; Velázquez y Quesada, 2011). Estos permiten a las células almacenar energía y nutrientes, para posteriormente utilizar esas reservas para su mantenimiento y crecimiento cuando se encuentren en condiciones adversas (Vincent, 2009).

En muchas algas como las diatomeas, los aceites son las formas principales de almacenamiento energético, mientras que *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus* y *Tetraselmis* han demostrado que acumulan una gran cantidad de carbohidratos (García, 2010; Zerrouh, 2013).

Algunas microalgas han sido empleadas en la depuración de diversos tipos de aguas residuales, entre ellas, las cianobacterias, por su capacidad de almacenar nutrientes. También hay que destacar la capacidad de determinadas microalgas para eliminar metales pesados o compuestos tóxicos orgánicos (hidrocarburos, biocidas, tensoactivos) que pueden ser fijados por ellas mediante adsorción química, intercambio iónico, enlace covalente, precipitación de superficie, reacciones redox o cristalización sobre la superficie de su pared celular. Los metales pesados son internalizados a través de un transporte de membrana (bioacumulación); una vez en el citoplasma, es secuestrado por proteínas ricas en grupos sulfhídricos (metaloneínas, fitoquelatinas) y algunos péptidos de unión a metales. Dependiendo del estado de oxidación son posibles dos transformaciones, una es una solubilización del estado insoluble inicial (lixiviación), la segunda es una insolubilización del metal que lo inmoviliza, inicia con una fase soluble. Los metales de diferentes valencias varían en su toxicidad; cuando se excretan enzimas

redox especiales, los microorganismos pueden transformar el metal a formas menos tóxicas. Si un metal no puede ser reducido por vías celulares o no es conveniente, entonces el metal puede ser acomplejado o transportado al exterior celular, o pueden suceder ambos eventos (Beltrán, 2016). La biomasa generada por biorremediación puede ser utilizada para producir biodiesel, pigmentos, aceites esenciales, entre otros (Hernández y Labbé, 2014).

En contraparte, cuando hay deficiencias nutricionales las algas usan el transporte activo para concentrar los nutrientes, fijan CO₂ para que los receptores de NH₄ queden disponibles (Edding et al., 2006), liberan sideróforos para captar metales (Lee, 2008), las cianobacterias activan la enzima fijadora de nitrógeno atmosférico (Rodríguez et al., 2008), muchas son unicelulares y otras presentan flagelos para desplazarse en busca de nutrientes. Algunos de estos flagelados, llamados mixótrofos pueden asimilar compuestos orgánicos en reemplazo de los nutrientes inorgánicos (Rodríguez et al., 2008).

Las diatomeas pueden aumentar el contenido de aceites desde un 20% en condiciones normales a un 40% cuando el nitrógeno en un nutriente limitante (Hernández y Labbé, 2014), como un forma de almacenar energía y bajo escasez de nutrientes, se activa el metabolismo secundario, en el que se obtienen metabolitos altamente activos; Estas sustancias han mostrado propiedades antitumorales, antivirales, antibióticas, entre otras (García et al., 2013; Sahoo y Seckbach, 2015), pero han sido poco investigados y explotados.

Finalmente se presenta en la Tabla 1 ejemplos de los taxones adaptados a las condiciones extremas que se investigaron de los cuales encontramos más información y se anexan los usos potenciales en biotecnología de estos.

Conclusiones

Las algas termófilas, psicrófilas alcalófilas, acidófilas y halófilas presenta adaptaciones de supervivencia a estos ambientes extremos, principalmente a nivel membrana y enzimas, Las termófilas y psicrófilas modifican sus

enlaces para obtener mayor fluidez, en las alcalófilas, acidófilas y halófilas existe una permeabilidad selectiva a los protones y iones extracelulares (Na⁺) o bombeo de los mismos hacia el exterior de la célula, así como mecanismos para compensar las deficiencias en estos ambientes (presencia de sideróforos para atrapar metales, transporte activo para la captación de CO₂ en las acidófilas y síntesis de soluto compatible en las halófilas. Las que habitan en ambientes de irradiancia extrema modifican la cantidad de carotenos para protegerse del daño oxidativo en alta luminosidad o aumentan la cantidad de clorofila, ficocianina y ficoeritrina para eficientizar la captación de luz, cuando escasea la misma. Las que habitan en ambientes eutróficos presentan estructuras especializadas (gránulos de cianoficinas, polifosfato y carboxisomas) que permiten su almacenamiento cuando existe exceso de nutrientes. Cuando hay escasez de ellos, se activan vías metabólicas alternas para almacenar nutrientes.

Dentro de los principales usos que se documentaron están la aplicación de extremo-enzimas: DNAPolimerasas en ingeniería genética; lipasas, proteasas, amilasas, xilanasas, celulasas, en la producción de detergentes, alimentos (pan, cerveza, sabores), papel, textiles, productos farmacéuticos, agroquímicos, cosméticos, en producción de biodiesel, entre otros usos. Los solutos compatibles sintetizados por las halófilas son aprovechados principalmente en el ramo alimenticio y farmacéutico, al igual que los variados pigmentos producidos (carotenoides-violaxantina, astaxanina, zeaxantina, luteína, fucoxantina, β-caroteno, clorofila, ficocianina, ficoeritrina) para enfrentar las condiciones estresantes. En bio-remediación se aprovecha la producción de sideróforos para la captación de metales pesados, y la presencia de estructuras de almacenamiento para eliminar la excesiva carga de nutrientes en ambientes eutróficos. Finalmente, productos para almacenar energía (aceites), así como metabolitos secundarios que se generan en condiciones de oligotrofia, pueden ser utilizados en la producción de biodiesel y para usos terapéuticos, entre la variada potencialidad que pueden tener.

Artículos

Tabla 1. Ejemplos de algunos taxones extremófilos y su potencial biotecnológico.

TAXÓN ALGAL	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO
T E R M O F I L A S	
<i>Phormidium laminosum</i>	<p>Presencia de ácidos grasos para la producción de biodiesel.^{1,2}</p> <p>Componentes con actividad antitumoral y antiespasmodial.³</p> <p>Glicolípidos que inhiben la actividad enzimática de HIV-1.³</p> <p>Alto valor nutricional, principalmente proteínas³</p> <p>Agente antibacteriano para microorganismos Gram negativos y positivos, <i>Candida albicans</i> y <i>Cladosporium resinae</i>.^{4, 5, 6}</p>
<i>Aphanocapsa thermalis</i>	Ácidos grasos para la producción de biodiesel. ^{1,5}
<i>Synechococcus elongatus</i>	<p>Ácidos grasos utilizados para la producción de biodiesel.¹</p> <p>Poli-hidroxibutirato (degradación biológica de plásticos).⁶</p> <p>Producción de hidrógeno, energía alterna⁷</p> <p>Captura el CO₂ de origen antropogénico.⁷</p> <p>Remover los nutrientes de efluentes termales.⁷</p> <p>Dispositivos sensibles a la luz, tecnología para convertir la energía solar en cantidades limitadas de electricidad autosustentable sin generar CO₂⁷</p>
<i>Mastigocladus laminosus</i>	El extracto metanólico contiene componentes antibacteriales que inhiben <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. siringe</i> , <i>Enterobacter sp.</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> . ⁶
P S I C R Ó F I L O S	
<i>Chlamydomonas nivalis</i>	Modelo para investigar la respuesta de adaptación al estrés ocasionado por las bajas temperaturas, intensidades de luz, radiación UV excesiva y ausencia de nutrientes. ⁸
A L C A L O F I L A S	
<i>Spirulina platensis</i>	<p>Industria alimenticia por su alto contenido de proteínas, aminoácidos esenciales no comunes, lípidos, minerales y un amplio rango de vitaminas incluyendo B12.⁹</p> <p>Contenido lipídico del 5.6 a 7% de su peso seco, el 83% puede ser utilizado en saponificación, el restante contiene parafinas esenciales, pigmentos, alcoholes terpenos y esteroides.⁹</p> <p>Precursor de la vitamina A.⁹</p> <p>Bajo porcentaje de ácidos nucleicos (4.2-6%), mucoproteínas de fácil digestión, no tóxicas y con ácidos grasos que no forman colesterol (potencial alimento para personas con enfermedad coronaria y obesidad).⁹</p> <p>Puede reducir los niveles de colesterol y estimular el sistema inmune, así como prevenir e inhibir algunos tipos de cáncer, reduce la nefrotoxicidad por fármacos y metales tóxicos, protección de la radiación.¹¹</p> <p>Uso terapéutico.¹⁰</p> <p>Evita las complicaciones relacionadas con la hiperlipidemia.¹⁰</p> <p>Es una fuente natural de antioxidantes hidrosolubles (pigmentos de ficocianina, principalmente la C, y componentes fenólicos) y de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasas y peroxidasas).³</p>

Artículos

A C I D O F I L A S

<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Puede ser utilizada en biorremediación, ya que esta puede convertir el cadmio en sulfuro de cadmio, y al ser este de baja solubilidad es menos disponible por lo que su toxicidad es menor. ¹⁸
--------------------------------	---

H A L O F I L A S

<i>Dunaliella salina</i>	<p>Fuente de genes para transformar plantas¹²</p> <p>Pigmento β-caroteno que puede ser utilizado en la industria médica y alimenticia^{12, 13}, en cosméticos y productos farmacológicos como colorante y/o antioxidante.^{14, 7}</p> <p>β-caroteno ha mostrado efectos preventivos en varios tipos de tumores cancerígenos y melanomas en humanos y animales. incluso esta alga es considerada como la mejor fuente productora de este pigmento ¹⁴</p> <p>Suplemento para animales como peces, al que además se le adiciona colorante, medicamento o sustancias para elevar la fertilidad en los organismos.¹⁴</p> <p>También posee otros pigmentos: clorofila-α, violaxantina, neoxantina, zeaxantinas y luteína, los cuales están relacionados con actividad potencial contra los radicales libres en el sistema inmune.¹⁴</p> <p>Antioxidante y precursor de la vitamina A.^{13, 14}</p> <p>Al tener la capacidad de remover y acumular componentes como NH_4 y PO_3^{-4} y metales pesados puede ser utilizada en el tratamiento de aguas residuales.¹⁴</p>
--------------------------	---

F O T O - I N H I B I D O R E S

<i>Ishige okamura</i>	<p>Vitamina E (Tocoferol).¹⁴</p> <p>Ingredientes bio-activos en cosméticos.¹⁴</p> <p>Fuente de Diphlorethohydroxycarmalol (DPHC), que protege a las células del daño por rayos UV.¹⁴</p>
<i>Fucus spp.</i>	Vitamina E (Toco-ferol). ¹⁴
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Vitamina E (Toco-ferol). ¹⁴
<i>Laminaria digitata</i>	Vitamina E (Toco-ferol). ¹⁴
<i>Palmaria palmata</i>	Vitamina E (Toco-ferol). ¹⁴

M I X O T R O F A S

<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<p>Alternativa para la producción de proteínas recombinantes, debido en parte por su cultivo fácil y económico, así como su gran capacidad para acumular biomasa y por ser inocuas para el ser humano.¹⁵</p> <p>β-caroteno, tiene utilidad en la industria alimenticia y cosmética; mientras que los ácidos grasos tienen utilidad en los biocombustibles.¹⁵</p> <p>Potencial para ser manipulada genéticamente, lo que incrementa su valor como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes de interés médico.¹⁵</p> <p>Sustracción de metales pesados en los cuerpos de agua, útil en bioremediación.¹⁵</p> <p>Consume metales pesados como Pb, Cd y Hg.^{16, 17}</p>
----------------------------------	--

Referencias:

1. Mejjide et al., 2015.; 2. Ertuğrul y Dönmez, 2011.; 3. Rodríguez et al., 2008.; 4. Lukavský et al., 2011.; 5. Abed et al., 2008.; 6. Mongra, 2012.; 7. Mongra, 2014.; 8. Na et al, 2012.; 9. Kumari et al., 2015a.; 10. Kumari et al., 2015b.; 11. Mostafa et al., 2016.; 12. Pick, 1998.; 13. Xu et al., 2016.; 14. Hosseini y Shariati, 2009.; 15. Rivera et al., 2011.; 16. Seckbach, 2007.; 17. Pereira, 2013.; 18. Sahoo y Seckbach, 2015.

Referencias

- Abed RMM, Dobretsov S y Sudesh K (2008) Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of applied microbiology* 106:1–12.
- Aguilera A (2013) Eukaryotic organisms in extreme acidic environments, the Rio Tinto case. *Life* 3: 363-374.
- Allende L (2004). Estructura de las fracciones del fitoplancton de lagos antárticos de Bahía Esperanza con estado trófico contrastante. Variaciones estivales a interanuales, e interacciones con otros componentes planctónicos. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires. 280 pp.
- Arrieta BE (2008) Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas (Biotechnologic uses of microalgae). *Revista del colegio de microbiólogos y químicos clínicos de Costa Rica*, 14: (1), 8-13.
- Beltrán PME, Gómez RAM (2016) Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), mercurio (Hg) mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Universidad Militar Nueva Granada* 12(2): 172-197.
- Bermúdez JL, Ladeiras C y Morales E (2002) Producción de biomasa de la microalga marina *Chroomonas* sp., en función del pH, intensidad luminosa y salinidad. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras* 31: 167-185.
- Bravo JG, Morales AT y Ayala A (2014) Aislamiento e identificación de microalgas en la región de la planta geotermoeléctrica CFE de “Los azufres” en el estado de Michoacán. In: *Ciencias de la Ingeniería y Tecnología, Volumen IV* (Libro electrónico). Ramos M y Aguilera V (Ed). Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato, México. pp 1-7.
- De las Rivas J (2013) Utilización de la energía luminosa en la fotosíntesis. In: *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Azcón-Bieto J y Talón M. Mc Graw Hill Education-Interamericana, 2da. Ed. pp. 191-209.
- Díaz MM y Maberly CS (2009) Carbon-concentrating mechanisms in acidophilic algae. *Phycology* 48 (2):77-85.
- Edding EM, Tala F y Vásquez AJ (2006) Fotosíntesis, productividad y algas marinas. *Fisiología vegetal* (11):1-40.
- Ertuğrul KS y Dönmez G (2011) Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. *Applied Energy* (88):3632–3635.
- Ferrera I y Louise A (2007) *Thermophiles*. *Encyclopedia of life sciences*.
- Freile PY (2001) Algas en la botica. *Avance y perspectiva* 20: 283-292.
- García VMJ (2010) Captura de CO₂ mediante algas unicelulares. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Madrid. pp. 1-118.
- García GA, Gutiérrez MIE, Acedo FE, Burgos HA, López TM, Valdés CM y Burboa ZM (2013) Las algas y otros organismos marinos como fuente de las moléculas bioactivas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Biotecnia* (1): 25 – 32.
- González HJC y Peña A (2002) Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Revista latinoamericana de microbiología* 44 (3-4): 137 - 156.
- Granada TCA (2010) Biotecnología de microorganismos extremófilos. Tesis de especialidad. Universidad Católica de Manizales. Venezuela. pp. 1-52.
- Harvey A (2000) Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug discovery today* (5): 294 - 300
- Hernández AWI (2012) Caracterización de dos comunidades microbianas de ambientes extremos ácidos del parque nacional Volcán Rincón de la Vieja, Guanacaste, Costa Rica. Tesis de maestría. Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/2041>

Artículos

- Hernández PA y Labbé JI (2014) Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía* 49 (2): 157-173.
- Hosseini TA y Shariati M (2009) *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology* 107: 14 – 35.
- Jaenicke R y Sterner R (2006) Life at high temperatures. In: *Prokaryotes 2: Ecophysiology and biochemistry*. Dworkin M, Falkow M, Rosenberg E, Scheifer KH y Stackebrandt E. Springer, Berlin. pp. 167-209.
- Kumari S, Pratap R y Varma MC (2015 a) Nutritive value of the blue algae *Spirulina platensis* as a green remedy- A potent nutraceutical agent. *BIOGLOBIA* 2 (2):3 -11.
- Kumari S, Pratap R y Varma MC (2015 b). Diabetes induced alteration in lipid profile of male albino mice and their recovery by using *Spirulina platensis* powder. *BIOGLOBIA* 2 (2): 66 - 72.
- Lee RE (2008). *Phycology*. Ed Cambridge. 4ª edición. USA.
- López RV, Carrera MD, Salgado E, Mateos SA, Báez JC y Costas E (2009) A fascinating example of microalgal adaptation to extreme crude oil contamination in a natural spill in arroyo minero, Rio Negro, Argentina. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 75 (4):883-899.
- Lukavský J, Furnadzhieva S y Pilarski P (2011) Cyanobacteria of the thermal spring at Pancharevo, Sofía, Bulgaria. *Acta botánica croata* 70 (2): 191–208.
- MALGAS (2013) Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. AST Ingeniería S.L. Asturias. Recuperado de www.ast-ingenieria.com.
- Meijide FR, Leira M, Torres VJE, López RMC, Carballeira R (2015) Estudio del componente biológico de las aguas mineromedicinales y termales de Ourense: Burgas y Outariz. *Memorias del Congreso Internacional del Agua termalismo y Calidad de Vida*. España.
- Merino-Moya J, Alva-López F, Román-Ramos A y Mendoza-Espinoza S (2014) Efecto de tres concentraciones de CO₂, obtenido de valvas de *Argopecten purpuratus* “Concha de abanico”, en el crecimiento poblacional de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio. *SAGASTEGUIANA* 1(1): 37-46.
- Messerli MA, Amaral-Zettler L A, Zettler E, Jung SK, Smith PJ (2005) Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile. *Journal of Experimental Biology* 208: 2569-2579.
- Mongra AC (2012) Distribution pattern of Cyanobacteria in hot water springs of Tattapani, Himachal Pradesh, India. *Journal of Academia and Industrial Research* 1 (7): 363-370.
- Mongra AC (2014) Potential producers of economical and medical important products in hot water spring Tattapani, Himachal Pradesh, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3 (1): 494 - 513.
- Mostafa MSI, Mahmoud EAY y Piercey NM (2016) Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Brazilian journal of microbiology* 47: 298 - 304.
- Na L, Dong W, Feng C y Shang TY (2012) Lipidomic profiling and discovery of lipid biomarkers in snow alga *Chlamydomonas nivalis*, under salt stress. *European Journal Lipid Science Technology* 114 (3):253-265.
- Nascimbene J, Spitale D, Thus H, Cantonati M (2011) Congruencies between photoautotrophic groups in springs of the Italian Alps: implications for conservation strategies. *Journal of Limnology* 70 (1):3-8.
- Oliart-Ros R M, Sánchez-Otero M G, y Manresa-Presas Á (2016) Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*, 11 (1): 79 - 90.
- Papadaki S, Kyriakopoulou K, Tzovenis I, Krokida M (2017) Environmental impact of phycocyanin recovery from *Spirulina platensis* cyanobacterium. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*,44:217-223.
- Pedrozo FL, Díaz MM, Temporetti PF, Baffico GD y Beamud SG (2010) Características limnológicas de un sistema ácido: Río Agriolago Caviahue, Provincia del Neuquén, Argentina. *Ecología Austral* (20): 173-184.

Artículos

- Peleato SML (2011) Las cianobacterias: cooperación versus competencia. Discurso de ingreso. Real Academia de Ciencias Exactas Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza.
- Pereira MM (2013) Toxicidad del cromo trivalente sobre el alga verde *Dictyosphaerium chlorelloides* y su adaptación a ambiente acuáticos altamente contaminados con este estado de eutrofización del metal pesado. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid pp.1 - 153.
- Pick U (1998) *Dunaliella*-A model extremophilic alga. Israel Journal of Plants Sciences 46 (2): 131 - 139.
- Ramírez N, Serrano JA, y Sandoval H (2006) Microorganismos extremófilos. actinomicetos halófilos en México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 37 (3): 56 - 71.
- Rivera SRA, Echeverría PS, Herrera VVA (2011) La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: nueva alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés médico. Ciencia, comunicaciones libres 62(4): 1 – 9.
- Robles FK, López EJA, Martínez CLR y Serna FM (2007) Evaluación del efecto de la concentración de hierro en el crecimiento y tamaño celular de *Chaetoceros muelleri* cultivada en laboratorio. Revista de Investigaciones Marinas 28 (1): 63-70.
- Rodríguez MLJ, Santoyo S, Cifuentes A, García BR, Señoráns FJ e Ibañez E (2008) Pressurid fluid extraction of bioactive compounds from *Phormidium* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry (56): 3517 – 3523.
- Rothschild LJ y Mancinelli LR (2001) Life in extreme environments. Nature 409: 1092-1191.
- Rubiano LC (2006) Aislamiento y caracterización de microorganismos termofílicos anaerobios lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiales termominerales de Paipa e Iza (Boyacá). Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia, Bogotá, pp. 1-70.
- Sahoo D y Seckbach J (2015) The algae world. Springer. Berlin.
- Seckbach J (2000) Journey to diverse microbial worlds: Adaptation to exotic environments. (Vol.2). Springer, Science & Business media. Israel.
- Seckbach J (2007) Algae and cyanobacteria in extreme environments. Springer. Berlin.
- Seckbach J. (2015). The Algae World, (Vol.26). Springer science & business media. Israel.
- Shiraiwa Y, Goyal A y Tolbert N (1992) Alkalization of the medium by unicellular green algae during uptake of dissolved inorganic carbon. Plant and Cell Physiology 34(5): 649-657.
- Sigeo CD (2005) Freshwater microbiology. Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- Suárez NC, Alazard D, Ramírez VF, Monroy HO y Fernández LL (2002) Las enzimas termoestables y sus aplicaciones industriales. Biotecnología 7 (1): 7 - 23.
- Velázquez D, Quesada A (2011) Las cianobacterias en ambientes polares. Asociación Española de Ecología Terrestre. Ecosistemas, 20 (1): 14-22.
- Vincent WF (2009) Plankton of Inland waters. Elsevier Academic Press.
- Wehr DJ, Sheath GR y Kocielek JP (2015) Freshwater algae of North America. Ecology and classification. Academic Press.
- Xu Y, Ibrahim MI, Harvey JP (2016) The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) CCAP 19/30. Plant physiology and biochemistry 106: 305-315.
- Zerriouh O (2013) Diseño de una biorrefinería de microalgas a nivel planta piloto. Tesis de Ingeniería. Universidad de Almería. pp 1-30.

Estabilidad de la hemaglutinina H5N1 del virus de la Influenza Aviar en semillas de tabaco

Yanaysi Ceballo*, Alina López, Kenia Tiel, Osmany Ramos, Yamilka Rosabal, Carlos, E. González, Abel Hernández

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba, Apartado Postal: 11600.

yanaysi.ceballo@cigb.edu.cu

Resumen

El almacenamiento de proteínas endógenas en semillas es importante para el éxito de la germinación y el crecimiento de las plantas. Esta propiedad ha sido adaptada y utilizada para producir proteínas heterólogas en este órgano teniendo en cuenta las ventajas que ofrece. En este estudio, se demostró la estabilidad de la hemaglutinina aviar H5N1 en semillas de *Nicotiana tabacum* L. almacenadas durante cinco años en diferentes condiciones de temperatura, sin afectarse los niveles de expresión y la germinación de las semillas transgénicas. Estos resultados muestran que las proteínas complejas se mantienen estables por largos períodos a temperaturas moderadas, constituyendo las semillas una fuente inmediata para la obtención de candidatos vacunales frente a diferentes enfermedades.

Palabras clave: Hemaglutinina, semillas, estabilidad, *Nicotiana tabacum*. L.

Abstract

The storage of endogenous proteins in seeds is important for successful germination and plant growth. This property has been adapted and used to produce heterologous proteins in this organ considering the advantages it offers. In this study, the stability of avian hemagglutinin H5N1 was demonstrated in *Nicotiana tabacum* L. seeds stored for five years under different temperature conditions, without affecting the expression levels and germination of transgenic seeds. These results show that the complex proteins remain stable for long periods at moderate temperatures, making the seeds an immediate source for obtaining vaccine candidates against different diseases.

Key words: Hemagglutinin, seeds, stability, *Nicotiana tabacum*. L.

Introducción

Las plantas son un sistema versátil para producir proteínas recombinantes. Entre las ventajas que ofrecen está el bajo costo de producción de la biomasa, la capacidad de acumular proteínas complejas con alto rendimiento y el bajo riesgo de contaminación con patógenos propios de animales y de humanos (Chan & Daniell, 2015; Marsian & Lomonossoff, 2016; Topp et al., 2016; Rage et al., 2020; Shanmugaraj et al., 2020). Las plantas de *Nicotiana tabacum* L. son ampliamente empleadas para la

producción de proteínas recombinantes (Conley et al., 2011; Khan et al., 2020; Mohammadi et al., 2020; Ruiz et al., 2020). Algunas de las ventajas que muestran son: la existencia de una metodología bien establecida de cultivo de tejidos y transformación genética, así como la posibilidad de cultivarlas en condiciones de contención (Tremblay et al., 2010; Varasteh-Shams et al., 2020). Otra ventaja importante de esta planta como biorreactor es que se trata de un cultivo no comestible que minimiza el riesgo del paso de las proteínas recombinantes a la cadena alimenticia (Matoba et al., 2011; Sedaghati et al., 2020).

Diferentes órganos de este cultivo como las hojas y las semillas son empleados con este fin (Shanmugaraj et al., 2020).

Las semillas, en particular, constituyen un sistema atractivo de expresión de proteínas debido a que almacenan estas moléculas en pequeños volúmenes y en ambientes estables (Stoger et al., 2002; Van Droogenbroeck et al., 2007; De Wilde et al., 2013; Murray-Hudson et al., 2014; Hernández et al., 2015; Vamvaka et al., 2016; Khan et al., 2020). Esta ventaja es posible por la existencia de un medio menos hidratado, que impide los procesos de hidrólisis y además la presencia de chaperonas e isomerasas que garantizan un plegamiento correcto de las proteínas (Müntz, 1998; Stoger et al., 2005; Urade, 2019; Balchin et al., 2020). Las semillas de *N. tabacum* cv BHmN son de pequeño tamaño, permitiendo que las proteínas alcancen altas concentraciones. El contenido de proteína es de aproximadamente 15-22% con respecto al peso fresco (Frega et al., 1991), lo cual justifica su empleo como fuente alternativa de proteína para la alimentación animal (Rossi et al., 2013). Se ha demostrado que los anticuerpos, antígenos vacunales y otras proteínas heterólogas pueden ser producidos en semillas, donde permanecen estables y funcionales durante varios años, incluso almacenados a temperatura ambiente (De Wilde et al., 2013; Vamvaka et al., 2016; Weichert et al., 2016; Dong et al., 2017). Específicamente, antígenos del virus de la influenza aviar (VIA), también se han producido en semillas (Nahampun et al., 2015; Ceballo et al., 2017), donde se confirmó que los animales inmunizados mostraron una respuesta protectora contra el VIA (Ceballo et al., 2018; Phan et al., 2020). Entre los principales antígenos del VIA, la hemaglutinina (HA) y la neuroaminidasa, constituyen los más inmunogénicos, aunque también se han expresados nucleoproteínas y proteína de la matriz, que confieren un efecto protector más amplio (Zheng et al., 2014; Kolpe et al., 2017; Yang & Liu, 2017; Kim et al., 2020).

La amenaza de una pandemia de gripe aviar ha enfatizado en la necesidad de medidas de prevención efectivas para combatir esta enfermedad. Una de las estrategias se basa en la vacunación, acompañada de medidas de bioseguridad

(Marangon et al., 2005; Ladman et al., 2019; Hautefeuille et al., 2020). Las vacunas comerciales existentes son predominantemente del tipo de virus completo inactivado y atenuado. Durante décadas, estas vacunas demostraron ser seguras y eficaces. Sin embargo, los procesos de producción, pueden ser inefectivos, cuando se requieren altas cantidades de dosis en el menor tiempo posible (Dai et al., 2019). Este aspecto se evidenció durante la pandemia de influenza H1N1 en el 2009.

En el presente estudio las semillas de tabaco que acumulan la HA del VIA, A/Vietnam/1203/04(H5N1), se almacenaron a diferentes temperaturas, demostrándose la estabilidad de la proteína almacenada durante cinco años en este órgano y sin afectar la germinación de dichas semillas. Estos resultados son de gran utilidad práctica, pues sugieren la posibilidad de disponer del antígeno de HA ante la aparición de una pandemia de gripe aviar.

Materiales y métodos

Fuente y análisis de las semillas

Los experimentos se realizaron con semillas transgénicas de *N. tabacum* cv. BHmN generación T1 de la línea I-13 (T1 I-13), productoras del dominio extracelular de la proteína HA del VIA referida por Ceballo et al. (2017). Las semillas cosechadas, treinta y cinco días después de la floración, en la parcela experimental del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), se almacenaron en diferentes condiciones de temperatura (T=4; T=28; T=37, T en °C) durante cinco años. Como control negativo (CN) se utilizaron semillas de igual variedad no transgénicas almacenadas bajo las mismas condiciones y por el mismo período de tiempo que las transgénicas. La cuantificación de la HA por ELISA y la visualización de las proteínas por SDS-PAGE y western blot se realizó según lo descrito por Ceballo et al. (2017).

Germinación de las semillas

Las semillas CN y T1 I-13 almacenadas durante cinco años en diferentes condiciones se esterilizaron superficialmente con etanol al 70% durante

30 segundos. Posteriormente se incubaron en hipoclorito de sodio al 9% durante 10 minutos, para luego dar lavados sucesivos con agua destilada estéril (cinco veces). El experimento se diseñó con tres réplicas para cada combinación de almacenamiento. Cada réplica se conformó con 100 semillas cada una, sembradas en medio MS, Sigma, (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con sacarosa 30 g/L, vitaminas MS 1 ml/L y agar 6,0 g/L en placas Petri. Las mismas fueron incubadas a 4 °C en la oscuridad durante tres días (estratificación) y seguidamente a 22 °C con un ciclo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad. La germinación fue definida por la aparición de la radícula a través de la cubierta de la semilla y, posteriormente, de las primeras hojas verdaderas. El porcentaje de germinación se determinó a los doce días mediante el conteo de semillas germinadas con respecto al total de las semillas sembradas. Para la germinación de las semillas transgénicas cosechadas más recientemente (CNr) se siguió el mismo procedimiento.

Producción de semillas T4 de la línea

I-13 en casas de cultivo protegido

Las semillas T1 I-13 se sembraron en presencia de Kanamicina 30mg/L para obtener generaciones sucesivas hasta llegar a la T4, seleccionando en cada etapa las líneas con mayores niveles de acumulación de HA. Las plántulas resistentes al antibiótico, propiciando condiciones de crecimiento. Para evaluar la producción de

semillas, se trasplantaron 150 de estas plantas a parcelas de 5 m² se cultivaron en casas de invernadero su adaptación a las nuevas separadas por 1 m (marco de plantación de 5 plantas/m²) a la casa de cultivo protegido del CIGB de un área de 1320 m², con luz natural y una temperatura promedio (28 ± 2 °C). La recolección de las semillas se llevó a cabo seis meses después de iniciado el semillero.

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas en la cantidad de HA almacenada en diferentes temperaturas, cuantificada por ELISA, se determinó mediante el software estadístico GraphPad Prism v.6.0e (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Se compararon los tratamientos mediante la prueba de Mann Whitney y se consideró significancia estadística para $p < 0,05$. La altura entre las plántulas transgénicas y las no transgénicas fueron analizadas mediante la prueba t de Student para $p < 0,0001$.

Resultados

En el presente estudio se cuantificó la proteína HA de los extractos de semillas T1 I-13 almacenadas en diferentes condiciones de temperatura, demostrándose que no hubo diferencias significativas en la concentración del antígeno entre los distintos tratamientos, así como tampoco con relación a la HA* (extracto de PTS de semillas transgénicas T1 I-13 conservado a -20 °C durante cinco años, referido por Ceballos et al. (2017) Figura 1.

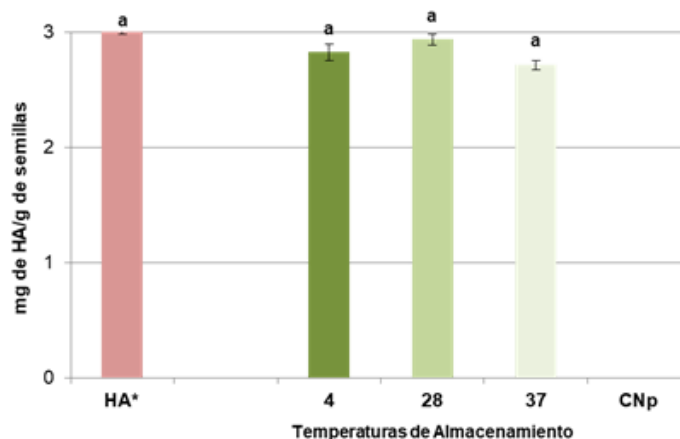


Figura 1. Análisis de la expresión de HA en semillas transgénicas de *N. tabacum* cv. BHMN, T1 I-13, almacenadas durante cinco años. En el ELISA se utilizó como anticuerpo primario un suero murino anti-HA1 y como anticuerpo secundario IgG anti ratón marcado con peroxidasa. HA*: extracto de PTS de semillas transgénicas T1 I-13 conservado a -20 °C durante cinco años; 4, 28 y 37: extracto de PTS de T1 I-13 almacenado durante cinco años a diferentes temperaturas (T=4; T=28; T=37, respectivamente); CNp: mezcla de extractos de PTS de semillas no transgénicas almacenadas durante cinco años a T=4; T=28; T=37, usadas como control negativo. Las barras de error en el gráfico indican la desviación estándar. En el análisis de los datos con la prueba de Mann Whitney no se observaron diferencias estadísticamente significativas (misma letra) entre los tratamientos para $p < 0,05$.

La HA de T1 I13 se mantuvo estable en este órgano durante cinco años sin sufrir degradaciones detectables, como se evidencia mediante SDS-PAGE y western blot (Figura 2). La identidad de la proteína fue confirmada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HA1 (Figura 2b). Una banda de aproximadamente 65 kDa fue detectada, sugiriendo la presencia de la forma monomérica de HA en condiciones reductoras, al igual que en el extracto proteico de HA*. En el caso de CNp (mezcla de extractos de PTS de semillas no transgénicas almacenadas durante cinco años a T=4; T=28; T=37) no se reconocieron proteínas en la inmunodetección.

Las semillas T1 I-13, almacenadas durante cinco años en diferentes temperaturas, mostraron al sexto día un retardo en el porcentaje de germinación con relación a las semillas CN, sin embargo a los doce días del ensayo, la germinación fue similar a éste. Entre los tratamientos se observó un mayor porcentaje germinativo a 28 °C durante el transcurso del experimento. Por otro lado, ocurrió un ligero retraso en la germinación de las semillas CN almacenadas

con respecto a las CNr (Tabla 1). No obstante, las plántulas transgénicas, independientemente de la temperatura de almacenamiento, no mostraron alteraciones morfológicas visibles entre ellas, pero se observó una marcada disminución en la talla de las mismas con relación a las de CN (Figura 3a y Tabla 2). Sin embargo, al cabo de tres meses ambos grupos de plantas alcanzaron un crecimiento semejante (Figura 3b).

Para evaluar la producción de semillas en la casa de cultivo protegido de la línea I-13 en la generación T4 se obtuvieron semillas de 140 plantas, lo que representa el 93.3 % del total sembrado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. El rendimiento de semillas por planta (g/planta) se situó en un rango de 2,5 a 23,6 g/planta, para un promedio de 6,25 g/planta y una producción total de 876 gramos. Es válido resaltar que el 54,2% de las plantas produjo más de 5 g/planta y 15 plantas produjeron más de 10 g/planta. La expresión de HA en esta generación T4 (datos no publicados) fue de aproximadamente 4 mg/g de semillas, lo que nos permitió acumular 3,4 g de HA para usos posteriores.

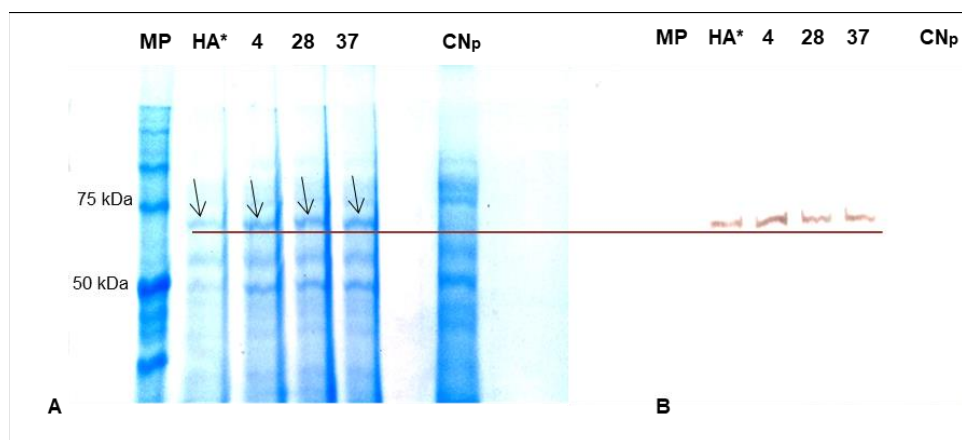


Figura 2. Caracterización de HA en semillas T1 I-13 de *N. tabacum* cv. BHMN, almacenadas durante cinco años en diferentes condiciones de temperatura. **A:** electroforesis SDS-PAGE al 9% con 15 µg de PTS de un extracto acuoso. **B:** detección por western blot de HA en presencia de un anticuerpo monoclonal contra HA1 conjugado con peroxidasa (CIGB Sancti-Spiritus). HA*: extracto de PTS de semillas transgénicas T1 I-13 conservado a -20 °C durante cinco años; **4, 28 y 37:** semillas almacenadas durante cinco años a diferentes temperaturas (T=4; T=28; T=37); MP: Marcador de Peso Molecular Proteína de gama amplia (Promega, USA); CNp: mezcla de extractos de PTS de semillas no transgénicas almacenadas durante cinco años a T=4; T=28; T=37, usadas como control negativo. Las flechas indican una banda que se corresponde en talla con la proteína HA (aprox. 65kDa).

Artículos

Tabla 1. Germinación de las semillas de *N. tabacum* cv. BHmN almacenadas durante cinco años en diferentes temperaturas.

Tratamientos	% Germinación (día 6)	% Germinación (día 12)
Semillas de plantas CNr	96	100
Semillas de planas CN (4°C)	90	95
Semillas de planas CN (28°C)	92	97
Semillas de planas CN (37°C)	90	93
Semillas transgénicas (4°C)	83	95
Semillas transgénicas (28°C)	89	100
Semillas transgénicas (37°C)	72	91

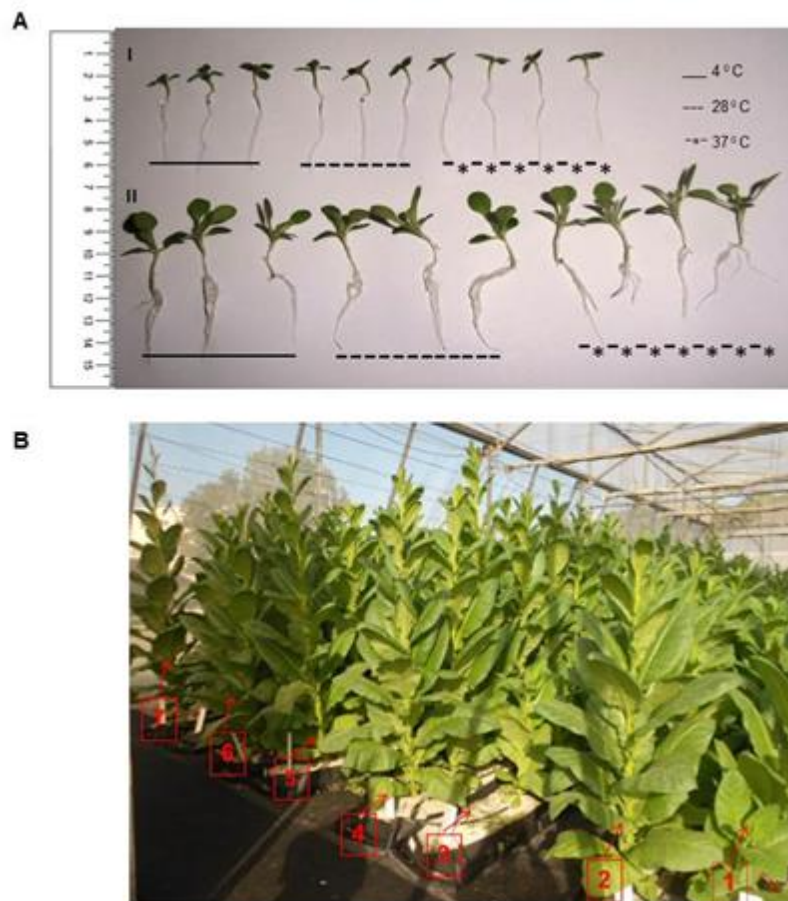


Figura 3. A: representación de germinados doce días post-siembra de las semillas de *N. tabacum* cv. BHmN almacenadas durante cinco años en diferentes temperaturas. I: obtención de plantas a partir de semillas transgénicas T1 1-13 almacenadas a T=4; T=28; T=37. II: obtención de plantas a partir de semillas no transgénicas almacenadas y germinadas bajo las mismas condiciones que las semillas transgénicas. B: plantas de *Nicotiana tabacum* cv. BHmN de tres meses de crecidas a partir de semillas almacenadas durante cinco años a diferentes temperaturas. 1, 2 y 3: plantas transgénicas obtenidas de semillas almacenadas que expresan la hemaglutinina aviar (de derecha a izquierda T=37, T=28 y T=4 respectivamente); 4, 5 y 6: plantas obtenidas a partir de semillas no transgénicas almacenadas (de derecha a izquierda T=37, T=28 y T=4 respectivamente); 7: plantas obtenidas a partir de semillas no transgénicas recién cosechadas. Las flechas indican el inicio de cada cantero.

Artículos

Tabla 2. Comparación de la variable altura entre los grupos de plantas transgénicas y no transgénicas en cada temperatura (T) de almacenamiento. Se representa el promedio de la altura (h) medida en centímetros a los doce días post-germinado. Se seleccionaron 20 réplicas en cada temperatura para cada grupo de plantas. S.D: representa la desviación estándar de cada grupo. El análisis de los datos con la prueba t de Student mostró diferencias estadísticamente significativas (diferentes letras) entre los grupos de plantas para $p < 0.0001$.

Grupos de Plantas	h (T=4)	h (T=28)	h (T=37)	S.D
Transgénicas (T)	1.38 ^a	1.33 ^a	1.35 ^a	0.15927
No transgénicas	2.91 ^b	2.82 ^b	2.88 ^b	0.16223

Tabla 3. Producción de semillas de la línea I-13 generación T4 en casa de cultivos protegido.

Plantas sembradas	Plantas con semilla	Rendimiento promedio	Total semillas
150	140	6.25	876

Discusión

Diversas especies de plantas se han utilizado para producir antígenos contra la influenza en semillas. Tal es el caso, de la nucleoproteína de la cepa H3N2 producida en semillas de maíz a niveles de 70 microgramos/gramo de semillas (Nahampun et al., 2015) y la HA producida en semillas de *N. tabacum* con niveles de acumulación superiores al 0.5% de PTS (Phan et al., 2014). En cambio, los 3 mg de HA por gramo de semillas de T1 I-13 obtenidos por Ceballos et al. (2017) continúa siendo el valor más alto informado para esta proteína producida en plantas. Este elevado nivel de expresión está en concordancia con los obtenidos para otras proteínas cuando utilizaron la combinación de promotor de β -faseolina, UTR y terminador de la proteína arcelina de frijol (Hernández et al., 2013; Hernández et al., 2015; Häkkinen et al., 2018).

Uno de los mayores beneficios de la producción de proteínas terapéuticas en semillas es la posibilidad de almacenarlas de forma activa durante largos períodos de tiempo (Fiedler & Conrad, 1995; da Cunha et al., 2019; Leite et al., 2019).

Nuestros resultados demostraron que las semillas T1 I-13 almacenadas durante cinco años mantuvieron niveles de HA semejantes a la HA*, independientemente de las diferentes temperaturas de almacenamiento. Estos datos tienen gran importancia práctica, pues permiten acumular la biomasa para su uso posterior en caso de una emergencia relacionada con la gripe aviar. Estudios similares con relación a las proteínas recombinantes en semillas han demostrado que estas se mantienen estables durante años bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Un ejemplo lo constituye la expresión de los multímeros de FLAG (proteína de la seda de la araña) acumulados en semillas de tabaco T1 durante un año, no afectando la concentración ni la estructura multimérica (Weichert et al., 2016). El fragmento de anticuerpo (scFv) en semillas de tabaco también se mantuvo estable durante un año (Fiedler & Conrad, 1995; Phillips et al., 1997). Asimismo, semillas de soja transgénica productoras del antígeno FanC y almacenadas por más de cuatro años a temperatura ambiente, no revelaron pérdidas detectables del antígeno (Oakes et al., 2009). La proteína endógena de semillas de

almendra, amandina, también se mantuvo estable durante diez años de almacenamiento aproximadamente (Su et al., 2017).

Por otra parte, la germinación de semillas no modificadas genéticamente almacenadas durante años ha sido ampliamente documentada en la literatura (Sano et al., 2020; Solberg et al., 2020). Se conoce, por ejemplo, que las especies de *Nicotiana* pueden mantener su capacidad de germinación durante diez años (Agacka et al., 2013). Según Lee et al. (2010), las semillas de tabaco mantienen su vigor y viabilidad mientras sus enzimas antioxidantes permanezcan activas. Sin embargo, semillas transgénicas de tabaco (F18 y VT2eB) mostraron retardo en la germinación con respecto a las semillas no transgénicas, justificándose por la interferencia del ADN exógeno en la germinación al modificar la maduración de la semilla (Onelli et al., 2017). Estos efectos también se apreciaron en las semillas T1 I-13 guardadas durante cinco años, las cuales mostraron, al inicio, un retraso en la germinación similar al informado por Depicker et al. (2005) para semillas transgénicas de *Arabidopsis*. Otro factor que puede incidir en la germinación es la temperatura de almacenamiento. En este sentido, la germinación de semillas T1 I-13 no se vio afectada en ninguna de las temperaturas probadas, siendo de 100 % en 28 °C a los doce días, superior con respecto a 4 y 37 °C (Tabla 1). En el caso de las semillas de *C. alata* almacenadas a bajas temperaturas (5 y 15 °C) también mantienen una germinación aproximadamente de 90% (Valverde-Rodríguez et al., 2019). Asimismo, semillas de *H. luteynii* tuvieron una alta germinación y viabilidad hasta los doce meses de almacenamiento a 10 °C (Uyaguari et al., 2019). Por tales razones pudiéramos deducir que la temperatura de almacenamiento de las semillas no tuvo relevancia en la germinación de estas especies. Un estudio de los patrones de expresión de proteínas de semillas de dos genotipos de trigo guardados durante diez años permitió concluir que la tolerancia de las semillas al almacenamiento se incrementa si éstas presentan una capacidad mayor para: (1) activar el sistema de defensa y prevenir el daño oxidativo;

(2) utilizar proteínas de almacenamiento para la germinación; (3) mantener el metabolismo energético para el suministro de energético (Chen et al., 2018).

Desde la década de los años 80, los sistemas de expresión basados en plantas han sido utilizados para el desarrollo de biofarmacéuticos, ya sea para humanos o para aplicaciones veterinarias, debido a las ventajas que ofrecen sobre los sistemas convencionales (Daniell et al., 2021). Las semillas específicamente, podrían ser una opción para la producción de vacunas o anticuerpos terapéuticos. Por tales razones, contar con un sistema de producción de plantas de tabaco bajo condiciones de cultivo confinado en el CIGB, permitiría sembrar tabaco durante todo el año (Mendoza et al., 2011) y obtener cantidades suficientes de biomasa de semillas productoras de HA. La densidad de siembra de 5 plantas/m², en un sustrato inerte (zeolita), admitiría la siembra de 6600 plantas dos veces al año y una cosecha anual de aproximadamente 79 kg de semillas. En el caso específico de semillas productoras de HA, se pudieran almacenar en este órgano anualmente hasta 306,6 gramos de antígeno. Por otra parte, si las plantas además desarrollan hijos a partir de las yemas axilares que produzcan semillas, tendríamos mayores rendimientos. Tal como sucedió para las 15 plantas altas productoras de semillas (hasta 23 g) obtenidas en este estudio, una práctica agronómica que puede ser incorporada con vistas a incrementar la producción de semillas por planta. Además, la siembra debería realizarse en los meses más fríos en Cuba, puesto que los en los períodos más cálidos se exacerbaban los patógenos de plantas que inciden negativamente en los rendimientos de las cosechas.

Otra estrategia para aumentar los rendimientos sería el empleo de variedades de *N. tabacum* productoras de mayor número de semillas. La producción en cv. BHmN se estima aproximadamente en 0,6–1,1 t/ha (Patel et al., 1998; Usta, 2005), sin embargo, plantas de cv. Solari mostraron una productividad significativamente superior, de hasta 4,5 t/ha (Grisan et al., 2016).

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el dominio extracelular de la proteína HA del VIA H5N1 se mantuvo estable en las semillas de *N. tabacum* cv. BHmN durante cinco años, independientemente de la temperatura de almacenamiento. Estos datos resaltan la posible utilidad de las semillas como fuente de reserva de hemaglutininas para su uso en candidatos vacunales y como parte de sistemas diagnósticos en la detección de animales enfermos ante una pandemia de Influenza aviar.

Referencias

- Agacka M, Depta A, Börner M, Doroszewska T, Hay FR, Börner A (2013) Viability of *Nicotiana* spp. seeds stored under ambient temperature. *Seed Science and Technology* 41 (3):474-478.
- Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2020) Recent advances in understanding catalysis of protein folding by molecular chaperones. *FEBS Letters*.
- Ceballo Y, Lopez A, Tiel K, Hernandez A (2018) Plant-Produced Avian Influenza Antigens. In: *Prospects of Plant-Based Vaccines in Veterinary Medicine*. Springer, pp 189-208.
- Ceballo Y, Tiel K, López A, Cabrera G, Pérez M, Ramos O, Rosabal Y, Montero C, Menassa R, Depicker A (2017) High accumulation in tobacco seeds of hemagglutinin antigen from avian (H5N1) influenza. *Transgenic research* 26 (6):775-789.
- Conley AJ, Zhu H, Le LC, Jevnikar AM, Lee BH, Brandle JE, Menassa R (2011) Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis. *Plant biotechnology journal* 9 (4):434-444.
- Chan HT, Daniell H (2015) Plant-made oral vaccines against human infectious diseases—are we there yet? *Plant biotechnology journal* 13 (8):1056-1070.
- Chen P, Shen Z, Ming L, Li Y, Dan W, Lou G, Peng B, Wu B, Li Y, Zhao D (2018) Genetic basis of variation in rice seed storage protein (Albumin, Globulin, Prolamin, and Glutelin) content revealed by genome-wide association analysis. *Frontiers in plant science* 9:612.
- da Cunha NB, Leite ML, Dias SC, Vianna GR, RECH FILHO E (2019) Plant genetic engineering: basic concepts and strategies for boosting the accumulation of recombinant proteins in crops. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Dai X, Xiong Y, Li N, Jian C (2019) Vaccine Types. In: *Vaccines*. IntechOpen,
- Daniell H, Jin S, Zhu XG, Gitzendanner MA, Soltis DE, Soltis PS (2021) Green giant—a tiny chloroplast genome with mighty power to produce high-value proteins: history and phylogeny. *Plant biotechnology journal* 19 (3):430-447.
- De Wilde K, De Buck S, Vanneste K, Depicker A (2013) Recombinant antibody production in *Arabidopsis* seeds triggers an unfolded protein response. *Plant physiology* 161 (2):1021-1033.
- Depicker A, Sanders M, Meyer P (2005) *Transgene silencing. Plant epigenetics* OxfordAmeslowa: Blackwell Pub:1-32.
- Dong Y, Li J, Yao N, Wang D, Liu X, Wang N, Li X, Wang F, Li H, Jiang C (2017) Seed-specific expression and analysis of recombinant anti-HER2 single-chain variable fragment (scFv-Fc) in *Arabidopsis thaliana*. *Protein Expression and Purification* 133:187-192.
- Fiedler U, Conrad U (1995) High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Bio/technology* 13 (10):1090-1093.
- Frega N, Bocci F, Conte L, Testa F (1991) Chemical composition of tobacco seeds (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of the American Oil Chemists Society* 68 (1):29-33.

- Grisan S, Polizzotto R, Raiola P, Cristiani S, Ventura F, Di Lucia F, Zuin M, Tommasini S, Morbidelli R, Damiani F (2016) Alternative use of tobacco as a sustainable crop for seed oil, biofuel, and biomass. *Agronomy for sustainable development* 36 (4):55.
- Häkkinen S, Nuutila A, Ritala A (2018) Modifying seeds to produce proteins. In: *Proteins in Food Processing*. Elsevier, pp 413-441.
- Hautefeuille C, Azzouguen B, Mouchel S, Dauphin G, Peyre M (2020) Evaluation of vaccination strategies to control an avian influenza outbreak in French poultry production networks using EVACS tool. *Preventive Veterinary Medicine* 184:105129.
- Hernández A, López-Quesada A, Ceballo-Cámara Y, Cabrera-Herrera G, Tiel-González K, Mirabal-Ortega L, Pérez-Martínez M, Pérez-Castillo R, Rosabal-Ayán Y, Ramos-González O (2015) Tobacco seeds as efficient production platform for a biologically active anti-HBsAg monoclonal antibody. *Transgenic research* 24 (5):897-909.
- Hernández A, López A, Ceballo Y, Rosabal L, Rosabal Y, Tiel K, Pérez M, González EM, Ramos O, Enríquez G (2013) High-level production and aggregation of hepatitis B surface antigen in transgenic tobacco seeds. *Biotechnol Appl* 30:97-100.
- Khan MS, Joyia FA, Mustafa G (2020) Seeds as Economical Production Platform for Recombinant Proteins. *Protein and Peptide Letters* 27 (2):89-104.
- Kim K-H, Jung Y-J, Lee Y, Park BR, Oh J, Lee Y-N, Kim M-C, Jeeva S, Kang S-M (2020) Cross protection by inactivated recombinant influenza viruses containing chimeric hemagglutinin conjugates with a conserved neuraminidase or M2 ectodomain epitope. *Virology* 550:51-60.
- Kolpe A, Schepens B, Fiers W, Saelens X (2017) M2-based influenza vaccines: recent advances and clinical potential. *Expert review of vaccines* 16 (2):123-136.
- Ladman BS, Gelb Jr J, Sauble LA, Murphy MV, Spackman E (2019) Protection afforded by avian influenza vaccination programmes consisting of a novel RNA particle and an inactivated avian influenza vaccine against a highly pathogenic avian influenza virus challenge in layer chickens up to 18 weeks post-vaccination. *Avian Pathology* 48 (4):371-381.
- Lee YP, Baek K-H, Lee H-S, Kwak S-S, Bang J-W, Kwon S-Y (2010) Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 61 (9):2499-2506.
- Leite ML, Sampaio KB, Costa FF, Franco OL, Dias SC, Cunha NB (2019) Molecular farming of antimicrobial peptides: available platforms and strategies for improving protein biosynthesis using modified virus vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 91.
- Marangon S, Capua I, Rossi E, Ferre N, Dalla Pozza M, Bonfanti L, Mannelli A (2005) The control of avian influenza in areas at risk: the Italian experience 1997–2003. *Avian influenza prevention and control Wageningen, The Netherlands: Springer*:33-39.
- Marsian J, Lomonosoff GP (2016) Molecular pharming—VLPs made in plants. *Current opinion in biotechnology* 37:201-206.
- Matoba N, Davis KR, Palmer KE (2011) Recombinant protein expression in Nicotiana. In: *Plant Chromosome Engineering*. Springer, pp 199-219.
- Mendoza O, Valdes R, Padilla S, Issac Y, Gavilan D, Lescaille Y, Avila Y, Mustelier Y, Rodriguez R, Gonzalez O (2011) Assessment of a *N. tabacum* L., variety using natural zeolite as substrate and confined conditions for consistent biomass, protein and plantibody production. *Journal of Agronomy* 10 (3):74-83.

- Mohammadi A, Niazi A, Aram F, Hassani F, Ghasemi Y (2020) Transformation of the L-Asparaginase II Gene to Potato Hairy Roots for Production of Recombinant Protein. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 23 (1):81-88.
- Müntz K (1998) Deposition of storage proteins. *Plant molecular biology* 38 (1-2):77-99.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15 (3):473-497.
- Murray-Hudson M, Wolski P, Murray-Hudson F, Brown MT, Kashe K (2014) Disaggregating hydroperiod: components of the seasonal flood pulse as drivers of plant species distribution in floodplains of a tropical wetland. *Wetlands* 34 (5):927-942.
- Nahampun HN, Bosworth B, Cunnick J, Mogler M, Wang K (2015) Expression of H3N2 nucleoprotein in maize seeds and immunogenicity in mice. *Plant cell reports* 34 (6):969-980.
- Oakes JL, Bost KL, Piller KJ (2009) Stability of a soybean seed-derived vaccine antigen following long-term storage, processing and transport in the absence of a cold chain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (13):2191-2199.
- Onelli E, Moscatelli A, Gagliardi A, Zaninelli M, Bini L, Baldi A, Caccianiga M, Reggi S, Rossi L (2017) Retarded germination of *Nicotiana tabacum* seeds following insertion of exogenous DNA mimics the seed persistent behavior. *PLoS one* 12 (12).
- Patel J, Patel B, Chakraborty M (1998) Production potential and quality aspects of tobacco seed oil. *Tobacco Res* 24:44-49.
- Phan HT, Hause B, Hause G, Arcalis E, Stoger E, Maresch D, Altmann F, Joensuu J, Conrad U (2014) Influence of elastin-like polypeptide and hydrophobin on recombinant hemagglutinin accumulations in transgenic tobacco plants. *PLoS One* 9 (6).
- Phan HT, Pham VT, Ho TT, Pham NB, Chu HH, Vu TH, Abdelwhab EM, Scheibner D, Mettenleiter TC, Hanh TX (2020) Immunization with Plant-Derived Multimeric H5 Hemagglutinins Protect Chicken against Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1. *Vaccines* 8 (4):593.
- Phillips J, Artsaenko O, Fiedler U, Horstmann C, Mock HP, Müntz K, Conrad U (1997) Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. *The EMBO Journal* 16 (15):4489-4496.
- Rage E, Marusic C, Lico C, Baschieri S, Donini M (2020) Current state-of-the-art in the use of plants for the production of recombinant vaccines against infectious bursal disease virus. *Applied Microbiology and Biotechnology*:1-10.
- Rossi L, Fusi E, Baldi G, Fogher C, Cheli F, Baldi A, Dell'Orto V (2013) Tobacco seeds by-product as protein source for piglets.
- Ruiz Y, Ramos PL, Soto J, Rodríguez M, Carlos N, Reyes A, Callard D, Sánchez Y, Pujol M, Fuentes A (2020) The M4 insulator, the TM2 matrix attachment region, and the double copy of the heavy chain gene contribute to the enhanced accumulation of the PHB-01 antibody in tobacco plants. *Transgenic Research*:1-16.
- Sano N, Rajjou L, North HM (2020) Lost in translation: Physiological roles of stored mrnas in seed germination. *Plants* 9 (3):347.
- Sedaghati B, Haddad R, Bandehpour M (2020) Transient expression of human serum albumin (HSA) in tobacco leaves. *Molecular biology reports* 47 (9):7169-7177.
- Shanmugaraj B, I Bulaon CJ, Phoolcharoen W (2020) Plant molecular farming: a viable platform for recombinant biopharmaceutical production. *Plants* 9 (7):842.
- Solberg SO, Yndgaard F, Andreasen C, Von Bothmer R, Loskutov IG, Asdal A (2020) Long-term storage and longevity of orthodox seeds: a systematic review. *Frontiers in Plant Science* 11:1007.

- Stoger E, Ma JK, Fischer R, Christou P (2005) Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Current opinion in biotechnology* 16 (2):167-173.
- Stoger E, Sack M, Fischer R, Christou P (2002) Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. *Current Opinion in Biotechnology* 13 (2):161-166.
- Su M, Liu C, Roux KH, Gradziel TM, Sathe SK (2017) Effects of processing and storage on almond (*Prunus dulcis* L.) amandin immunoreactivity. *Food Research International* 100:87-95.
- Topp E, Irwin R, McAllister T, Lessard M, Joensuu JJ, Kolotilin I, Conrad U, Stöger E, Mor T, Warzecha H (2016) The case for plant-made veterinary immunotherapeutics. *Biotechnology advances* 34 (5):597-604.
- Tremblay R, Wang D, Jevnikar AM, Ma S (2010) Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances* 28 (2):214-221.
- Urade R (2019) Oxidative protein folding in the plant endoplasmic reticulum. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 83 (5):781-793.
- Usta N (2005) Use of tobacco seed oil methyl ester in a turbocharged indirect injection diesel engine. *Biomass and bioenergy* 28 (1):77-86.
- Uyaguari CP, Jiménez J, Marín F, Palomeque X (2019) Respuesta de semillas de tres especies nativas altoandinas a diferentes condiciones de almacenamiento. *Maskana* 10 (2):64-75.
- Valverde-Rodríguez K, Morales C-O, García E-G (2019) Germinación de semillas de *Crescentia alata* (Bignoniaceae) en distintas condiciones de temperatura, luminosidad y almacenamiento. *Revista de Biología Tropical* 67 (2 SUPL):S120-S131.
- Vamvaka E, Twyman RM, Murad AM, Melnik S, Teh AYH, Arcalis E, Altmann F, Stoger E, Rech E, Ma JK (2016) Rice endosperm produces an underglycosylated and potent form of the HIV-neutralizing monoclonal antibody 2G12. *Plant biotechnology journal* 14 (1):97-108.
- Van Droogenbroeck B, Cao J, Stadlmann J, Altmann F, Colanesi S, Hillmer S, Robinson DG, Van Lerberge E, Terry N, Van Montagu M (2007) Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic *Arabidopsis* seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (4):1430-1435.
- Varasteh-Shams M, Nazarian-Firouzabadi F, Ismaili A (2020) The direct and indirect transformation methods on expressing a recombinant Dermaseptin peptide in tobacco transgenic hairy root clones. *Current Plant Biology*:100177.
- Weichert N, Hauptmann V, Helmold C, Conrad U (2016) Seed-specific expression of spider silk protein multimers causes long-term stability. *Frontiers in plant science* 7:6.
- Yang J-R, Liu M-T (2017) Human infection caused by an avian influenza A (H7N9) virus with a polybasic cleavage site in Taiwan, 2017. *J Formos Med Assoc* 116 (3):210-212.
- Zheng M, Luo J, Chen Z (2014) Development of universal influenza vaccines based on influenza virus M and NP genes. *Infection* 42 (2):251-262.

Bioremediation of lead in water by two pure microorganisms and bacteria-yeast consortium

Marisol Espinoza-C.*, Ana Victoria Selene Gómez, María Rita Valladares, Erasmo Flores, María Teresa Castañeda.

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Ciencias Básicas, Av. San Pablo No. 180, Azcapotzalco, Ciudad de México. C.P. 02200.

maesca@azc.uam.mx

Abstract

Water pollution by heavy metals continues to be a problem of environmental interest, so evaluating more efficient alternatives for their removal is of high importance. This paper presents the results obtained when applying microbial bioremediation processes through biosorption and bioaccumulation for the removal of lead in water through the use of the bacteria *Pseudomonas putida* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in pure culture, in which case the most efficient processes were applied in the bacteria-yeast consortium. The highest removals were achieved with the biosorption process, using autoclaved inactivated *Pseudomonas putida*, where a 100% removal was obtained within 24 hours, whereas with *Saccharomyces cerevisiae* inactivated in the water bath a removal of 90.23% was obtained. Subsequently, the evaluation of the microorganisms in the consortium was carried out, obtaining a lead removal of 52.11%, demonstrating that the use of pure cultures of such inactivated microorganisms is an efficient, fast, reliable and low-cost alternative, since the use of inactivated microorganisms reduces the use of culture media for their preservation.

Key words: Lead, biosorption, *Pseudomonas putida*, *Saccharomyces cerevisiae*, microbial bioremediation.

Resumen

La contaminación del agua por metales pesados, continúa siendo una problemática de interés ambiental, por lo que evaluar alternativas más eficientes para su remoción, es de gran importancia. En este artículo se presentan los resultados obtenidos al aplicar procesos de biorremediación microbiana mediante biosorción y bioacumulación para la remoción de plomo en agua mediante el uso de la bacteria *Pseudomonas putida* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en cultivos puros, en cuyo caso los procesos que resultaron más eficientes fueron aplicados en el consorcio bacteria-levadura. Las remociones más altas se alcanzaron con el proceso de biosorción, utilizando *Pseudomonas putida* inactivada en autoclave, ya que se obtuvo una remoción del 100% en 24 horas, mientras que con *Saccharomyces cerevisiae* inactivada en baño María se obtuvo una remoción del 90.23%. Posteriormente se realizó la evaluación de los microorganismos en consorcio, obteniéndose una remoción de plomo del 52.11%, demostrando que el uso de cultivos puros de dichos microorganismos inactivados son una alternativa eficiente, rápida, confiable y de bajo costo, al usar los microorganismos inactivados se reduce el uso de medios de cultivo para su preservación.

Palabras clave: Plomo, biosorción, *Pseudomonas putida*, *Saccharomyces cerevisiae*, biorremediación microbiana.

Introduction

The continuous environmental pollution by heavy metals is a problem of high importance at international level, they are chemical elements that have a density greater than 5 g/cm^3 and are not biodegradable. They are found naturally in the earth's crust at low concentrations, some of which are nutrients for flora and fauna, but at high concentrations under certain conditions can severely degrade the environment, affecting people (Caviedes et al., 2015; Shaban et al., 2016; Rigoletto et al., 2020).

Mercury (Hg), arsenic (As) and lead (Pb) are some of the most studied heavy metals due to their abundance and high toxicity to humans (Caviedes et al., 2015; Zango et al., 2020). The problems arising from them are due to their continued use in the industrial and mining sectors, as well as in the manufacturing processes of paint, pesticides, electronic products, munitions, among others, so that in some cases it is impossible to do without them. As a result of bad handling, poor practices and discharges of untreated waste, these metals are incorporated directly or indirectly into the air and soil as well as into aquifers, severely altering the environment, resulting in be one of the most important problems, because these metals are persistent and highly toxic and can be incorporated into the food chain (Uslu & Tanyol, 2006; Rodríguez, 2017).

In particular, the contamination of water by Pb causes serious health effects, since it is highly toxic, due to a blockage in the biological functions of living beings causing, in some cases, irreversible damages. Its main sources of emission to the environment are the smelting, recycling of batteries, paints and pigments, as well as the mining and electronics industry, among others (Boskabady et al., 2018). Upon entering the environment is mobilized in it being able to bioaccumulate in various species of flora and fauna, on the other hand, generates affectations in the nervous, immune, reproductive and cardiovascular systems of the human being, where the effect is proportional to the amount of metal present

in the body; Children usually have a higher absorption of Pb compared to adults. Once absorbed, most of it remains in the blood and spreads to the liver, kidney, bone marrow and central nervous system, as well as to the bones (Wani et al., 2015; Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016; Medfu et al., 2020).

Due to the innumerable cases of water contamination by heavy metals, various physicochemical techniques have been implemented for their decontamination, such as chemical precipitation, membrane filtration, ion exchange, coagulation and flocculation, among others, which are able to eliminate pollutants, but have shown some deficiencies such as high energy consumption, toxic sludge generation and high maintenance costs (Abdel-Raouf & Abdul-Raheim, 2017) reasons why other types of effective technologies based on biological decontamination have been contemplated, such as bioremediation, which has proven to be very efficient, since it allows the reduction of costs in the process and does not generate as many negative impacts on the environment (Kanamarlapudi et al., 2018).

In recent years, microbial bioremediation and biosorption/bioaccumulation processes have been considered as alternative technologies for novel, economical, efficient and ecological treatments, for the elimination of heavy metals in waste water contaminated by the industrial sector (Kanamarlapudi et al., 2018), in addition have demonstrated superior removal capacity to conventional physicochemical processes (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016). Algae, fungi and bacteria are used in microbial remediation as they are able to tolerate extreme conditions of pH, temperature and high concentrations of metals, making them viable either as active (living) or inactive (dead) biomass, for the various bioremediation processes (Ayangbenro & Babalola, 2017; Vendruscolo et al., 2017; Zango et al., 2018).

Microorganisms as biosorbents have the ability to effectively remove metal ions in the solution, in addition to reducing the concentration of ppm to ppb efficiently, therefore they are considered ideal for the treatment of complex waste water of high volume and with low concentration of

metallic ions (Covarrubias et al., 2015). Bioaccumulation is a mechanism dependent on the metabolism of the microorganism to be used, which means that biomass must be active; This process consists of a first stage, which is the surface adsorption of the metal ion in the cell wall, to be later internalized (bioaccumulated) in the cell, where the metal in some cases is reduced, thus decreasing its toxicity. This process occurs by cultivating the microorganism with the metal to be accumulated, both in the same culture medium since in this way the metabolic process of the microorganism is activated and the intracellular transport systems are activated for the accumulation of metal ions. Biosorption is a metabolically passive process, consisting of the binding of metal ions to the surface of the microorganism. It has several advantages, such as reducing the maintenance costs of microorganisms, since it is a non-invasive passive process, where microorganisms are inactivated, therefore no energy or use of culture media are required for long-term preservation, in addition to a low operational cost. In order for biosorption to be carried out, the microorganism must be suspended in the same solution containing the ions of the metal to be removed, there should be a process of incubation during a certain time so that the equilibrium is reached and biosorption begins, a surface adsorption occurs, in which the cell wall captures the ions, avoiding their availability (Soares & Soares, 2013; Gupta et al., 2016; Hansda et al., 2016; Kanamarlapudi et al., 2018; Zango et al., 2020).

Among the various microorganisms with capacity to bioremediate heavy metals, are the bacteria *Pseudomonas putida* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, among others, which have the advantage of being good biosorbents in processes of biosorption and bioaccumulation (Vimalnath & Subramanian, 2018; Massoud et al., 2019).

Pseudomonas putida

It is an aerobic bacterium, Gram negative, with short bacillus morphology, which is capable of metabolizing several organic and inorganic compounds, as well as

showing great resistance to heavy metals and organic solvents. This bacterium plays an important role in the removal processes due to its thin cell wall, as it contains a smaller amount of peptidoglycan. However, the presence of an additional outer layer composed of phospholipids and lipopolysaccharides gives this type of bacteria a negative charge, which facilitates the binding of metals. In addition, due to its reduced size the surface/volume ratio it raises, present in the microscale, which increases the amount of active sites available for absorption, being excellent for sequestering metal ions from industrial effluents (Timmis, 2002; Poblete-Castro et al., 2012; Kanamarlapudi et al., 2018; Bedoya et al., 2019). Great efficiency in the removal of heavy metals has been demonstrated, as reported by Mendoza-Hernández et al. (2010), who demonstrated that *P. putida* presents high resistance to high concentrations of As, Cr and Pb in aqueous solutions, bioaccumulating between 50 and 80 ppm of Pb.

Saccharomyces cerevisiae

Fungi are considered economic and ecological biosorbents due to their ease of cultivation and high biomass yield, among which are yeasts, that are single-celled systems. Most of the yeast biomass biosorbs a large variety of metals; in some cases, may have affinity to a single metal ion. *S. cerevisiae* biomass has ellipsoidal elongated cell morphology; is one of the most studied yeasts for the removal of contaminants, being among the best to decontaminate water, due to its great capacity for biosorption and bioaccumulation. This yeast has proved to be a good biosorbent for Cd, Co, Cr, Hg, Ni, Pb, U and Th (Labuto et al., 2014; Moreno-Rivas et al; 2018). Thippeswamy et al. (2014), reported a removal efficiency of Pb of 61%, better than that obtained by Deborah and Raj, (2016), of 59%.

In this work, the removal of Pb was evaluated using *P. putida* and *S. cerevisiae*, both in pure culture, and in yeast-bacteria consortium.

Materials and Methods

Reagents and culture media

For the preservation and development of microorganisms was used for *P. putida* agar of soybean trypticasein (AST) and broth Luria Bertani (BLB), for *S. cerevisiae* agar and broth Sabouraud dextrose (ASD and BSD, respectively), all media were acquired at Comercializadora de Materiales y Reactivos Químicos Tomasa Hernández. For digestion, nitric acid (HNO₃) and hydrochloric acid (HCl), concentrates and to prepare the synthetic water and standard solutions of Pb, lead nitrate salt (Pb(NO₃)₂) were used; All the reagents were obtained from Sigma-Aldrich.

Equipment

Automatic vertical autoclave (Lab Tech), atomic absorption spectrophotometer (GBC, Xplora model), Millipore Simplicity Smart water purification system for Milli-Q water, centrifuge (Benchmark Hermle Z206A) and HANNA potentiometer.

Microorganisms

Two different microorganisms were used in this study: *P. putida* bacteria from the culture collection of the Environmental Microbiology Laboratory of the Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco of Mexico City and the yeast *S. cerevisiae*, Saf-instant, LESAFFRE brand, freeze-dried.

Pb removal process using pure cultures

Inactivation of microorganisms

For the inactivation of *P. putida* and *S. cerevisiae*, two physical treatments were evaluated:

- Inactivation in a water bath: 3 tubes with 5 mL of the microbial culture were placed in a water bath at 85 °C for 1 hour.
- Autoclave inactivation: 3 tubes with 5 mL of the microbial culture were placed in the autoclave at 15 psi and 121 °C, for 15 minutes.

Once these treatments were completed, the efficiency of the inactivation process was determined by reseeding in Petri dishes and tubes with sterile culture media. *P. putida* was resembled in Petri dishes with AST and BLB tubes, which were incubated for a period of 24 to 48 hours at 28 °C, while *S. cerevisiae* was resembled in ASD Petri dishes and BSD tubes, which were incubated for a period of 48 to 72 hours at 28 °C. If microbial development was observed at the end of incubation, that inactivation process was ruled out. On the contrary, the lack of development demonstrated the efficiency of the inactivation process.

From the tubes containing the efficiently inactivated microorganism, duplicate smears were prepared to verify its morphology, because it is of the great importance that microorganisms retain their original morphology so that there are sites where metal ions will bind.

Parameter optimization in the removal of Pb in pure cultures

For the optimization of the parameters for the maximum removal of Pb (pH, contact time and agitation in RPM), the active and inactive biomass of each microorganism was used in pure culture to determine which of the two obtained a higher removal of Pb.

Glass bioreactors containing 7 mL of *S. cerevisiae* in BSD and 28 mL of *P. putida* in BLB were prepared, respectively, in addition to 4.2 mL of synthetic water (Pb solution in Milli-Q water at a concentration of 30 mg/L), which were rated at 70 mL with Milli-Q water, incubated at 30 °C. Table 1 shows the design of biosorption and bioaccumulation processes in bioreactors, with the parameters to be evaluated in each case.

Figure 1 shows the diagram of the 6 types of experiment in which the different values for the optimization of parameters described in Table 1 were evaluated. In each case, the concentration of Pb present in each bioreactor at the beginning and at the end of the experiment using atomic absorption spectrophotometry (EAA) in duplicate.

Artículos

Table 1. Parameters to optimize in bioreactors.

Microorganism	Process	Parameters to optimize				
		pH		Time of contact (h)	Agitation (RPM)	
<i>P. putida</i>	Biosorption	4	5	2	0	40
	Bioaccumulation	4	5	4	0	40
<i>S. cerevisiae</i>	Biosorption	4	5	6	0	40
	Bioaccumulation	4	5	8	0	40
				24		
Microbial consortium <i>(P. putida + S. cerevisiae)</i>	Once the process whose parameters remove a higher amount of the corresponding metal was identified, it was applied to the microbial consortium					

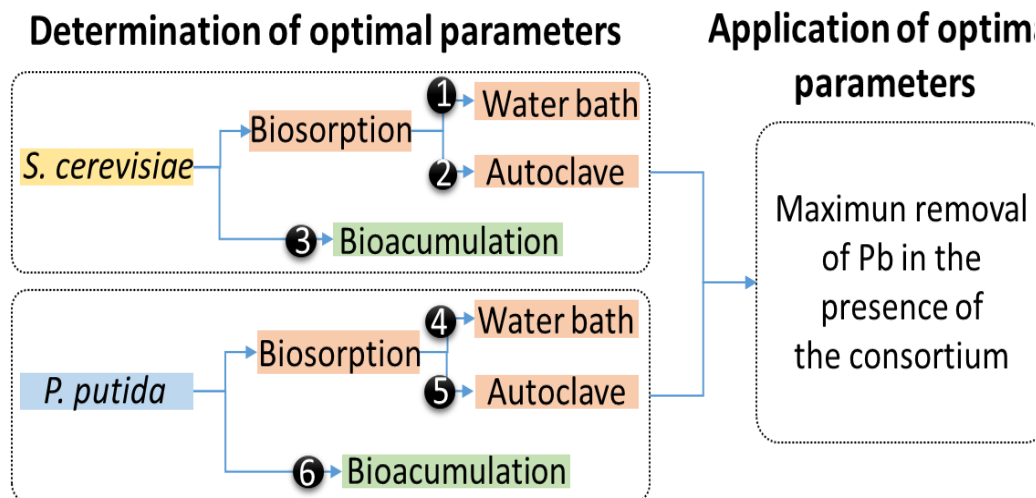


Figure 1. Illustrative diagram of the 6 experiments for optimization of parameters in biosorption and bioaccumulation processes, using pure cultures and the consortium.

All experiments were performed in triplicate. As controls, the same number of bioreactors were prepared in the absence of microorganisms.

Process of removal of Pb by the consortium

According to the results obtained during the bioaccumulation and biosorption experiments of Pb with *P. putida* and with *S. cerevisiae* in pure cultures, the most efficient process was determined for each microorganism, to test the bacteria-yeast consortium, under the same conditions, for which the corresponding bioreactors containing the metal, the sterile culture medium, synthetic water and the consortium were prepared. The experiment was performed in triplicate; As a control, 3 bioreactors were prepared in the absence of the consortium.

Determination of the remaining Pb by atomic absorption spectrophotometry

In all the processes the remaining Pb was determined by means of EAA, for which it was necessary to carry out previously a digestion process to the samples to be analyzed, to avoid possible interfering in the readings. The determination of the concentration of Pb was carried out at a wavelength (λ) of 283.3 nm, using air-acetylene flame.

Digestion of samples

This was done in autoclave, placing 25 mL of each reactor in 50 mL test tubes with screw cap, together with 1 mL of HNO₃ and 1 mL of HCl, concentrated. The tubes were placed inside the autoclave for 1 hour at 121 °C and 15 psi, once the process was completed, the tubes were allowed to cool to room temperature; The solution was subsequently filtered with Whatman filter paper No. 1 and stored at 4 °C until read.

Calibration curve of Pb

The calibration curve was obtained using standard concentrations of: 1, 5, 10, 15, 20 and 25 mg/L and a Milli-Q water target. Each determination was made in duplicate.

Determination of Remaining Pb

Once the incubation time of the Pb removal processes was finished, 25 mL of each bioreactor were taken, which were centrifuged in 50 mL to 5 G Falcon tubes for 5 min to 4 °C, to separate the microorganisms. Subsequently, the supernatant underwent the digestion process and the remaining Pb was quantified by EAA. All the samples were analyzed in duplicate.

Results and discussion

Inactivation of microorganisms

For Pseudomonas putida

It was determined that when applying the process of inactivation by water bath, the bacteria presented thermal resistance, since after being resected and incubated development was observed, so that process was discarded. With respect to autoclave inactivation, no development was observed, which confirmed that this process efficiently inactivated the bacteria.

For Saccharomyces cerevisiae

For yeast, both inactivation processes proved to be efficient, therefore both were evaluated.

Verification of microbial morphology

Figure 2A-D shows the morphology of microorganisms observed by stained smears before and after the efficient inactivation processes. Figure 2A shows the bacillary bodies of *P. putida* prior to the inactivation process; in comparison with Figure 2B for the sample obtained after the autoclave inactivation process, it is noted that the morphology of short bacilli is preserved without any alteration. Figure 2C shows the ellipsoidal morphology of *S. cerevisiae* prior to the inactivation process; in comparison with Figures 2D and 2E, no alteration in morphology is observed after treatment by water bath and autoclave, respectively.

Artículos

Calibration curve of Pb

The mean absorbance values obtained by EAA for the calibration curve of Pb are shown in Table 2, corresponding to the standards of 1, 5, 10, 15, 20 and 25 mg/L of Pb.

Using the data in Table 2, the calibration curve was constructed, which can be seen in Figure 3, where it is observed that as the concentration of Pb increases, the absorbance increases proportionally, with a correlation coefficient of 0.9997.

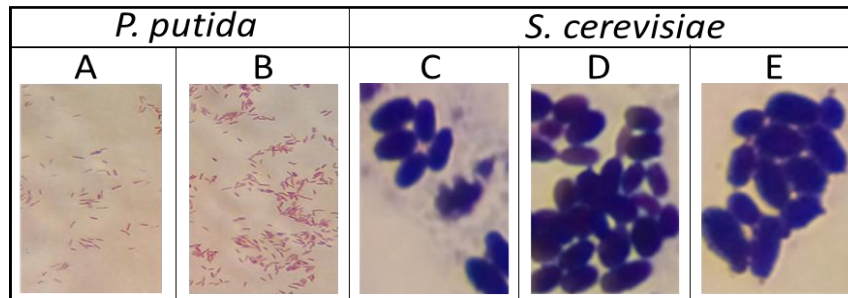


Figure 2. Comparison of the morphology of microorganisms before and after inactivation processes: *P. putida* before inactivation (A) and after inactivation in autoclave (B). *S. cerevisiae* before inactivation (C) and after inactivation in water bath (D) and autoclave (E), not in scale.

Table 2. Absorbance obtained for the different standards of Pb.

Standard	Concentration (mg/L)	Absorbance
1	1	0.004 0.002
2	5	0.021 0.003
3	10	0.041 0.002
4	15	0.062 0,000
5	20	0.083 0.001
6	25	0.102 0.003

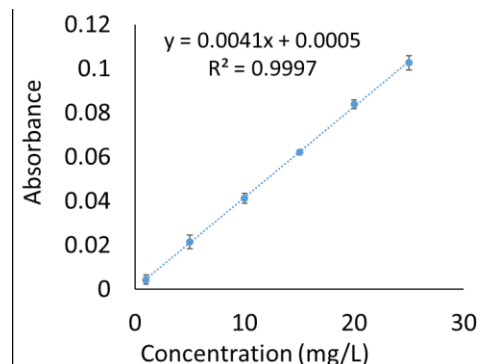


Figure 3. Calibration curve obtained for Pb by atomic absorption spectrophotometry.

This curve served as the basis for determining the concentration of remaining Pb.

Optimal parameters for maximum removal of Pb in pure cultures

The experimentally determined optimal parameters were pH of 5, constant agitation of 40 RPM, incubation period of 24 h to 30 °C and a concentration of *P. putida* of 36.18×10^8 CFU/mL and 48×10^8 CFU/mL of *S. cerevisiae*, which were applied in the processes of removal of Pb in pure crops and in the consortium.

Determination of the remaining Pb

Bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*

Figure 4 presents the results obtained during the Pb removal experiments, where it can be observed that at the beginning of the interaction between the yeast and the metal, there is immediately a removal of the same by biosorption. Later, at 24 hours, it is observed that the yeast also bioaccumulated Pb, decreasing the concentration of the metal to 5.942 ± 0.377 mg/L.

Table 3 shows the concentrations of Pb at the beginning and end for bioaccumulation process. In the process it was observed that when the yeast was added, there was immediately a decrease in

the concentration of Pb at the beginning of the experiment, which increased at 24 hours, the removal percentages is 43.63%.

Biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*

Figure 5A presents the results obtained for the evaluation of the removal process with *S. cerevisiae* inactivated in autoclave, observing an initial Pb concentration of 12.657 ± 0.153 in the bioreactor, which at 24 hours decreased to 3.227 ± 0.072 mg/L. On the other hand, in Figure 5B, when the inactivation of the yeast was in the water bath, a final concentration of 1.029 ± 0.330 was observed in the bioreactor.

In the biosorption process in which the inactivation of *S. cerevisiae* was by autoclave, a lower percentage of Pb removal was obtained (69.38%), it can be observed that using *S. cerevisiae* inactivated by heating in a water bath, a greater removal of Pb was obtained, since from the beginning the concentration was reduced to 3.988 mg/L and at the end of the 24 hours it decreased even more, reaching 1.029 mg/L of Pb in the bioreactor, which resulted in a removal of Pb of 90.23%. The removal percentages are shown in table 4.

Table 3. Concentration of Pb present in the bioreactor at the beginning and at the end of bioaccumulation processes.

Bioaccumulation process	Pb concentration (mg/L)		Percentage removals
	Start	Final	
Control	12.657 ± 0.153	10.541 ± 0.117	43.63%
Experiment	9.033 ± 0.438	5.942 ± 0.377	

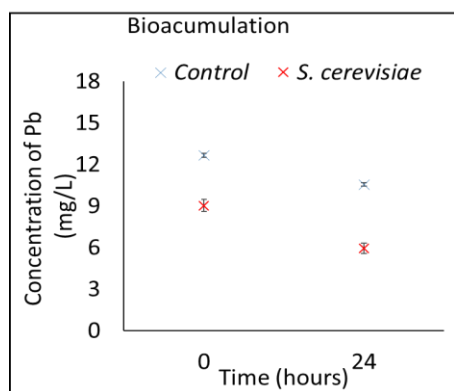


Figure 4. Results obtained by atomic absorption spectrophotometry for the bioaccumulation process of Pb by *S. cerevisiae* (red) and for the corresponding control (blue).

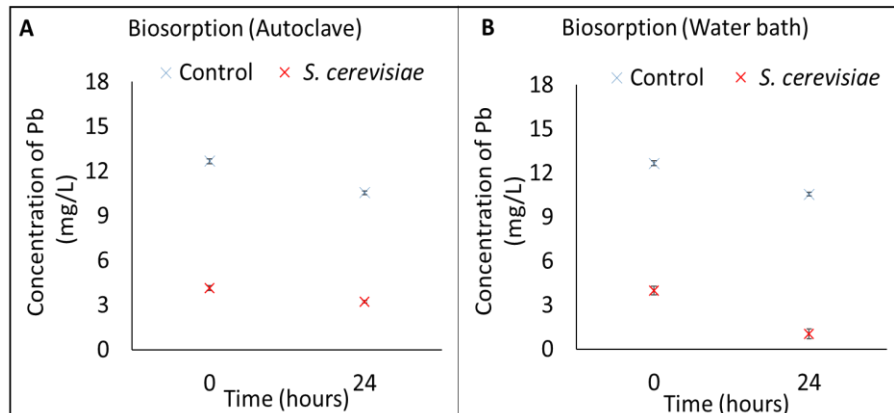


Figure 5. Results obtained by atomic absorption spectrophotometry for the biosorption process using *S. cerevisiae* (red) and its respective controls (blue), in which the yeast has been inactivated by autoclave (A) and by heating in a water bath (B).

Table 4. Concentration of Pb present in the bioreactor at the beginning and at the end of biosorption processes, and percentage of removal by *S. cerevisiae*.

Biosorption process		Pb concentration (mg/L)		Percentage removals
		Start	Final	
Inactivation by autoclave	Control	12.657 ± 0.153	10.541 ± 0.117	69.38%
	Experiment	4.144 ± 0.173	3.227 ± 0.072	
Inactivation in water bath	Control	12.657 ± 0.153	10.541 ± 0.117	90.23%
	Experiment	3.988 ± 0.308	1.029 ± 0.330	

Based on these results, to evaluate the removal of Pb by the bacteria-yeast consortium, the biosorption process was carried out, inactivating the yeast in water bath.

Determination of the remaining Pb

Bioaccumulation by *Pseudomonas putida*

Figure 6 shows the concentrations of Pb obtained in bioreactors at baseline and after 24 hours. At the initial time of the bioaccumulation process, a decrease in the concentration of Pb is observed immediately that the bacteria (red) has been added with respect to the control (blue), but at 24 h the concentration increased (red), which is

because the bacteria in the first few hours bioaccumulated Pb, but during the incubation time the bacteria did not tolerate the toxicity of this metal and released a part of what had already bioaccumulated at the beginning.

Biosorption by *Pseudomonas putida*

Because the autoclave inactivation process was the only efficient process for the bacterium, it was applied for evaluation in the biosorption process. In Figure 7 it can be observed that *P. putida* has high efficiency in the removal of Pb, since at the beginning of the experiment the concentration of Pb (red) with respect to the control (blue) decreases considerably, at the end of 24 hours of incubation, the bacterium was able to completely remove Pb.

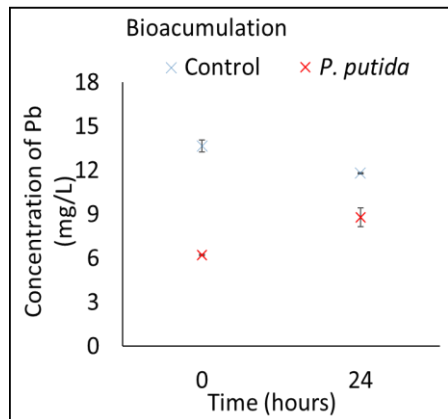


Figure 6. Results of atomic absorption spectrophotometry for the removal of Pb by bioaccumulation by *P. putida* (red) and corresponding control (blue).

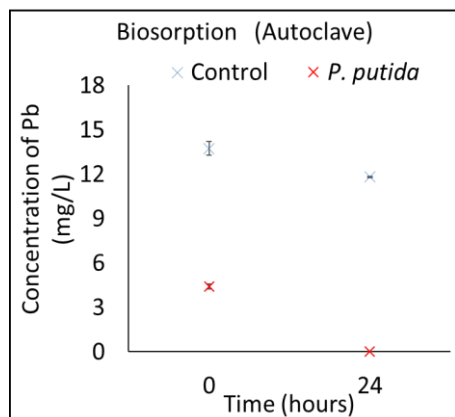


Figure 7. Results of atomic absorption spectrophotometry for the removal of Pb by *P. putida* by biosorption, inactivating this bacterium in an autoclave.

Table 5 shows the concentrations obtained in bioreactors at the beginning and at the end of the incubation time, as well as the percentage of Pb removed by *P. putida* for bioaccumulation and biosorption processes by inactivating the bacteria in autoclave. In both cases it can be observed that immediately when the bacteria are in contact with Pb, there is a decrease in the concentration of the metal. In the bioaccumulation process, the toxicity of the metal caused there to be no removal of the metal, as at 24 hours the bacteria released a large amount of the metal that had been biosorbed at the beginning of the process. With respect to the biosorption process, the bacterium was able to remove Pb in its entirety.

Based on these results it was determined that the efficiency in the removal of Pb using autoclaved inactivated *P. putida* is fully efficient, since it managed to remove 100% of the metal in 24 hours. This is because the bacteria are able to retain the metal in its cell wall, eliminating the availability of metal in water. Therefore, the process of biosorption with *P. putida* inactivated in autoclave is considered for use in the consortium.

Since the biosorption process inactivating *P. putida* by autoclave sterilization and *S. cerevisiae* by water bath heating were highly efficient for the removal

Artículos

of Pb, the performance of the consortium was evaluated using these conditions in the biosorption process.

Identification of remaining Pb in a biosorption process by the consortium

Figure 8 shows the comparison of the concentrations of Pb in the bioreactor at the beginning and at the end of the removal process by the consortium, observing that at the beginning of the process there is a

decrease in the concentration of Pb (red) with respect to the control (blue), which further decreases after 24 hours of incubation.

Table 6 shows the concentrations of Pb present in the bioreactor at the beginning and at the end of the removal process by the consortium, as well as the percentage of Pb removed, corresponding to 52.11%, which is a smaller percentage than that obtained during biosorption processes using each microorganism in pure culture.

Table 5. Pb concentration in the bioreactor at the beginning and at the end of bioaccumulation and biosorption processes and percentage of *P. putida* removal.

Process		Concentration (mg/L)			Percentage removals
		Home	Final		
Bioaccumulation	Control	13.646 ± 0.407	11.801 ± 0.042	There was no removal	
	Experiment	6.223 ± 0.049	8.804 ± 0.639		
Biosorption Inactivation by autoclave	Control	13.744 ± 0.477	11.818 ± 0.045	100%	
	Experiment	4.412 ± 0.186	0		

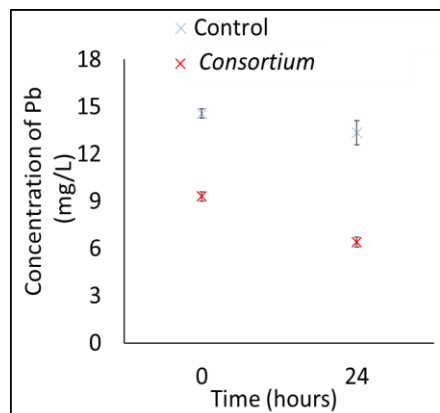


Figure 8. Results of atomic absorption spectrophotometry for the removal of Pb by the consortium through a biosorption process.

Table 6. Concentration of Pb present in the bioreactor at the beginning and end of the biosorption process with the consortium, as well as the percentage of removal.

Biosorption process	Concentration (mg/L)		Percentage removal
	Home	Final	
Control	14.558 ± 0.304	13.345 ± 0.760	52.11%
Consortium	9.288 ± 0.278	6.390 ± 0.325	

Conclusions

In this work, the efficiency in the removal of Pb in a synthetic water was compared, using pure cultures of *P. putida* bacteria and *S. cerevisiae* yeast, as well as the yeast-bacteria consortium.

By applying and comparing Pb removal processes by bioaccumulation and biosorption using *P. putida* (36.18×10^8 CFU/mL), the bacterium was found to be more efficient through the biosorption process when inactivated in autoclave, as 100% of the metal was removed in 24 hours at pH 5, with constant stirring of 40 RPM, incubating at 30 °C. As for the use of yeast *S. cerevisiae* (48×10^8 CFU/mL), through the process of biosorption inactivated by heating in the water bath, it was possible to remove 90.23% of the Pb present in the solution, under the same incubation conditions as the bacterium, which favored that they could be applied in a consortium, which, far from expected, proved to be less efficient, since a removal percentage of 52.11% was obtained, which is significantly less than removed using microorganisms in pure culture.

With the above it is shown that the microbial bioremediation through a biosorption process using pure cultures of *P. putida* and *S. cerevisiae*, can be a great alternative for the removal of Pb present in water, in addition to the fact that the use of inactive microorganisms for the union of metal ions greatly reduces the costs of

maintaining them, since they do not require nutrients, at the same time it is a non-invasive process which represents being a great alternative.

Acknowledgment

A.V.S. thanks to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the support provided through the scholarship 634392.

References

- Abdel-Raouf MS, Abdul-Raheim ARM (2017) Removal of heavy metals from industrial waste water by biomass-based materials: a review. *J. Pollut. Eff. Cont.* 05(01):180. <https://doi.org/10.4172/2375-4397.1000180>.
- Ayangbenro AS, Babalola O (2017) A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14(1):94. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>.
- Beltrán-Pineda ME, Gómez-Rodríguez AM (2016) Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 12(2):172–197. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>.

- Boskabady M, Marefati N, Farkhondeh T, Shakeri F, Farshbaf A, Boskabady MH (2018) The effect of environmental lead exposure on human health and the contribution of inflammatory mechanisms, a review. *Environ. Int.* 120:404–420. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.013>.
- Caviedes DI, Muñoz RA, Gualtero AP, Rodríguez D, Sandoval IJ (2015) Tratamientos para la remoción de metales pesados comúnmente presentes en aguas residuales industriales. *Revista Ingeniería y Región* 13(1): 73–90. <https://doi.org/10.25054/22161325.710>.
- Covarrubias SA, García JA, Peña JJ (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria* 25(NE-3):40–45. <https://doi.org/10.15174/au.2015.907>.
- Deborah S, Raj JS (2016) Bioremediation of heavy metals from distilleries effluent using microbes. *J. Appl. Adv. Res.* 1(2):23–28. <http://dx.doi.org/10.21839/jaar.2016.v1i2.21>.
- Gupta A, Joia J, Sood A, Sood R, Sidhu C, Kaur G (2016) Microbes as potential tool for remediation of heavy metals: a review. *J. Microb. Biochem. Technol.* 20168: 364–372. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000310>.
- Hansda A, Kumar V, Anshumali (2016). A comparative review towards potential of microbial cells for heavy metal removal with emphasis on biosorption and bioaccumulation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2117-1>.
- Kanamarlapudi SLRK, Chintalpudi VK, Muddada S (2018) Application of biosorption for removal of heavy metals from wastewater. In: *Biosorption*. Derco J and Vrana B (eds). IntechOpen, United Kingdom. pp. 69-116. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.77315>.
- Labuto, G., Trama, B., Castro da Silveira, G., de Souza, B., Vitorino, F. y Collazo, R. (2014). Metals uptake by live yeast and heat-modified yeast residue. *Ambiente y Agua* 66,17–35: <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1577>.
- Massoud R, Rasoul HM, Khosravi K, Hamzehlou P (2019) Bioremediation of heavy metals in food industry: Application of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electron. J. Biotechnol.* 37:56–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.003>.
- Medfu TM, Zewdu SF, Iniyehu IA. (2020). Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. *Cogent Food Agric.* 6(01):1–19. <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1783174>.
- Mendoza-Hernández JC, Perea VYS, Pretelin VC, Silveti LÁ, Martínez GMA, Pérez OG, Espinosa AB, Arriola MJ (2010) Biosorción de cromo, arsénico y plomo de soluciones acuosas por cultivos bacterianos en suspensión. *Rev. Latinoam. Ambient. Cienc.* 1(2):67–73. http://cmas.siu.buap.mx/portal_pprd/work/sites/rlac/resources/LocalContent/24/1/Mendoza-Hernandez.pdf.
- Poblete-Castro I, Becker J, Dohnt K, Martins V, Wittmann C (2012) Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 2279–2290. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3928-0>.
- Rigoletto M, Calza P, Gaggero E, Malandrino M, Fabbri D (2020) Bioremediation methods for the recovery of lead-contaminated soils: a review. *Appl. Sci.* 10(10):3528. <https://doi.org/10.3390/app10103528>.
- Rodríguez HD (2017) Intoxicación ocupacional por metales pesados. *Revista Médica de Santiago de Cuba* 21(12):3372–3385. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192017001200012.
- Shaban NS, Abdou KA, Hassan NE-HY (2016) Impact of toxic heavy metals and pesticide residues in herbal products. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* 5(1):102–106. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.10.001>.
- Soares EV, Soares HM (2013) Cleanup of industrial effluents containing heavy metals: a new opportunity of valorising the biomass produced by brewing industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(15): 6667–6675. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5063-y>.

Artículos

- Thippeswamy B, Shivakumar C, Krishnappa M (2014) Study on heavy metals biosorption ability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Biol. Res.* 2(2): 106–115. <https://doi.org/10.14419/ijbr.v2i2.2921>.
- Timmis K (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ. Microbiol.* 4(12): 779–781. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00365.x>.
- Uslu G, Tanyol M (2006) Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto *Pseudomonas putida*: Effect of temperature. *J. Hazard. Mater.* 135(1-3):87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.11.029>.
- Vendruscolo F, da Rocha G, Antoniosi N (2017) Biosorption of hexavalent chromium by microorganisms. *Int. Biodeter. Biodegr.* 119:87–95. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.008>.
- Vimalnath S, Subramanian S (2018) Studies on the biosorption of Pb(II) ions using *Pseudomonas putida*. *Sep. Sci. Technol.* 53(16): 2550–2562. <https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1464025>.
- Wani AL, Ara A, Usmani JA (2015) Lead toxicity: a review. *Interdiscip. Toxicol.* 8(2): 55–64. <https://doi.org/10.1515/intox-2015-0009>.
- Zango UU, Ahluwalia SS, Sharma AK (2018) Microbial Consortium of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* and *Paenibacillus dendritiformis* in the bioremoval of cadmium. *International Journal of Pharmaceutical Research* 10(3): 230–238. <https://doi.org/10.31838/ijpr/2018.10.03.077>.
- Zango UU, Yadav M, Sharma V, Sharma JK, Panwar S, Dan S, Sharma AK (2020) Microbial Bioremediation of Heavy Metals: Emerging Trends and Recent Advances. *Res. J. Biotech.* 15(1): 164–178.

Proceso continuo con reciclo: cultivos de alta densidad celular

María Cristina Rubio* y Antonieta Gordillo

Instituto de Biotecnología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.
Universidad Nacional de Tucumán. 4000. Tucumán. Argentina.

m1rubio25@hotmail.com; maria.rubio@fbqf.unt.edu.ar

Resumen

Una de las áreas de investigación más importantes de la biotecnología es la ingeniería genética y productos de valor agregado. Para que un producto sea competitivo económicamente es necesario desarrollar procesos que permitan altas concentraciones celulares; evitar la inhibición por sustrato y reducir aquellas debida al producto. El diseño de sistemas de fermentación que permiten una elevada productividad y alta concentración celular es utilizando un proceso continuo con reciclo o recirculación celular. El objetivo de este trabajo es efectuar una revisión de los cultivos de alta densidad celular, el funcionamiento del proceso continuo con reciclo y las investigaciones en las diferentes áreas de la biotecnología, a fin de concientizar su aplicación a nivel industrial.

Palabras clave: Alta densidad celular; proceso fermentativo; reciclo; recirculación de células.

Abstract

One of the most important areas of biotechnology research is genetic engineering and high-speed production processes, in order to obtain high volumetric productivity in value-added products. For a product to be economically competitive it is necessary to develop processes that allow high cellular concentrations; avoid substrate inhibition and reduce those due to the product. The design of fermentation systems that allow high productivity and high cellular concentration is using a continuous process with cell recycle or recirculation. The objective of this work is to carry out a review of high cell density crops, the functioning of the continuous process with recycling and research in the different areas of biotechnology, in order to raise awareness of their application at the industrial level.

Key words: High cellular density; fermentation process; recycle; cell recirculation.

Introducción

Los procesos fermentativos se realizan en bioreactores que pueden operar en forma discontinua; semicontinua o continua, los cuales utilizan diferentes sistemas de cultivos, sea en superficie o sumergidos. Dentro de estos procesos se pueden utilizar células libres o inmovilizadas para las reacciones de transformación química, la cual es un área de gran interés debido a sus grandes posibilidades industriales (Moreno García et al., 2018; Hutchinson et al., 2019). Los bioreactores pueden ser columnas de relleno, provistos de sistemas de agitación, de lecho fijo o reactores de lecho fluidizado. Los criterios que se toman

en cuenta para la selección y formas de operación se basan en las siguientes dificultades: • Retener a los microorganismos en el interior del reactor. • Reutilizar las células. • Mantener la actividad de los microorganismos durante largos periodos de operación. • Evitar la formación de espumas • Controlar el proceso global mediante los fenómenos de transferencia. • Disminuir los efectos electrostáticos.

En un reactor que opera en discontinuo, la productividad volumétrica (masa de producto/vol. x tiempo) del sistema es mucho menor respecto a los reactores de procesos continuos. Las ventajas que tienen los procesos convencionales, es que la inversión y la complejidad del sistema es

menor (Martos, 2011; Barba & Clausell Terol, 2014; Lindskog, 2017; Nieto Taype et al., 2020). Una de las áreas más importantes de la biotecnología por sus potenciales descubrimientos son la ingeniería genética y reactores con elevada velocidad de producción. Por ello, a fin de obtener condiciones de trabajo óptimas para los microorganismos se han estudiado e investigado nuevos sistemas de fermentación, con los cuales se pueda obtener altas productividades. Debido que este parámetro es directamente proporcional a la concentración de células, es sustancial trabajar con cultivos de alta densidad celular (Westman & Franzén, 2015; Santos et al., 2016; Moreno García et al., 2018; Véliz Valenzuela, 2020; Malairvang et al., 2020).

La necesidad de obtener procesos competitivos a nivel económico y productivo llevó, en primer lugar, a utilizar sustratos económicos, provenientes del descarte de las industrias. Así, Los estudios realizados por Santos et al. (2016) alcanzaron altas productividades usando procesos con reciclo y alta densidad celular, en el cual *S. stipitis* pudo adaptarse a medios ricos en xilosa (residuos agroindustriales) para la producción de etanol. A su vez, Matana et al. (2013), Kang et al. (2015) y Silva et al. (2016) reportaron el uso de sustratos celulósicos y lignocelulósicos para la producción de etanol. En segundo lugar, operar con procesos de alta densidad celular. Cabe resaltar, que estos sistemas presentan complicaciones adicionales como: acumulación de productos y residuos que pueden inhibir la producción, elevadas demandas de oxígeno y sustratos, aumentos en la densidad y viscosidad del medio, por ser altamente concentrados (Tao, 2011; Lindskog, 2017; Malairvang et al., 2020). Durante los últimos 30 años se han desarrollado numerosos algoritmos de estimación y control para bioprocesos, siendo una referencia los aportes realizados por Bastin & Douchain (1990). Sin embargo, el desarrollo de algoritmos específicos para procesos de alta densidad, con las restricciones que estos implican, es aún poco explorado. Es de interés el desarrollo de este tipo de controles para su aplicación en la producción de bioplásticos, biogases y otros procesos similares donde los puntos de operación óptimos no son conocidos con exactitud debido a la incertidumbre existente respecto a la biota del proceso y la impureza

de los sustratos (Wright et al., 2014; Jamilis, 2016; Lindskog, 2017).

El objetivo de este trabajo es efectuar una revisión de los cultivos de alta densidad celular, el funcionamiento del proceso continuo con reciclo y las investigaciones en las diferentes áreas de la biotecnología, a fin de concientizar su aplicación a nivel industrial.

Reactores continuos de tanque agitado con recirculación celular

El desarrollo creciente y acelerado de la economía moderna, impone nuevos retos a los países solicitando competitividad e implementación de tecnologías de alta eficiencia que permitan reducir costos e incrementar la productividad de los procesos. Dentro de los métodos empleados frecuentemente, el reciclo o recirculación de células es seleccionado con respecto al proceso fed batch o lote alimentado y al uso de células inmovilizadas, debido que ambos presentan elevado costo para el control del proceso y dificultades para mantener las condiciones de operación, especialmente en la inmovilización, se plantean problemas de transferencia de oxígeno adecuadas para la actividad celular (Martos, 2011; Barba & Clausell Terol, 2014; Hutchinson et al., 2019).

Las industrias de bioprocesos que operan en continuo son: la producción de etanol, levadura de panificación y algunas reacciones de conversión de sustrato a producto mediante sistemas enzimáticos (Westman & Franzén, 2015; Lindskog et al., 2017; Malairvang et al., 2020). En un reactor homogéneo y agitado, la corriente de medio o flujo de salida tiene la misma composición que el medio que se encuentra en el reactor. Estos se conocen como reactores de mezcla perfecta mediante las siglas CSTR (continuous stirred-tank reactor), es decir reactor de tanque agitado continuo (Barba & Clausell Terol, 2014; Kang et al., 2015; Jamilis, 2016; Lindskog et al., 2017; Nieto Taype, 2020).

En un proceso continuo, donde la velocidad del flujo de alimentación (FS_0) y la de salida del reactor son iguales (FS_r), continuos y constantes, la productividad del sistema se calcula como se indica en la ecuación 1:

$$P_v = [P] D \quad (1)$$

Donde P , es la concentración de producto (g/L) y D (h^{-1}), la velocidad de dilución, que se ajusta variando el caudal y se calcula midiendo el flujo (L/h) por unidad de volumen de trabajo (V) del reactor (L). Cuando el sistema continuo llega al estado estacionario, en el cual las variables son independientes del tiempo, la velocidad específica de crecimiento (μ) es igual a velocidad de dilución ($\mu=D$). Esto significa que si aumenta D , incrementa μ y por lo tanto la productividad, de acuerdo a la ecuación 1. La limitación del proceso continuo convencional, es que la velocidad de dilución (D) no se puede aumentar indefinidamente, ya que la velocidad específica de crecimiento máxima no logra alcanzar al valor de D y se produce el lavado del reactor, es decir en el flujo de salida se incrementa el número de microorganismos y la concentración de sustrato limitante llega a tener el mismo valor que el sustrato de entrada (S_0) (Martos, 2011; Kang et al., 2015; Nieto Taype et al., 2020).

Los procesos de alta densidad celular son aquellos en los cuales la concentración de microorganismos supera los 50 a 100 g/L. Los bioprocesos de baja densidad celular utilizan concentraciones menores, siendo muy usados para los estudios de investigación (Jamilis et al., 2014; Salar García, 2017; Herrera et al., 2019). En general se emplean para el modelado de procesos microbianos, formulación de medios de cultivo, estudio de factores externos sobre el desarrollo de procesos celulares, etc. (Jamilis, 2016; Ortega Quintana et al., 2017, Nieto Taype et al., 2020). La desventaja de estos procesos es la baja productividad, y los grandes volúmenes de medio que se deben procesar luego de la fermentación. Las condiciones de alta densidad celular sirven para incrementar la productividad volumétrica, es decir, para obtener mayor cantidad de biomasa o producto en un determinado volumen y tiempo (Matana et al., 2013; Tapia et al., 2013; Malairvang et al., 2020). Además, las elevadas concentraciones de biomasa que se pretende alcanzar se corresponden con una gran cantidad de sustrato que se debe consumir a lo largo del proceso.

El uso de un sistema de reciclo de microorganismos en un fermentador permite incrementar la concentración de células. De esta manera, con un aumento del catalizador biológico en el reactor se obtiene mayor

velocidad de conversión de sustrato a producto y con la recirculación o reciclo celular se trabaja con altas velocidades de dilución, lo que permite mayor flexibilidad de operación (Barba & Clausell Terol, 2014; Lindskog, 2017; Malairvang et al., 2020).

En 1961, Herbert fue el primero que reportó el diseño del proceso continuo con reciclo. Posteriormente se estudiaron varias formas de recircular células en los procesos de fermentación, ellas son: recirculación externa de la biomasa y recirculación interna de células, también llamado cultivo de perfusión (Pérez et al., 2004; Wright et al., 2014; Bohorquéz rincón & Sarmiento Higuera, 2017; Véliz Valenzuela, 2020). Pérez et al. (2004) reportaron que el equipo de separación se encuentra en el interior del reactor, las células están físicamente retenidas mediante un dispositivo mecánico, por ejemplo un filtro, por lo cual el medio libre de células se obtiene desde el interior del filtro. De esta forma, se alcanza eficiencia en el proceso sin que se elimine continuamente o se produzca la dilución de células. En este caso se pueden lograr concentraciones superiores a 107 células/mL. Debido que en este sistema el filtro se encuentra inmerso en el medio y no tiene movimiento, el inconveniente que se genera en el bioreactor es el bloqueo o taponamiento del filtro por las células que rodean al equipo. Las investigaciones de Hernández et al. (2010) reportaron que en el cultivo de perfusión de células de mamíferos, en tanque agitado, el dispositivo de retención celular es un filtro rotatorio o spinfilter. Con este sistema se logró alcanzar altas densidades de células en el seno del fermentador, trabajar a velocidades de dilución elevadas, utilizar instalaciones de pequeña capacidad y obtener altas concentraciones de producto en menor tiempo, sin que se produzcan obstrucciones en el filtro. En ambos casos de recirculación se requiere de un equipo de separación sólido-líquido por un proceso de sedimentación, centrifugación o filtración (Barba & Clausell Terol, 2014; Westman & Franzén, 2015; Lindskog, 2017).

En la Figura 1 se muestra un esquema del proceso continuo con reciclo externo de células. Este sistema consta de un recipiente que contiene al sustrato (S_0), un reactor y un separador externo de células (S_e). Es un

sistema agitado que mantiene la homogeneidad en el interior del reactor. El medio de cultivo que tiene el sustrato (S_0) ingresa al fermentador por medio de una bomba a una velocidad de flujo (F), expresado en volumen/ tiempo (L/h) y sale del bioreactor, a la misma velocidad, con un flujo de $F(1+\alpha)X_1$.

Donde S_0 , concentración de sustrato inicial; F , flujo volumétrico de alimentación; X_1 , concentración de células en un volumen (V) del reactor; μ , velocidad específica de crecimiento; X_2 , concentración de células a la salida del separador (Se).

Si se realiza un Balance de flujo del sistema (Fig. 1) y se expresa en forma matemática se obtienen las ecuaciones 2 y 3.

$$\text{Flujo que ingresa al reactor} = \text{flujo que sale del reactor} \quad (2)$$

$$F + \alpha F = F(1 + \alpha) \quad (3)$$

Reordenando la ecuación 3, se demuestra que:

$$F(1 + \alpha) = F(1 + \alpha)$$

Dónde: F , es velocidad de flujo de entrada al bioreactor; $F(1+\alpha)$, velocidad de flujo de salida; αF , velocidad de flujo de recirculación desde el separador al reactor y α , es la relación de reciclo, llamado también razón volumétrica de recirculación, que tiene valores entre $0 < \alpha < 1$.

Si se realiza el balance de células del reactor (Fig.1) y se expresa en forma matemática, se tienen las ecuaciones 4 y 5.

$$\text{velocidad de formación de células} + \text{células que regresan} - \text{células que salen} = \text{acumulación de células} \quad (4)$$

$$\mu X_1 V + \alpha F C X_1 - F(1 + \alpha) X_1 = V \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

Donde intervienen los términos, velocidad específica de crecimiento (μ); masa celular (X); factor de concentración de células (C), cuyo valor debe ser mayor a 1 ($C > 1$), acumulación o variación de células un intervalo de tiempo (dX/dt) y volumen (V) de líquido en el reactor. En la ecuación 5, no se incluyeron los términos, $F X_0$, debido que el medio de cultivo es estéril, y la velocidad de muerte de células ($\alpha X_1 V$) se desprecia al tener un valor menor frente a la masa celular activa del sistema.

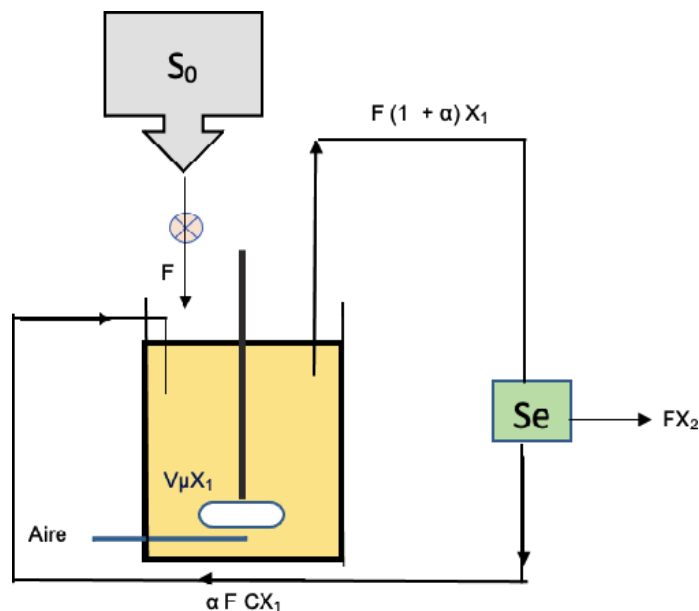


Figura 1: Esquema de un proceso continuo con recirculación de células.

Si se asume las mismas consideraciones que para un balance del proceso continuo convencional, en el estado estacionario, la variación de $dX/dt=0$. Este valor se reemplaza en la ecuación 5, se divide por V , se reordenan los términos y la ecuación queda:

$$\frac{\mu X_1 V}{V} = \frac{F(1 + \alpha)X_1}{V} - \frac{\alpha FCX_1}{V}$$

Donde la relación $F/V= D$, siendo D , velocidad de dilución cuya unidad es h^{-1} . Se reemplaza D , se simplifican los términos, X y D y se obtiene la ecuación 6:

$$\mu = D (1 + \alpha - \alpha C) \quad (6)$$

$$\mu = (1 + \alpha - \alpha C) D \quad (6)$$

De esta ecuación se concluye que $\mu < D$ a diferencia del continuo convencional donde $\mu=D$. El valor de D está incrementado por la relación de reciclo y el factor de concentración celular.

Con la ecuación 6 se puede demostrar el resultado del sistema cuando $\alpha=1$ y $C=1$ o al variar el valor de ellos. A modo de ejemplo se tiene:

1. Si $\alpha=1$ y $C= 2$, se tiene que $\mu= 0$, lo que indica que no hay crecimiento celular.
2. Si $\alpha=0.5$ y $C=1$, se obtiene que $\mu= D$, no es un proceso con recirculación o reciclo celular.
3. Si $\alpha= 0.5$ y $C=2.5$, por lo tanto $\mu= D (0.25)$ indica que hay reciclo celular.

A nivel del separador (Se), también se puede realizar un balance de las células que ingresan y salen del equipo como se muestra en las ecuaciones 7 y 8:

$$\text{células que salen del separador} = \text{células que ingresan al separador} \quad (7)$$

$$\alpha FCX_1 + FX_2 = F (1 + \alpha) X_1 \quad (8)$$

Se reordenan los términos comunes de los miembros y se obtiene la ecuación 9

$$X_2 = X_1 (1 + \alpha - \alpha C) \quad \text{ó} \quad \frac{X_2}{X_1} = (1 + \alpha - \alpha C) \quad (9)$$

Esta ecuación demuestra que $X_2 < X_1$, ya que el valor de X_1 está multiplicado por la relación de reciclo y el factor de concentración.

Considerando, que la relación de la velocidad específica de crecimiento y la velocidad de dilución también es igual a los factores (ecuación 6), se pueden relacionar las variables (μ , X y D) por la ecuación 10.

$$\frac{X_2}{X_1} = \frac{\mu}{D} \quad (10)$$

Por medio de esta ecuación se determina el valor de cualquiera de las variables conociendo el valor de las otras.

En el proceso continuo con reciclo, las células vuelven al reactor como se muestra en la figura 1. Debido a esto, la concentración celular del reactor se puede controlar a través del caudal de purga de salida del equipo de separación. Previamente, la corriente de salida del flujo pasa por un equipo de separación, por ejemplo una centrífuga, sedimentador o filtro. La centrifugación es un proceso óptimo para separar organismos unicelulares pero tiene la desventaja de facilitar la contaminación de las células que regresan al bioreactor y un elevado gasto energético (Pérez et al., 2004; Lindskog, 2017). Los sedimentadores son económicos pero requieren mucho tiempo para la separación y decantación de las células. La filtración tangencial es uno de los métodos más prometedores. En este filtro, la dirección del flujo es paralela a la superficie del medio filtrante. Por lo cual, la velocidad del medio que ingresa impulsa a las células hacia la salida. Mientras que el medio líquido (filtrado)

Artículos

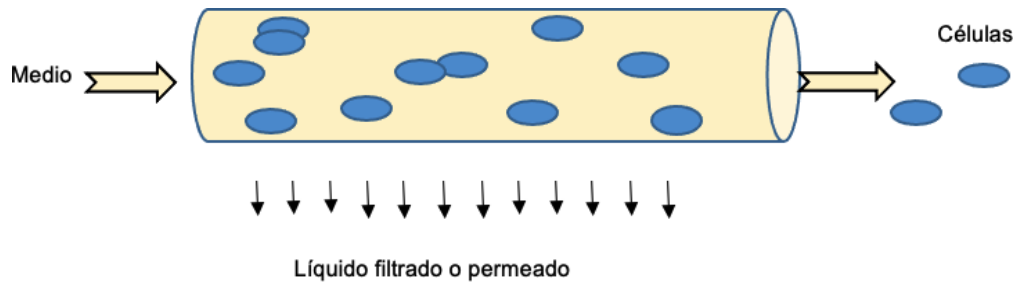


Figura 2: Mecanismo de filtración tangencial. Esquema de un tubo de membrana del filtro.

sale en forma perpendicular a través de la membrana del filtro debido a la presión del fluido (Figura 2), obteniéndose un flujo del filtrado que sale del filtro tangencial. El filtrado se recoge por conductos diferentes a las células, las cuales van acompañadas por una fracción de medio de cultivo agotado (Shen, 2014; Bohorquéz Rincón & Sarmiento Higuera, 2017).

Los filtros tangenciales permiten tiempos prolongados de operación, facilitan el retorno de los microorganismos al reactor en condiciones de asepsia y permiten la limpieza in situ.

Los filtros pueden tener diferentes tipos de membranas como las de microfiltración (con poros de 1 a 10 μm); de ultrafiltración (poros entre 0.001 a 0.05 μm) y membranas de osmosis reversa de 0.5 a 1nm. Estas últimas son usadas para retener sales para la purificación de aguas (Bohorquéz Rincón & Sarmiento Higuera, 2017).

Para este fin, existen dos tipos de membranas: anisotrópicas e isotrópicas. Esta última tiene poros uniformes por lo cual pueden retener partículas o células en el seno de su estructura que llegan a deteriorarse por contaminación microbiana. Las membranas anisotrópicas poseen dos estructuras diferentes, una muy delgada (menos de 1 μm) de alta selectividad y otra de un grosor de 20 μm a 1mm, siendo una estructura más abierta. Estas membranas no permiten el pasaje de ninguna partícula ni célula al interior de estas, por lo cual son fáciles de remover de la superficie (Bohorquéz Rincón & Sarmiento Higuera, 2017).

Las membranas pueden ser fabricadas con distintos materiales como, celulosa; nylon; polietileno; metal y cerámica.

Las exigencias para el uso de las membranas filtrantes son: 1- eficacia de separación mediante una porosidad regular y conocida; 2-elevado rendimiento de permeación y 3- elevada resistencia térmica, química y mecánica.

Actualmente se utiliza mucho la filtración tangencial con membranas de cerámica para el filtrado de vinos (Pérez de Alarcón, 2018).

Aplicaciones

Una aplicación importante es en el área industrial, donde el reciclaje de los organismos permiten la adaptación y la degradación de sustratos celulósicos para la producción de un metabolito de alto valor agregado como el etanol (Matana et al., 2013; Kang et al., 2015; Silva et al., 2016). También este sistema disminuye el efecto Crabtree, importante en la producción de biomasa para el área alimentaria (Malairvang et al., 2020). El inconveniente del uso de sustratos agroindustriales es que contienen partículas en suspensión, siendo una posible solución realizar un prefiltrado para eliminar en condiciones aerobias o anaerobias, el cual permite aumentar la velocidad de degradación del contaminante y la estabilidad del sistema. Así, en el área de medioambiente, se ha reportado el aislamiento de *Dehalococcide mccartyi*, capaz de reducir el percloroetano y

tricloroetano a eteno, el cual fue considerado como un organismo clave para biorremediar sitios contaminados con estos compuestos (Wright et al, 2014). Una desventaja que se presenta en este sistema es que con el producción de otros productos de interés. Es

decir que se puede trabajar con células mutantes o recombinantes, ya que dentro del reactor, al aumentar el número de células se restringe el espacio organismos desarrollarán más lentamente y mayor será el tiempo en el cual se pierde la información genética. En base a esto, en el área de ingeniería genética, se reportaron investigaciones para obtener altos niveles de expresión de proteínas recombinantes y en el desarrollo de virus para producir vacunas en el área de veterinaria (García et al., 2013; Tapia et al., 2016; Salar García, 2017; Ravasi, 2016; Véliz Valenzuela, 2020). Otra desventaja del reciclo, es que al incrementar el número de células, dificulta la transferencia de oxígeno en el medio cuando se realizan fermentaciones aerobias. Aprovechando este inconveniente, el sistema puede ser aplicado a células vegetales o animales debido al menor consumo de oxígeno por las células (Smelko et al., 2011).

Los estudios en investigación aplicada no solamente se recirculan las células sino también fuentes de nitrógeno, fósforo o algún nutriente indispensable para el desarrollo celular o producción de un metabolito (Pérez et al., 2004; Matana et al., 2013; Santos et al., 2016; Lindskog, 2017). Si el sustrato en un gas (CO₂; CH₄) se recicla y se usa como fuente de carbono (Martos, 2011; Barba & Clausell Terol, 2014; Lindskog, 2017; Malairvang et al., 2020).

Conclusiones

Los sistemas continuos con reciclo son una alternativa para ser aplicados en la industria a fin de mejorar la velocidad de producción de un metabolito de valor agregado, disminuir el tiempo de formación del mismo; trabajar con velocidades de dilución mayores a la velocidad específica de crecimiento máxima del organismo y aumentar la productividad del sistema. Las desventajas del sistema pueden ser utilizadas para la obtención de productos de células animales y vegetales y en la producción de virus para la elaboración de vacunas, tan requeridas actualmente.

Referencias

Bastin G & Dochain D (1990) On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors. Edt, Elsevier Science, Amsterdam.

Barba A & Clausell Terol C (2014) Reactores Químicos y Bioquímicos. Edt. Universitat Jaume

Bohorquez Rincón C & Sarmiento Higuera D (2017) Análisis del uso de bioreactores de membrana para el tratamiento de aguas residuales y posible implementación en Colombia. Tesis de grado. Facultad de Ingeniería. Universidad Católica de Colombia.

García J, Santaio Z, Zomalocarregui L, Quintana M, González D, Furrázola G, Cruz D (2013) Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Vacci Monito* 22: 30-39.

Herbert D (1961) Continuous culture of microorganisms. Edt. Soc. Chem. Ind. Monog. 12 London, pp. 21.

Hernández M, González A, Bouza J, Mayo O, Kulich E, Riera G (2010) Modelación preliminar de cultivo en perfusión de células de mamíferos en tanque agitado con spinfilter como dispositivo de retención. *Biotecnol. Apl.* 27: 36-41.

Herrera J, Leon L, Torres Y, Canon N, Herrera A, Cuenca M (2019) Evaluación y selección de 23-29.

Hutchinson U, Seneto K, Boredi S, Ngongang M, du Plessis H, Booyse M, Jolly N (2019) Reusability of immobilized cells for subsequent balsamic – styled vinegar fermentations. *Ferment.* 6: 1-3 (doi: 10.3390/fermentation6040103).

Jamilis M, Garelli F, Salatul M, Mozumder I, Castañeda T, De Battista H (2014). Modeling and estimation of production rate for the production phase of non-growth-associated high cell density processes. *Biopr.. Biosy. Eng.* 38:1903-1914.

Jamilis M (2016) Modelización, monitoreo y control en Procesos para producción de bioplásticos.

Tesis doctoral en Ingeniería. Universidad nacional de La Plata. Argentina. Pp1-129. Kang K, Chung D, Kim Y, Chung B, Choi G (2015) High titer ethanol production from simultaneous saccharification and fermentation using a continuous feeding system. *Fuel* 145: 18-24.

Artículos

- Lindskog E (2017) the upstream process: Principal modes of operation. In: Biopharmaceutical Processing. Eds. Jagschies G, Lindskog E, Lacki K, Galliner P, Edt. Elsevier Ltd, USA.
- Malairvang K, Krahang M, Sukna J, Rathanapradit K, Chansart S (2020) High cell density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* with intensive multiple sequential batches together with a novel technique of Fed batch at cell level (FCB). *Process* 8: 1321.
- Martos M A (2011) Modo de operación de bioreactores. Edt. Universitaria. Universidad nacional de Misiones. Argentina. pp, 1-58.
- Matana Y, Hasunuma T, Kondo A (2013) Cell recycle batch fermentation of high solid lignocellulose using a recombinant cellulase displaying yeast strains for high yield ethanol production in consolidated bioprocessing. *Biores. Technol.* 135: 403-409.
- Moreno García J, García Martínez T, Mauricio J, Moreno J (2018) Yeast immobilization systems for alcoholic wine fermentations: Actual Tren. Future Persp. *Front. Microbiol.* 9: 241.
- Nieto Taype M, Garcia Ortega X, Albiol J, Montesinos J, Valero F (2020) Continuous cultivation as a tool toward the rational bioprocess development with *Pichia pastoris* cell factory. *Front Bioeng. Biotechnol.* 8: 632.
- Ortega Quintana F, Álvarez H, Botero Castro H (2017) Enfrentando el modelado de bioprocesos: una revisión de la metodología de modelado. *ION* 3: 73-90.
- Pérez B, Ospina S, Godoy R (2004) Cultivos de alta densidad celular por retención interna: aplicación a la fermentación continua de etanol. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 6: 25-30.
- Pérez de Alarcón L (2018) Elaboración de vinos. Edt. Síntesis S.A. pp, 1-203.
- Ravasi P (2016) Desarrollo de levaduras para la producción de proteínas recombinantes en *Corynebacterium glutamicum*. Tesis Doctoral. Fac.de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.
- Santos S, Silva de Sousa A, Rodrigues S, Tramontana R, Rulle R, Squina F, Vazrossel C, Carvalho da Costa A, Lutz Lenczak J (2016) Bioethanol production by recupered *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentation with high cell density using xylose and glucose mixture. *Biores. Technol.* 219: 319-329.
- Salar García J (2017) Desarrollo de procesos de producción de ectoínas en cultivos de alta densidad de *Chromohalobacter salexigons* DSM-3043. Tesis de Master en Química fina y molecular. Universidad de Murcia.
- Shen F (2011) Separación de biomasa y productos (ácido láctico y ácido lactobiónico) por microfiltración. Master en Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo. España.
- Silva V, Nakanishi S, Dionisio S, Rossell C, Kenezak Gonsalves A, Rocha G (2016) Using cell recycling batch fermentation to valide a setup for cellulosic ethanol production. *J Chem. Technol. Biotechnol.* 91: 1853-1859.
- Smelko J (2011) Performance of high intensity fed batch mammalian cell cultures in disposable bioreactor systems. *Biotechnol prog.* 27: 1358-134.
- Tao Y (2011) Development and implementation of a perfusión based high cell density banking process. *Biotechnol Prog.* 27: 824-829.
- Tapia F, Vazqu ez Ramirez D, Genzel Y, Rechl U (2016) Bioreactors for high cell density and continuous multi-stage cultivation: options for process intensification in cell culture based viral vaccine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:2121-2132.
- Véliz Valenzuela F (2020) Estudio del cultivo en perfusión de células PK15 para la producción de vacunas veterinarias y análisis de puntos críticos para su escalamiento. Tesis de grado. Facultad Ingeniería Civil. U de Chile.
- Westman J & Franzén C (2015) Current progress in high cell density yeast bioprocess for bioethanol production. *Biotechnol. J.* 10:1185-1195.
- Wright B, Bruninghaus M, Urabel M; Walther J, Shah N, Bae S, Jhonsont T, Yin J; Zhou W, Konstantinov K. (2014) A novel seed-train process using high density cell banking, a disposable bioreactor and perfusión technologies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 2729-2737.

Current and alternative therapeutic options for Multiple Sclerosis

N.N Valdovinos-Knolle*, E. García-Vences

Universidad Anáhuac México. Facultad de Ciencias de la Salud. Centro de Investigación en Ciencias de la Salud. Avenida Universidad Anáhuac No. 46. Colonia Lomas Anáhuac, Huixquilucan, Estado de México.

edelisa81@gmail.com

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune, chronic, inflammatory, and demyelinating disease that affects the central nervous system (CNS). It is characterized by recurrent multifocal attacks with symptoms of neurological distress. These include motor disorders such as muscle weakness, spasticity, impaired reflexes or sensory alterations such as vibration, thermalgia, pain or symptoms with cerebellar character such as ataxia and tremors, among others. Due to the nature of the disease, treatment must target the symptoms, acute relapses and the modification of the disease. Different pharmacological treatments aim to inhibit or to modulate this response to avoid substantial motor and cognitive deterioration of the patient in the early stages and an individualized approach is therefore often required. This review updates current alternative treatments for MS at a preclinical and clinical level extracted from contemporary literature.

Key words: Multiple sclerosis, glatiramer acetate, neuroinflammation, autoimmune disease, alternative treatment.

Resumen

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune, crónica, inflamatoria y desmielinizante que afecta al sistema nervioso central (SNC). Se caracteriza por ataques multifocales recurrentes con síntomas de malestar neurológico. Estos incluyen trastornos motores como debilidad muscular, espasticidad, reflejos perjudicados y alteraciones sensoriales como vibraciones, termoalgesia, dolor o síntomas de carácter cerebeloso como ataxia y temblores, entre otros. Debido a la naturaleza de la enfermedad, el tratamiento debe dirigirse a los síntomas, las recaídas agudas y la modificación de la enfermedad. Los diferentes tratamientos farmacológicos tienen como objetivo inhibir o modular esta respuesta para evitar un deterioro motor y cognitivo sustancial del paciente en las primeras etapas y, por lo tanto, a menudo se requiere un enfoque individualizado. Esta revisión actualiza los tratamientos alternativos actuales para la EM a nivel preclínico y clínico extraídos de la literatura contemporánea.

Palabras clave: Esclerosis múltiple, acetato de glatiramer, neuroinflamación, enfermedad autoinmune, tratamientos alternativos.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune, chronic, inflammatory, and demyelinating disease that affects the central nervous system (CNS) (Blevins & Martin, 2003). It is characterized by recurrent multifocal

attacks with symptoms of neurological distress, including motor disorders such as muscle weakness, spasticity, impaired reflexes or sensory conditions (such as vibrations), thermalgia, pain or symptoms with cerebellar character (such as ataxia and tremors), with variable degrees of recovery (Porrás-Betancourt et al., 2007).

In the MS there was an alteration mediated due to the abnormal presence of activated antigen-specific autoreactive TCD4 + lymphocyte clones that attack the myelin basic protein. This occurs in susceptible people without having identified what the factors are that trigger the response. The main data available is the plates of demyelination of the white matter of the CNS. These are well-defined areas with few cells and loss of myelin, relative preservation of axons and gliosis, with increased predilection for optic nerves, periventricular white matter, brainstem, cerebellum and spinal cord, which generally surround one or more blood vessels of medium caliber (Noseworthy et al., 2000).

Inflammatory cells are located around the blood vessels, with diffuse parenchymal infiltrates. These infiltrates vary in their components, depending on the state of the lesion activity, but generally contain lymphocytes and macrophages with products of the degradation of myelin in its interior. It is noted that this is more commonly found in lesions that are active. There are also areas of remyelination with precursor cells of oligodendrocytes; astrocytic infiltration producing areas of gliosis and axonal injury (Ferguson et al., 1997).

ETIOLOGY

The etiology of the disease and its evolution remains unknown. There are however various etiological hypotheses. These mainly focus on the relationship between predisposing genetic factors and a person's interaction with the environment that generate effects capable of triggering an autoimmune response in the CNS (Lagumersindez et al., 2009). For example, it has been found that when comparing monozygotic twins to dizygotic twins, the former have been recorded to have a frequency of contracting the disease up to six times more than the latter due to pre-existing genetic factors. Furthermore, it has been shown that the risk of suffering from the disease among relatives affected with MS is less than 5%, this being between 20 and 40 times higher than in the rest of the population (Lagumersindez et al., 2009).

Among the observed environmental factors is a variety of infection, of which are typically viral in nature. Some of the proposed

agents are measles virus, human herpes virus type 6 (HHV-6), Epstein Barr virus (EBV), and a variety of retroviruses. Viruses of the herpes family are notable candidates in the pathogenesis of MS due to their natural history of periodic reactivation and inactivation phases. However, at present no specific virus has been shown to be substantially responsible for the disease (Alonso et al., 2006).

Several theories try to explain the relationship these infections have with the onset of the disease. These are based mainly on microbial superantigens, holding that certain microbial peptides could have the ability to exacerbate a high number of lymphocytes, including autoreactive clones, which would pass to the CNS therefore triggering the disease. Another theory taken into consideration is that of molecular mimicry in which it is stated that during infection the activation of autoreactive TCD4 + lymphocytes as well as B lymphocytes occurs, through the antigenic determination pathway, the cross-reactivity between the generated antigens by the infectious pathogen and the autoantigens of the CNS would be the triggers of the autoimmune inflammatory reaction (De Andrés, 2003).

PHYSIOPATHOLOGY

Different mechanisms have been proposed to explain the pathogenesis of progressive MS. The first postulates that brain damage is mediated by inflammatory processes similar to those present in remitting MS, but the inflammation varies in a way that it is no longer treatable by current therapeutic strategies (Frischer et al., 2009). In the second, MS begins as an inflammatory disease but over the years, it leads to neurodegeneration when presenting chronic inflammation, both being independent processes within the body (Cardona et al., 2006). Finally, the third suggests that MS has been immediately classified as a neurodegenerative disease and its progression can be modified or aggravated by the presence of inflammation in its early stages. (Cardona et al., 2006).

The physiopathology of progressive MS involves a variety of processes. These can present as stress oxidative, mitochondrial damage, inflammation, demyelinating plaque

formation, injury in diffuse tissue, activation of microglia and alteration of ion homeostasis axonal (that will be described later) (Lassman et al., 2012). Many components of innate and adaptive immunity induce demyelination, death of oligodendrocytes and axonal or neuronal damage in patients affected with MS, the including components are cytotoxic T cells and antibodies produced against neuronal or glial antigens. Additionally, the myelin sheaths are vulnerable to non-specific products secreted by activated macrophages and microglia that generate the destruction of tissues, such as cytotoxic cytokines, excitotoxins, and reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) the cellular and molecular mechanisms of MS are represented on the figure 1. (Prineas et al., 1978; Kostic, M. et al., 2015).

Myelin destruction is widely considered to be mediated by self-reactive Th1 cells. These autoreactive cells secrete pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as IL6, IL-12, IL-1 β , IFN γ and TNF α , which attract other cells in the immune system, such as B lymphocytes, monocytes, and neutrophils from the blood circulation.

Monocytes differentiate into macrophages by action of the IFN- γ secreted by the Th1 cells polarizing them towards pro-inflammatory macrophages (M1). These M1 polarized macrophages secrete cytokines and ROS that promote apoptosis of oligodendrocytes and that together with RNS such as nitric oxide produce highly cytotoxic compounds such as peroxynitrite, which induces lipoperoxidation, thus, generating demyelination (Barthelmes et al, 2016). In the periphery of these lesions there is the activation of more B and lymphocytes in the lymph nodes, proliferating in the spleen and migrating through the circulation to the CNS (Barthelmes et al, 2016).

Mitochondrial dysfunction and oxidative stress generated by inflammatory processes, as well as the presence of divalent metal ions, catalyze the reaction through which OH is produced, these are highly toxic. According to Bolanos et al.(1997) and Smith et al. (1999) free radicals alter the normal enzymatic function of the mitochondria, in addition to generating modifications in proteins accelerating their degradation and interfering in the *de novo* synthesis of the components of

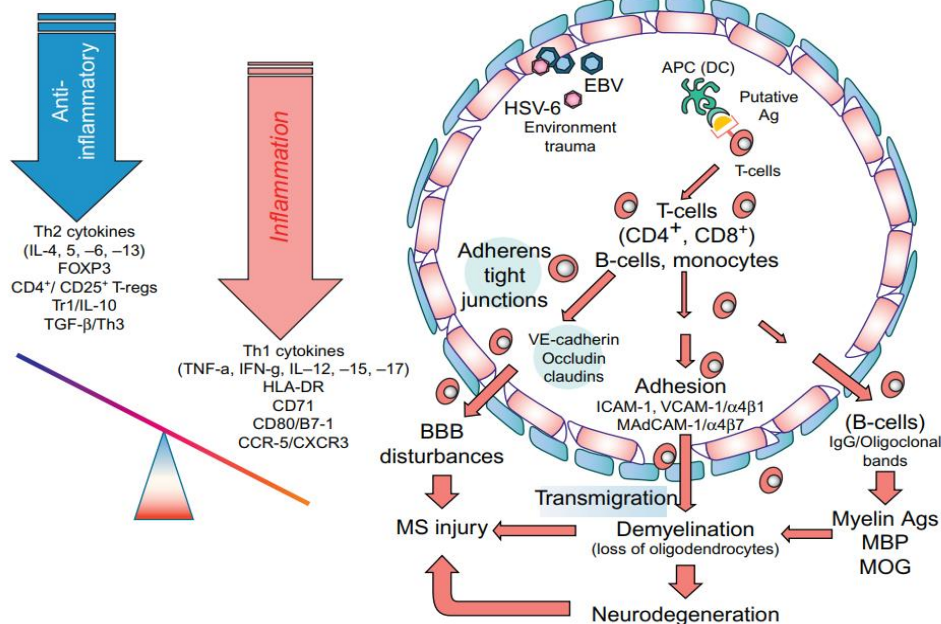


Figure 1. Proposed MS etiology by Maghzi, A.-H. et. Al. (2011), after exposure to environmental antigens myelin-sensitized autoreactive leukocytes are activated via binding of the T-cell receptor to the antigens, which is conveyed to them by antigen-presenting cells. The activated leukocytes (T cells, B cells, and macrophages) cross the BBB through the disrupted cerebral endothelial tight and adherent junctions (by disintegrating junctional complexes containing VE-cadherin, occludin, claudin, and junctional adhesion molecules). The activated leukocytes also secrete several pro- and anti-inflammatory cytokines that play regulatory roles in polarization of the peripheral environment toward inflammatory or anti-inflammatory mechanisms. Once these cells gain access to the CNS environment, they identify more autoantigens and generate and release more cytokines and autoantibodies, causing loss of myelin/oligodendrocyte complex as well as neurodegeneration.

the respiratory chain, which can lead to DNA damage. All these factors increase active lesions in MS. Oxidized lipids and DNA, as well as nitrotyrosine, are abundantly present in these. In the same way the presence of DNA and lipids in apoptotic oligodendrocytes and dystrophic axons contribute strongly to demyelination and neurodegeneration (Jomova et al., 2011).

The primary self-destructive mechanisms for the development of the pathophysiology of multiple sclerosis are: inflammation, demyelination, remyelination, neurodegeneration and formation of glial scars. These different processes are carried out in a focal or diffuse manner throughout the white matter and gray of the brain, as well as in the spinal cord (Haider et al., 2011).

1. Inflammation: inflammation is present in all stages of multiple sclerosis. Inflammatory lesions are present, consisting of perivascular and parenchymal infiltrates of neutrophils and macrophages, as well as CD8 +, CD4 + lymphocytes, and plasma or B cells or B lymphocytes (Lassman et al., 2012).

2. Alteration in sodium and potassium channels: Potassium channels are specialized structures within the membrane that separate neurons from the extracellular fluid. These channels open and close depending on electrical and chemical stimuli. When open they allow charged molecules, in this case potassium ions, to pass through them. In MS, the affected myelin exposes channels in the axon membrane that allow the loss of potassium ions, weakening the electrical current sent through the nerves, based on the physiology of the neuron and the action of the potential of action on myelinated and unmyelinated fibers (Álvarez Pinzón et al., 2018).

Sharma et al (2010) explain that in a myelinated fiber, only the areas of the axonal membrane corresponding to the nodes of Ranvier are in contact with the interstitial fluid. Virtually all sodium-potassium ion channels and pumps are concentrated in these areas. Therefore, action potentials can only be generated at the nodes and the nerve impulse then jumps from node to node, generating an acceleration in conduction. Due to the presence of a demyelinating inflammatory reaction, such as the characteristic in MS, the

physiology of the action potential is affected, where potassium plays a very important role since when performing a stimulus on the affected myelin sheath, it does not free depolarization by loss of potassium ions is allowed. This weakens the electrical current sent through the nerves and it is there that the potassium channel must be blocked to allow a better nervous stimulus that accelerates driving and reduces the difficulty of walking in patients with the disease. The recovery of brain functions is done initially by the resolution of edema, changes in pH, and the decrease in inflammation. In the long term, treatment is continued by the recovery of Na + channels. The new myelin plaques that are produced, however, are not the same as the original ones in terms of their structure. Instead, they are produced with shorter internodes and finer myelin which causes the sequelae of the disease (Carretero et al., 2001).

3. Demyelination: The destruction of myelin is widely considered to be mediated by autoreactive Th1 cells. These autoreactive cells secrete pro-inflammatory cytokines and chemokines that attract other cells of the immune system such as B lymphocytes, monocytes, and neutrophils from the bloodstream. Monocytes differentiate into macrophages by means of IFN-Gamma secreted by Th1 cells, polarizing them towards a pro-inflammatory type macrophage (M1). These macrophages secrete cytokines and reactive oxygen species that promote apoptosis of oligodendrocytes, thus generating demyelination (Barthelmes et al., 2016).

In turn, the Th2 lymphocytes secrete anti-inflammatory cytokines such as interleukin-10 (IL-10) which generates the differentiation of B lymphocytes to plasma cells, secrete specific antibodies against the basic protein of myelin, promoting its degradation and generating in turn the degradation of axons and neurons giving rise to the characteristic lesions of MS. In the periphery of these lesions there is the activation of more B and T lymphocytes within their Th1 phenotype in the lymph nodes, proliferating in the spleen and migrating through the circulation to the CNS (Barthelmes et al., 2016).

Leukocyte extravasation from the bone marrow, spleen, and lymph nodes into the circulation and subsequently to the CNS

is a process that depends on several factors, including chemokine-mediated molecular interactions between leukocytes and endothelium and their receptors. The production of chemokines by various cell types can be induced during the immune response by secreted cytokines such as TNF-alpha, IFN-Gamma and interleukin-6 (IL-6), generating leukocyte migration to the site of inflammation (Barthelmes et al., 2016).

4. Free radical production: during inflammation, neutrophils and macrophages produce ROS and RNS through a series of reactions mediated by NADPH oxidase, an enzyme complex made up of four subunits that is active in neutrophils and other mononuclear phagocytes. Specifically, in neutrophils, the enzyme is induced by zymosan (a TLR2 agonist), subsequently phosphorylation of the regulatory subunit p47 takes place. The p91 subunit, a cytochrome, generates superoxide (O_2^-), a free radical from oxygen (O_2) (Beutler, 2004).

The superoxide generated is converted to hydrogen peroxide through a reaction catalyzed by superoxide dismutase, this being a key reaction, since it allows the generation of other ROS. Among the products generated by hydrogen peroxide are halides, including hydrochloric acid, which is equivalent to the chlorine used daily. Hypochlorite can generate singlet oxygen - a high energy oxygen molecule which is extremely reactive with carbon double bonds and can react with superoxide to form the hydroxyl radical. RNS are also produced by a spontaneous reaction in which they use superoxide as a substrate, generating peroxynitrite. All the previously described molecules react with various molecular targets including lipids, proteins, and nucleic acids (Beutler, 2004).

In the specific case of MS, free radicals disrupt mitochondrial enzyme function, as well as modifying mitochondrial proteins and accelerating their degradation. Oxidative stress might also promote axonal tau phosphorylation, which has been detected in degenerating axons,94 and might explain the high levels of expression of molecules associated with endoplasmic reticulum stress (Cunnea, P., et. al., 2011). Oxidative injury is clearly associated with inflammation in RRMS lesions, but is also

pronounced in progressive MS lesions, despite low levels of inflammation. These findings suggest that oxidative stress might additionally be driven by factors other than the inflammatory process in the progressive stage of MS. (Haider, L., et. al., 2011).

DIAGNOSTIC CRITERIA

The diagnosis criteria of MS include a combination of clinical and paraclinical studies to help rule out other possible causes or injuries. The critical point to make an accurate diagnosis remains on the objective demonstration of dissemination of lesions in both time and space integrating magnetic resonance imaging (MRI) into the overall diagnosis scheme. The most well-known clinical diagnostic criteria are called McDonald's diagnostic criteria. This is where a flare is described as an episode of neurological disturbances suggestive of MS lasting more than 24 hours; these injuries can only be observed by performing a neurological examination (McDonald et al., 2001).

To be diagnosed with MS requires the existence of a T2 lesion in at least 2 of the following areas:

- Periventricular
- Juxtacortical
- Infratentorial
- Spinal cord

In patients with medullary or brainstem syndrome, symptomatic lesions are not part of the criteria and therefore should not be taken into consideration (Martinez-Altarriba et al., 2014).

MS is characterized by its great variability, whose symptoms and signs are determined by the area of the CNS affected by demyelinating lesions. According to the latest modifications of diagnosis made in 2013, it is possible to distinguish two clinical forms of presentation, relapsing-remitting disease (RRMS) and progressive disease (PMS) (Lublin et al., 2013).

About 85% of patients that present RRMS are characterized by the appearance of outbreaks of reversible neurological dysfunction that recur from time to time. Within this phenotype the isolated

neurological / demyelinating syndrome is included. This consists of a first acute episode affecting one or occasionally several areas and is the first clinical appearance form 80% of patients (Compston & Coles, 2008). Both forms can be active or not active (Lublin, 2014).

PMS is classified as primary progressive (PPMS), characterized by progressive accumulation of disability from the onset of the disease. Secondary progressive (SPMS), characterized by the progressive accumulation of disability after an initial course in outbreaks. Both forms are sub-classified, according to the level of disability in active / with progression, active / without progression, not active / with progression and not active / without progression (Lublin, 2014).

PHARMACOLOGICAL APPROACH AND TREATMENT.

Since the disease was discovered a large number of treatment options have been proposed (Figure 2), however a curative therapy has yet to be developed. There is currently a wide range of disease course modifying therapies approved by the FDA as shown in Table 1. These treatments are supplemented with the symptomatic treatment of flare-ups and clinical manifestations of the illness. Disease modifying agents aim to alter the course of the disease, decreasing the outbreak rate and the appearance of new lesions on MRI, as well as the stabilization or improvement of disability. Until now its use was only approved in the early stages of the disease (Medina Heras 2019).

Immunomodulators

Interferon-β

Interferon-β represents the first class of disease modifying therapies (DMTs) for MS that has been shown to be effective in reducing the rate of flare-ups and resonance injuries. It induces a decrease of about 30% of the outbreak rate to the 2 years of treatment (IFNB MS Study Group, 2001). It presents a favorable safety profile, being necessary for monitoring of liver enzymes and leukocyte count. There is evidence of its intervention in the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, as well as in reducing the number of inflammatory cells that pass through the Blood-brain barrier (BBB) (Mitsdoerffer & Kuchroo, 2009).

It is produced by various cell types including fibroblasts and macrophages. The mechanism of action of interferon beta is complex, involving effects at multiple levels of cellular function. It appears to directly increase expression and concentration of anti-inflammatory agents while down regulating the expression of proinflammatory cytokines exerting its biological effects by binding to specific receptors on the surface of human cells. This binding initiates a complex cascade of intracellular events that leads to the expression of numerous interferon-induced gene products and markers. These include MHC Class I, Mx protein, 2'/5'-oligoadenylate synthetase (OAS), β2-microglobulin, and neopterin (Madsen, 2017).

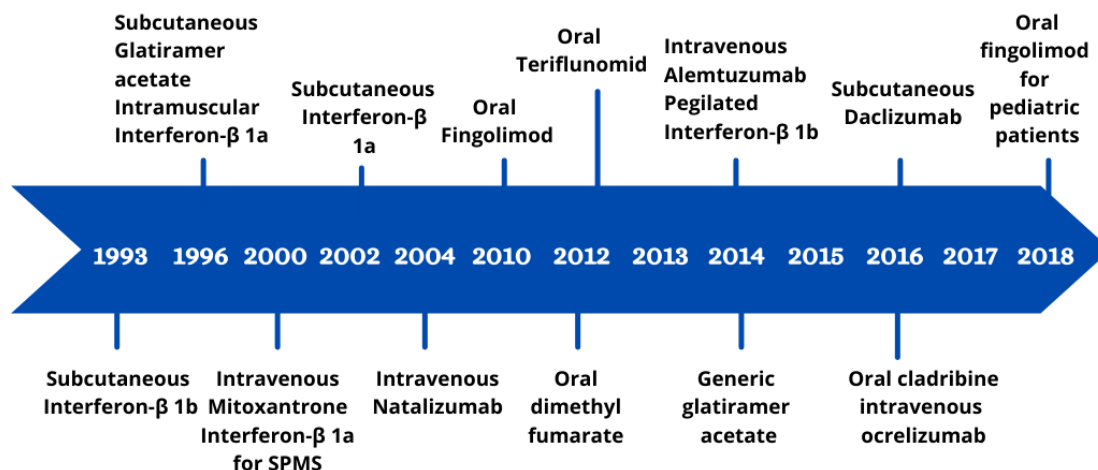


Figure 2. Temporary evolution of Multiple Sclerosis Treatments Adapted from Medina Heras S. (2019)

Artículos

Table 1. FDA approved disease modifying agents.

FDA approved Disease Modifying Agents (DMA's)			
Pharmacological agent	Molecular mechanism	Year of approval	Reference
Interferon	Effects at multiple levels of cellular function. It appears to directly increase expression and concentration of anti-inflammatory agents while down regulating the expression of proinflammatory cytokines	1993	Madsen, 2017
Glatiramer acetate	Inhibits the activation of autoreactive T cells against MBP, clones with a Th1 phenotype that are exposed to it have shown a dose-dependent inhibition as well as an increase in IFN- γ secretion, interfering with the activation of T cells	1993	Johnson et al., 1998
Mitoxantrone	Inhibits type II topoisomerase and disruption of DNA synthesis and might stimulate microglial death	2000	Li, J.M. et. al., 2012
Fingolimod	Acts on the sphingosine-1-phosphate receptor, blocks the capacity of lymphocytes to egress from lymph nodes, reducing the number of lymphocytes into the peripheral circulation to start the inflammatory cascade associated with myelin destruction	September 2010	English, C., & Aloï, J. J., 2015
Teriflunomide	Inhibits dihydro-orotate dehydrogenase, an enzyme responsible for pyrimidine synthesis of nucleic acids. Halts the production of nucleic acids needed in the proliferation of activated lymphocytes and B cells involved in the inflammatory cascade responsible for myelin destruction	September 2012	English, C., & Aloï, J. J., 2015
Dimethyl-fumarate	Reported to activate the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway that is involved in the cellular response to oxidative stress. Has protective properties for neurons and could further modulate immune response.	March 2013	English, C., & Aloï, J. J., 2015

Artículos

Alemtuzumab	Humanized monoclonal antibody that targets CD52 on lymphocytes and monocytes. It readily depletes monocytes and B and T lymphocytes, leading to long lasting changes in adaptive immunity, and reduces the pathogenesis of inflammatory response in MS	November 2014	English, C., & Aloï, J. J., 2015
Natalizumab	Humanized monoclonal antibody directed against alpha 4-integrin, a cell adhesion molecule present in the surface of monocytes and lymphocytes, blocking their binding to VCAM1 on the endothelial surface. Because of their binding, it inhibits the migration of these cells through the blood-brain barrier (BBB) to CNS, reducing its inflammation	July 2015	Sheremata et al., 2005
Ocrelizumab	Humanized anti-CD20 monoclonal antibody through antibody-dependent cell mediated cytotoxicity, antibody-dependent cellular phagocytosis, complement-dependent cytotoxicity, and apoptosis	March 2017	Syed Y. Y., 2018
Cladribine	Selectively depletes lymphocytes and has a predilection for B lymphocytes. Aside from its pro-apoptotic effects, it promotes immune tolerance and reduces immune cell infiltration into the CNS	March 2019	Jacobs, B. M., et. Al., 2018
Siponimod	Selective S1PR1 and S1PR5 modulator which causes long-lasting internalization of the S1P receptor upon binding, causing a decrease in absolute lymphocyte count.	March 2019	Goodman, A. D., Anadani, N., & Gerwitz, L., 2019

Glatiramer acetate

Cop-1 or glatiramer acetate is a synthetic polymer with an average molecular weight of 6.4 KD and an average length of 45 to 100 amino acids constituted of L-alanine, L-glutamic L-lysine, and L-tyrosine in a molar ratio of 4.2, 1.4, 3.4, and 1.0 (Bernard et al., 1992). The molecule was first synthesized in the 1960s at the Weizmann Institute of Sciences by Sela, Arnon, and Teitelbaum. Its discovery was accidental since this molecule was synthesized for the first time to study the interaction of myelin proteins and lipids that

are capable of inducing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Cop-1 was synthesized in search of the immunogenic sequence of myelin basic protein (MBP), however, rather than inducing disease, it was found to induce a protective effect in a variety of species (Arnon, 1996).

The results of the first experiments showed that the presence of EAE could be reduced from 75% to 20% in the treated animals. Cop-1 has not shown specificity in the inhibition of EAE depending on the species, since this inhibition it has been

observed in guinea pigs, rabbits, mice, monkeys, and baboons. Subsequent studies showed that the suppressive effect of Cop-1 could be transferred by lymphoid cells from mice immunized with it in syngeneic receptors (Lando et al., 1979). At first it was proposed that immunological cross-reaction mechanisms could be involved in this suppressive phenomenon, this was demonstrated at a cellular level using lymphocyte proliferation and delayed hypersensitivity techniques (Teitelbaum et al., 1997). The humoral reactivity was later demonstrated in 1991 (Teitelbaum et al., 1991). Due to its high polarity and hydrophilic nature, Cop-1 does not cross the blood-brain barrier. It therefore exerts its greatest immunological effects in the periphery. The nature of the random composition of the amino acids and the relatively short length of the peptide allows its binding to the major histocompatibility complex class II (MHCII). This union suggests different mechanisms of action based on experimental evidence in the EAE model and MS patients treated with the drug (Teitelbaum et al., 1991).

The pharmacodynamics of Cop-1 have been evaluated through its immunomodulatory potential, based on its effect on specific cells of the immune system that respond to MBP and other possible myelin antigens. Four molecular mechanisms identified are: competition for the binding of Cop-1 versus MBP to molecules of the major histocompatibility complex (MHC), competition for binding of the Cop-1 complex MHC versus MBP / MHC complex to the receptor of T cell, activation and induction of tolerance of specific T cells against MBP and induction of regulatory Th2 cells (Johnson et al., 1998).

The drug inhibits the activation of autoreactive T cells against MBP, clones with a Th1 phenotype that are exposed to it have shown a dose-dependent inhibition as well as an increase in IFN- γ secretion, interfering with the activation of T cells, including those of an autoimmune nature (Gran et al., 2000). However, the effect of Cop-1 on the production of ROS and RNS is limited to the effect of the cytokines produced by Th2 lymphocytes (IL10, IL4 and TGF β of the English transforming growth factor beta), for which the effect of this it is diminished on the demyelination process in its early stages (first

72 hours). In some models of spinal cord injury, the use of antioxidants has been used together with immunization with other modified neural peptides, observing a better motor recovery and neuronal preservation (Duthie et al., 1997), therefore the use of antioxidants with immunization with Cop-1 it could reduce the demyelination triggered and thereby preserve neural tissue and promote motor recovery.

Natalizumab

Natalizumab is a humanized monoclonal antibody administered intravenously that represents an important therapeutic option for the most aggressive forms of MS, natalizumab is directed against alpha 4-integrin, a cell adhesion molecule present in the surface of monocytes and lymphocytes, blocking their binding to VCAM1 on the endothelial surface (Sheremata et al., 2005). Because of their binding, it inhibits the migration of these cells through the BBB to CNS, reducing its inflammation. In clinical trials, it has shown natalizumab's effectiveness over 2 years, during which nearly half of early RRMS patients achieved no evidence of disease activity (NEDA). During year 2, nearly 75% of patients exhibited NEDA. Over 2 years, patients continued to experience significant cognitive and quality-of-life benefits. (Perumal, J. et. al., 2019).

The visible effects in clinical practice have resulted in a reduction of relapses, delay in disease progression and improvement on MRI in patients with RRMS (Fernández et al., 2015). In return, long-term exposure to Natalizumab increases the risk of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), an infection opportunistically caused by the John Cunningham virus or JC virus. This can reactivate in patients who are immunocompromised so patients taking natalizumab should undergo check-ups periodically (Rico Peñas, 2015).

Mitoxantrone

Mitoxantrone is a derivative of anthracycline that functions through inhibiting type II topoisomerase and disruption of DNA synthesis and might stimulate microglial death (Li, J.M. et. al., 2012). It is used in patients with recurrent-relapsing or secondary progressive MS, with outbreaks that present

an increased clinical activity, and a treatment administrating conventional immunomodulators does not work. Mitoxantrone is effective in reducing progression of disability and outbreak rate, however its use has been considerably restricted due to its cardiotoxicity and risk of acute leukemia (Bustamante & Sánchez, 2015).

Azathioprine

Azathioprine is a derivative of mercaptopurine. Their primary effects are focused against cells whose division is high, causing the inhibition of both cellular and humoral immunity. As an MS treatment the efficacy of this drug has been studied in a retrospective meta-analysis, showing a slight reduction in the advance of the disease after 3 years of treatment, and a reduction in outbreaks (Fernández et al., 2015).

Alternative Treatments

Plasmapheresis

Therapeutic plasma exchange apheresis (PP) is an extracorporeal blood purification technique designed to remove substances with a large molecular weight. The utility of this procedure includes the removal of antibodies, alloantibodies, immune complexes, monoclonal proteins, toxins and cytokines, and it involves the replenishment of a specific plasma factor containing 5% albumin. It is performed using a commercial continuous flow cell separator with technology based on centrifugation or transmembrane filtration (Navarro-Martínez & Cauli, 2020).

This therapy is one of the most contemporary and has been tested by Faissner et al. (2016) in patients with the chronic progressive form of the disease and with concomitant immunosuppressive therapy in order to reduce the risk of rebound effects, showing restoration on the responsiveness to IFN β therapy (Medenica et al., 1994) normalizing CD4+ counts, CD8+, HLADR antigen-bearing cells, NK, serum IFN, and the monocyte/macrophage cell population in PP responders. Unfortunately, the effect on IFN has proven to be transient, and lasts for 1 to 2 months even during the ongoing PP sessions. The beneficial effects of PP in MS patients range between 27–87% in clinical studies, and seems to depend on the number of PP sessions and the patient's characteristics.

Diet modification

Diet possibly plays an important role in MS as suggested by increased MS risk in populations with high meat and dairy consumption and suggestion of increased magnetic resonance imaging (MRI) disease activity with higher lipoproteins levels (Altowaijri et al., 2017). It is believed that diet may affect the disease by acting directly on enzymes, receptors, gene modification, vascular disease and microbiome modification, different kinds of diets have been suggested to improve the quality of life of MS patients, such as:

- Mediterranean Diet: extensively studied in cardiovascular disease, proven to have positive effects on vascular health in general. Since this diet has olive oil as its main source of fat it is suggested for MS due to the anti-inflammatory and free radical scavenger mediating a neuroprotective effect demonstrated in different animal models (Gardener et al., 2011).
- Paleolithic Diet: made popular by Dr. Terry Wahls, based on the concept that the human body is better equipped to handle a diet that might have been consumed by our ancestors (Wahls, 2014). It recommends a dietary pattern that includes a daily intake of three one-cup servings each of leafy green vegetables, sulfur containing vegetables, and intensely colored fruits and vegetables (FV). In addition, 6–12 ounces of meat and fish are recommended daily, as well as 16 ounces of fatty fish and 12 ounces of organ meat weekly. This specialized diet also excludes all dairy, gluten-containing grains, and eggs, and processed foods, added sugar, and trans-fat are to be avoided (Titcomb, T. J. et. al, 2020).
- Swank and Low-fat Diets: Dr. Roy Swank (1990, 2003) developed this diet based on the observation that MS prevalence increased in patients with high saturated fat intake. It limits the fat intake to 15 g per day and demonstrates reduced relapse rate, reduced disability progression, and improved overall survival (Wahls, T. et. al., 2018).
- McDougall Diet: it is a low-fat, plant-based diet that is based mainly on complex carbohydrates as the main

source of energy and was studied on brain MRI, clinical activity, fatigue, quality of life, metabolic biomarkers, adherence, and safety in people with relapsing-remitting MS. The diet group that was part of this experiment showed a significant reduction in fatigue, nevertheless, it did not show any effect on MS activity. (Yadav et al., 2016).

It is suggested that a combination of a good diet emphasizing intake of fruits, vegetables and legumes, and whole grains, low intakes of sugar, and red meat, and a healthy lifestyle are associated with a decrease in disability and symptoms in MS (Fitzgerald et al., 2017) as well as other holistic methods such as massages, acupuncture and meditation to improve fatigue in MS patients (Bisht et al., 2014).

Vitamins

The data regarding the relationship between antioxidant vitamins and MS is limited. It was found that low dietary intake of vitamin A, vitamin E and selenium but not of beta carotene or ascorbic acid, are associated to be a risk factor for the onset of the disease (Besler et al., 2002).

An investigation on the relevance of circulating carriers of vitamin D, vitamin D binding protein (DBP) and albumin in MS, it has been shown that the plasma level of DBP increases in patients during the remission phase (Rinaldi et al., 2015). This suggests a correlation between DBP and MS pathophysiology.

1,25(OH)D₃, the active form of vitamin D, has a dual effect on the immune system by promoting the innate system response and suppressing the adaptive immune activity. Its effect is well characterized on T-helper cells due to the fact that their proliferation and cytokine production are under regulation of 1,25(OH)D₃, and has as suppressing effect on producing inflammatory cytokines mediated by type 1 T-helper (Th1) cells (R.F. Chun et al., 2014).

The maturation of human dendritic cells (DC) can also be regulated by 1,25(OH)D₃ and the vitamin D receptor (VDR). Following exposure of differentiating human and mouse monocytes to 1,25(OH)D₃, expression of molecules

responsible for antigen capture is increased and DC differentiation and maturation is inhibited that leads to the insufficient stimulatory capacity of CD8+ T-cells specific antigen. Furthermore, the number of T-reg cells will be increased, which promotes IL-10 up-regulation from CD4+ T-cells and decreases the level of tumor necrosis factors (TNF) and in-terferons (IFN). Such molecules might influence suppression and interaction of DCs and T-cells in mice and humans (Khosravi-Largani et al., 2018).

Due to these results, it can be inferred that vitamin D supplementation can contribute to and delay the appearance of MS symptoms.

In another study, the effect of vitamin A on disease progression of 101 patients with MS was evaluated. The results show that vitamin A, administered as retinyl palmitate, suppresses the progression of upper limbs and cognitive disabilities and it seems to be valuable in suppressing neurodegenerative or inflammatory conditions of MS patients (Bitafran et al., 2015).

Omega-3 fatty acid

In MS patients, polyunsaturated fatty acid (PUFA) and antioxidant deficiencies along with a decrease on cellular antioxidant defense mechanisms have been observed, in EAE antioxidants and PUFA used as a treatment has shown a decrease in clinical signs of disease (Van Meeteren et al., 2005).

Omega-3 PUFAs are essential fatty acids, that means that mammals cannot synthesize them, but they are essential in the body to maintain health, so they are acids of fundamental intake in the human diet, found in large quantities in fish and shellfish, particularly oily fish, and in some plants such as flax seeds (Jelinek et al., 2013). There are three main Omega-3 acids. A-linolenic acid (ALA), which is the essential short-chain n-3 PUFA in the diet, and a precursor to the other two: eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (ADH) (Layé et al., 2018).

In numerous studies, the effect of Omega-3 at the inflammatory level is evaluated, considering the variation in the levels of metalloproteinases of the matrix after its administration. In 2007, GM Liuzzi et

al. observed that treatment of microglia with Omega-3 PUFA, or dose-dependent fish oil, inhibited the amounts of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) produced by lipopolysaccharide-stimulated microglia, but not the levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2).

L Shinto et al. conducted in 2009 a study in which the administration of Omega-3 through fish oil concentrate resulted in a significant 58% decrease in the levels of MMP-9 secreted in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after three months dietary supplementation while, on the other hand, there were no significant changes in terms of quality of life in patients.

On the other hand, many studies base their results on the expression levels of pro-inflammatory cytokines, such as IL or TNF, and nitric oxide (NO), directly related to T cell differentiation. The study carried out by W Kong et al. in 2011 is the first to show a significant decrease in the number of Th1 / Th17 encephalitogenic cells in the spleen and CNS of EAE mice which were fed with an ADH-enriched diet.

A recent clinical trial conducted by Kouchaki E., et. al. (2018) combined omega 3 fatty acid and vitamin D supplementation being randomized and placebo-controlled with Expanded Disability Status Scale (EDSS) score and inflammation as primary outcomes and oxidative stress biomarkers and metabolic profile as secondary outcomes showed a significant improvement in EDSS. In addition, cosupplementation resulted in a significant reduction in serum insulin, insulin resistance, and total/HDL-cholesterol, and a significant increase in insulin sensitivity and serum HDL-cholesterol concentrations proving also beneficial on overall metabolic status.

Exogenous Antioxidants; Luteolin

Flavonoids are chemical structures present in fruits, vegetables, seeds, nuts, etc. that have demonstrated antioxidant, anti-allergic, and anti-inflammatory activity (Fu et al., 2018).

Luteolin (LU) plays an important role by having antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective properties in different diseases. LU has been found to modify the levels of enzymatic antioxidants and lipid

peroxides, it also reduces the levels of glutathione peroxidase (GSH-px) and the inflammatory cytokine IL-12 in plasma or liver tissue in a liver cancer model in mice. Additionally, LU could activate erythroid-related nuclear factor 2 (Nrf2) - which is related to the expression of antioxidant genes in HepG2 cells of the hepatoma, and it has also been observed to prevent apoptosis induced by peroxidation by modulating signaling pathways associated with oxidative stress and apoptosis (Verbeek et al., 2004).

In particular, LU is a flavonoid that has shown inhibition of IL-3 secretion in basophils, as well as inhibition of the AP-1 pro-inflammatory pathway. Furthermore, it inhibits IgE-mediated secretion of histamine, leukotrienes, D2-type prostaglandins, and mast cell colony stimulating factor. Likewise, it reduces inflammation of the CNS by preventing the migration of monocytes through the BBB and can inhibit clinical symptoms of EAE, also inhibiting macrophages that phagocytose myelin, as well as the proliferation and activation of T cells. autoimmunity or differentiation to a Th2 phenotype [66, 67].

Flavonoids can be beneficial in neurodegenerative diseases because they can cross the BBB and neutralize free radicals that are involved in the pathogenesis of MS and EAE. Unique subclasses of flavonoids, flavones and flavonols, inhibit human mast cell secretion of pro-inflammatory molecules in response to triggering allergies and IL-1. The antioxidant capacity of LU to inhibit mast cell and T cell activation presents a new approach to the treatment of MS (Jacobs et al., 1986).

Epigallocatechin gallate (EGCG)

Epigallocatechin gallate (EGCG) is one of the major components of green tea. Due to its activity, it is considered a powerful antioxidant because the rings of phenol located in its structure act as electron traps and free radical scavengers, inhibiting the formation of ROS and reducing the damage caused by oxidative stress (Chu C et al., 2017).

Closer examination of its antioxidant characteristics highlights the improvement of mitochondrial function. EGCG also improves insulin resistance mediated by lipid infusion,

related to increased expression of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase (Kim HS et al., 2014).

Studies have found that EGCG benefits mice with EAE disease progression, inflammatory process, and demyelination of the SNC30 (Meng et al., 2016). Furthermore, this neuroinflammatory activity has also recently been attributed to inhibition of the release of group 1 protein from high mobility responsible for mediating injury or inflammatory stimuli (HMGB1), induced by endotoxins (Meng et al., 2016).

Generally speaking, EGCG has a large potential to lead to healthy aging by improving inflammatory disorders, morphological and functional events that occur in the brain, increase learning capacity and reduce oxidative damage lesions in the brain (Atulkumar et al., 2016).

Mesenchymal Stem Cells

Stem cells are unspecialized cells with the ability to renew themselves for long periods without significant changes in their general properties, they have the ability to differentiate into various specialized cell types under certain physiological or experimental conditions (Wei, X. et al., 2013).

Mesenchymal stem cells (MSCs) are non-hematopoietic adult stem cells with self-renewal ability, originating from the mesoderm, possess a multilineage differentiation capacity. They were isolated from bone marrow as colony forming unit fibroblast (CFU-F) by Friedenstein et al. in 1967 but they have also been isolated from other tissues such as adipose tissue, umbilical cord, fetal liver, muscle and lung. (Mansoor, S. R., Zabihi, E., & Ghasemi-Kasman, M., 2019).

The therapeutic potential of MSCs is directly associated with their differentiation capacity and paracrine effects. Furthermore, they are able to secrete different growth and trophic factors, cytokines, microRNAs, amongst others. In the specific context of treating MS, MSCs showed to be able to differentiate towards oligodendrocytes, by expressing oligodendrocyte progenitor cell (OPC) markers. A smaller percentage of cells also expressed myelin basic protein (MBP), which is a marker of mature oligodendrocyte.

A very low percentage of cells also expressed the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Ghasemi, N., 2018). The conditional medium (CM) included in the secretome derived from MSCs was able to enhance oligodendrogenesis in hippocampal neural stem cells and to support their integration into neuronal networks (Jadasz, J., et al. 2018).

Several phase 1 and 2 clinical trials have been registered, their main aim was to evaluate the safety of MSCs transplantation, however some studies have also shown improvements. A phase 1 trial confirmed the suitability and safety of autologous bone marrow MSCs (BM-MSC) intravenous transplantation in RRMS and SPMS patients. At the 6-month follow-up no severe adverse events or demonstration of disease activation were recorded. Several of these studies have reported that the main side effects presented during treatment were minor, such as fever, headaches and some infections, mostly associated to the lumbar puncture or pain at the injected site in case of intravenous administration (Gugliandolo, A., Bramanti, P., & Mazzon, E. 2020).

Due to the nature of phase 1 and 2 clinical trials it's important to confirm the efficacy of the treatment on proper clinical trials, it is also necessary to take into consideration that each study used a different cohort of patients, different cell types, different cell numbers. For this reason, it is difficult to define the optimal treatment in terms of dosage, administration conditions and cell type.

Conclusion

On behalf of the fact that several hypotheses suggest that the disease is the result of interactions between genetic factors and environmental agents, the research for preventive methods for MS has a high priority. Currently, various therapeutic strategies have focused on modulating the immune response through both pharmacological (glatiramer acetate, natalizumab, mitoxantrone, azathioprine) and non-pharmacological means (plasmapheresis, diet modification, vitamins, omega-3 fatty acid and exogenous antioxidants such as luteolin and epigallocatechin gallate) due to the lack of a

definitive cure. However, neither approach is successful in achieving substantial improvements in all MS patients due to the controversy generated by the choice of a functional and personalized treatment depending on the degree of inflammation present over time. Treating the right patient with the suitable drug soon in the initiation steps of the disease course, before disability would occur, could be accompanied with long-term positive results, a combination of these methods, in tandem with positive lifestyle habits, such as healthier eating, is recommended to increase the success of treatments and mitigate long-term symptoms of the chronic disease. There are other alternatives yet to be thoroughly explored, such as the transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) considering their ability in differentiation, migration, immune-modulation and neuroregeneration; searching for strategies to restore myelination by targeting a specific transmembrane protein of nervous system, leucine-rich repeat and immunoglobulin domain containing 1 (LINGO-1) or even consider epigenetic therapy as described by Gholamzad, M., et. al. (2018).

Referencias

- Alonso A, Olazábal EN, Martín AO (2006) Infección por virus de Epstein-Barr y esclerosis múltiple. *Rev Neurol.* 21:6-10.
- Altowaijri, G., Fryman, A., & Yadav, V. (2017). Dietary Interventions and Multiple Sclerosis. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 17(3). doi:10.1007/s11910-017-0732-3.
- Álvarez Pinzón, A., Lamarre, R., Yery L. Álvarez, Y. L. Álvarez, & Galvez, S. (2018). Revisión de la literatura: relación e importancia de los canales de potasio en esclerosis múltiple. *Revista Colombiana De Enfermería*, 8, 112-122. <https://doi.org/10.18270/rce.v8i8.551>.
- A.O. Rinaldi, I. Sanseverino, C. Purificato, et al., Increased circulating levels of vitamin D binding protein in MS patients, *Toxins (Basel)* 7 (2015) 129–137, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins7010129>.
- Arnon, R. (1996). The development of Cop 1 (Copaxone), an innovative drug for the treatment of multiple sclerosis: personal reflections. *Immunol Lett* 50, 1 – 15.
- Atulkumar N, Kalam A, Ahmed Z. (2016) Potential neuroprotective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Nutrition Journal.* 15(60):1-17.
- Barthelmes, J., Tafferner, N., Kurz, J., de Bruin, N., Parnham, M., Geisslinger, G. and Schiffmann, S. (2016). Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice and Evaluation of the Disease-dependent Distribution of Immune Cells in Various Tissues. *Journal of Visualized Experiments*, (111).
- Barthelmes J, Tafferner N, Kurz J, de Bruin N, Parnham M, Geisslinger G et al. (2016) Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice and Evaluation of the Disease-dependent Distribution of Immune Cells in Various Tissues. *Journal of Visualized Experiments.* (111).
- Bernard CCA, Mandel TE, Mackay IR. (1992) Experimental models of human autoimmune disease: overview and prototypes. In: Rose NR, Mackay IR, eds. *The autoimmune diseases* 11. San Diego: Academic Press, 47-106.
- Besler, H. T., Çomoğlu, S., & Okçu, Z. (2002). Serum Levels of Antioxidant Vitamins and Lipid Peroxidation in Multiple Sclerosis. *Nutritional Neuroscience*, 5(3), 215–220. doi:10.1080/10284150290029205.
- Beutler B. (2004) Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology.* 40(12):845-859.
- Bisht B, Darling WG, Grossmann RE, et al. (2014) A multimodal intervention for patients with secondary progressive multiple sclerosis: feasibility and effect on fatigue. *J Altern Complement Med.* 20:347–55.
- Bitarafan S., Saboor-Yaraghi A., Sahraian M.-A., et al., (2015) Impact of vitamin A supplementation on disease progression in patients with multiple sclerosis, *Arch. Iran Med.* 18 435–440.

- Blevins G, Martin R (2003) Future immunotherapies in multiple sclerosis. *Semin Neurol* 23(2): 147-58. DOI: 10.1055/s-2003-41137.
- Bolanos, J. P. et al. (1997) Nitric oxide mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implication for neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* 68, 2227–2240.
- Bustamante, R., & Sánchez, J. A. (2015). Protocolo terapéutico de las formas progresivas primarias y secundarias de la esclerosis múltiple. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(77), 4656–4660. doi:10.1016/j.med.2015.04.007.
- Cardona A E et al. (2006) Control of microglia neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* 9, 917-924.
- Carretero Ares J, Bowakim Dib W, Acebes Rey J. (2001) Actualización: esclerosis múltiple. *Medifam.*11(9).
- Chu C, Deng J, Qu Y. (2017) Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments. *BioMed Research International.* 5615647:1-9.
- Chun R.F., Liu P.T., Modlin R.L., et al., (2014)- Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis, *Front. Physiol.*-5-151. ,<http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2014.0015>
- Compston A, Coles A. (2008) Multiple sclerosis. *Lancet.* 372(9648):1502-17.
- Cunnea P, Mhaille A N, McQuaid S, Farrell M, McMahon J, and FitzGerald U(2011). Expression profiles of endoplasmic reticulum stress-related molecules in demyelinating lesions and multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 17(7), 808–818. <https://doi.org/10.1177/1352458511399114>.
- De Andrés C (2003) Interés de los brotes en la esclerosis múltiple. *Fisiopatología y tratamiento. Rev Neurol.* 36(11):1058-64.
- Domarus AvA, Farreras ValentíP1, Rozman C. (2012) *Medicina interna.* 17ª ed. Madrid [etc.]: Elsevier; 172, Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central; p.1353-1360.
- Duthie, S.J., Johnson, W. and Dobson, V.L. (1997) The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) and growth in human cells. *Mutat. Res.* 390, 141–151.
- English, C., & Aloï, J. J. (2015). New FDA-Approved Disease-Modifying Therapies for Multiple Sclerosis. *Clinical therapeutics*, 37(4), 691–715. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.03.001>.
- Faissner, S.; Nikolayczik, J.; Chan, A.; Hellwig, K.; Gold, R.; Yoon, M.S.; Haghikia, A. (2016) Plasmapheresis and immunoadsorption in patients with steroid refractory multiple sclerosis relapses. *J. Neurol.* 263, 1092.
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. (1997) Axonal Damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 20: 393-9 DOI: 10.1093/brain/120.3.393.
- Fernández O, Fernández V, Guerrero M. (2015) Tratamiento de la esclerosis múltiple. *Medicine* 11(77):4622-4633.
- Fernández, O., García-Merino, J. A., Arroyo, R., Álvarez-Cermeño, J. C., Izquierdo, G., Saiz, A., Olascoaga, J., Rodríguez-Antigüedad, A., Prieto, J. M., Oreja-Guevara, C., Hernández, M. A., Moral, E., Meca, J., & Montalbán, X. (2015). Spanish consensus on the use of natalizumab (Tysabri®)-2013. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 30(5), 302–314. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2013.10.004>
- Frischer JM et al. (2009) The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Brain* 132, 1175-1189.
- Fitzgerald, K. C., Tyry, T., Salter, A., Cofield, S. S., Cutter, G., Fox, R., & Marrie, R. A. (2017). Diet quality is associated with disability and symptom severity in multiple sclerosis. *Neurology*, 90(1), e1–e11. doi:10.1212/wnl.0000000000004768.

- Fu J, Sun H, Zhang Y, Xu W, Wang C, Fang Y et al. (2018) Neuroprotective Effects of Luteolin Against Spinal Cord Ischemia–Reperfusion Injury by Attenuation of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Journal of Medicinal Food*.21(1):13-20.
- Gardener H, Wright CB, Gu Y, et al. (2011) Mediterranean-style diet and risk of ischemic stroke, myocardial infarction, and vascular death: the Northern Manhattan Study. *Am J Clin Nutr*.94:1458–64.
- Ghasemi N. (2018). Transdifferentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells into oligodendrocyte progenitor cells. *Iranian journal of neurology*, 17(1), 24–30.
- Gholamzad, M., Ebtekar, M., Ardestani, M. S., Azimi, M., Mahmodi, Z., Mousavi, M. J., & Aslani, S. (2019). A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 68(1), 25–38. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1185-0>.
- Goodman, A. D., Anadani, N., & Gerwitz, L. (2019). Siponimod in the treatment of multiple sclerosis. *Expert opinion on investigational drugs*, 28(12), 1051–1057. <https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1676725>.
- Gran, B., Tranquill, L. R., Chen, M., Bielekova, B., Zhou, W., Dhib-Jalbut, S., & Martin, R. (2000). Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurology* 55, 1704 – 1714.
- Gugliandolo, A., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2020). Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis: Recent Evidence from Pre-Clinical to Clinical Studies. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8662. <https://doi.org/10.3390/ijms21228662>.
- Haider, L., Fischer, M. T., Frischer, J. M., Bauer, J., Höftberger, R., Botond, G., Esterbauer, H., Binder, C. J., Witztum, J. L., & Lassmann, H. (2011). Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain : a journal of neurology*, 134(Pt 7), 1914–1924. <https://doi.org/10.1093/brain/awr128>.
- Haider, L. et al. (2011) Oxidative damage and neurodegeneration in multiple sclerosis lesions. *Brain* 134, 914–924.
- Halliwell, B. (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685–716.
- IFNB Multiple Sclerosis Study Group. (2001) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo controlled trial. 1993 [classical article]. *Neurology*. 57(12 Suppl 5):S3-9.
- Jadasz, J. J., Tepe, L., Beyer, F., Samper Agrelo, I., Akkermann, R., Spitzhorn, L. S., Silva, M. E., Oreffo, R., Hartung, H. P., Prigione, A., Rivera, F. J., Adjaye, J., & Küry, P. (2018). Human mesenchymal factors induce rat hippocampal- and human neural stem cell dependent oligodendrogenesis. *Glia*, 66(1), 145–160. <https://doi.org/10.1002/glia.23233>.
- Jacobs, B. M., Ammoscato, F., Giovannoni, G., Baker, D., & Schmierer, K. (2018). Cladribine: mechanisms and mysteries in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 89(12), 1266–1271. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317411>.
- Jacobs L, Kinkel PR, Kinkel WR. (1986) Silent brain lesions in patients with isolated idiopathic optic neuritis. *Arch Neurol* 43; 452.
- Jelinek GA, Hadgkiss EJ, Weiland TJ, Pereira NG, Marck CH, van der Meer DM (2013). Association of fish consumption and omega 3 supplementation with quality of life, disability and disease activity in an international cohort of people with multiple sclerosis. *The international Journal of Neuroscience*. 123(11): 792-801.
- Jomova, K. & Valko, M. (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65–87.
- Johnson, K., Brooks, B., Cohen, J., Ford, C., Goldstein, J., Lisak, R., Myers, L., Panitch, H., Rose, J., Schiffer, R., Vollmer, T., Weiner, L. and Wolinsky, J. (1998). Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. *Neurology*, 50(3), pp.701-708.

- Khosravi-Largani, M., Pourvali-Talatappeh, P., Rousta, A. M., Karimi-Kivi, M., Noroozi, E., Mahjoob, A., ... Tavakoli-Yaraki, M. (2018). A review on potential roles of vitamins in incidence, progression, and improvement of multiple sclerosis. *eNeurologicalSci*, 10, 37–44. doi:10.1016/j.ensci.2018.01.007
- Kim HS, Quon MJ, Kim JA. (2014) New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology*. 10(2):187-95.
- Kong W, Yen J.H, Ganea D. (2011) Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation, inhibits antigen-specific Th1/Th17 differentiation and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain, Behavior, and Immunity*. 25(5): 872-82.
- Kostic, M., Stojanovic, I., Marjanovic, G., Zivkovic, N., & Cvetanovic, A. (2015). Deleterious versus protective autoimmunity in multiple sclerosis. *Cellular Immunology*, 296(2), 122–132. doi:10.1016/j.cellimm.2015.04.006
- Kouchaki, E., Afarini, M., Abolhassani, J., Mirhosseini, N., Bahmani, F., Masoud, S. A., & Asemi, Z. (2018). High-dose ω -3 Fatty Acid Plus Vitamin D3 Supplementation Affects Clinical Symptoms and Metabolic Status of Patients with Multiple Sclerosis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *The Journal of nutrition*, 148(8), 1380–1386. https://doi.org/10.1093/jn/nxy116
- Lagumersindez Denis N, Oviedo Gálvez M, and Martínez Sánchez G. (2009). Esclerosis múltiple: aspectos generales y abordaje farmacológico. *Revista Cubana de Farmacia*, 43(2).
- Lando, Z., Teitelbaum, D., & Arnon, R. (1979). Effect of cyclophosphamide on suppressor cell activity in mice unresponsive to EAE. *J Immunol* 123, 2156-2160.
- Lassmann, H., van Horssen, J. and Mahad, D. (2012). Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nature Reviews Neurology*, 8(11), pp.647-656.
- Layé S, Nadjar A, Joffre C, Bazinet RP. (2018) Anti-Inflammatory Effects of Omega-3 Fatty Acids in the Brain: Physiological Mechanisms and Relevance to Pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 70(1):12-38.
- Li, J. M., Yang, Y., Zhu, P., Zheng, F., Gong, F. L., & Mei, Y. W. (2012). Mitoxantrone exerts both cytotoxic and immunoregulatory effects on activated microglial cells. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 34(1), 36–41. https://doi.org/10.3109/08923973.2011.572890.
- Liuzzi GM, Latronico T, Rossano R, Viggiani S, Fasano A, Riccio P. (2007) Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on MMP-9 release from microglial cells-implications for complementary multiple sclerosis treatment. *Neurochemical Research*. 32(12):2184-93.
- Lublin FD. (2014) New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol*. 72 Suppl 1:1-5.
- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. (2014) Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 83(3):278-86.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 50:121--7.
- Madsen C. (2017) The innovative development in interferon beta treatments of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain and Behavior*. 7(6):e00696.
- Maghzi, A.-H., Borazanci, A., McGee, J., Steven Alexander, J., Gonzalez-Toledo, E., & Minagar, A. (2011). Multiple Sclerosis. *Neuroinflammation*, 1–23. doi:10.1016/b978-0-12-384913-7.00001-0
- Mansoor, S. R., Zabihi, E., & Ghasemi-Kasman, M. (2019). The potential use of mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis. *Life Sciences*, 116830. doi:10.1016/j.lfs.2019.116830.

- Martinez-Altarrriba MC, et al. (2014) Revisión de la esclerosis múltiple (2). Diagnóstico y tratamiento. *Semergen*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semerg.2014.07.011>.
- Medenica, R.D.; Mukerjee, S.; Huschart, T.; Corbitt, W. (1994) Interferon inhibitor factor predicting success of plasmapheresis in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Apher.* 9, 216–221.
- Medina Heras S. (2019) Estudio del mecanismo de acción de dimetil fumarato y teriflunomida en la esclerosis múltiple: búsqueda de biomarcadores predictivos de respuesta [Doctorado]. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, España, Madrid.
- Meng X, Li B, Liu S, Kang H, Zhao L, Zhou R. EGCG (2016) in Green Tea Induces Aggregation of HMGB1 Protein through Large Conformational Changes with Polarized Charge Redistribution. *Science Research.* 6(22128):1-10.
- Mitsdoerffer M, Kuchroo V. (2009) New pieces in the puzzle: how does interferon-beta really work in multiple sclerosis? *Ann Neurol.* 65(5):487-8.
- Navarro-Martínez R, Cauli O. (2020) Therapeutic Plasmapheresis with Albumin Replacement in Alzheimer's Disease and Chronic Progressive Multiple Sclerosis: A Review. *Pharmaceuticals.* 13(2):28.
- Noseworthy JH, Lucchinetti IC, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Medical Progress: Multiple sclerosis. *N Eng J Med* 343(13): 938-52 DOI: 10.1056/NEJM200009283431307.
- Perumal, J., Fox, R. J., Balabanov, R., Balcer, L. J., Galetta, S., Makh, S., Santra, S., Hotermans, C., & Lee, L. (2019). Outcomes of natalizumab treatment within 3 years of relapsing-remitting multiple sclerosis diagnosis: a prespecified 2-year interim analysis of STRIVE. *BMC neurology*, 19(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12883-019-1337-z>
- Porras-Betancourt M, Núñez-Orozco L, Plascencia-Álvarez N, Quiñones-Aguilar S and Sauri-Suárez S (2007). Esclerosis múltiple. *Rev Mex Neuroci* 8(1): 57-66.
- Prineas, J. W. & Wright, R. G. (1978) Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab. Invest.* 38, 409–421.
- Rico Peñas B. (2017) Efectividad y riesgos del tratamiento biológico con Natalizumab en esclerosis múltiple. Tesis de grado en medicina. Universidad de Valladolid.
- harma R, Fischer MT, Bauer J et ál. (2010) Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. *Acta Neuropathol (Berl)* 120: 223-236.
- Sheremata WA, Minagar A, Alexander JS, Vollmer T. (2005) The role of alpha-4 integrin in the aetiology of multiple sclerosis: current knowledge and therapeutic implications. *CNS Drugs.*19(11):909-22.
- Shinto L, Marracci G, Baldauf-Wagner S, Strehlow A, Yadav V, Stuber L, et al (2009). Omega-3 fatty acid supplementation decreases matrix metalloproteinase-9 production in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 80(2-3): 131-136.
- Smith, K. J., Kapoor, P. A. & Felts, P. A. (1999) Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol.* 9, 69–92 .
- Swank RL, Dugan BB. (1990) Effect of low saturated fat diet in early and late cases of multiple sclerosis. *Lancet.* 336:37–9.
- Swank RL, Goodwin J. (2003) Review of MS patient survival on a Swank low saturated fat diet. *Nutrition.*19:161–2.
- Syed Y. Y. (2018). Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis. *CNS drugs*, 32(9), 883–890. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0568-7>.
- Teitelbaum, D., Aharoni, R., Sela, M., & Arnon, R. (1991). Cross-reactions and specificities of monoclonal antibodies against myelin basic protein and against the synthetic copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9528 – 9532.

Artículos

- Teitelbaum, D., Arnon, R., & Sela, M. (1997). Copolymer 1: from basic research to clinical application. *Cell Mol Life Sci* 53, 24 -28.
- Titcomb, T. J., Bisht, B., Moore, D. D., 3rd, Chhonker, Y. S., Murry, D. J., Snetselaar, L. G., & Wahls, T. L. (2020). Eating Pattern and Nutritional Risks among People with Multiple Sclerosis Following a Modified Paleolithic Diet. *Nutrients*, 12(6), 1844. <https://doi.org/10.3390/nu12061844>.
- Van Meeteren, M.E.; Teunissen, C.E.; Dijkstra, C.D., and van Tol, E.A.F. (2005) Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Eur. J. Clin. Nutr.* 59:1347–1361.
- Verbeek, R., Plomp, A.C., van Tol, E.A. and van Noort, J.M. (2004) The flavones luteolin and apigenin inhibit in vitro antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. *Biochem. Pharmacol.* 68, 621–629.
- Wahls TL AE. (2014) *The Wahls protocol: how I beat progressive MS using Paleo principles and functional medicine*. New York, NY: Penguin Group.
- Wahls, T., Scott, M. O., Alshare, Z., Rubenstein, L., Darling, W., Carr, L., Smith, K., Chenard, C. A., LaRocca, N., & Snetselaar, L. (2018). Dietary approaches to treat MS-related fatigue: comparing the modified Paleolithic (Wahls Elimination) and low saturated fat (Swank) diets on perceived fatigue in persons with relapsing-remitting multiple sclerosis: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 19(1), 309. <https://doi.org/10.1186/s13063-018-2680-x>
- Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L., & Shi, Y. F. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta pharmacologica Sinica*, 34(6), 747–754. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.50>.
- Weinshenker BG, Bass B, Rice G, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, et al. (1989) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 112: 113-46.
- Yadav V MG, Kim E, et al. (2016) Low-fat, plant-based diet in multiple sclerosis: A randomized controlled trial. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 9:80–90.



www.smbb.com.mx