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

Año 2022 Volumen 26, Número 1 ISSN 0188-4786





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. Aurora Antonio Pérez 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. Isadora Martínez Arellano

Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta

Dr. Jaime Ortega López Dra. Andrea Sabido Ramos

Dra. Georgina Sandoval

Dra. Elda Patricia Segura Ceniceros Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez

Dra. María Eugenia de la Torre

Dra. Virginia Villacruz Dra. Beatriz Ruiz Villafán

Formación y edición

Pas. QA Mariana Espinoza Tapia

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 prohibe 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 | |
| Vacunas anti-COVID-19 basadas en la glicoproteína Spike del SARS-CoV-2 producida de forma recombinante: Situación actual y tecnologías de producción | |
| • | 9 |
| Actividad antimicrobiana de extractos de <i>Taraxacum officinale</i> y <i>Agave</i> lechuguilla | |
| Dulce María Carrillo Hernández y Dulce María Galván Hernández | 26 |
| Alternativas terapéuticas actuales con nanopartículas poliméricas para el tratamiento de Alzheimer y Parkinson Camila Debernardo-Hurtado, Paulo Kuribreña-Morales, Alder Ibarra-Zamora, Isaac Cervantes-DíazBarriga, Moisés Talavera-Paulin | 45 |
| Epidemiology of Dengue in Mexico and Biotechnological Solutions: A Review | |
| Eduardo Garcia-Martinez, Ahtziri Hernandez-Arce, Isabel Zamarripa-Zercovitz y Emma Herrera | 64 |

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 márgenesaplicados 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 centralde 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 paralos 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:

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.

- 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..."

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 & Solis 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.

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/publicaiones/publicacion-de-articulo/. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal. 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

La Biotecnología y la salud

A más de dos años de que la OMS declaró la pandemia de la COVID-19, el panorama desolador a nivel mundial por la falta de fármacos o vacunas para combatirla obligó a las autoridades a tomar medidas extremas de aislamiento. Aun así, las pérdidas humanas y económicas fueron enormes. Hoy, aun cuando la pandemia persiste, gracias al desarrollo de vacunas eficaces y seguras en tiempos récord, nos hemos adaptado a convivir con esta enfermedad. Lo anterior no hubiera sido posible sin las contribuciones de la ciencia, la tecnología y sobre todo de la biotecnología.

En unos meses nuestra SMBB cumplirá sus primeros 40 años de promover y difundir el trabajo de investigación, desarrollo e innovación de los biotecnólogos y bioingenieros en nuestro país, principalmente a través del Congreso Nacional y la revista Biotecnología. En el primer número del volumen 26 de la revista Biotecnología se incluyen cuatro trabajos que son muestra del potencial que la biotecnología ofrece para contribuir al mejoramiento de la salud pública. No podía faltar en este número una revisión de las diferentes tecnologías usadas en los cientos de desarrollos de vacunas contra el COVID-19, donde Vanesa Hernández y José A. Serrato analizan la situación actual de las vacunas anti-COVID-19 basadas en la proteína S y su receptor. Sin duda junto con las vacunas, el descubrimiento de los antibióticos ha sido una de las mayores contribuciones de la biotecnología en el área de la salud. Sin embargo, el mal uso de éstos ha generado la resistencia en muchos microrganismos patógenos. Por lo que es necesario buscar alternativas terapéuticas, como es el caso de la revisión acerca de la actividad antimicrobiana de los extractos de Taraxacum offciniale y Agave lechuquilla, dos plantas de uso en la medicina tradicional, que nos presentan Dulce María Carrillo-Hernández y Dulce María Galván-Hernández. Además, el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson requiere que los fármacos atraviesen la barrera hematoencefálica, C. Debernardo-Hurtado y col., analizan los reportes de estudios in vitro e in vivo, donde el uso de nanopartículas poliméricas tiene el potencial para el desarrollo de alternativas terapéuticas para estas y otras enfermedades neurodegenerativas. Finalmente, Eduardo García-Martínez y col., discuten los reportes epidemiológicos de los últimos 20 años sobre el Dengue en nuestro país y las alternativas biotecnológicas potenciales para la prevención y tratamiento de esta enfermedad.

Aprovecho la oportunidad para reconocer el trabajo y dedicación de la Dra. María Soledad Córdova Aguilar, al comité editorial y revisores por su generosidad para que la SMBB mantenga esta labor de difusión y promoción de la Biotecnología y Bioingeniería. A todos nuestros asociados los invitamos a difundir nuestra revista y que la consideren como una opción para dar a conocer su trabajo de investigación.

Dr. Jaime Ortega López
Presidente de la MDN 2020 – 2022
jortega@cinvestav.mx

Vacunas anti COVID-19 basadas en la glicoproteína Spike del SARS-CoV-2 producida de forma recombinante: Situación actual y tecnologías de producción

Vanessa Hernández¹ y José A. Serrato^{2*}

¹Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, C.P. 62210. Cuernavaca, Morelos.

²Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, Alcaldía de Tlalpan, C.P 14080, CDMX.

serratoiner@gmail.com

Resumen

La pandemia de COVID-19 que actualmente vivimos ha dejado de manifiesto la importancia de la biotecnología para la salud pública. En tiempo récord se generaron cientos de candidatos de vacunas; desde los desarrollos biotecnológicos más novedosos basados en ARN, vectores virales y proteínas recombinantes, hasta las de tecnologías tradicionales de virus atenuados e inactivados. En diciembre de 2021 la OMS aprobó para su uso de emergencia la primera vacuna basada en proteínas recombinantes del virus SARS-CoV-2. Este tipo de vacunas representan el mayor número de candidatos en ensayos clínicos de Fase III, algunas en espera de su aprobación y otras ya aprobadas para uso de emergencia en su país de origen y en algunos países en desarrollo con urgencia de vacunar a su población. Interesantemente, para su producción, se han utilizado indistintamente todos los sistemas de expresión recombinante disponibles: levaduras, bacterias, plantas y células animales (mamífero e insecto), siendo este último el más utilizado. Dichas vacunas representan una excelente alternativa para coadyuvar en el proceso de vacunación debido a su seguridad, capacidad de producción, facilidad de manejo y bajo costo. En la presente revisión se analiza la situación actual de las vacunas anti COVID-19 basados en la proteína Spike (S) o su dominio de unión al receptor (RBD) del virus SARS-CoV-2 así como los sistemas de expresión recombinante más utilizados para su producción.

Palabras clave: SARS-CoV-2, COVID-19, vacunas, Spike, RBD, proteínas recombinantes.

Abstract

The COVID-19 pandemic we are currently experiencing has highlighted the importance of biotechnology for public health. Hundreds of vaccine candidates have been developed in record time, from the most innovative biotechnological developments based on RNA, viral vectors and, recombinant proteins, to the more traditional ones based on technologies of attenuated and inactivated viruses. In December 2021 the WHO approved for emergency use the first vaccine based on recombinant viral proteins of SARS-CoV-2. These kind of vaccines represent the most significant number of candidates in Phase III clinical trials, some awaiting approval and others already approved for emergency use in their country of origin and in some developing countries with urgency to vaccinate their population. Interestingly, all the recombinant expression systems available were indistinctly used in developing these vaccines: animal cells (mammalian and insect), yeast, bacteria,

and plants. These vaccines represent an excellent alternative to assist in the vaccination process due to their safety, production capacity, easy of handle, and low cost. This review analyzes the current situation of vaccines against COVID-19 based on the *Spike* protein (S) or its receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 virus, and the recombinant expression systems most used for their development.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, vaccines, spike, RBD, recombinant proteins.

(https://coronavirus.jhu.edu/region/mexico). A un año del inicio de de la campaña de

Introducción

2020 será recordado por la propagación pandémica del nuevo Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2, del inglés "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2") responsable de la enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19, del inglés "Coronavirus Disease 2019"). El SARS-CoV-2 es un virus altamente transmisible y patogénico causante de la COVID-19, con un rango de manifestaciones que pueden ir desde un resfriado común hasta neumonía severa y otras manifestaciones graves que pueden causar la muerte (Hoffmann & Kamps, 2021). Desde inicios del 2021 se contó con diferentes vacunas aprobadas por la OMS para su uso de emergencia, fundamentalmente vacunas de ARN, de vectores virales y de virus inactivados (Venkadapathi et al., 2021). Sin embargo, contrario a las expectativas generadas por la disponibilidad de vacunas no fue menos año complejo, particularmente en países en desarrollo y de bajos ingresos; la baja disponibilidad de vacunas en conjunto a los requerimientos particulares para su manejo y aplicación hicieron el proceso de vacunación muy lento (Cioffi and Cioffi, 2021; Rahman and Islam, favoreciendo 2021), la aparición diseminación de nuevas variantes del virus (Harvey et al., 2021), extendiendo la duración pandemia y acentuando consecuencias a todos los niveles; salud, educativo, económico y social por solo mencionar algunos sectores (Nicola et al., 2020). Al 01 de abril de 2022 se han infectado 489 millones de personas a nivel global, de los cuales 6.15 millones perdieron la vida (https://coronavirus.jhu.edu/). En México, 5.66 millones de personas se han infectado, de los cuales 323,000 (5.7%) no sobrevivieron a la enfermedad

vacunación solo se ha conseguido vacunar con al menos una dosis al 66% de la población mundial(https://ourworldindata.org/covidvaccinations) y para el caso de nuestro país esquema completo 62.5% (https://coronavirus.jhu.edu/region/mexico). Las vacunas basadas en las proteínas S o su dominio RBD del virus SARS-CoV-2, producidas de forma recombinante, como es el caso de la vacuna Nuvaxovid de la farmacéutica estadounidense Novavax, recientemente aprobada por la OMS para su de emergencia (https://extranet.who.int/pqweb/vaccines/vacc inescovid-19-vaccine-eul-issued),

representan una tecnología exitosa para sumarse al proceso de vacunación, particularmente en países en desarrollo y de bajos recursos económicos.

La proteína S del virus SARS-CoV-2 como antígeno para la producción de vacunas

Estructura del SARS-CoV-2

De acuerdo a su caracterización genética y serológica la familia de los coronavirus se divide en cuatro géneros y generalmente infectan diferentes grupos de animales: Alfacoronavirus (alfa-CoV), Betacoronavirus (beta-CoV), Gamacoronavirus (gama-CoV) y Deltacoronavirus (delta-CoV). Los alfa-CoV y beta-CoV se encuentran mayoritariamente en mamíferos en tanto que los gama-CoV y delta-CoV se encuentran fundamentalmente en aves (Forni et al.,2017). Los coronavirus causantes de las epidemias recientes de SARS (del inglés "Severe Acute Respiratory Syndrome") en 2003 (por SARS-CoV), de

MERS (del inglés "Middle East Respiratory Syndrome") en 2012 (por MERS-CoV) y la presente pandemia de COVID-19 (por SARS-CoV-2) corresponden a un subgrupo de *beta-CoV* denominado *Sarbecovirus* (Singh and Yi, 2021).

La secuencia del genoma del SARS-CoV-2 fue elucidada en enero de 2020 (Lu et al... 2020). Mediante análisis filogenético y de genómica comparativa se determinó que el genoma de SARS-CoV-2 tiene tan solo un 50% de homología con el genoma de MERS-CoV. Notablemente SARS-CoV-2 tiene menos de un 80% de identidad con el genoma de SARS-CoV, sin embargo, es importante mencionar que tienen un 94.4% de homología en la secuencia nucleotídica del marco de lectura abierto que codifica para proteínas no sendos estructurales de SARS-CoV-2 tiene un Interesantemente 96.2% de identidad con el genoma del coronavirus de murciélago (BatCoV) RaTG13 (Abdelrahman et al 2020; Pillay, 2020). A la fecha, se desconoce aún el reservorio animal del cual el SARS-CoV-2 se transmitió al humano (Temmam et al., 2022)

SARS-CoV-2 es un virus morfológicamente esférico y considerado como un virus grande con un diámetro de entre 80 y 120 nm. Es un virus de ARN de cadena sencilla, de sentido positivo no segmentado. Su genoma está formado por 29903 nucleótidos (~30 kb), lo que lo ubica entre los virus de ARN con genomas más grandes (Hoffmann and Kamps, 2021). La nucleocápside viral está compuesta fundamentalmente por la proteína N (del inglés "Nucleocapsid") cuya función es estabilizar al ARN viral. Es un virus envuelto en una bicapa lipídica. Dicha cápside viral está compuesta mayoritariamente por la proteína M (del inglés "Membrane") que da soporte estructural a la cápside. También se encuentra presente la proteína E (del inglés "Envelope"), una pequeña proteína de membrana esencial para el ensamblaje y liberación de los viriones. Finalmente, en la cápside también se encuentra la proteína S (del inglés "Spike") cuya función es la unión a la Enzima Convertidora de Angiotensina 2 (ACE-2, del inglés "Angiotensin Converting Enzime 2") presente en la membrana celular de diferentes linajes celulares humanos (Zhao et al., 2020). La función de la proteína S es fusionarse con la membrana celular y permitir la internalización del virus en la célula (Perlman & McIntosh, 2019; Wrapp et al., 2020). El nombre de coronavirus deriva del latín "corona" en referencia a la corona o halo que se observa en la morfología de los virus del género Coronavirus bajo el microscopio electrónico y que se debe a los trímeros de la proteína S que emergen de la cápside en forma de espículas con una longitud de entre 20 y 40 nm (Zuckerman, 2009).

Proteína S y su dominio RBD

La proteína S (monomérica) está compuesta por 1273 aminoácidos con un peso molecular de 180 kDa aproximadamente; consta de un dominio N-terminal extraviral grande (ectodominio), un dominio transmembranal anclado a la cápside viral y un dominio C-terminal intraviral corto (endodominio) (Figura 1) (Shang et al., 2020; Walls et al., 2020).

En la mayoría de los coronavirus el ectodominio es cortado por proteasas celulares de membrana dividiéndolo en dos subunidades funcionales denominadas S1 y S2. La subunidad S1 corresponde a la parte globular de la espícula responsable de la unión con el receptor ACE2 en tanto que la subunidad S2 corresponde a una subunidad tipo tallo cuya función es facilitar la fusión con la membrana celular (Lan et al., 2020). La subunidad S1 se divide a su vez en un Dominio N-terminal (NTD, del inglés "N-Terminal Domain") y un Dominio C-terminal (CTD, del inglés "C-Terminal Domain"). El Dominio de Unión al Receptor (RBD, del inglés "Receptor Binding Domain") se sitúa en el CTD de la subunidad S1. El RBD está compuesto de aproximadamente aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 27 kDa. Dentro de la secuencia del RBD se encuentra el Motivo de Unión al Receptor (RBM, del inglés "Receptor Binding Motif") el cual es el encargado de hacer el primer contacto con el dominio peptidasa del receptor ACE2 (Li et al., 2005). La proteína S es una glicoproteína altamente N-glicosilada; cuenta con 22 sitios de Nglicosilación, de los cuales dos se encuentran en el RBD (en la Asn331 y Asn343) (Watanabe et al 2020; Zhang et al 2021) (Figura 2).

Dada la función primordial de la proteína S y su dominio RBD en el proceso de infección viral, son las proteínas más interesantes para la generación de vacunas, también como antígenos para la producción de anticuerpos monoclonales y para el desarrollo de kits de diagnóstico (Huang et al.,2020; Pillay, 2020).

Vacunas anti COVID-19 basadas en proteínas S y RBD

El RBD de la proteína S del virus SARS-CoV-2 es un blanco inmunodominante y altamente específico de los anticuerpos producidos en

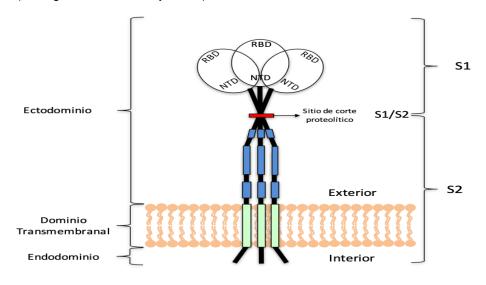


Figura 1. Representación esquemática de la proteína S trimérica del virus SARS-CoV-2. NTD, Dominio N-terminal; RBD, Dominio de Unión al Receptor.

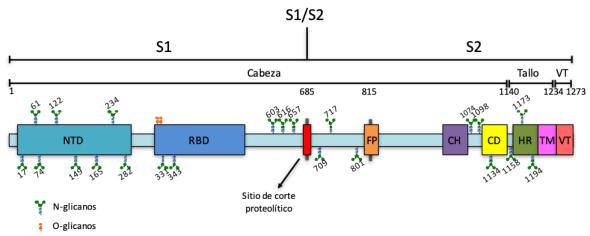


Figura 2. Secuencia primaria representativa de la proteína S monomérica del virus SARS-CoV-2. NTD, Dominio N-terminal; RBD, Dominio de Unión al Receptor; FP, Péptido de Fusión; CH, Hélice Central; CD, Dominio Conector; HR, Secuencias Repetidas de siete Aminoácidos; TM, Dominio Transmembranal; VT, Cola Viroplasmática.

los enfermos de COVID-19 (Premkumar et al., 2020), por lo tanto, la proteína S y articularmente el RBD son excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas.

Afortunadamente, desde inicios de 2021 se contó con diferentes vacunas,

fundamentalmente vacunas de ARN y vectores adenovirales, las cuales ulteriormente entregan el material genético de la proteína S del virus o su RBD para que el propio organismo sintetice subunidades proteicas que funcionen como moléculas

inmunogénicas (Mendonca et al., 2021; Roncati & Corsi, 2021). Dichas vacunas fueron aprobadas por la OMS para su uso de emergencia y actualmente se encuentran en pruebas clínicas de fase IV (ensayo clínico en el que se estudian los efectos secundarios a largo plazo). Dichas vacunas, aun cuando han presentado diferentes porcentajes de eficacia, permitieron disminuir significativamente la propagación de la pandemia.

Actualmente se encuentran en fase preclínica y clínica cientos de candidatos de vacunas y de naturaleza muy diferente: desde las más novedosas de ARN, vectores virales no replicantes, ADN, vectores virales replicantes, de partículas pseudo virales y de las propias proteínas virales producidas de forma recombinante, hasta las más tradicionales de virus atenuados e inactivados (Chung et al., 2021; Venkadapaty et al., 2021) (Figura 3).

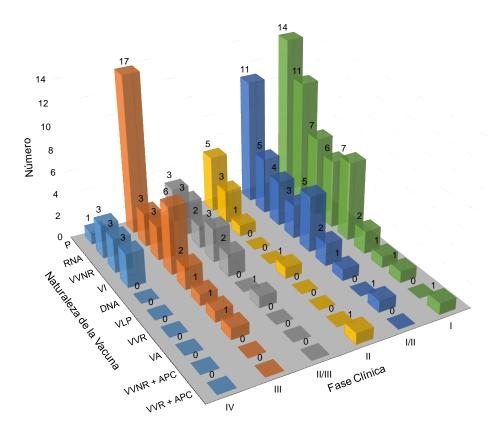


Figura 3. Vacunas anti COVID-19 en pruebas clínicas.

Naturaleza del candidato de vacuna: P, péptido o proteína viral; RNA, de ácido ribonucleico; VVNR, vector viral no replicante; VI, virus inactivado; DNA, de ácido desoxirribonucleico; VLP, partícula pseudo-viral; VVR, vector viral replicante; VA, virus atenuado; VVNR+APC, vector viral no replicante + célula presentadora de antígeno; VVR+APC, vector viral replicante + célula presentadora de antígeno. Fuente:https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines (al 01 de Abril de 2022)

Es muy interesante observar que a la fecha (01 de abril de 2022), de los 196 candidatos de vacuna en pruebas pre-clínicas anti COVID-19, 75 se basan en proteínas virales producidas de forma recombinante (representando el 38%). De los 151 candidatos ya en pruebas clínicas de fase I hasta IV, 51 se basan en proteínas recombinantes virales (representando el 33%)

(https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines).

Actualmente se cuenta ya con una vacuna basada en proteínas virales en pruebas clínicas de fase IV, aunque no ha sido aprobada por la OMS para su uso de emergencia. Sin embargo, en el mes de diciembre de 2021, la vacuna Nuvaxovid (NVX-CoV2373) de la farmacéutica

estadounidense Novavax es la primera vacuna basada en proteínas virales aprobada por la OMS para su uso de emergencia (https://extranet.who.int/pqweb/vaccines/vacc inescovid-19-vaccine-eul-issued). Además, de los 34 candidatos de vacuna en fase III (estudio previo a la aprobación, en donde se prueba la seguridad y eficacia en miles de individuos), 17 candidatos (representando el proteínas son de virales (particularmente la Proteína S y su RBD). Dichas proteínas son producidas de forma recombinante en diferentes sistemas de expresión, siendo las células de mamífero (CHO y HEK), el sistema de células de insecto-baculovirus y la producción en (específicamente levaduras en Pichia pastoris) los sistemas de expresión más utilizados (Tabla 1). (https://www.who.int/publications/m/item/draft -landscape-of-covid-19-candidate-vaccines).

Sistemas de expresión recombinante para producción de proteínas S y RBD

Las vacunas basadas en proteínas virales recombinantes, además de ser muy seguras en virtud de no contener material genético, ni virus o partes de él, se fabrican con una tecnología bien establecida que puede solucionar la demanda de vacunas y a menor costo que las vacunas basadas ácidos nucleicos (Gupta et al., 2019). Dada la inminente necesidad de vacunas anti COVID-19 para frenar la pandemia, es muy interesante notar la diversidad de sistemas de expresión que se han utilizado para la producción de candidatos de vacunas basados en las proteínas S y RBD del SARS-CoV-2. Desde métodos innovadores como la producción de péptidos sintéticos, los cuales no requieren de un sistema vivo de expresión (Ryzhikov et al., 2021; Guirakhoo et al., 2020), hasta sistemas de expresión en plantas con resultados muy prometedores (A Study to Tolerability, Evaluate Safety, Reactogenicity of an RBD-Fc-based Vaccine Prevent COVID-19, https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT049530 78; KBP-201 COVID-19 Vaccine Trial in Healthy Volunteers, https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT0 4473690). Este último quizá con la desventaja de no tener la capacidad para satisfacer la demanda requerida de vacunas en una situación de pandemia, además del potencial para desencadenar reacciones inmunológicas o alérgicas no deseadas derivado del tipo de glicosilación de proteínas que producen las células de planta (Gomord et al., 2005; Margolin et al., 2020).

Recientemente Tripathi & Shrivastava (2019), publicaron una revisión al respecto de los avances recientes en bioprocesos para la producción de proteínas recombinantes en general, abarcando todos los sistemas de expresión disponibles hasta la fecha, así como los avances en el desarrollo de procesos. Por su parte Pollet et al. (2021) a inicios de 2021, publicó una revisión referente a la situación de las vacunas anti COVID-19 basadas en proteínas recombinantes. abarcando diferentes aspectos; desde las tecnologías de producción, hasta las vías de administración y los adyuvantes más utilizados.

Expresión en bacterias (E. Coli)

La expresión recombinante de proteínas en bacterias es el sistema más económico y escalable para la producción de proteínas a nivel industrial, particularmente para la producción de proteínas recombinantes pequeñas como hormonas (insulina y hormona de crecimiento entre otras), factores de crecimiento, interferones e interleucinas (Gupta & Shukla, 2016; Walsh, 2018). La mayoría de dichas moléculas son producidas en Escherichia coli. En el caso de producción de proteínas recombinantes para vacunas, existen dos vacunas aprobadas recientemente por la FDA contra la enfermedad meningocócica causada por Neisseria meningitidis serogrupo B. Dichas vacunas se producen también en E. coli (Rivero-Calle et al., 2019). El sistema de expresión en bacterias (procariotas) tiene la limitante de no poseer una maquinaria secretoria, por lo tanto, no glicosila las proteínas, no forma puentes disulfuro adecuadamente y no las secreta al medio de cultivo; las acumula intracelularmente como cuerpos de inclusión. Las proteínas deben ser extraídas, solubilizadas y replegadas in vitro (Jefferis, 2007). En el caso de producción de proteínas virales del SARS-CoV-2 como candidatos vacunales anti COVID-19, existen

algunos desarrollos en bacterias en pruebas pre-clínicas

(https://www.who.int/publications/m/item/draft -landscape-of-covid-19-candidate-vaccines.

Landscape of candidate vaccines in preclinical development). Sin embargo, dicho sistema de expresión no figura entre los más utilizados por los candidatos de vacuna en pruebas clínicas más avanzadas (Fase III y IV) y con mayores posibilidades para su aprobación a corto plazo. Lo anterior probablemente por la preocupación de que en dicho sistema de expresión no es posible obtener las modificaciones postraduccionales necesarias para el correcto plegamiento de la proteína S o su RBD (como glicosilación y formación de puentes disulfuro) y que pudieran impactar en la antigenicidad de la molécula (Peng et al., 2021). En virtud de lo anterior, los sistemas de expresión en levaduras y células animales (células de mamífero e insecto) han sido las tecnologías seleccionadas para generar los candidatos de vacuna anti COVID-19 que actualmente se encuentran en ensavos clínicos de fase III v IV y con mayor posibilidad de ser aprobados a

(https://www.who.int/publications/m/item/draft_landscape-of-covid-19-candidate-vaccines).

Expresión en levadura

En los últimos años las levaduras se han posicionado herramienta como una biotecnológica prometedora para producción de proteínas recombinantes, particularmente para uso terapéutico. Los avances en el meioramiento de las células. tanto a nivel genético como del bioproceso de producción, han hecho que este sistema de expresión sea una excelente opción para la producción de proteínas más complejas que anteriormente se producían exclusivamente en células de mamífero (Baghban et al., 2019). Se puede considerar que el sistema de expresión en levaduras posee las ventajas tanto de los sistemas de expresión bacterianos como de células animales. Al igual que las bacterias, las levaduras poseen una alta velocidad de crecimiento, alcanzan altas densidades celulares y la producción se puede escalar fácilmente a volúmenes muy grandes. Su medio de cultivo es, por mucho, más económico que los utilizados en cultivos

de células animales y recientemente los títulos proteína recombinante se incrementado sustancialmente en este sistema de expresión (Huang et al., 2018). Con respecto a las bondades que comparte con los cultivos de células animales, las levaduras poseen una maquinaria secretoria les permite producir proteínas que glicosiladas, correctamente plegadas secretadas al medio de cultivo (Harcum, 2006). Entre las líneas celulares de levadura más utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes para uso terapéutico se encuentran. Saccharomyces cerevisiae. Pichia pastoris y Hansenula polymorpha (Huertas & Michán, 2019). Quizá la desventaja más grande de dicho sistema de expresión es levaduras no generan que las glicosilación comparable a la humana, en su lugar hipermanosilan las proteínas y se puede presentar el inconveniente de desencadenar respuestas inmunes indeseadas (Gupta & Shukla, 2018; Wu et al., 2002). Al igual que en bacterias, el sistema de expresión en levaduras se utiliza exitosamente para la producción de hormonas recombinantes (predominantemente insulina, producida en S. cerevisiae), factores sanguíneos y de crecimiento. En el área de vacunas, H. polymorpha y S. cerevisiae son el sistema de expresión para la mayoría de las vacunas recombinantes producidas contra hepatitis B y dos contra la infección por el virus del papiloma humano (Walsh, 2018). En el caso de candidatos de vacuna contra COVID-19 en ensayos clínicos de fase III, de los 17 candidatos que hay a la fecha, dos utilizan levaduras como su sistema de expresión (Tabla 1). En ambos desarrollos utilizan P. pastoris como línea celular de expresión y casos producen también en ambos únicamente al dominio RBD de la proteína S del virus (Limonta-Fernandez et al., 2021; Pollet el al., 2021a).

Una ventaja de expresar proteínas recombinantes glicosiladas en *P. pastoris*, en comparación con otras levaduras como *S. cerevisiae*, es que produce glicanos no tan hipermanosilados y ramificados (hasta manosa 13), lo cual reduce la posibilidad de respuestas inmunogénicas no deseadas. En el caso de la vacuna Abdala del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de

Cuba, derivado de los resultados de su ensayo clínico de Fase III, reportan un 92.28% de eficacia frente a la enfermedad sintomática y 100% en la prevención de la enfermedad sistémica severa y la muerte. No reportan porcentaje de eficacia contra la infección (www.cigb.edu.cu/wp-

content/uploads/2021/04/Ficha-Abdala-Espanol-3-sep-2021.pdf). Dicha vacuna, aun cuando no ha recibido aprobación para su uso de emergencia por la OMS, es la primera vacuna de origen proteico que cuenta con

vacuna de origen proteico que cuenta con aprobación para su uso de emergencia en Cuba, Venezuela, Nicaragua y Vietnam (www.cigb.edu.cu/wp-

content/uploads/2021/04/Hitos-Abdala.pdf).

Expresión en células de insecto

El cultivo de células de insecto data de principios de los años 60's cuando se establecieron las primeras líneas celulares de lepidópteros (células de polillas o palomillas obtenidas en su estado de pupa) (Grace. 1962) y ya como sistema de expresión de proteínas recombinantes a partir de los años 80's (Smith et al., 1983). La producción de proteínas recombinantes en células de insecto es un proceso de dos etapas en donde las células son primero cultivadas hasta una determinada concentración celular y luego infectadas con un baculovirus (virus que infectan artrópodos) recombinante al cual se le ha clonado el gen de la proteína que se desea producir (Palomares et al., 2006).

En comparación con los demás sistemas de expresión, el de células de insectobaculovirus es muy versátil, se puede utilizar la producción de proteínas para recombinantes, partículas pseudovirales y virus. Existen diferentes líneas celulares que se pueden utilizar, entre las más comúnmente utilizadas se encuentran las Sf9, Sf21 (de Spodoptera frugiperda, o gusano cogollero del maíz) y High Five™ (de *Trichoplusia ni,* u oruga de la col) (Contreras-Gómez et al., 2013). Es un sistema de fácil manipulación y escalamiento de la producción, además de ser un sistema de expresión altamente seguro en términos de bioseguridad ya que los baculovirus solo se replican en invertebrados (Bollati-Fogolín & Comini, 2008). Las dos limitaciones más importantes que sistema de expresión puede tener son:

primero, que la producción de las proteínas es discontinua, es decir, se debe hacer en lotes debido a que durante el proceso de infección de las células con los baculovirus hay lisis y muerte celular. El segundo factor tiene que ver con el perfil de glicosilación. Si bien las células de insecto glicosilan las proteínas, no lo hacen igual que las células de mamífero. La glicosilación de las células de insecto es más simple que la de mamífero, caracterizada por estructuras de tipo paucimanosa (Shi & Jarvis, 2007). Lo anterior es de particular importancia producir cuando se desea proteínas recombinantes terapéuticas (Goh & Ng, 2018). En comparación con los cultivos bacterianos o de levadura, en los cultivos de células de insecto la proliferación es más lenta; utilizan medios de cultivo más complejos y por tanto más costos, casi al mismo nivel que los medios de cultivo para cultivos de células de mamífero. En comparación con estos últimos, las células de insecto alcanzan mayores densidades celulares en menor tiempo (Burgener & Butler, 2006; Gorfien, 2007; Moraes et al., 2008).

En la actualidad el sistema de expresión en de insecto-baculovirus células consolidado como una tecnología exitosa para la producción de vacunas (Cox et al 2011). Existen en el mercado dos vacunas recombinantes producidas en células de insecto; Cervarix® de GlaxoSmithKline, es una vacuna para la prevención del cáncer cérvico-uterino ocasionado por el virus del papiloma humano. Dicha vacuna está hecha de partículas pseudo-virales a base de la proteína L1 de la cápside del virus (Walsh, 2018; Buck et al, 2013). La segunda vacuna es Flublok® de Protein Sciences (ahora parte de Sanofi Pasteur), una vacuna cuadrivalente contra la influenza estacional basada en la proteína hemaglutinina de 4 diferentes tipos de influenza A y B circulantes. (Walsh, 2018; https://www.sanofiflu.com/flublokquadrivalent-influenza-vaccine/).

En el caso de candidatos de vacuna contra COVID-19, el sistema de expresión en células de insecto es el segundo más utilizado (después del de células de mamífero) para la producción de la proteína S o su RBD. De los 17 candidatos de vacuna en estudios clínicos

de Fase III, cinco se desarrollaron en células de insecto (Tabla 1).

La vacuna NVX-CoV2373 de la farmacéutica Novavax consiste en una nanopartícula multimérica de la proteína S trimérica. Es la única vacuna producida en células de insecto que cuenta con resultados de uno de sus estudios clínicos de fase III y fue recientemente aprobada (diciembre de 2021) por la OMS para su uso de emergencia. Reporta una eficacia del 89.7% contra la infección (Heath et al., 2021).

Es interesante mencionar que tanto la hemaglutinina del virus de la influenza como la proteína S del SARS-CoV-2 son proteínas de fusión de clase I de la superficie del virus, altamente glicosiladas y cuya función es establecer el primer contacto con la célula blanco. Adicionalmente, ambos virus son pandémicos y tienen una alta tasa de mutación, generándose variantes en periodos de tiempo cortos. Para la generación de vacunas basadas en proteínas recombinantes virus con las características arriba mencionadas, se requiere de sistemas de muy fáciles de manipular expresión genéticamente y con la capacidad de generar altas concentraciones de proteínas virales de las nuevas variantes en tiempos muy cortos (Krause et al., 2021; Sanyaolu et al., 2021). El sistema de expresión en células de insecto tiene dicha ventaja sobre los demás sistemas de expresión. Un ejemplo de lo anterior es la vacuna FluBlock para la influenza estacional de la Farmacéutica Sanofi Pasteur y parece ser que ahora también con su candidato de vacuna anti COVID-19 (VAT00002) basada en la proteína S producida en la misma plataforma de expresión (Cox, https://pactr.samrc.ac.za/TrialDisplay.aspx?Tr ialID=13475;

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04904549).

Expresión en células de mamífero

Las células de mamífero son el sistema de expresión por excelencia para la producción de muchas proteínas recombinantes de uso terapéutico con características similares a las proteínas nativas humanas (Ozturk, 2006). Particularmente proteínas grandes y

como son los complejas anticuerpos monoclonales y demás proteínas humanas con un alto valor agregado en el mercado farmacéutico que requieren modificaciones postraduccionales (como formación de puentes disulfuro glicosilación) para el correcto plegamiento de la proteína y por ende para preservar su función biológica como molécula terapéutica (Butler, 2008; Hossler, 2012; Walsh, 2018). Sin embargo, este sistema de expresión es el más costoso en virtud de las características propias del bioproceso con células animales (por la complejidad de los medios de cultivo, los tiempos largos de cultivo, la escalabilidad del cultivo, etc.). Existen diferentes líneas celulares que se pueden utilizar para la producción a nivel industrial (CHO, HEK, BHK, PER-C6), sin embargo, las células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) son la línea celular más ampliamente utilizada para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas (Tihanyi Nyitray, 2021). Aun cuando las células de mamífero no son el sistema de expresión tradicional para la producción de vacunas basadas en proteínas virales, ejemplos como el de la vacuna para herpes Shinarix producida GlaxoSmithKline, la cual utiliza células CHO para la producción de la glicoproteína E del virus como antígeno vacunal (Norden et al., 2019). De forma muy interesante, para la producción de candidatos de vacunas anti COVID-19 ya sea para la expresión de la proteína S o el dominio RBD del virus SARS-CoV-2, las células de mamífero representan el sistema de expresión más utilizado en los candidatos pruebas clínicas en avanzadas. Lo anterior se puede explicar en virtud de la complejidad estructural de la proteína S o su RBD y que mediante su producción en células de mamífero se garantice su integridad estructural y por tanto su inmunogenicidad (Henderson et al., 2020; Reis et al., 2021). De los 17 candidatos de vacunas en pruebas clínicas de fase III, ocho se desarrollaron mediante expresión en células de mamífero: siete en células CHO v uno en **HEK293** (Tabla 1) (https://www.who.int/publications/m/item/draft -landscape-of-covid-19-candidate-vaccines).

Tabla 1. Candidatos de vacuna anti COVID-19 basadas en proteínas virales recombinantes de SARS-CoV-2, en ensayos clínicos de fase III y IV(al 01 de abril de 2022)

Sistema Esquema de Fase del No. No. Descripción de vacunación Desarrollador País estudio Dosis expresión (días) Ш Proteína S Células de 1 2 0 + 21Novavax **EUA** trimérica insecto Ш Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical + RBD Células $0 + 28 \circ 0 +$ 2 2-3 Institute of Microbiology, Chinese Academy of China dimérico CHO 28 + 56Sciences Ш Células de 3 2 0 + 21Sanofi Pasteur+GSK EUA/UK Proteína S insecto Ш Proteína S Células 0 + 21China Clover Biopharmaceuticals Inc./Dynavax trimérica CHO Ш Células de Proteína S 2 0 + 21AUS/Irán 5 Vaxine Pty Ltd./CinnaGen Co. insecto ΙV Medigen Vaccine Biologics + Dynavax + Células Taiwán/ 6 Proteína S 2 0 + 28National Institute of Allergy and Infectious CHO **EUA** Diseases (NIAID) Ш Multímero Células 7 2 0 + 28Instituto Finlay de Vacunas Cuba de RBD CHO Ш Células de 8 RBD 2 0 + 28West China Hospital + Sichuan University China insecto Ш 0 + 14 + 28Center for Genetic Engineering and 9 RBD 3 Levadura Cuba 00 + 28 + 56Biotechnology (CIGB) Biological E. Limited / Texas Children's Center India/EU III 10 RBD Levadura 2 0 + 28for Vaccine Development A III Células 2 11 Proteína S 0 + 21Nanogen Pharmaceutical Biotechnology Vietnam CHO Ш Células SK Bioscience Co., Ltd. and CEPI / Washington Corea/EU RBD 12 2 0 + 28293F University Α Células de III 13 Proteína S 2 0 + 21Shionogi Japón insecto Ш 14 Proteína S ND 3 0 + 21 + 51Razi Vaccine and Serum Research Institute Irán Ш RBD Células 15 2 0 + 21Livzon Pharmaceutical China CHO dimérico Ш Bagheiat-allah University of Medical 16 RBD ND 3 0 + 21 + 35Irán Sciences/AmitisGen RBD Células Ш 2 17 0 + 21Laboratorios Hipra, S.A. España dimérico CHO

Fuente: https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines.

Recientemente, el Instituto Finlay de Vacunas de Cuba, reportó en resultados intermedios de su ensayo clínico de fase III para su vacuna Soberana02, un 62% de eficacia contra la infección por COVID-19 en su esquema de dos dosis (www.finlay.edu.cu/blog/fichas-desoberana/). Soberana02 consiste en un multímero (4 a 8 moléculas) de RBD producido en células CHO, conjugados covalentemente a toxoide tetánico (Valdez-Balbin et al., 2021, 2021a). Dicha vacuna aún no ha sido autorizada por la OMS, sin embargo, cuenta con autorización para su uso de emergencia en Cuba e Irán. En otro estudio clínico de Fase II donde se evaluó un esquema heterólogo de tres dosis, dos con la vacuna Soberana02 y una tercera dosis con su vacuna SoberanaPlus, se determinó una eficacia de 75.5% contra la infección: 91.2% contra la enfermedad sintomática y 100% contra la enfermedad sintomática severa y (www.finlay.edu.cu/blog/fichas-desoberana/). Soberana Plus es una vacuna de RBD dimérico (sin toxoide tetánico) producida en células CHO (Chang-Monteagudo et al., 2021).

Conclusiones y perspectivas a corto plazo

Al 01de abril de 2022 el SARS-CoV-2 ha infectado de COVID-19 a 5.65 millones de mexicanos, de los cuales 323,000 (5.7%) perdieron la vida. Ya se cuenta con diferentes vacunas aprobadas para su uso de emergencia, sin embargo, solamente se ha vacunado con esquema completo al 62.5% de la población. Actualmente se encuentran en fase preclínica y clínica cientos de candidatos de vacunas: desde las más novedosas de ARN, vectores virales no replicantes, ADN, vectores virales replicantes, de partículas pseudo virales y de las propias proteínas virales producidas de forma recombinante, hasta las más tradicionales de virus atenuados e inactivados. Las vacunas basadas en la proteína S y su dominio RBD del virus SARS-CoV-2 representan una alternativa para coadyuvar en el proceso de vacunación debido a su eficacia, seguridad, escalabilidad y menor costo. De los 34 candidatos de vacuna en fase III, 17

candidatos de proteínas son virales (representando el 50%) producidas de forma recombinante. Para el desarrollo de dichas vacunas se han utilizado todos los sistemas expresión disponibles: bacterias. levaduras, plantas y células animales (mamífero e insecto). Dada las características estructurales de la proteína S o su RBD se ha seleccionado preferentemente su producción en células de mamífero e insecto y en menor proporción en células de levadura. Los datos de eficacia que se han reportado a la fecha, por lo menos uno para cada sistema de expresión, muestran que las vacunas son eficaces. independientemente de desventaias inherentes a cada sistema de expresión. En diciembre de 2021 la OMS aprobó para su uso de emergencia la primera vacuna ante COVID-19 basada en proteínas virales producidas de forma recombinante y ya se cuenta con una vacuna en estudio clínico de fase IV. En los últimos cuatro meses, el número de candidatos de vacuna en fase III basadas en proteínas virales se incremento de 12 a 17. Lo anterior refleia la factibilidad de que en el corto plazo se cuente con diferentes vacunas anti COVID-19 basadas en proteínas recombinantes para sumarse en el proceso de vacunación, particularmente en países en desarrollo y de bajo ingreso económico en los cuales el proceso de vacunación ha sido muy lento.

Referencias

Abdelrahman Z, Li M, Wang X (2020) Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. Front. Immunol. 11:552909. doi: 10.3389/fimmu.2020.552909.

Baghban R, Farajnia S, Rajabibazl M, Ghasemi Y, Ali Mafi A, Hoseinpoor R, Rahbarnia L, Aria M (2019) Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Mol Biotechnol* 61:365–384.

https://doi.org/10.1007/s12033-019-00164-8.

- Bollati-Fogolín M, Comini MA (2008) Cloning and expression of heterologous proteins in animal cells. Chapter 3. In Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy. Castilho L, Moraes AM, Augusto EFP, Butler M (eds) Taylor & Francis. USA. pp. 39-74.
- Buck ChB, Day PM, Trus BL (2013) The Papilloma Major Capsid Protein L1. *Virology*. October; 445(0):169–174. doi:10.1016/j.virol.2013.05.038.
- Burgener A, Butler M (2006) Medium development. Chapter 3. In cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies, Ozturk S, Hu WS (eds) Taylor & Francis. USA. pp. 627-692.
- Butler M (2008) Post-translational modification of recombinant proteins. Chapter 6. In Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy, Castilho L, Moraes AM, Augusto EFP, Butler M (eds) Taylor and Francis. USA. pp. 129-143.
- Chang-Monteagudo A, Ochoa-Azze R, Climent-Ruiz Y, Macías-Abraham C, Rodríguez-Noda L, Valenzuela-Silva C, Sánchez-Ramírez B, Perez-Nicado R, Hernández-García T, Orosa-Vázquez I, Díaz-Hernández M, García-García M, Jerez-Barceló Y, Triana-Marrero Y, Ruiz-Villegas L, Rodríguez-Prieto LD, Puga-Gómez R, Guerra-Chaviano PP, Zúñiga-Rosales Y, Marcheco-Teruel B, Rodríguez-Acosta M, Noa-Romero E, Enríquez-Porto-González Puertas J, Fernández-Medina O, Valdés-Zayas A, Chen GW, Herrera-Martínez L, Valdés-Balbín Y, García-Rivera D, Verez-Bencomo V (2021) A single dose of SARS-CoV-2 FINLAY-FR-1A vaccine enhances neutralization response in COVID-19 convalescents, with a very good safety profile: An open-label phase 1 clinical trial. The Lancet Regional Health - Americas, Volume 100079. 4, https://doi.org/10.1016/j.lana.2021.10 0079.

- Chung JY, Thone MN, Kwon YJ (2021) COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. *Advanced Drug Delivery Reviews* 170:1-25. doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.011.
- Cioffi A, Cioffi F (2021) COVID-19 vaccine: Risk of inequality and failure of public health strategies. *Ethics, Med. Public Health.* 17:100653. https://doi.org/10.1016/j.jemep.2021. 100653.
- Contreras-Gómez A, Sánchez-Mirón A, García-Camacho F, Molina-Grima E, Chisti Y (2013) Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. Biotechnol. Prog., 30:1-18. https://doiorg.8080/10.1002/btpr.1842.
- Cox MMJ (2009) Development of an influenza virus vaccine using the baculovirus insect cell expression system. **Implications** for pandemic preparedness. Ph.D. Thesis. Wageningen University. Wageningen, Netherlands. Pp.136. ISBN 978-90-8585-479-1. https://edepot.wur.nl/14323.
- Cox MMJ, Hashimoto Y (2011) A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol 107, Supplement, July2011, pp. S31-S41. https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.0
- Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M (2017) Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes *Trends Microbiol*, January, Vol. 25, No. 1, pp. 35-48. http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.0 9.001
- Grace TDC (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissue grown in vitro. *Nature*.195:788–789.
- Guirakhoo F, Kuo L, Peng J, Huang JH, Kuo B, Lin F, Liu K, Liu Z, Wu G, Ding S, Hou LL, Cheng J, Yang V, Jiang H, Wang J, Chen T, Xia W, Lin E, Hung

- Ch H, Chen K, Shih Z, Lin Y, Schurter BT, Hu MM, Heppner G, Malherbe DC, Bukreyev A, Hellerstein M, Monath T, Wang CY (2020) A Novel SARS-CoV-2 Multitope Protein/Peptide Vaccine Candidate is Highly Immunogenic and Prevents Lung Infection in an Adeno Associated Virus Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 (AAV hACE2) Mouse Model. Nov. 30. doi: https://doi.org/10.1101/2020.11.30.39 9154.
- Goh JB, Ng SK (2018) Impact of host cell line choice on glycan profile. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(6):851-867, DOI: 10.1080/07388551.2017.1416577.
- Gomord V, Chamberlain P, Jefferis R, Foye L (2005) Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. Trends Biotechnol. 23: 559–65.
- Gorfien SF (2007) Cell culture media development: customization of animal origin-free components and supplements. Chapter 5. In: Cell Culture and Upstream Processing. Butler M. (ed) Taylor & Francis. pp. 81-102.
- Gupta SK, Dangi AK, Smita M, Dwivedi S (2019)Effectual bioprocess development for protein production, in Applied Microbiology and Bioengineering, ed Ρ. Shukla (London: Academic Press), 203-227. 10.1016/B978-0-12-815407doi: 6.00011-3.
- Gupta SK, and Shukla P (2016) Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. Crit. Rev. Biotechnol. 36, 1089–1098. doi: 10.3109/07388551.2015.1084264.
- Gupta SK Shukla P (2018) Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102:10457–10468.

- https://doi.org/10.1007/s00253-018-9430-6.
- Harcum SW (2006) Protein Glycosylation. Chapter 5. In cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies, Ozturk S. and Hu W.S. (eds). Taylor & Francis. USA. pp. 627-692.
- Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, Ludden C, Reeve R, Rambaut A, Peacock SJ, Robertson DL (2021) SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat. Rev. Microbiol.*19(7):409-429. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0
- Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, Boffito M, Browne D, Burns F, Chadwick DR, Clark R, Cosgrove C, Galloway J, Goodman AL, Heer A, Higham A, lyengar S, Jamal A, Jeanes C, Kalra PA, Kyriakidou C, McAuley DF, Meyrick A, Minassian AM, Minton J, Moore P, Munsoor I, Nicholls H, Osanlou O, Packham J, Pretswell CH, San Francisco Ramos A, Saralaya D, Sheridan RP. Smith R. Soiza RL. Swift PA, Thomson EC, Turner J, Viljoen ME, Albert G, Cho I, Dubovsky F, Glenn G, Rivers J, Robertson A, Smith K, Toback S, the 2019nCoV-302 Study Group (2021). Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. The New England journal of 385(13)1172-1183. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107 659.
- Henderson R, Edwards RJ, Mansouri K, Janowska K, Stalls V, Kopp M, Haynes BF, Acharya P (2020) Glycans on the SARS- CoV-2 spike control the receptor binding domain conformation. *bioRxiv*. Jun 30;2020.06.26.173765. https://doi.org/10.1101/2020.06.26.173765.
- Hoffmann C, Kamps BS (2021) In: Kamps B.S. & Hoffman C. (eds.). Clinical Presentation. COVID Reference 6th

- edition (Chapter 8). Steinhauser Verlag. https://covidreference.com/.
- Hossler P (2012) Protein Glycosylation Control in Mammalian Cell Culture: Past Precedents and Contemporary Prospects. Adv Biochem Engin/Biotechnol. DOI: 10.1007/10_2011_113.
- Huang M, Wang G, Qin J, Petranovic D, Nielsen J (2018) Engineering the protein secretory pathway of Saccharomyces cerevisiae enables improved protein production. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 115, E11025—E11032. doi: 10.1073/pnas.1809921115.
- Huang Y, Yang C, Xu X, Xu W, Liu S (2020) Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. Acta Pharmacologica Sinica. 41:1141-1149. https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4.
- Huertas MJ, Michán C (2019) Paving the way for the production of secretory proteins by yeast cell factories. Microb. Biotechnol. 12, 1095–1096. doi: 10.1111/1751-7915.13342.
- Jefferis R (2007) Post-translational modifications of recombinant antibody proteins. Chapter 6. In: Cell Culture and Upstream Processing. Butler M (ed.) Taylor & Francis. pp. 103-130.
- Krause PR, Fleming TR, Longini IM, Peto R, Briand S, Heymann DL, Beral V, Snape MD, Rees H, Ropero A, Balicer RD, Cramer JP, Muñoz-Fontela C, Gruber M, Gaspar R, Singh JA, Subbarao K, Van Kerkhove MD, Swaminathan S, Ryan MJ, Henao-Restrepo A (2021) SARS-CoV-2 Variants and Vaccines. *N. Engl. J. Med.* doi: 10.1056/NEJMsr2105280.
- Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, Wang Q, Zhang L, Wang X (2020) Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*.

- Vol. 581:215-220. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5.
- Li W, Zhang Ch, Sui J, Kuhn JH, Moore MJ, Luo S, Wong S, Huang I, Xu K, Vasilieva N, Murakami A, He Y, Marasco WA, Guan Y, Choe H, Farzan M (2005) Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* 24:1634–1643.
- Limonta-Fernández M, Chinea-Santiago G, Martín-Dunn AM, Gonzalez-Roche D. Bequet-Romero M. Marquez-Perera G, González-Moya I, Canaan-Haden-Ayala C, Cabrales-Rico A, Espinosa-Rodríguez LA, Ramos-Gómez Y, Andujar-Martínez I, González-López LJ, Perez de la Iglesia M, Zamora-Sanchez J, Cruz-Sui O, Lemos-Pérez Cabrera-Herrera G, Valdes-G, Hernández J. Martinez-Diaz E. Pimentel-Vazquez E, Ayala-Avila M, Guillén-Nieto G (2021) The SARS-CoV-2 receptor-binding expressed in Pichia pastoris as a candidate vaccine antigen. Jul, 03. medRxiv 2021.06.29.21259605; doi: https://doi.org/10.1101/2021.06.29.21 259605
- Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W (2020) Genomic characterisation and epidemiology of 2019 coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. The Lancet. 395(10224):565-574. https://doi.org/10.1016/ S0140-6736(20)30251-8.
- Margolin E, Crispin M, Meyers A, Chapman R, Rybicki EP (2020) A Roadmap for the Molecular Farming of Viral Glycoprotein Vaccines: Engineering Glycosylation and Glycosylation-Directed Folding. Front Plant Sci. Dec

- 3;11:609207.doi: 10.3389/fpls.2020.609207.
- Mendonca SA, Lorincz R, Boucher P, Curiel DT (2021) Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic. *npj Vaccines* 6:97. https://doi.org/10.1038/s41541-021-00356-x.
- Moraes AM, Zucatelli-Mendonca R, Torres-Suazo CA (2008) Culture media for animal cells. Chapter 5. In Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy, Castilho L., Moraes A. M., Augusto EFP & Butler M (eds.) Taylor & Francis. USA. pp. 111-128.
- Nicola M, Alsafi Z, Sohrabi C, Kerwan A, Al-Jabir A, Iosifidis C, Agha M, and Agha R (2020) The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. *Int. J. Surg.* 78:185–193. doi.org/10.1016/j.ijsu.2020.04.018
- Norden R, Nilsson J, Samuelsson E, Risinger C, Sihlbom C, Blixt O, Larson G, Olofsson S, Bergstrom T (2019) Recombinant glycoprotein E of varicella zoster virus contains glycan-peptide motifs that modulate B cell epitopes into discrete immunological signatures. *Int. J. Mol. Sci.* Feb 22;20(4):954. doi: 10.3390/ijms20040954.
- Ozturk SS (2006) Cell culture technology-an Overview. In cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies, Ozturk S & Hu WS (eds.) Taylor & Francis. USA. pp. 1-13.
- Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT (2006) Principles and Applications of the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System. Chapter 18. In cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies, Ozturk S, & Hu WS (eds.) Taylor & Francis. USA. pp. 627-692.
- Perlman S, McIntosh K (2019) Coronaviruses, Including Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Middle East

- Respiratory Syndrome (MERS). In: Bennett J.E., Dolin R., Blaser M.J. and Douglas M. Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, p. 2072. Elsevier Inc. https://expertconsult.inkling.com/read/bennett-mandell-douglas-principle-practice-infect-diseases-9e/chapter-155/coronaviruses-including-severe.
- Peng X, Cheng J, Gong H, Yuan M, Zhao X, Li Z, Wei D (2021) Advances in the design and development of SARS-CoV-2 vaccines. *Mil. Med. Res.* 8:67. https://doi.org/10.1186/s40779-021-00360-1.
- Pillay TS (2020) Gene of the month: the 2019nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. *J. Clin. Pathol.* 2020;73:366–369. doi:10.1136/jclinpath-2020-206658.
- Pollet J, Chen WH, Strych U (2021)
 Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. Advanced Drug Delivery Reviews 170:71–82. https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.001.
- Pollet J, Chen WH, Versteeg L, Keegan B, Zhan B, Wei J, Liu Z, Lee J, Kundu R, Adhikari R, Poveda C, Villar MJ, Leao AC, Rivera JA, Momin Z, Gillespie PM, Kimata JT, Strych U, Hotez PJ, Bottazzi ME (2021a) SARS-CoV-2 RBD219-N1C1: A yeast-expressed SARS-CoV-2 recombinant receptorbinding domain candidate vaccine virus neutralizing stimulates antibodies and T-cell immunity in mice. Apr, 13. Human Vaccines & Immunotherapeutics, DOI: 10.1080/21645515.2021.1901545.
- Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, Martinez DR, Raut R, Markmann A, Cornaby C, Bartelt L, Weiss S, Park Y, Edwards CE, Weimer E, Scherer EM, Rouphael N, Edupuganti S, Weiskopf D, Tse LV, Hou YJ, Margolis D, Sette A, Collins MH, Schmitz J, Baric RS, de Silva AM (2020) The receptor binding domain of the viral spike protein is an

- immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.* Jun 11;5(48):eabc8413. doi: 10.1126/sciimmunol.abc8413.
- Rahman M, Islam M (2021) Early approval of COVID-19 vaccines: Pros and cons. Hum. Vaccines Immunother.17(10):3288-3296. https://doi.org/10.1080/21645515.202 1.1944742.
- Reis CA, Tauber R, Blanchard V (2021) Glycosylation is a key in SARS-CoV-2 infection. *J Mol Med (Berl*). Aug;99(8):1023-1031. doi:10.1007/s00109-021-02092-0.
- Rivero-Calle I, Raguindin PF, Gómez-Rial J, Rodriguez-Tenreiro C, Martinón-Torres F (2019) Meningococcal Group B Vaccine For The Prevention Of Invasive Meningococcal Disease Caused By Neisseria meningitidis Serogroup B. Infection and drug resistance, 12, 3169–3188. doi.org/10.2147/IDR.S159952
- Roncati L, Corsi L (2021) Nucleoside-modified messenger RNA COVID-19 vaccine platform. *J Med Virol.* 93:4054–4057. DOI: 10.1002/jmv.26924.
- Ryzhikov AB, Ryzhikov EA, Bogryantseva MP, Danilenko ED, Imatdinov IR, Nechaeva Pyankov EA, OV. Pyankova OG, Susloparov IM, Taranov OS, Gudymo As, Danilchenko NV, Sleptsova Bodnev SA, Onkhonova GS, Petrov VN, Moiseeva AA, Torzhkova PY, Pyankov SA, Tregubchak TV, Antonets DV, Gavrilova EV, Maksyutov RA (2021) Immunogenicity and protectivity of the peptide vaccine against SARS-CoV-2. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2021;76(1):5–19.
- Sanyaolu A, Okorie C, Marinkovic A, Haider N, Abbasi AF, Jaferi U, Prakash S, Balendra V (2021) The emerging SARS-CoV-2 variants of concern. Ther Adv Infect Dis. Jun

- 18;8:20499361211024372. doi: 10.1177/20499361211024372.
- Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, Geng Q, Auerbach A, Li F (2020) Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, Vol. 581:221-224. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y.
- Shi X, Jarvis DL (2007) Protein Nglycosylation in the baculovirus-insect cell system. *Curr. Drug Targets* 8:1116–1125.
- Singh D, Yi SV (2021) On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Exp. Mol. Med.* 53:537–547. doi.org/10.1038/s12276-021-00604-z
- Smith GE, Summers MD, Fraser MJ (1983)
 Production of human beta interferon in in- sect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3:2156–2165.
- Temmam S, Vongphayloth K, Baquero E, Munier S, Bonomi M, Regnault B, Douangboubpha B, Karami Chrétien D, Sanamxay D, Xayaphet V, Paphaphanh P, Lacoste V, Somlor S, Lakeomany K, Phommavanh N, Pérot P, Dehan O, Amara F, Donati F, Bigot T, Nilges M, Rey FA, van der Werf S, Brey T, Eloit M (2022) coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells. Nature. Article Accelerated Preview. Published online 16 February 2022. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04532-4
- Tihanyi B, Nyitray L (2021) Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discovery Today: Technologies*. Available online 12 Apr 2021. doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003.
- Tripathi NK, Shrivastava (2019) Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. Font. Bioeng. Biotechnol. 7:420. doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420.

- Valdes-Balbin Υ, Santana-Mederos D. Quintero L, Fernández S, Rodriguez L, Sanchez-Ramirez B, Perez-Nicado R, Acosta C, Méndez Y, Ricardo MG, Hernandez T, Bergado G, Pi F, Valdes A, Carmenate T, Ramirez U, Oliva R, Soubal J-P, Garrido R, Cardoso F, Landys M. Gonzalez H. Farinas M. Enriquez J, Noa E, Suarez A, Fang Ch, Espinosa LA, Ramos Y, Luis González LJ, Climent Y, Rojas G, Relova-Hernández E, Cabrera-Infante Y, Losada SL, Boggiano T, Ojito E, León K, Chiodo F, Paquet F, Chen GW, Rivera DG, Garcia-Rivera D, Verez-Bencomo V (2021) SARS-CoV-2 RBD-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine Induces a Strong Neutralizing Immunity in Preclinical Studies. ACS Chem. Biol. 16:1223-1233. https://doi.org/10.1021/acschembio.1 c00272.
- Valdes-Balbin Y, Santana-Mederos D, Paquet F, Fernandez S, Climent Y, Chiodo F, Rodríguez L, Sanchez-Ramirez B, Leon K, Hernandez T, Castellanos-Serra L, Garrido R, Chen GW, Garcia-Rivera D. Rivera DG. Verez-Bencomo (2021a) Molecular Aspects Concerning the Use of the SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain as a Target for Preventive Vaccines. ACS central Science. 7(5):757-767. https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c 00216.
- Venkadapathi J, Govindarajan VK, Sekaran S, Venkatapathy S (2021) A Minireview of the Promising Drugs and Vaccines in Pipeline for the Treatment of COVID-19 and Current Update on Clinical Trials. *Frontiers in Molecular Biosciences*. Jun, Volume 8, doi: 10.3389/fmolb.2021.637378.
- Walls AC, Park Y, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* Apr 16;181(2):281-292.e6.

- https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02. 058.
- Walsh G (2018) Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* 36(12):1136-1145.
- Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M (2020) Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*, 369(6501):330–333. https://doi.org/10.1126/science.abb99 83.
- Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C, Abiona O, Graham BS, McLellan JS (2020) Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation. *Science*, 367, 1260–1263.
- Wu J-M, Lee Ch-K, Hsu T-A (2002)
 Asparagine-linked glycosylation
 modofications in Yeast. Chapter 9. In:
 Cell Engineering, Volume 3:
 Glycosylation. Al-Rubeai M (ed.)
 Kluwer Academic Publishers. pp. 215231.
- Zhang Y, Zhao W, Mao Y, Chen Y, Wang S, Zhong Y, Su T, Gong M, Du D, Lu X, Cheng J, Yang H (2021) Site-specific N-glycosylation Characterization of Recombinant SARS-CoV-2 Spike Proteins. *Mol. Cell Proteomics*. 20:100058. https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.0 02295.
- Zhao P, Praissman JL, Grant OC, Cai Y, Xiao T, Rosenbalm KE, Aoki K, Kellman BP, Bridger R, Barouch DH, Brindley MA, Lewis NE, Tiemeyer M, Chen B, Woods RJ, Wells L (2020) Virus-Receptor Interactions of Glycosylated SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Receptor. *Cell Host Microbe*. 28(4):586-601.e6. doi:10.1016/j.chom.2020.08.004.
- Zuckerman AJ (2009) Coronaviruses and Toroviruses. In: Principles and Practice of Clinical Virology. Wiley. Richman et al. (eds.). p. 511-531.

Actividad antimicrobiana de extractos de *Taraxacum officinale* y *Agave lechuguilla*

Dulce María Carrillo-Hernández¹, Dulce María Galván-Hernández^{1*}

¹Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5, Col. Carboneras, C. P. 42074, Mineral de la Reforma, Hidalgo.

*dulce_galvan11212@uaeh.edu.mx

Resumen

Las especies vegetales son ampliamente estudiadas en diversos campos de la biología, en particular, la obtención y análisis de la actividad biológica de metabolitos secundarios es un área de interés para la biotecnología por los beneficios que aporta al área médica, industrial y agrícola. Existen diversos grupos biológicos usados para este fin, ya sea por su amplia distribución como el caso de Taraxacum officinale, o porque representan especies endémicas que han estado sometidas a manejo constante, como el género Agave, por tal motivo, este trabajo tiene como objetivo realizar una revisión bibliográfica sobre las propiedades antimicrobianas de T. officinale y Agave lechuguilla, plantas conocidas por sus usos y aplicaciones en medicina tradicional. Mediante el uso de extractos etanólicos, acuosos y metanólicos, se pueden obtener fenoles, saponinas, terpenos y alcaloides en T. officinale demostrando actividad antibiótica sobre 9 especies de bacterias y 3 de hongos, también se reportó actividad significativa sobre 4 virus y 2 especies de curculiónidos (Sitophilus zeamais y Acanthoscelides obtectus); en cambio, en A. lechuquilla, mediante extractos acuosos, etanólicos, metanólicos y hexánicos se obtienen taninos, saponinas, polifenoles, glucósidos, flavonoides y alcaloides, los cuales han mostrado actividad antibiótica contra 9 bacterias, 18 especies de hongos y una especie de curculiónido (Sitophilus oryzae). Los componentes de los extractos de ambas plantas tienen gran potencial para la inhibición de microorganismos, algunos de importancia clínica, proporcionando información valiosa de metabolitos con actividad antimicrobiana y de sus aplicaciones como alternativas para el desarrollo de nuevos productos en la industria biotecnológica enfocadas al ámbito médico.

Palabras clave: Metabolitos secundarios, extractos vegetales, actividad antimicrobiana, aprovechamiento biotecnológico.

Abstract

Plant species are widely studied in several fields of biology, in particular, obtaining and analysis of biological activity of secondary metabolites is an area of interest for biotechnology due to the benefits it brings to the medical, industrial, and agricultural areas. There are several biological groups used for this purpose, either due to their wide distribution as in the case of *Taraxacum officinale*, or because they represent endemic species that have been subjected to constant management, such as the genus Agave, for this reason, this work aims to carry out a bibliographic review on the antimicrobial properties of *T. officinale* and *Agave lechuguilla*, plants known for their uses and applications in traditional medicine. Through the use of ethanolic, aqueous and methanolic extracts, can be obtained phenols, saponins, terpenes and alkaloids in *T. officinale* showing antibiotic activity on 9 species of bacteria and 3 of fungi, significant activity was also reported on 4 viruses and 2 species of curculionids (*Sitophilus zeamais* and *Acanthoscelides obtectus*); on the other hand, in *A. lechuguilla*, through the use of aqueous, ethanolic, methanolic

and hexanic extracts can be obtained tannins, saponins, polyphenols, glycosides, flavonoids and alkaloids, which have shown antibiotic activity against 9 bacteria, 18 species of fungi and a species of curculionide (*Sitophilus oryzae*). The components of the extracts of both plants have great potential for the inhibition of microorganisms, some of clinical importance, providing valuable information about metabolites with antimicrobial activity and their applications as alternatives for the development of new products in the biotechnological industry focused on the medical field.

Key words: Secondary metabolites, plant extracts, antimicrobial activity, biotechnological use.

Introducción

En los últimos años distintas especies vegetales han sido estudiadas para la búsqueda y producción de moléculas o compuestos de origen natural con alguna actividad biológica, como una alternativa al uso de fármacos comúnmente empleados en el tratamiento de diversas enfermedades (Azmir et al., 2013; Domínguez, 2015). Las plantas utilizan una parte del carbono asimilado para la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no tienen una función importante dentro del metabolismo primario, estas se denominan metabolitos secundarios, que algunas veces son específicos para cada familia o especie de planta y se clasifican en cuatro grupos principales: terpenos, fenoles, glicósidos y alcaloides (Ávalos & Pérez-Urria, 2009; Croteau et al., 2000; Esquinca & Moreno, 2008).

Actualmente, existen diversas investigaciones enfocadas en la descripción y caracterización de compuestos provenientes de plantas usadas en medicina tradicional (Avellaneda, principalmente 2005), presentan alguna actividad biológica contra microorganismos patógenos. El estudio biotecnológico de plantas con potencial antimicrobiano permite identificar nuevos compuestos que puedan ser utilizados contra microorganismos capaces de resistencia a fármacos, de esta manera se encontrarían compuestos naturales que pueden ser aprovechados mediante la estandarización de sus principios activos, para posteriormente ser producidos en mayor cantidad (Domínguez, 2015; Vivot et al., 2012; Villarreal et al., 2014). Se ha registrado actividad antimicrobiana en metabolitos como fenoles y taninos (Domingo & López, 2003; Mohamad et al., 2005; Vallejo et al., 2014),

terpenos (Vallejo et al., 2014), flavonoides (Tsuchiya et al., 1996; Cordell et al., 2001; Vallejo et al., 2014), quinonas, cumarinas, saponinas (Domingo & López, 2003) y alcaloides (Cordell et al., 2001; Mohamad et al., 2005; Vallejo et al., 2014).

A pesar de la gran diversidad de plantas con la que cuenta el país, aún se requieren investigaciones que documenten identificación de productos derivados de la flora con algún grado de relevancia, por ejemplo, una especie importante para México es Agave lechuquilla, conocida comúnmente como "lechuguilla" (Figura 1), ésta pertenece al orden de los Asparagales, es originaria del norte del país, sin embargo, se encuentra distribuida desde el noroeste hasta Hidalgo y Guanajuato (Rzedowski, 2006). Es utilizada en la fabricación de costales, sombreros, y también se emplea como jabón; en medicina tradicional se usa para generar un agente activo contra la tuberculosis en el ganado (Reyes et al., 2000). Entre sus principales metabolitos se encuentran las saponinas (Ontiveros et al., 2017), estos compuestos tienen la propiedad de actuar sobre las membranas celulares de patógenos, por ejemplo, en levaduras del género Candida provocan la separación de la membrana citoplasmática de la pared celular. desintegrándola (Díaz, 2009); otros metabolitos que se encuentran en la especie son glúcidos y compuestos fenólicos (Ontiveros et al., 2017).

Por otro lado, se cuenta con especies consideradas malezas que en algunas zonas o cultivos pueden ser aprovechadas, tal es el caso de *Taraxacum officinale* conocida como "diente de león" (Figura 2), pertenece a la familia Asteraceae, es de procedencia

europea pero actualmente se encuentra distribuida en todos los continentes en intervalos entre los 2900 hasta los 4000 msnm (Espinosa & Sarukhán,1997), esta planta es utilizada en medicina tradicional para atender malestares como la indigestión, retención de líquidos y hepatitis (Dearing et al., 2001). Dentro de sus principales metabolitos secundarios se encuentran los flavonoides y compuestos fenólicos, los cuales actúan como antioxidantes y antiinflamatorios (Xue et al., 2017), también contiene terpenos, cumarinas y taninos (Chacha, 2018).

Estos ejemplos señalan la importancia de establecer métodos que permitan aprovechar los recursos fitogenéticos con un enfoque sustentable. basados en conocimientos tradicionales y científicos que permitan contribuir a la preservación y conservación de los mismos, por tal motivo, en el presente se analizan las propiedades antimicrobianas de Agave lechuquilla y Taraxacum officinale, especies de interés comercial por el aprovechamiento de sus partes como materia prima y como remedios para algunas afecciones (Carmona et al., 2017; Castillo et al., 2013); además de tener un uso potencial en la industria, en virtud de aplicaciones medicinales antimicrobianas (Del Vitto & Petenatti, 2015).

Metabolitos secundarios en plantas

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas producidas en plantas que al parecer no tienen una función directa, pero que derivan del metabolismo primario del carbono interviniendo en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. Estos pueden ser específicos para ciertos grupos en los cuales, algunos productos pueden tener funciones ecológicas importantes; por ejemplo, para la protección contra depredadores, proporcionándole un sabor amargo a la planta, para atraer polinizadores proporcionando el color y olor de flores y frutos, o como protección ante patógenos tales como virus, hongos o bacterias, actuando sobre sus proteínas y enzimas, dañando el ADN o degradando la pared celular de estos (Cruz et al., 2006). Estos compuestos se pueden encontrar en diversas concentraciones dentro de la planta, algunos casos se encuentran en cantidades bajas o inactivas, basta la presencia de un estímulo externo para producirlas en mayor cantidad reacciones bioquímicas cortas y simples (Montes-Belmont, 2009).



Figura 1. Agave lechuguilla.



Figura 2. Taraxacum officinale. A) Flor de diente de león, B) Estructura completa de la planta.

Las plantas han sido utilizadas de manera tradicional para combatir enfermedades, actualmente, la identificación de metabolitos en plantas es de gran interés para la industria, lo cual genera un alto valor económico, ya que algunos de ellos son utilizados para la manufactura de cosméticos, industria alimentaria y farmacéutica (Sierra et al., 2018).

Los metabolitos secundarios se pueden agrupar en cuatro grupos principales:

Terpenos: Es el grupo más amplio de metabolitos, derivan en compuestos como hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), pigmentos y esenciales. además metabolitos secundarios provenientes del proceso de fotosíntesis como carotenoides, clorofilas, plastoquinonas, y ubiquinonas. Se clasifican por el número de isopropeno (5C) que contienen: los que poseen 10C (dos unidades de 5C) se llaman monoterpenos, los que tienen 15C son sesquiterpenos, los de 20C se llaman diterpenos, cuando tienen 30C se llaman triterpenos, tetraterpenos cuando tienen 40C y politerpenos cuando existen más de 40C. Se sintetizan a partir de dos rutas metabólicas. la del mevalónico y la del metileritritol fosfato,

las cuales generan isopentenil difosfato precursores (IPP) que son sesquiterpenos monoterpenos. diterpenos. Algunas sustancias suelen ser tóxicas para los herbívoros, por tanto, son compuestos con potencial para el control biológico de patógenos (González-López et al., 2016); algunos aceites esenciales tienen actividad actuando sobre la antimicrobiana, bicapa lipídica de la membrana plasmática de los microorganismos alterando su permeabilidad (Bueno-Sánchez et al., 2009).

Fenólicos: Compuestos Se caracterizan por poseer un anillo aromático con un grupo hidroxilo, en este grupo encontramos las cumarinas. flavonoides, lignina y taninos. Existen dos rutas metabólicas implicadas en la generación de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shikimico (que produce fenoles simples), y la del ácido malónico (que genera fenoles diversos), la mayoría de estos compuestos derivan de la fenilalanina (Ávalos & Pérez-Urria, 2009). Las propiedades biológicas de los compuestos fenólicos son diversas, principalmente inhiben enzimas al reaccionar con grupos sulfidrilos de los aminoácidos (Montes-Belmont, 2009), de esta manera ayudan en la defensa

de la planta contra patógenos y herbívoros (Pérez-Pérez et al., 2014). Contribuyen en la fisiología de la planta protegiendo los tejidos frente a la radiación ultravioleta, por ejemplo, los flavonoides poseen características propias para la pigmentación, responden a la luz y controlan los niveles de auxinas contribuyendo en el crecimiento y diferenciación celular (Pérez-Pérez et al., 2014), además al igual que los forman complejos taninos. aminoácidos nucleofílicos de las proteínas lo que conduce a su inactivación (Montes-Belmont, 2009). Sus propiedades antimicrobianas están relacionadas con el número de hidroxilos en su anillo aromático lo que determina el nivel de toxicidad de un compuesto (Domingo & López, 2003).

Glicósidos: Son moléculas compuestas por un carbohidrato denominado glicona, unido a otra estructura llamada aglicona o genina mediante un enlace glicosídico, la aglicona es responsable de su bioactividad (Guerra de León, 2009). El esqueleto químico se clasifica en triterpenos que tienen 30 átomos de carbono y núcleo, tanto el carbohidrato como la aglicona pueden tener estructuras diversas, lo que proporciona los diferentes tipos de glicósidos que existen (Fernandes et al., 2019). Entre los metabolitos más destacados se encuentran las saponinas, éstas poseen un grupo hidrofílico (azúcar) unido a un terpenoide hidrofóbico lo que le otorga propiedades surfactantes, pertenecen al grupo de glicósidos triterpenos (Díaz, 2009). En general, los glicósidos suelen actividad antibacteriana. antifúngica y antiviral, en las saponinas la ramificación terminal del azúcar se relaciona con la actividad microbicida, forman complejos con esteroles de las membranas celulares (Montes-Belmont, 2009) y producen poros en la misma, permeabilidad alterando su provocando la lisis del microorganismo (Díaz, 2009).

Alcaloides: Los alcaloides representan un grupo químicamente homogéneo, los caracteriza la presencia de nitrógeno dentro de un anillo aromático heterocíclico (Domingo & López, 2003), su clasificación se basa en el número de anillos aromáticos que poseen. Normalmente se sintetizan a partir de aminoácidos como lisina, tirosina y triptófano (Piñol et al., 2008), son solubles en agua, y actúan como reservorios de nitrógeno en las plantas, sin embargo, no son productos finales, lo que su concentración y disponibilidad suele ser distinta para cada organismo (Piñol et al., 2008). Su actividad biológica está dirigida a la defensa de las plantas ante ataques de hongos o bacterias, lo cual puede ser a causa de la presencia de nitrógeno en su estructura como amina o amida (Ruitón et al., 1998), se intercalan entre pared celular y el DNA del microorganismo (Domingo & López, 2003), esto ocurre principalmente en los llamados alcaloides cuaternarios (Montes-Belmont, 2009).

Métodos de extracción de metabolitos secundarios

Gracias a los avances tecnológicos con los que se cuenta hoy en día, se pueden extraer los metabolitos de las plantas e informar sobre sus diversas propiedades o la toxicidad que pudieran presentar (Rojas et al., 2015). Existen distintos métodos de extracción que han comprobado ser eficaces y útiles para la obtención de estos compuestos biológicos, entre ellos se encuentran la hidrodestilación, extracción por método de Soxhlet, uso de disolventes (percolación, maceración, digestión, infusión) (Sierra et al., 2018) o nuevas técnicas como los fluidos supercríticos (López, 2011). El éxito en la obtención de un compuesto depende de la textura del material vegetal, el nivel de humedad que presenta, el grado de partícula y del tipo de sustancia que se va a aislar (Chacha 2018); es importante considerar que la elección de un método de extracción depende de la naturaleza química de las sustancias que deseamos obtener, por

ejemplo, para obtener sustancias de baja polaridad se usan comúnmente solventes como el éter o cloroformo, y para sustancias de mediana a alta polaridad, el etanol o acetona (Lizcano & Vergara, 2008). A continuación, se describen algunas técnicas de extracción de metabolitos secundarios comúnmente utilizadas en laboratorios.

Hidrodestilación: es una técnica utilizada para la obtención de aceites esenciales, los cuales se obtienen mediante la volatilidad de los componentes de interés (Azmir et al., 2013). Para ello se calienta un recipiente que contiene el material vegetal y el solvente, los compuestos se arrastran mediante el vapor saturado que se genera (Cerpa, 2007); el producto final puede formar dos fases, si el aceite es lo suficientemente denso, se puede separar por decantación (Rojas, 2009)

Extracción por maceración: consiste en sumergir el material vegetal en disolventes como el etanol o agua, requiere de tiempos prolongados para obtener los metabolitos. normalmente se usan frascos oscuros los cuales se agitan constantemente durante el proceso (Carrión & García, 2010). Es una técnica ampliamente usada por su factibilidad y capacidad extractiva (Espada et al., 2020). Existen dos tipos de maceración: en frío cuando el material vegetal y el disolvente se dejan reposar a temperatura ambiente (Rojas et al., 2015); el otro método es en caliente, que consiste en aplicar calor sobre la mezcla para minimizar el tiempo de extracción, pero hacer que los componentes puede termolábiles se pierdan (López, 2008).

Extracción por percolación: el disolvente pasa a través del material vegetal triturado en un solo sentido, esto permite obtener concentraciones mayores del compuesto ya que el disolvente extrae los compuestos de manera progresiva, esta técnica permite obtener cerca del 95% de compuestos disponibles, un requisito importante es que el material vegetal haya sido hidratado previamente con el disolvente (Carrión & García, 2010).

Extracción por decocción: consiste en colocar el material vegetal en un recipiente que contenga agua caliente al punto de ebullición, se deja hervir durante un tiempo y

posteriormente se retira del fuego dejando reposar; la desventaja de esta técnica es que algunos componentes termolábiles pueden perderse (López, 2002).

Extracción por medio de infusión: el material vegetal se humedece previamente en agua y se coloca a punto de ebullición por un pequeño lapso (alrededor de 5 minutos), posteriormente se deja reposar a temperatura ambiente (Carrión & García, 2010).

Extracción por medio de fluidos supercríticos: un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico (Sierra et al., 2018), esta técnica usa dióxido de carbono (CO₂), el cual se trabaja frío y presurizado, el extracto es recolectado a intervalos cerrando la válvula que suministra el gas; es un método usado para la extracción de aceites esenciales y pigmentos (Peredo et al., 2009).

Extracción en equipo Soxhlet: es una técnica llevada a cabo con un disolvente orgánico como éter, cloroformo, metanol, hexano, etanol o agua (Núñez, 2008), el cual refluye a través de una membrana de celulosa, la columna que conforma el aparato se divide en dos partes, en la superior se encuentra el material vegetal y en la inferior el disolvente, por lo que al evaporarse, éste subirá hasta donde está el material vegetal, posteriormente se condensa y cae sobre el tejido, extrayendo los compuestos deseados (Canosa, 2008). Es una técnica con gran capacidad extractiva y versatilidad en solventes a utilizar (Espada et al., 2020).

Extracción asistida por rotavapor: utiliza un matraz de vacío que rota durante el proceso, este se encuentra dentro de una tina con agua a la que se le suministra calor, el producto de la condensación se recoge en un matraz receptor; esta técnica ofrece la ventaja de incrementar el rendimiento del extracto (BÜCHI, 2015).

Extracción por pulsaciones eléctricas: se basa en la ruptura de la membrana celular mediante pulsos eléctricos, las moléculas se separan según su carga, liberándose el compuesto. Este método puede ser utilizado

para preparar el material antes de una maceración convencional (Azmir et al., 2013).

Extracción asistida por enzimas: esta técnica puede ser utilizada para obtener metabolitos secundarios que se encuentran inmersos en la red de polisacáridos-lignina y que no están disponibles cuando se usa solo una técnica con solvente, por lo que el uso de enzimas como la pectinasa, puede considerarse un pretratamiento de extracción con el fin de liberar compuestos limitados (Rosenthal *et al.*, 1996).

Solventes utilizados para la obtención de metabolitos

La eficiencia de extracción de un metabolito depende del tipo de solvente que se utiliza; sus características tales como puntos de fusión y ebullición, además de su polaridad. están relacionadas con la solubilidad de los compuestos. ΕI agua, diclorometano. cloroformo, acetato de etilo, acetona, etanol, cloroformo y metanol son los solventes más utilizados (Azmir et al., 2013). Los solutos de mayor polaridad se quedan mayor tiempo retenidos, en cambio, los menos polares eluyen con mayor facilidad, por ejemplo, si el solvente es de menor polaridad obtendremos alcaloides, por otro lado, si el solvente es de polaridad obtendremos ésteres, aminas, alcoholes o fenoles (Bravo, 2018). En el caso del metanol, éste puede extraer eficazmente fenoles, flavonoides, quinonas, saponinas, taninos, cumarinas y alcaloides (Raaman, 2006); en solventes como el agua y etanol, se extraen eficazmente taninos, fenoles, antocianinas, terpenoides, alcaloides y saponinas, mientras que el cloroformo y eficaces extravendo fenoles, éter son alcaloides. flavonoides terpenoides У (Cowan, 1999; Soto & Rosales, 2016). Por otro lado, el acetato de etilo arrastra consigo terpenos. taninos, resinas. alcaloides. aminoácidos, glucósidos, flavonoides, fenoles, azúcares reductores y proteínas, demostrando que estos son también solventes de alto espectro para la extracción de metabolitos (Khan et al., 2010), así mismo, la acetona extrae flavonoides aminoácidos y esteroles; finalmente el hexano extrae terpenos, carotenoides y esteroides (Marcano & Hasegawa, 2018).

Métodos de evaluación de la actividad biológica

Diferentes métodos pueden ser utilizados para evaluar la actividad biológica de los extractos vegetales, por ello, se deben tomar en cuenta los factores que pueden afectar las los de microorganismos respuestas (temperatura. pН, actividad del agua, nutrientes y las mismas características de los microorganismos utilizados). Los estudios in vitro evalúan la susceptibilidad de estos microorganismos frente a los extractos vegetales que deseamos analizar, estos ensayos se clasifican principalmente en: métodos de dilución, métodos de difusión y de bioautografía (Ramírez & Marín, 2009).

El método de dilución es útil para determinar la concentración mínima inhibitoria de un extracto, al ser cuantitativo nos permite observar si el extracto tiene actividad bactericida o bacteriostática (Ramírez & Marín, 2009). En esta técnica se evalúan diferentes cantidades de extracto vegetal que se mezcla con el medio de cultivo. posteriormente, se realiza la siembra del microorganismo por extensión en placa (aproximadamente 1 mL de la cepa), y se incuba según las condiciones apropiadas de crecimiento cada tipo para microorganismo (Sánchez et al., 2016). También se puede evaluar por dilución en caldo, sin embargo, la interpretación de los datos se obtiene mediante la medición de turbidez del medio, que nos indica el nivel de viabilidad del microorganismo. Para esta prueba se debe usar un control positivo en el cual se note claramente la mayor turbidez en el medio (Picazo, 2000), generalmente la concentración de bacterias usada para esto es de 5 x 10⁵ unidades formadoras de colonias (ufc)/mL, equivalente a 0.5 en la escala de Mac Farland, siendo el medio de cultivo Müller Hinton (MH) el más usado para el cultivo (Ramírez & Marín, 2009).

El método de difusión puede realizarse mediante papel o pozos, sus resultados son altamente reproducibles y es recomendada por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad en Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), de Estados Unidos. Esta prueba consiste en estudiar el

efecto de las sustancias ensayadas individualmente, mediante la medición del halo de inhibición del crecimiento microorganismo en relación con la concentración de la sustancia. Para esto se coloca un disco de papel filtro Whatman de unos 6 ml de diámetro impregnado del extracto vegetal, o bien, se deposita una cantidad determinada dentro de un pozo hecho directamente en la placa (Sánchez et al., 2016), es importante destacar que para comparar los efectos de las distintas sustancias o concentraciones sobre el microorganismo estudiado. se requiere contrastar con un medicamento o sustancia que actúa como control positivo (Carbajal et al., 2013).

La epsilometría también conocido como "Etest", es un método de susceptibilidad microbiana que combina los principios de la difusión en disco y la dilución en agar, sin embargo, a diferencia de la dilución en disco esta técnica nos arroja un resultado cuantitativo. Consiste en una tira solida de un material que contiene un gradiente de la sustancia a probar en la cara inferior, y una escala de lectura en su cara superior (Viera, 2002), esta tira se coloca sobre el agar para después incubar y medir la concentración mínima inhibitoria, para esto se debe medir desde el punto de intersección entre el extremo de inhibición de la elipse y la tira (Picazo, 2000).

La bioautografía es una técnica sencilla que utiliza la cromatografía para lograr visualizar los campos de actividad antimicrobiana, la cuantificación de la actividad se logra a través de la medición del diámetro del halo de difusión que se genera al aplicar el extracto en diferentes concentraciones (Colorado et al., 2007).

Actividad biológica en extractos de Taraxacum officinale

Taraxacum officinale conocida comúnmente como diente de león ha sido una planta utilizada ampliamente en la medicina tradicional, por lo que los estudios de su actividad biológica son muy variados hasta la fecha, se ha comprobado su actividad contra diversos microorganismos y para tratar distintas enfermedades (Han et al., 2011;

Rodríguez et al., 2017). Contiene en su mayoría compuestos fenólicos (flavonoides y polifenoles), terpenos, cumarinas y taninos (Tettey et al., 2014; Chacha, 2018). Los solventes mayormente utilizados obtener los metabolitos de esta planta son el etanol y el agua, ya que arrastran consigo triterpenos, fenoles, saponinas, flavonoides y quinonas; también el uso del metanol es común ya que es un solvente de alto espectro que arrastra alcaloides, esteroides, cumarinas, fenoles y flavonoides en esta especie (Fabri et al., 2011), a los metabolitos secundarios anteriormente mencionados se les ha atribuido actividad antimicrobiana (Domingo & López, 2003; Mohamad et al., 2005; Oseni & Yussif, 2012), algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1.

La cantidad de metabolitos secundarios difiere al interior de una misma planta, por ejemplo, Rodríguez y colaboradores (2017) identificaron mayor eficacia de inhibición en extractos de tallos de Taraxacum a una concentración de 1000 µg/µl contra bacterias como Enterobacter cloacae, Enterococcus faecium, Providencia rettgeri, Streptococcus pneumoniae, entre otras. En cambio, Oseni & Yussif (2012) identificaron actividad biológica de las hojas en extractos acuosos (100 y 200 μg/μl) y etanólicos (50 μg/μl) contra Klebsiella pneumoneae. Pseudomona aeruginosa, Staphylococcus aureus y Escherichia coli, estas bacterias también han sido estudiadas por otros autores (Azuero et al., 2016; Rodríguez et al., 2017; Díaz et al., 2018; Hernández et al., 2020).

estudio sobre la incidencia de enfermedades infecciosas es de vital controlar cualquier importancia para enfermedad transmisible al hombre. A pesar de que P. aeruginosa es una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza, incluso formando parte del microbiota del hombre, es una de las principales causas de infecciones hospitalarias graves (Azuero et al., 2016), es un patógeno oportunista implicado en infecciones respiratorias, del tracto urinario, gastrointestinales, otitis y bacteriemia (Wagner & Iglewski, 2008). Por otro lado, E. coli es el anaerobio facultativo más abundante de la microflora intestinal humana (Kaper et al., 2004), causa

enfermedades endógenas alterando la pared intestinal tales como peritonitis o sepsis (Azuero et al., 2016). Así mismo, S. aureus es de las principales bacterias asociadas a infecciones nosocomiales, se ha mostrado que presenta resistencia a antibióticos, lo que afecta a los pacientes en forma grave (Cervantes-García et al., 2014), se presenta tras lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas, puede penetrar desde la piel teiidos profundos produciendo bacteriemia y cuadros metastásicos (Azuero et al., 2016). Por esta razón, es importante la búsqueda de nuevas terapias antimicrobianas a partir de la identificación de compuestos naturales como alternativa a los tratamientos con antibióticos conocidos, lo cual, es de gran relevancia en el área de la salud pública (Rodríguez et al., 2017).

Otra bacteria de importancia médica es K. pneumoniae la cual está estrechamente relacionada con los géneros Escherichia y Salmonella, es un patógeno oportunista capaz de colonizar varios sitios corporales (tracto respiratorio, intestino, nasofaringe, piel) (Wyres & Holt, 2016). Díaz y colaboradores (2018) confirmaron que los extractos hexánicos de hoja de Taraxacum, a una concentración de 800 µg/ml es efectivo para inhibir el crecimiento de esta bacteria, otros autores también comprobaron su efecto inhibidor en esta especie (Rodríguez et al., 2017). Con el extracto de hexano se pueden obtener metabolitos de tipo terpenoides como acetato de lupeol, betulina, lupeol, ftalato de dietilo y fitol (Díaz et al., 2018). Los terpenos producen una perturbación de la fracción lipídica de las membranas celulares causando fugas de los materiales intracelulares (Bueno-Sánchez et al., 2009).

Además de la capacidad inhibidora en bacterias, también se ha comprobado actividad biológica de T. officinale contra levaduras. Candida albicans microorganismo versátil para sobrevivir como comensal en varios sitios como el intestino, cavidad oral v vaginal (Azuero et al., 2016), puede afectar de manera superficial hasta provocar infecciones sistémicas potencialmente mortales: pesar colonizar asintomáticamente la micoflora

humana, en condiciones de inmunosupresión del huésped, puede convertirse en un patógeno agresivo (Tsui et al., 2016). El uso de extractos metanólicos (Fabri et al., 2011; Azuero et al., 2016), acuosos, hexánicos (Tettey et al., 2014) y etanólicos (Rodríguez et al., 2017), han mostrado resultados satisfactorios para inhibir el crecimiento de este microorganismo. Así mismo, para reducir el crecimiento de Saccharomyces cerevisiae (Tettey et al., 2014) se han extractos acuosos, hexánicos, utilizado cloruro de metileno y acetato de etilo; y en el caso del hongo Cryptococcus neoformans, se han utilizado extractos metanólicos de Taraxacum (Fabri et al., 2011).

Otros trabajos han mostrado que T. officinale tiene actividad antiviral; el uso de extractos acuosos se ha utilizado contra el virus de la influenza tipo A humana (He et al., 2011). Por otro lado, se ha evaluado el efecto inhibidor de los extractos de Taraxacum sobre la actividad de la transcriptasa reversa (RT) y replicación del VIH-1, esto se debe a la presencia de compuestos fenólicos como el ácido clorogénico, ácido cafeico, glicósidos, flavonoides (lutelina) entre otros, lo cual es relevante para el desarrollo de terapias antirretrovirales (Han et al., 2011). El mecanismo de acción de los fenoles y flavonoides parece estar relacionado con la inhibición enzimática, interacciones con proteínas y formación de complejos en la pared celular de patógenos (Domingo & López, 2003; Rodríguez et al., 2017); otros trabajos han evaluaron la efectividad de extractos de diente de león contra el virus de la fiebre amarilla (Rodríguez et al., 2013) y el virus del dengue (Flores et al., 2018).

También existen estudios que se han enfocado en describir las propiedades insecticidas de *T. officinale* sobre gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* (lannacone *et al.*, 2008) y gorgojo del frijol *Acanthoscelides obtectus* (Jovanović *et al.*, 2007). En la búsqueda de nuevas alternativas para el control de insectos, se recurre a los compuestos fitoquímicos para contrarrestar la resistencia que algunas especies han generado a insecticidas químicos, de esta manera se reduce el impacto al medio

ambiente y salud humana (Ontiveros et al., 2021).

| Tabla 1. Actividad antimicrobiana co | omprobada de Taraxacum officinale. |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Metabolito secundario identificado | Actividad biológica |

| | Tubia 1. Motividad distinisiono | biana comprobada de Taraxacam omemaie. | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Tipo de extracto | Metabolito secundario identificado | Actividad biológica | Referencia |
| Extracto metanólico | No identificados | Antibacteriana contra Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa | (Azuero et al. 2016) |
| Extracto hexánico y clorofórmico | Triterpenos y fenoles | Antifúngica contra <i>Candida albicans</i> Antiviral contra el virus de la fiebre amarilla | (Rodríguez et al. 2013) |
| Extracto acuoso, hexánico, butanólico, cloruro de metileno y acetato de etilo | Fenoles y flavonoides | Antibacteriana contra <i>S. aureus, E. coli, Bacillus subtilis</i> Antifúngica contra <i>C. albicans</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | (Tettey et al. 2014) |
| Extracto etanólico | Quinonas, flavonoides y triterpenos | Antibacteriana contra Streptococcus pneumoniae. Enterococcus faecium, Klebsiella pneumoniae, Providencia rettgeri, P. aeruginosa, Enterobacter cloacae, E. coli y S. aureus Antifúngica contra C. albicans | (Rodríguez et al. 2017) |
| Extracto acuoso | No identificados | Antiviral contra el virus de la influenza A / PR / 8/34 y WSN (H1N1) | (He et al. 2011) |
| Extracto etanólico | Triterpenos y saponinas | Antibacteriana contra S. aureus y P. aeruginosa | (Hernández et al. 2020) |
| Extracto etanólico y acuoso | Saponinas, azúcares reductores, fenoles, triterpenos y fitoesteroles | Antibacteriana contra E. coli y S. aureus | (Oseni y Yussif, 2012) |
| Extracto metanólico | Alcaloides, esteroides, cumarinas, fenoles y flavonoides | Antifúngica contra <i>C. albicans</i> y <i>Cryptococcus neoformans</i> | (Fabri et al. 2011) |
| Extracto metanólico y acuoso | Fenoles | Antiviral contra el virus del dengue | (Flores et al, 2018) |
| Extracto hexánico y de acetato de etilo | Triterpenoides, terpenos y cumarinas | Antibacteriana contra Proteus mirabilis, K. pneumoniae, E. coli y S. aureus | (Díaz et al, 2018) |
| Extracto acuoso | Fenoles y glicósidos | Actividad antiviral contra la RT del VIH-1 y el retrovirus híbrido-MoMuLV / MoMuSV | (Han et al, 2011) |

Actividad biológica en extractos de Agave lechuguilla

Agave lechuguilla conocida como "lechuguilla" es una planta con alta resistencia al ataque de plagas, tiene gran distribución gracias a su reproducción vegetativa y sexual (Reyes et al., 2000), es una planta perenne que posee de 25 a 30 hojas y crece en zonas áridas y semiáridas, en América se distribuye desde Nuevo México hasta Guanajuato (Pérez, 2010). De acuerdo con el conocimiento ancestral, se han identificado distintos usos y efectos terapéuticos de las especies pertenecientes al género Agave, ya sea para combatir el dolor gástrico, golpes, para mejorar el

sistema nervioso, diabetes, cicatrización, artritis reumatoide. antiinflamatorio antimicrobiano, entre otras (Ayón, 2007).

Entre los principales metabolitos secundarios A. lechuguilla se encuentran las saponinas esteroidales (esmilagenina y gitogenina) (Medina, 2014), también contiene flavonoides, taninos y fenoles a los cuales se les atribuye su actividad antimicrobiana (Verastegui, 1995; Barrón, 2016; Diaz, 2009; Tucuch et al., 2020). Se ha registrado que los extractos de A. lechuguilla tienen actividad efectiva para inhibir bacterias como: Kurthia gibsonii, Lactobacillus plantarum (Barrón, 2016), Nocardia asteroides y N. brasiliensis (Verastegui, 1995), Enterobacter aerogenes,

Escherichia coli, Salmonella typhi, Staphylococcus aureus (Méndez et al., 2012), Helicobacter pylori (Gonzales, 2014), Clostridium perfringens y Shigella dysenteriae (Verástegui et al., 1996), entre otros. En la tabla 2 se presentan algunos trabajos de extractos naturales obtenidos de A. lechuguilla y su respectiva actividad biológica.

Como ya se mencionó, la búsqueda de compuestos que ayuden controlar а provocadas por patologías diversos microorganismos es de gran importancia debido a la resistencia que han adquirido contra algunos antibióticos, tal es el caso de la bacteria H. pylori causante de gastritis crónica, úlceras y algunos tipos de cáncer. Se ha comprobado que extractos metanólicos a concentraciones de 10 y 5 mg/ml mostraron actividad contra esta bacteria, en particular, las saponinas a concentraciones entre 0.25-5 mg/ml tienen mejor efectividad, esto se debe a que la saponina de A. lechuguilla es de tipo esteroidal unida a una aglicona y un oligosacárido formado por 4 hexosas y una pentosa, a esta estructura se le atribuye la actividad antibacteriana (Gonzales, 2014). Las saponinas que poseen una cadena de azúcares unida al carbono-3, forman compleios con los esteroles de membranas celulares, generando grandes poros en estas y causando lisis celular (Díaz, 2009).

Por otro lado, los flavonoides compuestos bioactivos que se pueden aprovechar incluso de la biomasa residual; dado que esta especie es utilizada para extraer fibra, el 85% del material cosechado se descarta, se ha comprobado que esta presenta alto contenido biomasa flavonoides principalmente de sorhamnetina, flavanona, hesperidina, delfinidina, quercetina, kaempferol, cianidina, apigenina categuina los cuales tienen varias industria aplicaciones en la agrícola, alimentaria, cosmética У farmacéutica (Morreeuw et al., 2021). Los flavonoides tienen hidróxidos fenólicos en su estructura, pueden entrar fácilmente en la membrana

celular de los microorganismos donde se combinan con sus proteínas y las desnaturalizan, de esta manera se reconoce que actúan como agentes mutágenos (Tereschuk, 2007).

Existen una gran cantidad de hongos causantes de enfermedades en el hombre y animales, los cuales pueden provocar desde afecciones leves como alergias, hasta infecciones fúngicas muy fuertes (micosis) principalmente pacientes en inmunosuprimidos (Guarro, 2012), estas micosis pueden ser difícil de tratar debido a su resistencia a la mayoría de los fármacos disponibles, al igual que en bacterias. Sin embargo, se ha probado la efectividad de extractos metanólicos y acuosos de A. lechuquilla contra Candida albicans y C. rugosa (Verastegui, 1995; Verástegui et al., 1996). También se ha observado efectividad contra el hongo dematofito Epidermophyton floccosum (Verastegui, 1995; Verástegui et 1996), Trichophyton tonsurans (Verastegui, 1995; Verástegui et al., 1996; Verástegui et al., 2008) causante de tiñas corporales; contra Sporothrix schenckii (Verastegui, 1995; Verástegui et al., 1996; Verástegui et al., 2008) causante de infecciones crónicas de la piel y tejidos subcutáneos; y contra hongos del género Cryptococcus [C. neoformans (Verástegui et al., 2008); C. laurentii y C. albidus, (Verastegui, 1995; Verástegui et al., 1996)] los cuales afectan principalmente pulmones y cerebro, aunque pueden infectar cualquier órgano dañando el sistema nervioso central, por eso su infección puede estar asociada con cuadros de meningitis (Li & Mody, 2010).

En el área veterinaria también es de gran importancia disminuir agentes patógenos causantes de enfermedades que puedan transmitirse de animales a humanos o viceversa, el género *Microsporum* pertenece a un grupo de hongos dermatofitos que puede ser transmitido entre grupos de mamíferos (Grässer et al., 2000); mediante extractos etanólicos de *A. lechuguilla*, se ha observado una inhibición en el crecimiento de los hongos *M. canis* (Verastegui, 1995; Verástegui et al., 1996) y *M. gypseum* (Verastegui, 1995; Verástegui et al., 2008).

Tabla 2. Actividad antimicrobiana comprobada de Agave lechuguilla.

| Tipo de extracto | Metabolito secundario identificado | Actividad biológica | Referencia |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Extracto acuoso, etanólico, lanolina y manteca de cacao | Taninos y polifenoles | Antifúngica contra Rhizoctonia solani | (Pérez, 2010). |
| Extracto etanólico | Saponinas esteroidales | Antifúngica contra Candida albicans, Candida rugosa, Cryptococcus neoformans, Cryptococcus laurentii, Cryptococcus albidus, Microsporum canis, Microsporum gypseum, Trichophyton tonsurans, Epidermophyton floccosum, Sporothrix schenckii, Nocardia asteroides y Nocardia brasiliensis | (Verastegui, 1995). |
| Extracto metanólico | Saponinas | Antifúngica contra <i>Penicillium rubrum, Fusarium oxysporum</i> Antibacteriana contra <i>Kurthia gibsoni</i> i y <i>Lactobacillus plantarum</i> | (Barrón, 2016). |
| Extracto etanólico y hexánico | Saponinas, taninos y flavonoides | Antifúngica contra Rhizopus stolonifer, Colletotrichum gloeosporioides y Penicillium digitatum | (De Rodríguez et al. 2011) |
| Extracto etanólico y acuoso | Carbohidratos, azúcares reductores, saponinas y taninos | Antifúngica contra Fusarium oxysporum | (Tucuch et al. 2020) |
| Extracto acuoso y etanólico | Saponinas, taninos y terpenos | Antibacteriana contra Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Salmonella typhi y Staphylococcus aureus | (Méndez et al. 2012) |
| Extracto etanólico | Polifenoles | Antifúngica contra Rhizoctonia solani | (Castillo et al. 2015) |
| Extracto etanólico | No identificados | Antifúngica contra Candida albicans, Candida rugosa, Cryptococcus neoformans, Cryptococcus laurentii, Cryptococcus albidus, Microsporum canis, Microsporum gypseum, Trichophyton tonsurans, Epidermophyton floccosum, y Sporothrix schenckii y antibacteriana contra Clostridium perfringens y Shigella dysenteriae | (Verástegui et al. 1996). |
| Extracto etanólico | No identificados | Antifúngica contra Cryptococcus neoformans, Microsporum gypseum, Trichophyton tonsurans, y Sporothrix schenckii | (Verástegui et al. 2008). |
| Extracto metanólico | Saponinas y alcaloides | Antibacteriana contra Helicobacter pylori | (Gonzales, 2014) |

Así mismo, existen hongos fitopatógenos saprobios o parásitos de plantas como los pertenecientes al género Fusarium (Guarro, 2012) que causan grandes afectaciones en los cultivos, la búsqueda de componentes bioactivos naturales para ser utilizados como control biológico es de gran relevancia por su bajo costo y fácil aplicación (Rivera et al., 2004). Se ha probado la eficacia de extractos metanólicos (Barrón, 2016), etanólicos y acuosos (Tucuch et al., 2020) de A. lechuguilla contra Fusarium oxysporum. También se ha encontrado efectividad de extractos etanólicos (Castillo et al., 2015), y acuosos (Pérez, 2010), los cuales son ricos en polifenoles y taninos, contra Rhizoctonia solani, una especie fitopatógena de plantas; además de la efectividad contra el moho Rhizopus stolonifer (De Rodríguez et al., 2011) los cuales degradan frutos y vegetales. El género Penicillium incluye un grupo de especies capaces de infectar granos y semillas de almacén causando disminución capacidad en su de germinación, decoloración, calentamiento y producción de micotoxinas (Tequida-Meneses et al., 2002), los extractos metanólicos de A. lechuguilla han tenido efectividad contra Penicillium rubrum (Barrón, 2016), en cambio, los etanólicos y hexánicos han tenido un resultado positivo contra P. digitatum (De Rodríguez et al., 2011), esto señala la importancia de investigar las propiedades de los metabolitos en plantas para identificar compuestos inofensivos tanto para el hombre como para el ambiente.

Otra propiedad de los extractos de agave es su capacidad insecticida, un ejemplo de ello es su capacidad repelente contra el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae*, se conoce que los alcaloides, terpenos, esteroides, fenoles, flavonoides y taninos contienen funciones defensivas contra insectos (Orozco, 2006), muchos de estos metabolitos se encuentran presentes en *A. lechuguilla*, aunque aún no se ha identificado la estructura específica de compuestos particulares a los que se les atribuya esta actividad biológica.

Conclusión

Los extractos de Taraxacum officinale y lechuguilla presentan actividad inhibitoria relevante ante distintos tipos de microorganismos brindando una oportunidad para el desarrollo de nuevos medicamentos. La actividad antimicrobiana por parte de extractos de plantas, así como las técnicas de extracción de metabolitos secundarios han sido estudiadas por científicos de divergentes campos entre ellos biotecnólogos. los cuales buscan aprovechamiento de fuentes de origen biológico para el desarrollo de bienes, servicios y productos de importancia y utilidad para la sociedad. Para esto los ensayos in vitro permiten evaluar la efectividad de una variedad de compuestos tienen efectos inhibidores microorganismos, sin embargo, aún queda inconcluso conocer exactamente cuáles son compuestos encargados de actividad, así como los efectos y toxicidad que puedan causar, es por esto que se debe continuar con la estandarización de los métodos de extracción y estudios enfocados al análisis y caracterización de la estructura molecular de dichos compuestos mediante métodos cromatográficos. A pesar de ello, el contar con un resumen sobre los diferentes métodos de extracción y principales grupos de metabolitos encontrados en T. officinale y A. lechuquilla nos acerca y dirige el camino de la investigación para ahondar más sobre compuestos específicos con actividad biológica y así, proponer su posible industrialización a futuro con el sustento de investigaciones sistematizadas

Referencias

Ávalos GA, Pérez-Urria E (2009) Metabolismo secundario de plantas. Serie Fisiología Vegetal Reduca 2(3): 119 – 145.

Avellaneda S, Rojas N, Cuellar R, Fonseca R (2005) Actividad antibacteriana de *Diphysa minutifolia*. Rose. Revista Cubana de Plantas Medicinales 10(2): 1-10.

Ayón PY (2007) Estudio etnofarmacológico de las diferentes especies endémicas de agave en la medicina tradicional del Estado de

- Hidalgo. Tesis de Licenciatura en Farmacia. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo, México. pp. 1-85
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Omar AKM (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of Food Engineering 117(4): 426–436. http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013. 01.0140.
- Azuero A, Jaramillo JC, San Martin D, D´Armas H (2016) Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas de uso ancestral en Ecuador. Revista Ciencia UNEMI 9(20): 11 18. https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016pp11-18p.
- Barrón HRL (2016) Evaluación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de saponinas de la pulpa de *Agave lechuguilla* Torrey. Tesis Maestría en Ciencia y Tecnología con especialidad en Biotecnología Productiva. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. México. pp. 1-122.
- Bravo BFM (2018) Comparación de la capacidad antioxidante de cuatro metabolitos secundarios presentes en la planta amazónica Banisteriopsis caapi (Ayahuasca) frente la N-Acetil cisteína, fármaco antioxidante comercial. Tesis de Ingenieria en Biotecnología de los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca Ecuador. pp. 1-108.
- Bueno-Sánchez JG, Martínez-Morales JR, Stashenko E (2009) Actividad antimicobacteriana de terpenos. Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud 41(3): 231-235.
- BÜCHI Labortechnik AG (2015) Manual de instrucciones (Original) Rotavapor® R II, Versión E. pp. 27.
- Canosa RM (2008) Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenes. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales. Tesis Doctorado en Química. Universidad de Santiago de Compostela. pp. 1-290.

- Carvajal TZ, Ramírez ZL, Ducurú MG, Valery CG, Méndez J, Rodríguez OM (2013) Actividad biológica de extractos de tres plantas sobre bacterias patógenas para el humano. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 33(1): 35-39.
- Carmona J, Morales MT, Mussatto S, Castillo QD, Ríos GL (2017) Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). Revista Mexicana de Ciencias Forestales 8(42): 100 122.
- Carrión JÁV, García GCR (2010) Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia metódica. Tesis en Bioquímica y Farmacéutica. Universidad de Cuenca. Ecuador. pp. 1-138.
- Castillo QD, Sáenz RJT, Narcia VM, Vázquez RJA (2013) Propiedades físicomecánicas de la fibra de *Agave lechuguilla* Torr. de cinco procedencias bajo plantaciones. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 4(19): 78-91.
- Castillo RF, Hernández CFD, Gallegos MG, Flores OA, Rodríguez HR, Aguilar CN (2015) Efectividad *in vitro* de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia solani*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6(3): 549 562.
- Cerpa Ch.MG (2007) Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. Tesis Doctorado. Universidad de Valladolid, España. pp. 1-303.
- Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM (2014)
 Características generales del Staphylococcus aureus. Revista Latinoamericana de Patología Clínica, Medicina de Laboratorio 61(1): 28-40.
- Chacha GGE (2018) Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de extracto hidro etanólico de las hojas de Taraxacum officinale en Proteus spp. Tesis Maestría en Farmacia Clínica y Hospitalaria. Universidad Regional Autónoma de los Andes. Ambato, Ecuador. pp. 1-98.
- Colorado RJ, Galeano JE, Martínez MA (2007)
 Desarrollo de la bioautografía directa
 como método de referencia para evaluar
 actividad antimicrobiana de la
 gentamicina contra Escherichia coli.

- Revista de la Facultad de Química Farmacéutica 14(1): 67 71.
- Cordell GA, Quinn BML, Farnsworth NR (2001)
 The potential of alkaloids in drug discovery. Phytotherapy Research 15(3): 183–205. https://doi.org/10.1002/ptr.890.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) Natural products (Secondary metabolites). In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (ed). American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. pp. 1250-1318.
- Cowan MM (1999) Plant products as microbial agents. Clinical Microbiology Reviews 12(4): 564-582. https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564.
- Cruz BM, Hernández FY, Rivas FE (2006) Mecanismos de resistencia de las plantas al ataque de patógenos y plagas. Temas de Ciencia y Tecnología 10(29): 45-54.
- De Rodríguez DJ, García RR, Castillo FDH, González CNA, Galindo AS, Quintanilla JAV, Zuccolotto LEM (2011) *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan desert plants against postharvest fruit fungi. Industrial Crops and Products 34(1): 960–966. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.0 3.001.
- Dearing M, Mangione A, Karasov W (2001) Plant secondary compounds as diuretics: An overlooked consequence. American Zoologist (41): 890–901. https://doi.org/10.1093/icb/41.4.890.
- Del Vitto LA, Petenatti EM (2015) Asteráceas de importancia económica y ambiental Segunda parte: Otras plantas útiles y nocivas. Multequina (24): 47-74.
- Díaz PLN (2009) Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. Revista de Estudios Transdisciplinarios 1(2): 32-55.
- Díaz K, Espinoza L, Madrid A, Pizarro L, Chamy R (2018) Isolation and identification of compounds from bioactive extracts of *Taraxacum officinale* Weber ex F. H. Wigg. (Dandelion) as a potential source of antibacterial agents. Evidence-Based Complementary and Alternative

- Medicine: 1–8. https://doi.org/10.1155/2018/2706417.
- Domingo D, López BM (2003) Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia. 16(4): 385 393.
- Domínguez F (2015) La Biotecnología y las Plantas Medicinales. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias 66: 1-8.
- Espada DL, Ferrer SA, Padró RL, Arias RL, León DL (2020) *Dendropanax arboreus*: estudio fitoquímico de la savia del tronco. Revista Cubana de Química 32(1): 74 87.
- Espinosa GFJ, Sarukhán J (1997) Manual de malezas del valle de México. Ediciones científicas Universitarias. UNAM-Fondo de Cultura Económica. México.
- Esquinca ARG, Moreno MC (2008) Papel ecológico de los metabolitos secundarios. Lacandonia 2(1): 123 130.
- Fabri RL, Nogueira MS, Dutra LB, Bouzada MLM, Scio E (2011) Potencial antioxidante y antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. Revista Brasileira de Plantas Medicinais 13(2): 183-189. https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000200009.
- Fernandes BF, Gonçalves HR, Guimarães MR, Alves AA, Bieski IGC (2019) Estudo etnofarmacológico das plantas medicinais com presença de saponinas e sua importância medicinal. Revista da Saúde da AJES 5(9):16 22.
- Flores OMR, Rosas MNH, Moreno DA, Vallejo RV, Reyes LJ, Domínguez F, Santos LG (2018) *Taraxacum officinale* and *Urtica dioica* extracts inhibit dengue virus serotype 2 replication *in vitro*. BMC Complementary and Alternative Medicine 18(1): 10. https://doi.org/10.1186/s12906-018-2163-3.
- Gonzales CG (2014) Aislamiento y caracterización de compuestos derivados de plantas de la familia *Agavaceae* con efecto antimicrobiano sobre *Helicobacter pylori*. Tesis Doctoral en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México. pp. 1-138.
- González-López ÁM, Quiñones-Aguilar EE, Rincón-Enríquez G (2016) Actividad biológica de los terpenos en el área agroalimentaria. En: Los compuestos

- bioactivos y tecnologías de extracción. Espinosa-Andrews H, García-Márquez E, Gastélum-Martínez E (ed). CIATEJ, A.C. Tecnología Alimentaria. Zapopán, Jalisco, México. pp. 33 49.
- Gräser Y, Kuijpers AFA, El Fari M, Presber W, De Hoog GS (2000) Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporum canis* complex. Medical Mycology, 38: 143-153. http://doi.org/10.1080/mmy.38.2.143.153
- Guarro J (2012) Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 30(1): 33-39. http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.006
- Guerra de León OJ (2009) Los glicósidos esteroidales. Aislamiento y elucidación estructural. Feijóo.
- Han H, He W, Wang W, Gao B (2011) Inhibitory effect of aqueous dandelion extract on HIV-1 replication and reverse transcriptase activity. BMC Complementary and Alternative Medicine 11(112): 10. https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-112.
- He W, Han H, Wang W, Gao B (2011) Antiinfluenza virus effect of aqueous extracts from dandelion. Virology Journal 8(1): 538. https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-538.
- Hernández MLV, Pabón BCL, Hernández RP (2020) Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de plantas medicinales empleadas para el control de infecciones urinarias. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas 16(1): 43-56. https://doi.org/10.18359/rfcb.4896.
- lannacone J, Seng WY, Alcantara P, Rodríguez R (2008) Actividad insecticida y repelente de plantas en el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais*. Revista Scentia 10: 146-154.
- Jovanović Z, Kostić M, Popović Z (2007) Grainprotective properties of herbal extracts against the bean weevil *Acanthoscelides obtectus* Say. Industrial Crops and Products, 26(1): 100–104. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.01.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology, 2: 123-140.

- Khan R, Latif A, Mohammad Z, Khan UA (2010)
 Activity of solvent extracts of *Prosopis*spicigera, Zingiber officinale and
 Trachyspermum ammi against multidrug
 resistant bacterial and fungal strains. The
 Journal of Infection in Developing
 Countries. 4(5): 292-300.
 https://doi.org/10.3855/jidc.621.
- Li SS, Mody CH (2010) Cryptococcus.
 Proceedings of the American Thoracic
 Society, 7: 186-196.
 http://doi.org/10.1513/pats.200907-063AL
- Lizcano RAJ, Vergara GJL (2008) Evaluación de la actividad de antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente а patógenos microorganismos У fitopatógenos. Tesis Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. pp. 1-129.
- López AE (2008) Producción de bebida alcohólica de alta calidad. Tesis Licenciatura en Ingeniería Química. Universidad de las Américas, Puebla Cholula, México. pp. 1-51.
- López GN (2011) Obtención y aplicación de extractos naturales. Conferencia llevada a cabo en el Consorcio Estratégico de investigación y desarrollo de envases alimentarios. España.
- López LT (2002) Formas de administración más habituales de plantas medicinales. Fitoterapia 21(2): 122 125.
- Marcano D, Hasegawa (2018) Fitoquímica orgánica. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. pp. 588.
- Medina GMI (2014) Determinación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos del escapo floral de *Agave salmiana*. Tesis Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Celaya. Guanajuato, México. pp. 1-65.
- Méndez M, Rodríguez R, Ruiz J, Morales AD, Castillo F, Hernández CFD, Aguilar CN (2012) Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. Industrial Crops and Products 37(1): 445–450.

- https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.
- Mohamad FM, Ameenah GF, Anwar HS (2005) Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of mauritius, Pharmaceutical Biology 43(3): 237-242.
 - https://doi.org/10.1080/13880200590928 825.
- Montes-Belmont R (2009) Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Micología 29: 73-82.
- Morreeuw ZP, Escobedo-Fregoso C, Ríos-González LJ, Castillo-Quiroz D, Reyes AG (2021) Transcriptome-based metabolic profiling of flavonoids in *Agave lechuguilla* waste biomass. Plant Science, 305:110748.

 https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.11
- Núñez CE (2008) Extracciones con Soxhlet. (http://cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf)
- Ontiveros FD, Sandoval PPA, Ávila DMA, De la Fuente SNM, Linaje TMS, Valencia CCM (2017) Evaluación de la actividad antimicrobiana y perfil fitoquímico del Agave lechuguilla Torrey. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos (2): 217-222.
- Ontiveros GJG, Cerna ChE, Ochoa FYM, Landeros FJ, Aguirre ULA, Hernández JA (2021) Actividad insecticida de extractos de plantas sobre *Cuerna costalis* (F.). Southwestern Entomologist, 45(4): 1045-1060.

https://doi.org/10.3958/059.045.0422

- Orozco GC (2006) Efectividad biológica in vitro de extractos vegetales en insectos plaga indicadores. Tesis Maestría en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila, México. pp. 1-99.
- Oseni LA, Yussif I (2012) Screening ethanolic and aqueous leaf extracts of *Taraxacum officinale* for *in vitro* bacteria growth inhibition. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences 20(6): 4.
- Peredo H, Palou E, López A (2009) Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas Selectos de Ingeniería de

- Alimentos. Universidad de las Américas Puebla. Puebla, México. pp. 24 32.
- Pérez HME (2010) Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de plantas del sureste de Coahuila en diferentes solventes contra *Rhizoctonia solani*. Tesis Ingeniero Agrónomo Parasitólogo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila, México. pp. 74.
- Pérez-Pérez E, Ettiene G, Marín M, Casassa-Padron A, Silva N, Raga J, González C, Sandoval L, Medina D (2014) Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). Revista de la Facultad de Agronomía 31: 60 77.
- Picazo JJ (2000) Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. In: Procedimientos de Microbiología Clínica. pp. 1-54.
- Piñol MT, Palazón J, Cusidó RM (2008) 17. Introducción al metabolismo secundario, In: Fundamentos de fisiología vegetal. Azcón-Bieto J, Talón M. (ed). McGRAW HILL Interamericana. pp.323-348.
- Ramírez LS, Marín CD (2009) Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad bacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia Et Technica 15(42): 263-268. https://doi.org/10.22517/23447214.2687.
- Raaman N (2006) Phytochemical techniques. New India Publishing Agency Nueva Delhi, India. pp. 1-311.
- Reyes AJA, Aguirre RJR, Peña VCB (2000) Biología y aprovechamiento de *Agave lechuguilla* Torrey. Boletín de la Sociedad Botánica de México 67: 75-88. https://doi.org/10.17129/botsci.1626.
- Rivera AMM, Hechevarría SI, Carballo GC, Reyes AM (2004) Posibilidades de control de enfermedades a partir de productos naturales y controles biológicos en las plantas medicinales. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 9(3):0-0.
- Rodríguez OM, Chumpitaz Z, Ríos S, Méndez M, Méndez J, Cabrera G (2013) Actividad antiviral contra el virus de la fiebre amarilla, cepa vacunal 17D, de extractos de hojas de *Taraxacum officinale* GH Weber ex Wiggers. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 12(4): 346-355.

- Rodríguez PCN, Zarate SAG, Sánchez LCL (2017) Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. NOVA. 15(27): 119-129. https://doi.org/10.22490/24629448.1963.
- Rojas OA (2009) Hidrodestilación y caracterización del aceite esencial de plantas medicinales de Santa María Huitepec, Oaxaca. Instituto Politécnico Nacional. México. pp. 1-79.
- Rojas AL, Jaramillo JC, Barros LM (2015) Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios. Universidad Técnica de Machala. Ecuador. pp. 1-106.
- Rosenthal A, Pyle DL, Niranjan K (1996)
 Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. Enzyme and Microbial Technology 19(6): 402–420. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)80004-F.
- Ruitón CMF, Alcarraz MR, Vidalón MT (1998) Flavonoides y alcaloides de *Lupinus* ballianus CC Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. Ciencia e Investigación, 1(2): 71-80.
- Rzedowski J (2006) Vegetación de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. pp. 1-504.
- Sánchez GE, Castillo HSL, García PP (2016)
 Actividad antimicrobiana. Investigación
 en plantas de importancia médica.
 OmniaScience. Barcelona, España.
- Sierra SMA, Barros AR, Gómez PD, Mejía TA, Suárez RD (2018) Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales. Fundación Universitaria Agraria de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 1-52.
- Soto GM, Rosales CM (2016) Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxyla*. Maderas. Ciencia y Tecnología 18(4): 701-714. http://dx.doi.org/ 10.4067/S0718-221X2016005000061.
- Tequida-Meneses M, Cortez-Rocha M, Rosas-Burgos EC, López-Sandoval S, Corrales-Maldonado C (2002) Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus*

- flavus, Aspergillus niger, Penicillium chrysogenum, Penicillium expansum, Fusarium moniliforme y Fusarium poae. Revista Iberoamericana de Micología, 19(1): 84-88.
- Tereschuk ML, Quarenghi MV, González M, Baigorí MD (2007) Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de Tagetes del Noa. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 6(6): 364 366.
- Tettey CO, Ocloo A, Nagajyoth PCN, Lee KD (2014) An in vitro analysis antiproliferative and antimicrobial solvent activities of fractions of Taraxacum officinale (Dandelion) leaf. of Applied Pharmaceutical Journal 41-45. Science 4(3): http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2014.403
- Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA (2016)
 Pathogenesis of *Candida albicans*biofilm. Pathogens and disease. 74(4): 113. http://doi.org/10.1093/femspd/ftw018
- Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, Iinuma M (1996) Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of Ethnopharmacology 50(1): 27–34. https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)85514-0.
- Tucuch PMA, Arredondo VR, Hernández CFD (2020) Antifungal activity of phytochemical compounds of extracts from Mexican semi-desert plants against *Fusarium oxysporum* from tomato by microdilution in plate method. Nova Scientia 25(2): 1-19. https://doi.org/10.21640/ns.v12i25.2345.
- Vallejo A, Feitosa A, Gourlart AE, Pires LL, Mosquera OM (2014) Tamizaje de acción antimicrobiana de 34 extractos vegetales contra bacilos gramnegativos. Salud & Sociedad 1(2): 34-39.
- Verastegui MMÁ (1995) Análisis del efecto antifúngico de 20 extractos de plantas.
 Tesis Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiologia.
 Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México pp. 1-57.
- Verástegui MA, Sánchez CA, Heredia NL, García AJS (1996) Antimicrobial activity of

- extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. Journal of Ethnopharmacology 52(3): 175–177. https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)84802-1
- Verástegui Á, Verde J, García S, Heredia N, Oranday A, Rivas C (2008) Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24(7): 1249–1252. https://doi.org/10.1007/s11274-007-9563-8
- Villarreal ML, Cardoso TA, Ortíz A, Ashutosh S (2014) Biotecnología para producir medicinas de plantas mexicanas. Revista Digital Universitaria 15(8): 1-15.
- Vivot EP, Sánchez C, Cacik F, Sequin C (2012) Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos

- (Argentina). Ciencia, Docencia y Tecnología 23(45): 165-185.
- Vjera TV (2002) Evaluación e indicación de las técnicas de difusión-dilución (epsilometría). Revista Chilena de Infectología 19(2): 85 87. http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182002019200003.
- Wagner VE, Iglewski BH (2008) *P. aeruginosa* biofilms in CF infection. Clinical Reviews in Allergy & Immunology. 35: 124-134.
- Wyres KL, Holt KE (2016) *Klebsiella pneumoniae* population genomic and antimicrobial-resistant clones. Trends in Microbiology. 24(12): 944-956. http://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.007
- Xue Y, Zhang S, Du M, Zhu M-J (2017)
 Dandelion extract suppresses reactive oxidative species and inflammasome in intestinal epithelial cells. Journal of Functional Foods, 29: 10-18 http://doi.org/10.1016/j.jff.2016.11.032

Alternativas terapéuticas actuales con nanopartículas poliméricas para el tratamiento de Alzheimer y Parkinson

C. Debernardo-Hurtado*, P. Kuribreña-Morales, A. Ibarra-Zamora, I. Cervantes-Díaz-Barriga, M. Talavera-Paulin.

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.

*Autor para correspondencia camila.debernardohu@anahuac.mx

Resumen

Las enfermedades neurodegenerativas han significado un gran desafío para el desarrollo de nuevos tratamientos debido a la gran dificultad de atravesar la barrera hematoencefálica. A raíz de esto, con el paso de los años se han buscado nuevas tecnologías que puedan resolver este problema y el uso de nanotecnología parece ser una opción. Esta revisión se centra en recopilar información sobre el uso de las nanopartículas poliméricas (NPPs) en dos de las enfermedades neurodegenerativas con mayor prevalencia en el mundo: Alzheimer y Párkinson. El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la presencia de placas seniles provocadas por la acumulación de beta amiloide. Por otra parte, el Párkinson ha sido relacionada con los "PARK Genes"; éstos causan alteraciones en la homeostasis mitocondrial y a su vez en el aparato locomotor gracias a la deficiencia de dopamina en el sistema nigroestriado, la pérdida de pigmentación oscura del cerebro y con el, los cuerpos de Lewy. Además, se abordan diversas NPPs que en estudios in vitro e in vivo, han presentado alta biodisponibilidad, baja toxicidad, transporte eficaz a través de la barrera hematoencefálica (BHE), mejorando en algunos casos la motricidad, niveles de dopamina, desagregación de fibrillas amiloides, entre otros. Las NPPs representan un área de oportunidad para el desarrollo de nuevos tratamientos para Alzheimer, Párkinson e incluso otras enfermedades neurodegenerativas sin solución o tratamiento aparente.

Palabras clave: Nanopartículas, Alzheimer, Parkinson, nanomedicina.

Abstract

Neurodegenerative diseases have been a great challenge for the development of new treatments due to the great difficulty of crossing the blood-brain barrier. As a result, over the years new technologies have been sought to solve this problem and the use of nanotechnology seems to be an option. This review focuses on gathering information on the use of polymeric nanoparticles (NPPs) in two of the most prevalent neurodegenerative diseases in the world: Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Alzheimer's is a neurodegenerative disease characterized by the presence of senile plaques caused by the accumulation of beta-amyloid. On the other hand, Parkinson's has been related to "PARK Genes"; these cause alterations in mitochondrial homeostasis and in turn in the locomotor system due to dopamine deficiency in the nigrostriatal system, loss of dark pigmentation of the brain and with it, Lewy bodies. In addition, several NPPs that in *in vitro* and *in vivo* studies have shown high bioavailability, low toxicity, efficient transport across the blood-brain barrier (BBB), improving in some cases motor function, dopamine levels, amyloid fibril disaggregation, among others, are discussed. NPPs represent an area of opportunity for the development of new treatments for Alzheimer's, Parkinson's and even other neurodegenerative diseases with no apparent solution or treatment.

Key words: Nanoparticles, Alzheimer, Parkinson, nanomedicina

Introducción

La "Nanociencia" es la disciplina que "estudia los fenómenos y el manejo de materiales a escala nanométrica" de acuerdo con Gómez (2018). De ella deriva la nanotecnología, una herramienta que permite la manipulación, desarrollo y aplicación de productos y procesos a nano escala. Una definición más amplia de este término, mencionada por Kantuta (2010), es "disciplina centrada en el estudio, diseño, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales, mediante el control de la materia y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nano escala".

los Dentro de múltiples desarrollos nanotecnológicos encuentran las nanopartículas (NPs), las cuales se componen de diferentes materiales con tamaños que oscilan en un rango de entre 1 a 100 nm, como lo indica Najahi et al. (2021). Gracias a que las NPs pueden estar constituidas por diversos materiales, pueden presentar diversas estructuras entre las cuales las más comunes son nanotubos de carbono, nanocristales, puntos cuánticos, nanofibras, filtros nanoporosos, nanohilos, nanopartículas de óxidos metálicos, nanocapilares, dispersión de nanopartículas, películas de nanopines, nanocompuestos de polímero, entre otros (Oropesa, 2012). Esta diversidad de materiales ha permitido su uso en múltiples áreas como la industria textil (Navarro, 2018) v (Villa, 2018); la agricultura (Saldívar, 2018); generación de energía (Jaime, 2018); ahorro de agua (Medina, 2015); informática (Medina, 2015). Además, de manera especial el desarrollo de sistemas de administración de medicamentos en el área de la nanomedicina (Hernández, 2016). Sin embargo, a pesar del gran interés y usos explorados de las NPs, su producción todavía no cuenta con una reglamentación específica de las técnicas debido a la novedad relativa del área (Medina, 2015).

Igualmente, la gran superficie de contacto de las NPs, pese al tamaño, ha sido una de las características más importantes para los investigadores, ya que les confiere mayor capacidad de funcionalización. Otra propiedad importante, gracias a su menor tamaño, es la capacidad que algunas NPs han demostrado para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Dicha barrera es una bicapa lipídica que aísla al cerebro del contacto directo con la sangre, confiriendo una protección contra compuestos y moléculas. De igual manera la BHE permite el transporte selectivo entre la sangre y el cerebro (Hernández, 2016).

Aplicación de las NPs para el trasporte y liberación de medicamentos

Una de las ventajas que poseen las NPs, como menciona Bao, G et al. (2018), es su capacidad de encapsular medicamentos y su liberación posterior en la zona requerida. Gracias a la gran estabilidad que presentan. han resultado ideales para la experimentación in vitro e in vivo. Por lo tanto, su uso como transportadores de fármacos, es una de las aplicaciones más importantes en nanomedicina, ya que mejora la selectividad del tratamiento, permite una localización más rápida en el sitio de acción donde debe de liberarse el agente terapéutico, permitiendo así una eficacia de tan solo segundos. En cambio, los fármacos tradicionales pueden demorar el inicio de su efecto después de 10 o 15 minutos según lo reportado por Gómez (2018). De igual manera, la técnica brinda la opción de mejorar la vida útil de los medicamentos gracias a la protección que les confiere contra la degradación química v enzimática y permite además una velocidad específica de liberación en el órgano blanco de acuerdo con Aparicio et al. (2018). Aunque hay diferentes tipos de NPs que se pueden utilizar para este propósito, las más utilizadas investigadas hov en día son las nanopartículas poliméricas (NPPs). Bao, G et al. (2018) menciona que esto se debe principalmente а las propiedades fisicoquímicas que le confieren los materiales orgánicos de los que están constituidas.

Esta revisión se centra en las NPPs debido a las ventajas que ofrecen, entre ellas, su

sistema de liberación controlada del fármaco que les permiten llegar a la diana terapéutica con mayor facilidad y aumentar su eficacia. Además, ofrecen una protección al fármaco de los agentes atmosféricos mejorando la farmacodinamia, reduciendo la degradación del principio activo y sus efectos tóxicos, mejorando el tiempo de circulación del fármaco en el organismo y su velocidad de disolución y aumento de la biodisponibilidad (García, 2016). Finalmente, como menciona Cayero (2018), las NPPs, brindan la ventaja de interiorizarse a lugares no accesibles para los fármacos tradicionales debido al pequeño tamaño que poseen además de tener la capacidad de biodegradarse en un tiempo óptimo.

Entre las nanopartículas poliméricas que se utilizan para la administración de fármacos se encuentran principalmente dos tipos: las hidrófobas e hidrófilas. Algunos ejemplos de NPPs hidrófobas son: el ácido poliácido (PLA), el cual ya se ha empleado para la administración de dexametasona, como comenta Ruy, C. R et al. (2003); la poliEcaprolactona que hoy en día es utilizada con fármacos que inhiben la histona desacetilasa como tratamiento para el cáncer, según datos de Tu, B. et al. (2020); el uso de polianhídridos para el tratamiento de gliosarcoma Scott, A et al. (2011). En cambio, dentro de las NPPs hidrófilas se encuentran ejemplos como el poli-etilenglicol (POG), el cual actualmente se estudia por su uso potencial para tratamiento de cáncer de piel, según lo descrito por Gallo Ramírez, J. P et al. (2019). Además, Almeida, M et al. (2018) menciona que el poli-oxido de propileno PPO está en proceso investigación para sus aplicaciones en tratamientos para el cáncer. Por otra parte, también se ha observado la gran utilidad de las NPPs como biosensores para la detección de anomalías en pacientes con infecciones microbianas y en desordenes moleculares, según lo reportado por Gómez (2018). La función de las NPPs es actuar como acarreadores de moléculas que faciliten el reconocimiento de las células y los tejidos en el cuerpo. Debido a que las aplicaciones requieren que las NPPs permanezcan un tiempo determinado en el cuerpo del paciente. se ha observado que es de suma importancia, como nos comenta Aparicio (2018), el tamaño

de la partícula. Si su escala supera los 100 nm las NPPs son eliminadas por torrente sanguíneo, mientras que, si se encuentran por debajo de 10 nm, se excretan por medio de la orina y las que están basadas en algún metal pueden ser fácilmente filtradas por los riñones, según datos de Zheng (2018), causando que el tiempo de exposición de las células blanco a las NPPs se vea afectado.

Asimismo, en diferentes estudios se plantea el uso de NPPs para enfermedades específicas de alta prevalencia como la osteoporosis, Sinha (2021). Dicho estudio muestra cómo las NPPs también tienen la capacidad de ser promotoras del crecimiento de tejido óseo, siendo dicha característica diferenciadora la clave para el tratamiento de osteoporosis. De igual manera, se ha investigado el empleo de NPPs especialmente para el tratamiento de cáncer. Las Nanopartículas de oro (AuNPPs) han recibido, en esta área, un mayor peso ya pueden usarse como agentes antineoplásicos que, según señala Fundora (2021), tienen gran eficacia citotóxica que puede ser potenciada con la ayuda de algunos agentes estabilizadores. Al mismo tiempo, hoy en día se cuentan con varias NPPs que se pueden encontrar en productos comerciales clínicamente aprobados como Doxil® (usado en quimioterapias), Abraxane (medicamento contra el cáncer), y AmBisome (tratamiento antifúngico) de acuerdo con datos de Baetke et al. (2015).

Como indica Aparicio et al. (2018), gracias a que las NPPs tienen la característica de poder atravesar la barrera hematoencefálica, surge la posibilidad de la aplicación de tecnología a nano escala en tratamientos para enfermedades neurodegenerativas. Las nuevas técnicas se basan en la administración de fármacos dirigidos a regiones específicas del cerebro, causando que la disponibilidad del agente terapéutico en el sistema nervioso mejore y la toxicidad causada por distribución a otros órganos disminuya.

¿Qué son las enfermedades neurodegenerativas?

Las enfermedades neurodegenerativas, según Torrel *et al.* (2015) son un grupo de enfermedades caracterizadas por una

considerable pérdida de neuronas a lo largo del tiempo en áreas concretas del cerebro o en sistemas anatomofuncionales. Hay más de 100 enfermedades neurodegenerativas existentes, sin embargo, en esta revisión, se hará hincapié en los dos tipos más comunes y sus tratamientos con NPPs, Alzheimer y Parkinson.

Debido a la importancia que tienen estas enfermedades en el panorama mundial, se desarrollado diversas terapias tratamientos aplicados a éstas, sin embargo, se han encontrado tres principales desafíos que detienen su avance. El primero de estos desafíos es la llegada de los fármacos al cerebro va que cuenta con barreras anatómicas difíciles de cruzar por cualquier molécula siendo una de éstas la BHE que, como menciona Gárate (2018), ayuda a mantener la homeostasis cerebral siendo casi impermeable, limitando el paso de fármacos y su absorción, lo que convierte al cerebro en un órgano diana casi imposible de alcanzar. El segundo desafío es la vía de administración ya que la vía local es altamente invasiva y las vías sistémicas como la oral y la parenteral pueden resultar en un cambio de las propiedades del fármaco debido a los procesos de degradación a los que este está sometido antes de llegar al cerebro (Cunha et al., 2017). Sin embargo, hay autores como Muntimadugu et al. (2016), que hablan del uso de la vía intranasal para administración de NPPs-fármacos con beneficios como alta vascularización, permeabilidad en la mucosa a través del bulbo olfatorio creando un camino directo de nariz a cerebro y administración fácil e indolora. Finalmente, el ultimo desafío se encuentra en seleccionar un modelo animal que sea capaz de simular las enfermedades neurodegenerativas posibilitando así escalar el tratamiento de animales a humanos de forma segura ya que el modelo tradicional, el ratón, no es capaz de adquirir la patología de Alzheimer de forma natural por lo que esta enfermedad se tiene que inducir de manera genética provocando un aumento de costo (Steffen et al., 2016); el segundo modelo usado en estas enfermedades es el primate Cercopitecus verdes (Chlorocebus pygerythrus) pero los estudios con este modelo animal se han visto restringidos

gracias a las diversas implicaciones éticas (Toledano *et al.*, 2011).

Alzheimer y aplicación de nanopartículas poliméricas.

El Alzheimer según Matthew et al. (2016) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la formación de placas seniles que ocasiona la muerte neuronal y sinapsis deficientes. Es una enfermedad autosómica dominante que, según Cannavo et al. (2019), se caracteriza por la presencia de una mutación en el cromosoma 21 y en el gen que codifica para la proteína integral de membrana denominada proteína precursora de amiloide (APP), la cual también se encuentra en células no neuronales con distintas isoformas, sin embargo, se cree que tiene un papel importante durante regulación de la sinapsis neuronal.

La proteína APP, una vez colocada en la membrana celular como parte normal de su procesamiento, es escindida por la acción de la beta y gamma secretasas en los dominios extracelular y transmembranales formando así la proteína beta amiloide que se acumula extracelularmente formando las placas seniles que resultan neurotóxicas. Dichas placas tienen un proceso de formación complejo debido a que están formadas por 40 aminoácidos aproximadamente. Menéndez et al. (2017), son derivadas de la glicoproteína transmembranal APP y tienen la tendencia a conglomerarse formando una gran cantidad de sábanas de beta plegada. La APP es de gran tamaño y tiene sitios de unión con la heparina y cobre funcionando como un transportador de metales y regulador del procesamiento proteolítico. Por lo tanto, si la proteína APP sufre una mutación, entonces habrá un aumento de beta amiloide y, a su vez, una mayor toxicidad en las neuronas provocando la aparición de esta enfermedad neurodegenerativa. Por otro lado, de manera simultánea en el citoplasma, la proteína tau, es encargada de regular la estabilidad del citoesqueleto por medio de los microtúbulos y la morfología axonal al generar cambios estructurales y conformacionales por medio de la fosforilación y desfosforilación. Datos de Pupo et al. (2017), mencionan que la proteína tau es hiperfosforilada por la proteína beta

amiloide, a causa del estrés oxidativo ocasionado por ella. Como consecuencia, los microtúbulos neuronales pierden estabilidad y a su vez, ocasionan la formación de un ovillo a lo largo de la dendrita, provocando la muerte neuronal y con ella la demencia, según Deyan et al. (2015).

Al ser el tipo de demencia más común en personas de la tercera edad comprendiendo el 70% de todos los casos y un total de pacientes enfermos en el mundo de 46.8 millones según INNN (2017), es urgente encontrar un tratamiento útil y prometedor. Por todo esto, como se observa en la Tabla 1, en la última década se ha estudiado el uso de NPPs aplicadas а diferentes tratamientos aprovechando su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. En algunos casos, se realizaron diferentes modificaciones, siendo una de ellas, hibridaciones con otros compuestos como el quitosano (Hanafy et al., 2016), o recubrimientos con polisorbato 80

para modificar su solubilidad (Wilson et al, 2008). Los ensayos con estas NPPs se hicieron en modelos in vitro e in vivo. Para los estudios in vitro se utilizaron células HT22 (Fan et al., 2018), células HaCaT (Madhu et al., 2021), bolsa de diálisis (Madhu et al., 2021), células PBCEC (Li, G. et al., 2020) y células SH-SY5Y (Jha, A. et al., 2019). Por otro lado, para los estudios in vivo los modelos animales fueron ratas Sprague-Dawley, las cuales fueron utilizadas en 5 estudios. Asimismo, también se utilizaron ratas Wistar (Hanafy et al., 2016), ratones Balb/c (Kaur et al., 2018), APP/PS1 (Fan et al., 2018) y 3xTqAD (Yao et al., 2011). Además de los modelos experimentales, se recalca la importancia de las vías de administración. La mayoría de los estudios utilizan la vía intranasal debido a la absorción por el bulbo olfatorio (figura 1). Sin embargo, hay dos estudios hechos por Mittal (2011) y Yao et al. (2011) en donde se usa exitosamente la administración oral (vía sistémica), optando así por una absorción en la barrera hematoencefálica.

Tabla 1. Diferentes NPPs en proceso de investigación o aprobación para el tratamiento de Alzheimer.

| Nanopartículas evaluadas | Modelo de estudio | <u>Vía de</u> administración y dosis | <u>Principales</u> <u>hallazgos</u> | <u>Referencias</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Nanopartículas de poli(n-butil cianoacrilato) solas y recubiertas con polisorbato 80 | in vivo: Ratas | Administración sistémica por inyección intravenosa dosis: 1 mg/kg | Mejora significativa en el transporte del fármaco. | (Wilson <i>et al</i> , 2008) |
| Poli(lactida-co- glicolida) (PLGA) + estradiol y Poli(lactida-co- glicolida) (PLGA) + Tween 80. | in vivo: ratas macho Sprague- Dawley | vía oral Dosis: 100, 200 Y 400 µg por rata. vía intravenosa. Dosis: 100 µg por rata. | El recubrimiento de las NPPs con T-80 mostró ser estable durante su paso por el tracto gastrointestinal (GI). Vía oral igual de eficaz que vía intravenosa para | (Mittal, 2011) |

| | | | el desarrollo de la | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| 2-desoxi-D- glucosa (2-DG) | In vivo: Ratones 3xTgAD hembra de 6 meses de | Adicionado al alimento AIN- 93G Dosis: 0.04% | enfermedad Reducción del estrés oxidativo en mitocondrias del modelo in vivo. Disminución de la | (Yao <i>et al</i> , 2011) |
| | edad | por dos semanas | proteína precursora amiloidea y los oligómeros beta amiloide. | |
| Nanopartículas de hidrobromuro de galantamina con quitosano (CX-NP2) | <i>In vivo</i> : Ratas Wistar | Vía intranasal Tamaño de la nanopartícula: 48.3 a 68.3 nm. | Sencillez de preparación, costo relativamente bajo y aumentó la biodisponibilidad como reservorios de fármacos | (Hanafy <i>et al</i> , 2016) |
| | | Dosis <i>in vivo</i> : | intracelulares | |
| | | 3 mg/kg | | |
| Nanopartículas de PGLA con tarenflurbil (TFB) | in vivo: Ratas Sprague- Dawley | Vía intranasal Tamaño de la nanopartícula: 247 nm. Dosis <i>in vivo</i> : | Desarrollo de sistemas de entrega eficientes para TFB. protección del fármaco contra la degradación química y biológica | (Muntimadugu et al, 2016) |
| | | 5 mg/kg | en la cavidad nasal | |
| Nanopartículas PLGA-PEG- B6/Cur | in vitro: células HT22 in vivo: ratones (APP/PS1) | dosis <i>in vitro</i> : (50, 100, 200, y 500 µg/mL) Vía intraperitoneal Dosis <i>in vivo</i> : 25 mg/kg | Buena bioseguridad, alta biodisponibilidad y mejora de la eficiencia de transporte al cerebro. | (Fan <i>et al,</i> 2018) |

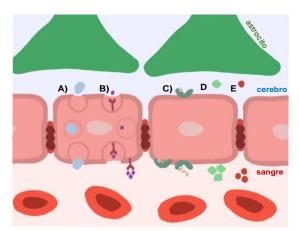
| Nanopartículas de PLGA- quitosanocon análogos de TRH antiepilépticos | In vivo: ratas Sprague- Dawley y ratón Balb/c macho In vitro: células HaCaT | Vía intranasal Tamaño de la nanopartícula: 163.6 ± 8 nm. Dosis in vitro: 51.5 µg/mL | Aumentó la biodisponibilidad y mejoró el suministro del fármaco al cerebro brindando propiedades mucoadhesivas. | (Kaur <i>et al</i> , 2018) |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| | | Dosis <i>in vivo</i> : 80 mg/kg | | |
| Quitosano- PLGA | in vitro: células SH- SY5Y | Dosis: 20 μg. /ml | Inhibición de la formación de amiloide in vitro, desagregación de los amiloides preformados e Inhibición de la formación de fibrillas amiloides. | (Jha <i>et al</i> , 2019) |
| PEG-polilactida (PLA) conjugadas con Lf (PPN) (Lf- PPN). | in vitro: células endoteliales capilares de cerebro porcino (PBCEC). | Dosis de PBCEC: 1, 2 y 4 ng/mL | Buena encapsulación, mejora de suministro a través de la y tamaño de NPPs pequeño. | (Li et al, 2020) |
| Nanopartículas de PGLA con Withaferin-A | <i>In vitro</i> : Bolsa de Diálisis | Tamaño de la nanopartícula: 121 ± 2 nm Dosis <i>in vitro</i> : 500 µg/ml | Nanoencapsulación de un fármaco antioxidante y su retención de actividad antioxidante a la hora de liberarse para prevenir la neurodegeneración en Alzheimer | (Madhu <i>et al</i> , 2021) |

Además del tipo de NPPs, del modelo animal y de la vía de administración, una de las cosas más importantes de las investigaciones son

los hallazgos encontrados. Los estudios mostraron buena bioseguridad y biodisponibilidad de las NPPs utilizadas (Fan

et al., 2018), mejora en el suministro del fármaco al cerebro (Kaur et al., 2018) y buena protección del fármaco al ser encapsulado en las NP, evitando así su degradación (Madhu et al., 2021). Se destaca también la falta de seguimiento en los ensayos que utilizan la vía oral para la administración de las NP en los estudios de Mittal (2011) y Yao et al. (2011).

Estos estudios demostraron resultados muy buenos. sin embargo, no continuaron tomando en cuenta esta vía administración, ya que se optaron por vías intranasales. El cambio de enfoque se puede deber a un acceso más facilitado al cerebro sin exponer al fármaco a altos procesos de degradación (figura 1).



- A) TRANSCITOSIS MEDIADA POR ABSORCIÓN.
- B) TRANSCITOSIS MEDIADA POR RECEPTORES.
- C) TRANSPORTE MEDIADO POR TRANSPORTISTAS.
- D) DIFUCIÓN PASIVA.
- E) VÍA PARACELULAR.

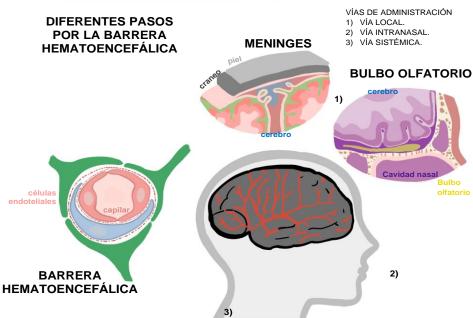


Figura 1. Vías de transporte de las NPPs y su llegada al cerebro. Se pueden observar las diferentes vías de administración y las partes del cerebro en las que se absorben. 1) Administración por vía local y absorción por meninges. 2) Administración por vía intranasal y absorción por bulbo olfatorio. 3) Administración por vía sistemática y absorción por la barrera hematoencefálica. En los apartados A), B), C), D) y E) se muestran diferentes tipos de transporte a través de la barrera hematoencefálica.

Parkinson y aplicación de nanopartículas poliméricas.

La enfermedad de Parkinson (PD) está clasificada como un desorden neurodegenerativo, el cual puede ser progresivo o crónico dependiendo paciente. Según Dexter & Jenner (2013), ocupa el segundo lugar en prevalencia de enfermedades neurodegenerativas en países industrializados, siendo el género femenino el más afectado. Aunque no se conoce con certeza la causa de PD, Kouli et al. (2018) mencionan la influencia de ciertos factores que propician la enfermedad. La edad es el factor de riesgo más importante va que la prevalencia a los 60 años es de 0.5-1%, teniendo un aumento a 1-3% en la edad de 80

Datos de Schulte & Gasser (2011) mencionan la presencia de aproximadamente 23 genes relacionados con PD los cuales han sido denominados como "PARK Genes". Dentro de los genes autosómicos dominantes, se han encontrado mutaciones puntuales en SNCA (gen de alfa-sinucleina) y LRRK2 (quinasa rica en repeticiones de leucina 2). Este último gen ha sido confirmado como patogénico por Healy et al. (2008), debido a las implicaciones que puede tener en el paciente. Por otra parte, los genes autosómicos recesivos PRKN, PINK1 v DJ-1 han sido relacionados con alteraciones en la homeostasis mitocondrial en un estudio realizado por Pickrell & Youle (2015). Además, PARK14, PARK17 v PARK20 han sido descritos como genes que han influido en el desarrollo de Parkinson atípico.

A medida que avanza la enfermedad, el paciente puede presentar síntomas que afectan o no al aparato locomotor. Los síntomas motrices causados por PD pueden ser bradicinesia, hipocinesia, acinesia, rigidez en el cuerpo e inestabilidad en la postura. Kouli *et al.* (2018) han reportado que dichos síntomas se pueden comenzar a presentar de 12-14 años antes del diagnóstico de PD. Balestrino & Schapira (2020) mencionan que en la patología de PD hay una deficiencia de dopamina en el sistema nigroestriado.

Además, Sonne et al. (2021) observaron una pérdida de pigmentación en la sustancia oscura del cerebro, específicamente en la parte compacta. En dicha estructura, se localizan las neuronas dopaminérgicas, responsables de la producción de dopamina en el cerebro. Dennis (2012) indica que la pérdida de pigmentación en la parte compacta se da por la muerte de neuronas dopaminérgicas, las cuales contienen un pigmento llamado neuro-melanina.

Una de las posibles causas de la deficiencia de dopamina es producto de la falla fisiológica en la zona subventricular del cerebro. Li *et al.* (2019) ha descrito que dicha área tiene un papel muy importante, ya que es el origen de la neurogénesis de las células productoras de dopamina. El neurotransmisor descrito es clave en los ganglios basales, ya que tiene la tarea de intensificar las señales nerviosas que son enviadas a los músculos. Debido a ello, se ha relacionado la pérdida de dopamina con los síntomas relacionados a afectaciones en el sistema locomotor de personas que padecen la enfermedad en cuestión.

Por otra parte, Brundin et al. (2017) menciona que en PD hay una acumulación de proteínas interneuronales. alfa-sinucleína principalmente, las cuales reciben el nombre de cuerpos de Lewy (LB). Las proteínas mencionadas tienden a presentar un mal plegamiento, lo cual afecta su estructura y la solubilidad que tienen. Debido a lo descrito anteriormente, se generan inclusiones proteicas las cuales pueden ser localizadas dentro de las neuronas. Sin embargo, autopsias realizadas por Rocha & Morrison (2021) han encontrado LB en el córtex cerebral, sustancia oscura e hipocampo. Por ende, se ha llevado a realizar modelos sobre la formación de LB y su movimiento a través del sistema nervioso. Braak et al. (2003) han propuesto un modelo en donde la presencia de LB comienza en el núcleo de los nervios vágales y glosofaríngeo, pasando al tronco encefálico y terminando en el córtex cerebral. Debido a que dichas inclusiones proteicas son encontradas a lo largo del sistema nervioso, Beach (2017) ha relacionado los LB con la demencia y otros desordenes relacionados con cuerpos de Lewy, al igual que nuevas terapias para ambas enfermedades.

La enfermedad de Parkinson, al afectar la producción de dopamina en el sistema nervioso central, ha sido el blanco para el desarrollo de nuevos tratamientos. Al igual que con la enfermedad de Alzheimer, una limitante para nuevos tratamientos es el poder atravesar la barrera BHE y una correcta absorción por parte de las células diana. En consecuencia, se han ido estudiando nuevas formas de liberación de un compuesto activo con la capacidad de atravesar la BHE. Las NPPs, como es mencionado por Baskin et al. (2020), brindan la oportunidad de eliminar las limitantes farmacocinéticas debido a su tamaño y afinidad por su ligando. En estudios realizados por Paccione (2016), Hasdsri et al. (2009), Rashed et al. (2015) y Zhang et al. (2018) han demostrado que las NPPs estudiadas tienen la capacidad de atravesar la BHE, al igual que transportar de manera eficiente el compuesto activo. Dentro de los estudios, principalmente se han tomado como célula diana a las neuronas productoras de dopamina, aunque de igual manera se ha abordado para la alfa-sinucleína. Los tratamientos mencionados buscan disminuir la

pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro, al igual que aumentar la concentración de dopamina. Con ello, se quiere lograr una terapia contra el PD, la cual pueda revertir parcial o complemente los efectos adversos que promueve esta enfermedad.

En los últimos años se han realizado diversos estudios en los que se utilizan NPPs cargadas con diferentes compuestos, como se observa en la tabla 2. En estas investigaciones se utilizan modelos in vitro e in vivo; algunos de los modelos in vitro incluyeron células SH-SY5Y con MPP+ (Zhang et al., 2018), HUVEC (Gan et al., 2019), MBCK (Zhao et al., 2020), BE (2)-M17 y HeLa (García et al, 2021). Por otro lado, los estudios in vivo utilizan ratas Wistar (Gambaryan et al., 2014) y Sprague-Dawley (Zhao et al., 2020); ratones C57BL/6 (Wu et al., 2020) y GAT1 knockout inducidos con Parkinson (Zhao et al., 2020) y Drosophila melanogaster o mosca de la fruta (Fernández et al., 2021) que destaca por ser uno de los modelos más recientes utilizados en esta enfermedad.

Tabla 2. Diferentes NPPs en proceso de investigación o aprobación para el tratamiento de Parkinson.

| Nanopartículas evaluadas | Modelo de estudio | <u>Vía de</u> <u>administración</u> <u>y dosis</u> | <u>Principales</u> <u>hallazgos</u> | Referencias |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Poli lactida-co- glicólida (PGA) | In vivo: Ratas Wistar | Administración intranasal Dosis: 0.35 mg/kg diariamente por 4 semanas. | Mayor biodisponibilidad y ruta de administración más eficaz. Recuperación motriz. El efecto duró una semana después de ser suspendido el tratamiento, lo cual | (Gambaryan et al, 2014) |

| | | | supone un tiempo de | |
|-----------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|--------------------|
| | | | vida media mayor. | |
| | | | | |
| nonogol do | in vivo: rotoo Winter | Implantación | Mojoro ojgnificativo | (Rashed et |
| nanogel de | in vivo: ratas Wistar | intratecal | Mejora significativa | <i>al</i> , 2015) |
| PVP/PAA | macho adultas | | en el estado de | |
| cargado con | | Dosis: 12 mg/kg | catalepsia y mejora | |
| dopamina | | | en la función | |
| | | | mitocondrial del | |
| | | | cerebro. | |
| | | | Mayor cruce de la | |
| NPPs de | In vivo: Ratas | Vía intranasal | BH, reducción de | (Sridhar <i>et</i> |
| quitosano | macho Sprague- | | metabolismo de | <i>al</i> , 2018) |
| cargadas de | Dawley | Dosis: | selegilina sistémico. | |
| selegilina | | <i>In vivo</i> : 1 mg/kg | oologa olololliloo | |
| | | m vivo. Ting/kg | Restauración de | |
| | | | actividad antioxidante | |
| | | | de catalasa y | |
| | | | aumento de | |
| | | | concentración de | |
| | | | glutatión reducido, | |
| | | | tras tratamiento. | |
| | | | | |
| | | | Niveles de dopamina | |
| | | | significativamente | |
| | | | más elevados tras | |
| | | | administración de | |
| | | | NPPs que | |
| | | | con soluciones | |
| | | | orales. | |
| | in vitro: | Administración | Mayor vida útil de | (Zhang et al, |
| Cerasomas | neuroblastoma | intravenosa | circulación, mayor | 2018) |
| modificados con | humano (SH- | | permeación, entrega | · |
| PS 80 cargados | SY5Y) con MPP+ | | eficiente de | |
| con curcumina | (1-metil-4- | Dosis: 15 mg de | curcumina y | |
| (CPC) | fenilpiridina) | curcumina/kg | | |
| | | | | |
| | l . | | | |

| | | | menos | |
|-----------------|----------------------|------------------|------------------------|----------------------|
| | in vivo: ratones | | complicaciones no | |
| | C57BL/6 | | deseadas. | |
| | | | No toxicidad, | |
| NPPs cargadas | In vitro: HUVEC | Vía sistémica | potencial para inhibir | (Gan <i>et al</i> , |
| con miRNA-124 | (células | catéter. | las vías de | 2019) |
| | endoteliales) y | | señalización | |
| | células microgliales | Dosis: 20 nM | proinflamatorias y | |
| | BV2. | | mejorar la | |
| | | | neuroprotección, | |
| | In vivo: ratones | | disminución de 3 | |
| | C57BL/6 macho | | veces en la apoptosis | |
| | | | en las células | |
| | in vitro: células de | Células MBCK: | Mejorar en la | (Zhao <i>et al</i> , |
| GB encapsulado | riñón canino Madin- | 1µg /ml | absorción de GB, | 2020) |
| en PEG-PCL | Darby (MBCK) y | | | |
| (GB-NP) | células de | células SH- | Mejora en transporte | |
| | neuroblastoma SH- | SY5Y: 1, 5, 10 y | a través de barreras, | |
| | SY5Y | 20 μM. | reducción de déficits | |
| | | | conductuales. | |
| | in vivo: embriones | pez cebra: | | |
| | y larvas de pez | Dosis: 50, 100, | | |
| | cebra, | 200 | | |
| | ratas Sprague- | ng/mL | | |
| | Dawley | | | |
| | 1/ 0.4.74 | Ratas vía oral | | |
| | y ratón GAT1 | Dosis: 4 mg/kg. | | |
| | knockout inducido | | | |
| | por MPTP de | Ratones: vía | | |
| | Parkinson | oral | | |
| | | Dosis: 5 mg/kg. | | |
| | | 20313. 3 Hig/kg. | | |
| _ | | Inyección | _ | |
| Extracto de | In vivo: Ratones | intraperitoneal | Restauración de la | (Wu et al, |
| Ginkgo biloba - | C57BL/6 macho | | motricidad, | 2020) |
| | | | disminución del daño | |

| ácido protocatecuico | | Dosis: 0.1 mL/10g de peso, por 21 días | en neuronas. Aumento en la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) en la sustancia negra del mesencéfalo. | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Poli-butil- cianoacrilato con dopamina | in vivo: ratas Wistar macho adultas | Administración intravenosa Dosis: 4.95 de dopamina mg/kg | Liberación sostenida y reversión de déficits neuroconductuales | (Jahansooz et al, 2020) |
| NPPs de 1,4-bis(imidazol-1-ylmethyl) benceno (BIX) encapsulando dopamina (Inspiradas en neuromelanina) | In vitro: células BE(2)-M17 y HeLa In vivo: ratones hembra de 12 semanas, (tolerancia y MRI) ratas: Sprague- Dawley | Inyección intracerebrovent ricular Dosis: 200 µg Administración intranasal Dosis: 20 µL con dosis total equivalente de 50 µg de DA libre. | Las nanopartículas mostraron baja toxicidad in vitro, al igual que mayor retención intracelular de dopamina y lento metabolismo. La administración nasal mostró ser eficiente atenuando alteraciones motoras. | (García et al, 2021) |
| NPPs de polivinilpirrolidon a(PVP) cargas de luteína | In vivo: Drosophila melanogaster (Moscas de la fruta) | vía oral Dosis: 6 μM de Iuteína. | Efectos de neuroprotección contra daño inducido por rotenona en sistema locomotor, permitiendo supervivencia celular, | Fernandes et al, 2021) |

restauración de
niveles de dopamina,
la actividad
enzimática de tirosina
hidroxilasa,
acetilcolinesterasa e
indicadores de estrés
oxidativo.

Así mismo la importancia de los estudios mencionados radica en los resultados obtenidos, mostrando así una biodisponibilidad de las NPPs (Jahansooz et al., 2020), mejor cruce a través de la BHE (Sridhar et al., 2018) y mayor vida útil de circulación de la curcumina (Zhang et al., 2018). En cuanto a los efectos que tuvieron las NPPs, Rashed et al. (2015) reportó una mejora en la función mitocondrial del cerebro. mientras que Wu et al. (2020) y Fernández et al. (2021) pudieron disminuir el daño en las neuronas y brindar protección neuronal, respectivamente. Los estudios de toxicidad son de suma importancia en el desarrollo de terapias alternas para Parkinson, sin embargo, solo el estudio de García et al. (2021) reportó una baja toxicidad en los estudios in vitro.

Perspectiva actual

Analizando las diferentes terapias que han sido probadas durante muchos años, podemos darnos cuenta de que existen tres desafíos importantes a las que éstas se buscan superar enfrentan y que se constantemente. El primer desafío para combatir las enfermedades neurodegenerativas es atravesar la barrera BHE ya que limita el paso de fármacos y su absorción. Como segundo mayor desafío para combatir las enfermedades neurodegenerativas, se encuentra la vía de administración debido a que el cerebro es un órgano diana difícil para los fármacos. El tercer desafío consiste en encontrar el modelo animal ideal para simular las enfermedades neurodegenerativas y poder escalar el tratamiento de animales a humanos deteniendo el avance en el área.

Las NPs poliméricas demostraron un gran potencial para superar los primeros dos desafíos, no obstante, para el tercer desafío no hay suficiente bibliografía que respalde una nueva solución. Como se observó en las tablas 1 y 2, los estudios in vivo se suelen hacer en una mayor cantidad con modelos de estudio tradicionales, sin embargo, se han probado nuevos modelos como las moscas de la fruta y los peces cebra, siendo el más prometedor este último. El uso del pez cebra en las investigaciones realizadas por Saleem et al. (2018), y más recientemente por Zhao et al. (2020), brindan una nueva perspectiva al tercer desafío ya que el modelo no cuenta con las restricciones anteriormente mencionadas y cuenta con un gran parecido neurológico al humano en las vías neuroanatómicas, neuroquímicas y conductuales; además de que dicho modelo cuenta con un sistema nervioso relativamente simple y con una transparencia óptica de los embriones permitiendo imágenes neurológicas en tiempo real, mejorando así la comprensión de la actividad neuronal y la distrofia axonal de una manera no invasiva.

En conclusión, las NPPs han abierto muchas puertas en el área médica dando así la posibilidad de combinar diversos materiales para obtener mejores y más prometedores resultados, permitiendo así, encontrar una manera eficiente para el transporte y llegada de medicamentos a las células diana de enfermedades que antes parecían sin solución o sin tratamiento aparente, tal como las enfermedades neurodegenerativas.

Referencias

Almeida, M., Magalhães, M., Veiga, F., & Figueiras, A. (2018). Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. *Journal of Polymer Research*, 25(1), 1-14.

Aparicio Blanco J. (2018). Development of lipid nanocapsules as a strategy to overcome the passage across the blood-brain barrier of drug substances acting on the central nervous system. Tesis Doctoral en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España Madrid. pp. 5-357

Balestrino, R., & Schapira, A. (2020). Parkinson disease. *European journal of neurology*, 27(1), 27–42.

Bao,G., Mitragotri,S.& ,Tong,S.. (2018). Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. Annu Rev Biomed Eng, 15: 253-282

Baskin, J., Jeon, J. E., & Lewis, S. (2021). Nanoparticles for drug delivery in Parkinson's disease. *Journal of neurology*, *268*(5), 1981–1994.

Beach, T. G., Adler, C. H., Serrano, G., Sue, L. I., Walker, D. G., Dugger, B. N., Shill, H. A., Driver-Dunckley, E., Caviness, J. N., Intorcia, A., Filon, J., Scott, S., Garcia, A., Hoffman, B., Belden, C. M., Davis, K. J., Sabbagh, M. N., & Arizona Parkinson's Disease Consortium (2016). Prevalence of Submandibular Gland Synucleinopathy in Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies and other Lewy Body Disorders. *Journal of Parkinson's disease*, *6*(1), 153–163.

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol Aging. 24(2):197-211.

Brier, M. R., Gordon, B., Friedrichsen, K., McCarthy, J., Stern, A., Christensen, J., ... & Ances, B. M. (2016). Tau and Aβ imaging, CSF measures, and cognition in Alzheimer's disease. Science translational medicine, 8(338), 338ra66-338ra66.

Brundin, P., Ma, J., & Kordower, J. H. (2016). How strong is the evidence that Parkinson's disease is a prion disorder?. *Current opinion in neurology*, *29*(4), 459–466.

Cannavo, C., Tosh, J., Fisher, E. M., & Wiseman, F. K. (2020). Using mouse models to understand Alzheimer's disease mechanisms in the context of trisomy of chromosome 21. Progress in brain research, 251, 181-208.

Cayero, M. (2018). NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA VEHICULIZAR ACTIVOS FARMACÉUTICOS AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. Tesis Doctoral en Farmacia. Universidad de Sevilla. España Sevilla.pp. 2-146

Cunha. (2017). Lipid Nanoparticles for Nasal/Intranasal Drug Delivery. NIH, 1, 257–282.

Dennis W. Dickson. (2012). Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology. Department of Neuroscience

Dexter, D. & Jenner, P. (2013). Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. ELSEVIER, 62:132-144.

Fan, S., Zheng, Y., Liu, X., Fang, W., Chen, X., Liao, W., Jing, X., Lei, M., Tao, E., Ma, Q., Zhang, X., Guo, R., & Liu, J. (2018). Curcuminloaded PLGA-PEG nanoparticles conjugated with B6 peptide for potential use in Alzheimer's disease. Drug delivery, 25(1), 1091–1102.

Fernandes, E. J., Poetini, M. R., Barrientos, M. S., Bortolotto, V. C., Araujo, S. M., Santos Musachio, E. A., De Carvalho, A. S., Leimann, F. V., Gonçalves, O. H., Ramborger, B. P., Roehrs, R., Prigol, M., & Drigol, Guerra, G. P. (2021).Exposure lutein-loaded to nanoparticles attenuates parkinson's modelinduced damage in drosophila melanogaster: Restoration of dopaminergic and cholinergic system and oxidative stress indicators. Chemico-Biological Interactions, 109431.

Fundora, E. Z., Batista, C. A. L., & Pérez, M. J. (2021). Nanopartículas de oro como alternativa terapéutica para el tratamiento del cáncer. Archivos del Hospital Universitario" General Calixto García", 9(1), 5-7

Gallo Ramírez, J. P., & Ossa Orozco, C. P. (2019). Fabrication and characterization of silver nanoparticles with potential use in the treatment of skin cancer. Ingeniería *y Desarrollo*, 37(1), 88-104.

Gambaryan, P. Y., Kondrasheva, I. G., Severin, E. S., Guseva, A. A., & Discrete A. A., & Conservation of the efficiency of parkinson's disease treatment using a poly(lactic-coglycolic acid) (PLGA) based L-DOPA delivery system. Experimental neurobiology. (3): 246–252.

Gan, L., Li, Z., Lv, Q., & Huang, W. (2019). Rabies virus glycoprotein (RVG29)-linked microRNA-124-loaded polymeric nanoparticles inhibit neuroinflammation in a parkinson's disease model. International Journal of Pharmaceutics, 567, 118449.

García-Corvillo, M. (2016). Nanopartículas poliméricas de administración intranasal para la liberación de activos en el sistema nervioso central. Ars Pharmaceutical. 2340-9894

García-Pardo, J., Novio, F., Nador, F., Cavaliere, I., Suárez-García, S., Lope-Piedrafita, S., Candiota, A. P., Romero-Gimenez, J., Rodríguez-Galván, B., Bové, J., Vila, M., Lorenzo, J., & Emp; Ruiz-Molina, D. (2021). Bioinspired theranostic coordination polymer nanoparticles for intranasal dopamine replacement in parkinson's disease. ACS Nano, 15(5), 8592–8609.

Gómez Garzón, M. (2018). Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. Repertorio de medicina y cirugía, 27, 75-80.

Hanafy A, Farid R, Helmy M, ElGamal S. Pharmacological, toxicological and neuronal localization assessment of galantamine/chitosan complex nanoparticles in rats: future potential contribution in Alzheimer's disease management. Drug Delivery. (2016). 23(8):3111-3122.

Hartl, N., Adams, F., & Merkel, O. M. (2021). From adsorption to covalent bonding: Apolipoprotein E functionalization of polymeric nanoparticles for drug delivery across the blood–brain barrier. *Advanced therapeutics*, *4*(1), 2000092.

Healy, D. G., Falchi, M., O'Sullivan, S. S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S., Brice, A., Aasly, J., Zabetian, C. P., Goldwurm, S., Ferreira, J. J., Tolosa, E., Kay, D. M., Klein, C., Williams, D. R., Marras, C., Lang, A. E. (2008). LRRK2in Parkinson's disease – drawing the curtain of penetrance: a commentary BMC Med 6, 33

Horie, K., Barthélemy, N. R., Sato, C., & Bateman, R. J. (2021). CSF tau microtubule binding region identifies tau tangle and clinical stages of Alzheimer's disease. Brain, 144(2), 515-527.

INNN. (2017). ¿Qué es la Enfermedad de Alzheimer?. 21 de octubre del 2021, de Instituto Nacional de Neurología y ciencia. Disponible en: http://www.innn.salud.gob.mx/interna/medica/padecimientos/alzheimer.html

Jahansooz, F., Hosseinzade, B. E., Zarmi, A. H., Hadi, F., Massood Hojjati, S. M., & Shahpasand, K. (2020). Dopamine-loaded poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles reverse behavioral deficits in Parkinson's animal models. Therapeutic Delivery, 11(6), 387-399.

Jaime, R., & Klay, A. (2018). Síntesis y caracterización de nanopartículas PbS/SiO₂ para su implementación en una celda solar de heterounión. Tesis Doctoral en Física. Universidad de Sonora. México Sonora.

Jha, A., Ghormade, V., Kolge, H., & Paknikar, K. M. (2019). Dual effect of chitosan-based nanoparticles on the inhibition of β -amyloid peptide aggregation and disintegration of the preformed fibrils. Journal of Materials Chemistry B, 7(21), 3362-3373.

Jie Zheng, Mengxiao Yu, Bujie Du. (2018). Transport and interactions of nanoparticles in the kidneys. Nature Reviews Materials, 3(10):1

Kantuta, C., (2010) GN. NANOTECNOLOGIA CONCEPTOS GENERALES. Revista de Información, Tecnología y Sociedad.

Kaur, S. Manhas, P. Swami, A. Bhandari, R. Sharma, K.K. Jain, R. Kumar, R. Pandey, S.K. Kuhad, A. Sharma, R.K. Wangoo. (2018). N. Bioengineered PLGA-chitosan nanoparticles for brain targeted intranasal delivery of

- antiepileptic TRH analogues, Chemical Engineering Journal.
- Kouli A, Torsney KM, Kuan WL. (2018). Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. NCBI
- Li C, Cheol Kim J, Liu Y. (2012) Biruloquinone, an Acetylcholinesterase Inhibitor Produced by Lichen-Forming Fungus Cladonia macilenta. JMB, 23(2): 161-166
- Li, G., Sun, X., Wan, X., & Wang, D. (2020). Lactoferrin-Loaded PEG/PLA Block Copolymer Targeted With Anti-Transferrin Receptor Antibodies for Alzheimer Disease. Dose-Response, 18(3), 1559325820917836.
- Linda Hasdsri. (2009). Functional Protein Delivery into Neurons Using Polymeric Nanoparticles. JBC, 11, 10.
- Lorena Gárate. (2018). Toxicidad de Nanopartículas Magnéticas en un Modelo invitro de Barrera Hematoencefálica. IPICYT, 1, 69.
- Madhu, S., Komala, M. & Pandian, P. (2021). Formulation Development and Characterization of Withaferin-A Loaded Polymeric Nanoparticles for Alzheimer's Disease. BioNanoSci. 11, 559–566
- Maia, J., Santos, T., Aday, S., Agasse, F., Cortes, L., Malva, J. O., Bernardino, L., & Ferreira, L. (2011). Controlling the neuronal differentiation of stem cells by the intracellular delivery of retinoic acid-loaded nanoparticles. ACS nano, 5(1), 97–106.
- Medina, M. E., Galván, L. E., & Reyes, R. E. (2015). Las nanopartículas y el medio ambiente. Universidad, Ciencia y Tecnología, 19(74), 49-58.
- Méndez, G. M., García, C., Suárez-Sanmartín, E., Fernández, S., Álvarez-Escudero, R., & Blázquez, M. (2017). Biomarcadores para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer. Biomedicina, 2.
- Mihov, D., Raja, E., & Spiess, M. (2015). Chondroitin Sulfate Accelerates Trans-Golgito-Surface Transport of Proteoglycan Amyloid Precursor Protein. Traffic, 16(8), 853-870.

- Mittal, G., Carswell, H., Brett, R., Currie, S., & Kumar, M. R. (2011). Development and evaluation of polymer nanoparticles for oral delivery of estradiol to rat brain in a model of Alzheimer's pathology. Journal of Controlled Release, 150(2), 220-228.
- Muntimadugu, E., Dhommati, R., Jain, A., Challa, V. G. S., Shaheen, M., & Khan, W. (2016). Intranasal delivery of nanoparticle encapsulated tarenflurbil: A potential brain targeting strategy for Alzheimer's disease. *European journal of pharmaceutical sciences*, 92, 224-234.
- Muntimadugu, Eameema, Dhommati, Raju, Jain, Anjali, Challa, Venu Gopala Swami, Shaheen, M., Khan, Wahid. (2016). Intranasal delivery of nanopar- ticle encapsulated tarenflurbil: A potential brain targeting strategy for Alzheimer's disease. ELSEVIER, 224-234.
- Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2021). Safe Nanoparticles: Are We There Yet?. International Journal of Molecular Sciences, 22(1), 385
- Navarro-Tovar G, Martínez Castillo J. H, González Castillo M. C. (2018). La ropa inteligente, una importante aplicación de la nanotecnología. de UNIVERSITARIOS POTOSINOS Disponible en: http://www.uaslp.mx/Comunicacion-Social/Documents/Divulgacion/Revista/Quinc e/225/225-01.pdf
- Oropesa Nuñez R. Jáuregui Haza U. J. (2012.). Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas Nanoparticles as drug carriers: characteristics and perspectives. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 43, 2-21.
- Paccione Basmadji, N. (2016). Nanopartículas poliméricas en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Tesis Doctoral en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, España Madrid.
- Pickrell, A. M., & Youle, R. J. (2015). The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. Neuron, 85(2), 257–273.
- Rashed, E. R., Abd El-Rehim, H. A., & El-Ghazaly, M. A. (2015). Potential efficacy of dopamine loaded-PVP/PAA nanogel in

- experimental models of Parkinsonism: possible disease modifying activity. *Journal of biomedical materials research. Part A*, *103*(5), 1713–1720.
- Rocha Cabrero F, Morrison EH. Lewy Bodies. (2021). Treasure Island (FL) StatPearls 30725641.
- Ruy, C. R., Silvia, S., Rodrigo, J. F., Cecília, B. M., Barcellos, I., & Funck, J. A. (2003). Nanoparticles containing dexamethasone: physicochemical properties and anti-inflammatory activity. *Acta Farm. Bonaerense*, 22(1), 11-5.
- S C Baetke, T Lammers, F Kiessling. (2015). Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. BJR, 88(1054): 20150207.
- Saldivar, R. H. L., Argüello, B. M., Reyes, I. V., & De los Santos Villarreal, G. (2018). Agronanotecnología: una nueva herramienta para la agricultura moderna. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo, 50(2), 395-411.
- Saleem. (2018). Zebrafish: an emerging realtime model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. Cell death Discovery, 4.
- Schulte, C., & Gasser, T. (2011). Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression. *The application of clinical genetics*, *4*, 67–80.
- Scott, A. W., Tyler, B. M., Masi, B. C., Upadhyay, U. M., Patta, Y. R., Grossman, R., ... & Cima, M. J. (2011). Intracranial microcapsule drug delivery device for the treatment of an experimental gliosarcoma model. Biomaterials, 32(10), 2532-2539.
- Sinha S.. (2021). Osteoporosis and Its Nanotechnology-Based Advanced Treatment. J Biomed Nanotechnol, 1.
- Sonne J, Reddy V, Beato MR. (2021) Neuroanatomy, Substantia Nigra. NCBI
- Sridhar, V., Gaud, R., Bajaj, A., & Samp; Wairkar, S. (2018). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intranasally administered selegiline nanoparticles with improved brain delivery in parkinson's

- disease. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 14(8), 2609–2618.
- Steffen, Markus Krohn, Kristin Paarmann, Christina Schwitlick, Thomas Brüning, Rita Marreiros, Andreas Müller-Schiffmann, Carsten Korth, Katharina Braun & Jens Pahnke . (2016). Revisiting rodent models: Octodon degus as Alzheimer's disease model?. BMC, 4.
- Toledano. (2011). ¿Existe la enfermedad de Alzheimer en todos los primates? Patología Alzheimer en primates no humanos y sus implicaciones fisiopatológicas (II). ELSEVIER, 1, 1-11.
- Torrel G. (2015). Enfermedades neurodegenerativas. De AMF, Disponible en: https://amf-semfyc.com/web/article_ver.php?id=1450
- Troncoso J. (2006). Lesiones precoces en la enfermedad de Alzheimer. Medigraphic
- Tu, B., Zhang, M., Liu, T., & Huang, Y. (2020). Nanotechnology-based histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8, 400.
- Viada Pupo, E., Gómez Robles, L., & Campaña Marrero, I. R. (2017). Estrés oxidativo. Correo Científico Médico, 21(1), 171-186.
- Villa F. (2018). APLICACIONES DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA TEXTIL. UNED, 1, 1-74. 24
- Wided Najahi-Missaoui, Robert D. Arnold, Brian S. Cummings. (2021). Safe Nanoparticles: Are We There Yet?. MDPI. 22(1): 385.
- Wilson, B., Samanta, M. K., Santhi, K., Kumar, K. P. S., Paramakrishnan, N., & Suresh, B. (2008). Poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. Brain research, 1200, 159-168.
- Wilson, B., Samanta, M. K., Santhi, K., Kumar, K. P., Paramakrishnan, N., & Suresh, B. (2008). Poly(N-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the

brain to treat alzheimer's disease. Brain Research, 1200, 159-168.

Wszolek, Z. K., Berciano, J., Schapira, A. H., ... International LRRK2 Consortium (2008). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. The Lancet. Neurology, 7(7), 583–590.

Wu, T., Fang, X., Xu, J., Jiang, Y., Cao, F., & Damp; Zhao, L. (2020, August 31). Synergistic effects of ginkgolide B and protocatechuic acid on the treatment of parkinson's disease. NCBI, 25(17): 3976.

Yao, J., Diaz, R., Cadenas, E., Mao, Z. Z., & Diaz, Chen, S. (2011, July 1). 2-deoxy-D-glucose treatment induces ketogenesis,

sustains mitochondrial function, and reduces pathology in female mouse model of alzheimer's disease. NIH, 21747957

Zhang, N., Yan, F., Liang, X., Wu, M., Shen, Y., Chen, M., ... & Dai, Z. (2018). Localized delivery of curcumin into brain with polysorbate 80-modified cerasomes by ultrasound-targeted microbubble destruction for improved Parkinson's disease therapy. Theranostics, 8(8), 2264.

Zhao, Y., Xiong, S., Liu, P., Liu, W., Wang, Q., Liu, Y., Tan, H., Chen, X., Shi, X., Wang, Q., & Chen, T. (2020). Polymeric Nanoparticles-Based Brain Delivery with Improved Therapeutic Efficacy of Ginkgolide B in Parkinson's Disease. International journal of nanomedicine, 15, 10453–10467.

Epidemiology of Dengue in Mexico and Biotechnological Solutions: A Review.

Eduardo Garcia-Martinez $^{1+}$ (0000-0001-7902-6040), Ahtziri Hernandez-Arce $^{1+}$ (0000-0003-1154-6669), Isabel Zamarripa-Zercovitz $^{1+}$ (0000-0002-6899-0026) y Emma Herrera 2 (0000-0003-3261-0869).

¹ Biotechnology undergraduate student. Universidad Anáhuac México Campus Norte, Av. Lomas Anáhuac 46, Col. Lomas Anáhuac, C.P. 52786, Huixquilucan, Estado de México, México.

² PHD. In Science in Biomedicine and Molecular Biotechnology. Universidad Anáhuac México Campus Norte, Av. Lomas Anáhuac 46, Col. Lomas Anáhuac, C.P. 52786, Huixquilucan, Estado de México, México.

* eduardogmtkd@gmail.com † These authors contributed equally.

ABSTRACT

Dengue disease is a public health matter in some regions of the world. Since it was first reported in Mexico in 1941 it has been a very complex and relevant problem to address. Antigenic diversity, genetic and immunological susceptibility are some factors that limit the development of an efficient treatment for the disease. The control methods used are vector and symptomatic ones. This review aims to discuss the epidemiology of Dengue in Mexico from 2000 to 2021 and the different biotechnological strategies that are in development. The findings show that Mexico had an increase in cases since 2019 which affected people of all ages. Current research has reasonable expectations for preventive care and therapeutic treatment that include vaccines, antivirals and monoclonal antibodies.

Key words: Dengue Virus, Dengue, Epidemiology, Mexico, Vaccines, Monoclonal Antibodies, Antivirals.

RESUMEN

El Dengue es un problema de salud pública en algunas regiones del mundo. Desde que se reportó por primera vez en México en 1941 ha sido un problema muy complejo y relevante de abordar. La diversidad antigénica, la susceptibilidad genética e inmunológica son algunos factores que limitan el desarrollo de un tratamiento eficaz para la enfermedad. Los métodos de control utilizados son el vectorial y el sintomático. Esta revisión tiene como objetivo discutir la epidemiología del Dengue en México del 2000 al 2021 y las diferentes estrategias biotecnológicas que se encuentran en desarrollo. Los hallazgos muestran que México tuvo un aumento de casos desde 2019 y que afecta a personas de todas las edades. La investigación actual tiene expectativas razonables para la atención preventiva y el tratamiento terapéutico que incluyen vacunas, antivirales y anticuerpos.

Palabras clave: Virus del Dengue, Dengue, Epidemiología, México, Vacunas, Anticuerpos Monoclonales, Antivirales.

INTRODUCTION

Dengue is a mosquito borne disease that represents a serious public health problem worldwide (Daep et al., 2014; WHO, 2020). The estimated incidence of Dengue is approximately 284 to 528 million infections per year, the average cost per case is around \$84.73 USD for fatal cases and 70.10 USD for cases admitted to hospitals (Hasan et al., 2016). It is a viral infection caused by Dengue virus (DENV) that belongs to the family Flaviviridae. Its genome is composed of a single strand of positive RNA (ssRNA+) that goes from 9.2 to 11.0 kb in length. It has a single open reading frame that encodes for three structural proteins that form the capsid (C), envelope (E) and membrane (M), and seven nonstructural proteins which play a role in assembly and replication, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5 (Dengue Viruses, n.d.; ICTV, 2020).

Viral infection begins when the mosquito vector genus Aedes deposits the viral particles in the epidermis where cells such as keratinocytes and dendritic cells of the skin are permissive to infection. These migrate to lymphatic organs for viral replication in the cells' cytoplasm (Laureti et al., 2018; Lim et al., 2018). Upon arrival, the viral particle opens the nucleocapsid to emancipate the viral RNA, which takes over the host cell machinery in the rough endoplasmic reticulum to replicate, transcribe and translate its genetic information. Later, it becomes enveloped, matured, and converted into an infectious particle that is released and can now infect other cells in the host (Dengue Viruses, n.d.; Pierson & Diamond, 2020).

Mexico classifies Dengue infection severity in four main groups, being asymptomatic infections, undifferentiated fever, Dengue fever (DF) or non-severe cases, and Dengue hemorrhagic fever (DHF) which characterized bγ increased capillary permeability and hypovolemic shock (Lim et al., 2018). The severity of disease depends on many factors that have not been fully understood (Martina et al., 2009). The knowledge gathered from outbreaks have revealed that antigenic diversity among

serotypes is one of the most critical of them (Lan & Hirayama, 2011; Thanachartwet et al., This antigenic diversity 2015). classification of DENV in four serotypes (Yung et al., 2015). The exposure to one serotype confers partial protection to a secondary infection with other serotypes, which is called heterotypic infection (Bell et et al., Dejnirattisai al., 2019; Paradoxically, the heterotypic infection exponentially increases the risk of severe disease due to the development of ineffective and detrimental immunity. These processes are explained in the two more accepted Antibody Dependent theories called Enhancement (ADE) and Original Antigenic Sin (OAS) (Dejnirattisai et al., 2016; Rothman, 2011).

Currently there are no approved prevention methods for this viral agent, or treatments for this disease beyond those intended to relieve the symptoms of infection. However, multiple research projects and clinical trials are testing several molecules with therapeutic properties which can be classified as vaccines, drugs, and antibodies (Deng et al., 2020; Rajapakse et al., 2012; San Martín et al., 2012). The current review aims to discuss the epidemiology of Mexico from 2000 to 2021, including major outbreaks, incidence, and social context, as well as biotechnological strategies against Dengue.

MATERIALS AND METHODS

Epidemiology of Dengue in México

We conducted a literature and documentary search of available sources describing the epidemiology of Dengue in Mexico between 2000 and 2021, aiming to discuss the evolution over time. Number of cases, including both DF and DHF, as well as deaths and mortality rates per year, outbreaks, seroprevalence, serotypes distribution and other relevant information were compiled and analyzed.

The databases consulted included PubMed, Scientific Electronic Library Online (SciELO), PAHO/WHO database, Mexican academic and medical databases. The numbers of cases, deaths and serotype distribution were

collected from PAHO dynamic figures, CENAPRECE bulletins and Ministry of Health Epidemiological week reports and were compared to find similarities, gaps and irregularities. Additionally, medical reports, guidelines and other documental resources provided by government institutions, health and academic sector and international organizations were included to better understand the sociopolitical context in this period aiming to discuss its implication in the progression of Dengue. Some of the keywords used to collect relevant information were "Dengue', 'epidemiology', 'Mexico' and 'outbreak'.

Biotechnological Solutions

Preclinical, Clinical, and Experimental studies were included for discussing the current status of biotechnological solutions against Dengue Disease. Vaccines, Monoclonal antibodies and Antiviral drugs were the approaches discussed in the present work.

Literature was collected from PubMed and Scholar Google from the period of 2014 up to date. The efficacy of the treatments was determined in terms of reduction of viral titers for RNA quantification, NS1 sera levels and mortality rates in case of animal experiments. Given the lack of preclinical and clinical studies in monoclonal antibodies-based therapy, experimental studies evaluating the efficiency for treating Dengue in murine and non - human primates were included.

RESULTS AND DISCUSSION

The Origins of a Public Health Problem

The first great Dengue epidemics date back to the 18th to 19th century in Asia, Africa and North America. This time period was characterized by spontaneous but large epidemics, and although there were no molecular tests for characterization, patients reported clinical pictures compatible with DF (San Martín et al., 2012). Later, the commercial, economic and ecological stage of the 20th century facilitated the dissemination and cocirculation of different serotypes of DENV worldwide (Warkentien, 2016). Moreover, severe and fatal cases of

Dengue started to increase, DHF epidemics started in Manilla Philippines in 1954 (Warkentien, 2016), followed by Southeast Asia countries in the years 1958 - 1980 and South and Central Pacific in the same timeframe (Ivonne Torres-Galicia et al., 2014).

Due to the increasing threat of the Aedes mosquito as a vector of hemorrhagic diseases. the Pan American Organization (PAHO) made important efforts to control its spread during 1947 - 1970, achieving the eradication in more than 20 countries across the Americas (San Martín et al., 2012; Warkentien, 2016). However, gradual loss of both political and social interest in the disease, as well as flexibility in measures taken by PAHO, resulted in the deterioration of the program, reinfestation of lost territory and the greatest geographical extension ever (Ivonne Torres-Galicia et al., 2014; San Martín et al., 2012; Schneider et al, 2010). Consequently, this would cause an important increase in outbreaks throughout the Americas, and the beginning of a serious health problem that affects thousands of people to date (San Martín et al., 2012; Ivonne Torres-Galicia et al., 2014).

Mexico's Epidemiology

First Dengue transmission reports in Mexico appeared in 1941, with an estimated incidence of 6,955 cases per 100,000 people (Ivonne Torres-Galicia et al., 2014; Schneider et al. 2010). In the next 2 decades, the country experienced low incidence and even eradication in 1963 mainly due to the PAHO campaigns (Schneider et al, 2010). However, the reintroduction of the viral agent in 1978 resulted in multiple outbreaks south of the Mexican territory (Schneider et al. 2010; Laredo-Tiscareño et al., 2012). Even though the following outbreaks of Dengue did not show an important increase in cases, the territorial extension of Aedes mosquito went up to 1100 m over the sea level and there was a reintroduction of different serotypes, which alarmed health experts (Subsecretaría de Salubridad DIGEPI. 1984: PAHO/WHO. n.d.; Koopman & Gómez - Dantés, 1986).

Mexico experienced the introduction of serotypes 1,2 and 4 in the mid-eighties (Schneider et al, 2010; Laredo-Tiscareño et al., 2012) and subsequently DENV 3 in 1994 (Ivonne Torres-Galicia et al., 2014; San Martín et al., 2012). As Haldstead's studies would demonstrate, cocirculation of different serotypes elevates the risk of Dengue complications (Halstead, 1981). The first consequences of this fact would be noticed in 1984, with the first deaths caused by Dengue (Koopman & Gómez - Dantés, 1986). DHF

cases would also increase dramatically in the following years, reaching a peak in 1997 with 52,561 cases and 37 deaths (Fajardo-Dolci et al., 2012; Ivonne Torres-Galicia et al., 2014; PAHO/WHO, n.d.). Exposing these key events will help to understand the context of Dengue in the 21st Century, which is summarized in table 1.

Table 1. Epidemiology of Dengue in México

| Year | Serotypes | Total Number of | Incidence (Per 100,000 | Number of cases Regular | Number of cases Dengue | Deaths | Mortality Rate (Per 100,000 |
|------|-----------------|--------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------|--------------------------------|
| rear | | Cases | hab.) | Dengue | Hemorrhagic Fever | | hab.) |
| 2000 | DENV 1, 2, 3 | 21,665 | 21.9 | 21,615 | 50 | 0 | 0.00 |
| 2001 | No information | 6,019 | 6.0 | 5,828 | 191 | 0 | 0.00 |
| 2002 | DENV 1, 2, 3 | 8,415 | 8.3 | 6,986 | 1,429 | 6 | 0.01 |
| 2003 | No information | 3,599 | 3.5 | 2,180 | 1,419 | 0 | 0.00 |
| 2004 | DENV 1, 2, 3, 4 | 6,243 | 6.0 | 4,284 | 1,959 | 13 | 0.01 |
| 2005 | DENV 1, 2, 3 | 12,607 | 11.9 | 8,352 | 4,255 | 0 | 0.00 |
| 2006 | DENV 1 | 22,810 | 21.2 | 18,333 | 4,477 | 0 | 0.00 |
| 2007 | DENV 1, 2, 3, 4 | 40,539 | 37.1 | 32,642 | 7,897 | 10 | 0.01 |
| 2008 | DENV 1, 2, 3 | 25,040 | 22.6 | 18,926 | 6,114 | 24 | 0.02 |
| 2009 | DENV 1, 2, 3, 4 | 238,289 | 212.0 | 227,015 | 11,374 | 96 | 0.09 |
| 2010 | DENV 1, 2, 3 | 51,635 | 45.3 | 45,299 | 6,336 | 20 | 0.02 |
| 2011 | DENV 1, 2, 3, 4 | 63,628 | 55.0 | 59,338 | 4,290 | 36 | 0.03 |
| 2012 | DENV 1, 2, 3, 4 | 165,749 | 141.3 | 148,043 | 17,706 | 170 | 0.14 |
| 2013 | DENV 1, 2, 3, 4 | 231,498 | 198.4 | 212,831 | 18,667 | 192 | 0.16 |
| 2014 | DENV 1, 2, 3, 4 | 124,943 | 103.8 | 116,275 | 8,668 | 39 | 0.03 |
| 2015 | DENV 1, 2, 3, 4 | 219,593 | 180.2 | 214,129 | 5,464 | 42 | 0.03 |
| 2016 | DENV 1, 2, 3, 4 | 129,263 | 105.5 | 806 | 130,069 | 34 | 0.03 |
| 2017 | DENV 1, 2, 3 | 89,892 | 72.0 | 89,518 | 375 | 34 | 0.03 |
| 2018 | DENV 1, 2, 3, 4 | 78,621 | 62.3 | 77,763 | 858 | 45 | 0.04 |
| 2019 | DENV 1, 2, 3, 4 | 268,458 | 210.4 | 264,898 | 3,560 | 371 | 0.29 |
| 2020 | DENV 1, 2, 3, 4 | 129,639 | 93.6 | 119,581 | 1,058 | 79 | 0.06 |
| 2021 | DENV 1, 2, 3, 4 | 20,894 | 16.0 | 20,761 | 133 | 8 | 0.01 |

^{*}Data was obtained from PAHO (PAHO/WHO, n.d)

In the last two decades there have been five major outbreaks caused by Dengue, with the presence of the infected vector in 30 out of the 32 states of the country. The first major outbreak was in 2007, with around 40,539 registered total cases, with four serotypes present. The most affected state was Quintana Roo. Later in 2009, the second major outbreak was more severe with 238,289 reported cases in which 11,374 cases correspond to DHF, and the most affected state by this outbreak was Colima. The third major outbreak can be identified in 2013, with 231,498 reported cases, from which 18,667 are DHF, according to the

PAHO. The fourth major outbreak was in 2015 with 219,593 total cases. And finally in 2019, the most recent major outbreak, the PAHO reported 268,458 cases, with the highest value for mortality rate of these two decades being 0.29, with 371 deaths (Ivonne Torres-Galicia et al., 2014; Secretaría de Salud, 2014). (See table 1).

The Dengue virus has been present in the last two decades in Mexico; it has shown an increase in the incidence in the Pacific and Gulf regions. In 2002, Mexico reported a new trend in which an increase of cases shifted towards pediatric and juvenile populations, age groups 15 to 24 years were the most

susceptible to have DHF. The main states affected by this trend were Colima, Guerrero, Michoacan and Oaxaca. Dengue in children and juveniles represents a risky situation due to the clinical features and the early complications presented, which are mainly associated with a rapid and fulminant disease evolution that involves many organs and that could lead to a fatal outcome. Although there was an increase of infection in children and young people, it is not a specific age-related disease (Ivonne Torres-Galicia et al., 2014; Torres-Galicia et al., 2014).

From 2000 to 2013, the main approach to managing Dengue was focused on programs to control the vector by increasing the application coverage. insecticide approach did not work out and the cases kept appearing and affecting young population. In 2013, the approach changed, and the strategies allocated resources to prevention (Secretaría de Salud, 2014). The new approach assigned brigades of health promotors and vector control by keeping risk factors under control in the most susceptible areas. The strategy also reduced the use of insecticides to contribute to the sustainability avoid the vector resistance insecticides. Since this program modified, the country has invested in the development and introduction of a vaccine against Dengue fever, with the participation of the public and private sectors, to prepare Mexico to be one of the first countries to have a vaccine against Dengue (Secretaría de Salud, 2014).

Biotechnological Solutions

In the present day there is no specific treatment available for Dengue infection mainly because of controversial results reported in clinical trials of different therapeutic candidates (Rajapakse et al., 2012; Eerde et al., 2019). This lack of consistency in results may be a consequence of both viral and host factors that intervene in DENV infection (Thanachartwet et al., 2015). Genetic variability in terms of polymorphisms in Major Histocompatibility Complex (MHC), cytokine profile and response variations, cellular receptors and other immunological

elements determine the clinical evolution of pathology (Thanachartwet et al., 2015; Lan & Hirayama, 2011). Moreover, viral load, Dengue serotype, subsequent infection and time period between infections also have a great impact on the outcome of pathology (Lan & Hirayama, 2011; Yung et al., 2015).

Despite the limitations previously exposed, numerous therapeutic and prophylactic strategies have been explored in recent years (Low et al., 2017; Thisyakorn & Thisyakorn, 2014). Biotechnology has greatly contributed to modern medicine by providing molecular diagnostic tools that allow medical personnel precisely detect diseases and make smarter decisions (Afzal et al., 2016). It has made it possible to produce novel and more complex drugs for prevention, combat and even eradication not only infectious diseases such as polio and smallpox, but also non transmittable diseases like cancer (Afzal et al., 2016; Sarthak Aggarwal, 2021). Within the vast market of Biopharmaceutical products, therapeutic proteins represent the most relevant products due to the great demand and potential applications (Schillberg et al., 2019). For infectious diseases management and control, the current arsenal is conformed mainly by vaccines, antibodies and antiviral molecules (Afzal et al., 2016). These last products could generate a direct or indirect inhibitory effect in the vital process of virus life cycle (Low et al., 2017). Additionally, biotechnology allowed to detect, isolate and take the production to an industrial scale of molecules from living organisms and development of antiviral drugs (Obi et al., 2021).

Vaccines

The development of Dengue vaccine candidates has advanced over the last decade because researchers and pharmaceutical companies have invested resources create several vaccine to candidates involving various approaches. Referring to replicating viral vaccines which are created by reducing the virulence of the pathogen without compromising its viability, through attenuation by cell cultures or

mutagenesis, and the formation of chimericlike viruses, these vaccines are robust, have broad immunity and are long lasting, but can present genetic instability and a possibility of reversion. On the other hand, there are nonreplicating viral vaccines, which include DNA vaccines, inactivated virus vaccines, subunit protein vaccines and virus-like particles; these vaccines have reduced reactogenicity and balanced immune response, but are less broad, potent and durable (Khetarpal & Khanna, 2016)(Redoni et al., 2020). A listing of the current vaccine candidates in different phases of clinical trials is shown in table 2.

Table 2. Developing Vaccines for Dengue Infection

| Vaccine Name | Туре | Clinical Trial Phase |
|-------------------------------------|--------------------------|----------------------|
| Dengvaxia | Live attenuated virus | Licensed |
| TDV | Live attenuated virus | III |
| TDV 003/005 | Live attenuated virus | III |
| TDENV-PIV | Inactivated vaccine | II |
| D1ME100 | DNA vaccine | I |
| TVDV | DNA vaccine | I |
| DEN-80E | Subunit vaccine | I |
| TLAV/TPIV | Heterologous prime/boost | 1 |
| DEN 1/2 chimeric virus | Live attenuated virus | Preclinical |
| HR-Tet | Live attenuated virus | Preclinical |
| ChinDENV | Live attenuated virus | Preclinical |
| Purified psoralen inactivated virus | Inactivated vaccine | Preclinical |
| cEDIII | Subunit vaccine | Preclinical |
| YF17D-D2/pE1D2 | Heterologous prime/boost | Preclinical |
| VEE-VRP | Virus like particle | Preclinical |
| DSV4 | Virus like particle | Preclinical |
| DENV-2 VLP | Virus like particle | Preclinical |
| MV-DEN | Viral Vector | Preclinical |
| /// | 0040 Dadaa' dal 000 | ٥١ |

(Khetarpal & Khanna, 2016; Redoni et al., 2020)

In the present day there is only one vaccine that is licensed in Mexico and over 20 Dengue endemic countries, which is the Chimeric Yellow Virus Dengue Vaccine (CYD-TDV), commercialized under the name Dengvaxia created by Sanofi Pasteur. It is a tetravalent live-attenuated yellow fever virus vaccine 17D, aimed to provide a balanced immunity against all of the four serotypes of Dengue. It has an age indication limited to persons of 9-45 years of age, because other ages present a relative risk of Dengue-related hospitalization during clinical Additionally, this vaccine appears to act like a primary natural infection in people who have not been infected, also known as naïve individuals. These individuals are at a higher risk of developing secondary-like infection which is associated with more severe disease; because of that, it can only be applied to people who have already been infected with Dengue (Khetarpal & Khanna, 2016; Redoni et al., 2020).

Dengvaxia and most of the current vaccine candidates lead to the generation of cross-reactive antibodies, which is an important problem with Dengue infection, so research has to continue for vaccine candidates. Then, the ideal vaccine has to provide protective immunity from DENV infection regardless of serotype, age and previous infection (Redoni et al., 2020).

Monoclonal Antibodies

Monoclonal Antibodies (mAb) - based therapy represents an alternative to vaccines. This passive immunization approach has shown successful reduction of viral load and pathology resolution against some other agents such as RSV, Ébola virus and recently SARS - CoV2 (Hu et al., 2019). However, DENV mAb therapy is limited by similar factors to vaccine approach, including cross reactivity, ADE and neutralizing capacities (Hooft van Huijsduijnen et al., 2020).

Both structural (E, prM, C) and nonstructural (NS1, NS3, NS5) DENV proteins exert humoral responses (Hurtado Monzón et al., 2020). For that reason, many DENV directed mAbs have been characterized and studied such as those directed to the envelope protein (Hurtado Monzón et al., 2020). Envelope protein is the main antibody target due to its role in attachment, internalization, and interaction with host cells (Hooft van Huijsduijnen et al., 2020). Envelope directed mAbs that have already been proved in vivo are listed in table 3. Multiple studies showed that in terms of neutralizing capacity, serotype specific mAbs presented the highest grade (Natali et al., 2021). In vivo assays with Human mAb (HmAb) 1F4 and 5J7 demonstrated that structure of epitopes plays a crucial role in molecular recognition and

neutralization of virus (Fibriansah et al., 2014; Young et al., 2020). Particularly, those Abs directed to DIII in E protein, are the most potent, serotype - specific antibodies reported (Budigi et al., 2018; Natali et al., 2021). However, these kinds of Abs are not easily found in human sera. In order to improve its serotype spectra and neutralizing capacity, two mAbs have been produced. Firstly, VIS513 is an engineered, humanized mAb that is able to potently neutralize DENV avoiding ADE (Budigi et al., 2018), and relieve symptoms of severe disease (Ong et al., 2017). Secondly, m366.6 is a variant of m366 which underwent an affinity maturation process for augmented affinity to 4 serotypes (Hu et al., 2019). For that reason, DIII directed mAbs are promising therapeutic options for Dengue (Budigi et al., 2018).

Table 3. Therapeutic Monoclonal antibodies candidates against dengue infection

| | Serotype Specificity | Target Molecule | Biological Activity | Host of Isolation |
|-------------|----------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| mAB | | | | |
| 1F4 | DENV 1 | Envelope (D I and DI - DI hinge) | Significant reduction of viral RNA copy number in infected mice (Fibriansah et al., 2014; Young et al., 2020) | Human |
| 5J7 | DENV 3 | Envelope | Reduction of an average of 10 fold virus titers in in AG129 mice at nanomolar | Human |
| 337 | DEINA 2 | (Quaternary structure) | concentrations (Young et al., 2020) | Hulliali |
| 747(4)B7 | DENV 1 | Envelope Dimer Epitope | Prevented Aedes mosquitoes from acquiring DENV 1 from plasma (Tuan Vu | Human |
| | | (EDE2) | et al., 2019) | |
| 753(3)C10 | DENV 1, 4 | Envelope Dimer Epitope (EDE1) | Blockade of DENV 1, 4 transmission to Aedes mosquitoes (Varadarajan, Srinivasan, Maity & Ghosh, 2016). | Human |
| VIS513 | DENV 1 -4 | Envelope | Reduction of DENV titers and protects from both primary and secondary | Engineered |
| V13313 | DENV 1-4 | (Domain III) | antibody enhanced infection (Budigi et al., 2018). | Liigiileeleu |
| m366.6 | DENV 1, 3, 4 | Envelope | Protection from lethal DENV 1 - 4 infection in mouse model (Hu et al., 2019) | Human |
| | DENV 2 (Partial | (Domain III) | | |
| | protection) | | | |
| 3G9 | DENV 3 | Fusion Loop Epitope (Envelope DII) | Strong neutralization and prolongation of survival of mice after a lethal DENV challenge (Kotaki et al., 2021). | Human |
| 1G5 - LALA | DENV 1 | Envelope | Protection against DENV 1 infection in murine model with no ADE (Xu et al., | Human |
| 100 - LALA | DEIW 1 | Livelope | 2017). | Haman |
| prM - AID | DENV 1 | prM antibodies | Reduction in viral titers, IL - 10 and ALT in mice challenged with DENV1 | Mouse |
| | | | (Wang et al., 2017) | |
| SIgN - 3C - | DENV 1 - 4 | Envelope Dimer Epitope | Decrease viremia of 4 serotypes in adult infected mice (Lu et al., 2018). | Human |
| LALA | | (EDE) | | |
| 1C19 | DENV 1 - 4 | bc Loop | Recognizes an adjacent site of FL and potently neutralizes all serotypes | Human |
| | | (Envelope DII) | (Smith et al., 2013). | |
| D23-1G7C2 | DENV 1 - 4 | Envelope | Broadly neutralizes 4 serotypes with no ADE in mice (Ramadhany et al., | Human |
| | | | 2015). | |
| N297Q - | DENV 1 - 4 | Fusion Loop Epitope | Cross - neutralizing activity to all serotypes with no ADE in mice (Injampa et | Human |
| B3B9 | | (Envelope DII) | al., 2017). | |
| 1H7.4 | DENV 2 | NS1 | 100 % of survival in mice receiving sublethal dose of DENV plus NS1 (Beatty | Mouse |
| | | | et al., 2015) | |
| 2E8 | DENV 1 - 4 | NS1 | Reduction of viral titers and NS1 levels in mouse sera. | Mouse |
| | | | Reduction of DENV - induced prolonged bleeding time in mouse (Xu et al., 2017). | |

Despite high neutralization activity, limited pan - serotype recognition of specific mAbs and the relatively high risk for complication of disease via ADE made researchers look for other options (Fibriansah et al., 2014). Complex epitopes such as the quaternary Envelope Dimer Epitope (EDE) have been demonstrated to stimulate the production of antibodies (Kotaki et al., 2021) with high diverse neutralization and cross reactivity

among serotypes (Dejnirattisai et al., 2014; Varadarajan, Srinivasan, Maity & Ghosh, 2016). Unfortunately, the presence of diverse affinity antibodies in primarily infected patients appeared to reduce the efficiency (Varadarajan, Srinivasan, Maity & Ghosh, 2016) of EDE directed mAbs 747(4)B7 and 753(3)C10 (Tuan Vu et al., 2019). Although the mechanism of decreased efficiency remains unclear, it is hypothesized that

antibodies with diverse neutralization capacities compete with each other for epitopes (Varadarajan, Srinivasan, Maity & Ghosh, 2016). These results suggest that other criteria for further mAb target selection need to be considered such as degree of conservation or immunodominance. Fusion Loop Epitope is a glycerine rich, hydrophobic sequence located in the distal end of DII (Klein et al., 2013). It is implicated in critical processes of infection such as dimerization of E protein and pH dependent membrane fusion (Costin et al., 2013). Additionally, this linear epitope is immunodominant and highly conserved among DENV serotypes and even other flaviviruses which make it an interesting candidate (Costin et al., 2013; Rouvinski et al., 2017). Several groups have characterized and produced FLE antibodies, reporting a broad cross reactivity between serotypes (Deng et al., 2011; Smith et al., 2013). Unfortunately, most of these anti FLE mAbs showed neutralization values considerably lower compared to those mAbs directed to E dimers or quaternary viral structures and potently induce ADE (Kotaki et al., 2021, Smith et al., 2013). This poor neutralization capacity seems to be caused by suboptimal exposition of the FLE region in mature DENV (Rouvinski particles et al.. 2017). Interestingly, Tsai et. al reported that FLE from patients with a secondary infection potently neutralize DENV, while those form patients with primary infection show weak neutralization capacity (Tsai et al., 2013). These findings prompted new research such as the one conducted by Kotaki et. al, in which anti FLE 3G9 mAb underwent an affinity maturation process and modification (Kotaki et al., 2021). These optimizations increment 3G9 potency and reduce the risk of ADE (Kotaki et al., 2021).

ADE is theorized to occur due to the suboptimal neutralization of DENV that facilitate the entry to dendritic cells via FcyR, resulting in the exacerbation of pathology (Dejnirattisai et al., 2016). Consequently, mAbs therapeutic candidates should avoid or even reduce the risk of ADE *in vivo*. Several strategies to overcome this problem have been proposed. mAb - Fc modification by deletion of glycosylation sites such as

N297Q-B3B9 (Injampa et al., 2017) or induction of mutations (SIgN-3C - LALA, IG5 - LALA) reduced ADE and seemed to be decisive in the performance of the therapy (Xu et al., 2017; Lu et al., 2018). Alternatively, the administration of anti-idiotypic antibodies specific to prM mAb dramatically reduced ADE effect in mice challenged with DENV1 (Wang et al., 2017).

Challenges in development of structural proteins directed mAbs that efficiently treat Dengue make researchers explore nonstructural proteins as potential therapeutic targets because of the lack of ADE induction and high degree of conservation (Wan et al., 2014). NS1 is a multifunctional protein that plays crucial roles in both viral cycle and pathogenesis (Nasar, Rashid and Iftikhar, 2019). This is the only protein constitutively secreted by infected host cells (Chen, Lai and Yeh, 2018), and serum concentration of NS1 is correlated to disease severity (Nasar, Rashid and Iftikhar, 2019). Some pathogenic roles attributed to this protein are coagulation disruption, vascular cascade leakage, thrombocytopenia, proinflammatory factors production, etc (Nasar, Rashid and Iftikhar, 2019). NS1 mAb have demonstrated multiple mechanisms includina therapeutic reduction of viral titers, reduction in DENV replication via complement-dependent cytotoxicity (CDC), cross reactivity (Wan et al., 2017) and reduction of NS1 induced symptoms (See table 3).

mAbs represents interesting an alternative/complement to vaccination, with promising results such as those previously presented. This kind of therapy may reduce the risk of severe dengue and disease transmission (Sultana et al., 2009). However, mAbs approach faces important barriers including cross reactivity, potency and the risk of ADE as well as lack of experimental models that mimics human pathogenesis of Dengue (Kotaki et al., 2021; Chokephaibulkit et al., 2020). Limited capability in mounting full immune responses, lower infection efficiency, high technical and economic requirements and lack of clinical manifestations are some reasons why mAbs and other therapeutic candidates cannot be

carried to Clinical Trials (Chokephaibulkit et al., 2020; Zompi & Harris, 2012).

Antivirals

Currently, there are no approved or available antiviral drugs for the treatment of Dengue in any of its clinical manifestations. The only treatment available is supportive fluid therapy for severe Dengue and anti-inflammatory drugs to treat the symptoms of mild Dengue. The development of antiviral drugs effective against Dengue has been a big challenge. The main objective of an antiviral drug for Dengue is to be able to reduce the viral load in the first 70 hours in order to prevent the progression to a more severe clinical manifestation. One of the limitations of drug development is the fact that the antiviral should inhibit all four DENV serotypes (Anasir et al., 2020).

Different studies have been made to understand detect new and antiviral metabolites in natural sources that are able to target viral proteins (See table 4). There are manv different approaches development of antiviral drugs against Dengue. One of the most advanced approaches is the drug repurposing for Dengue therapy, in which many studies are currently in clinical trials. Approved and used antiviral drugs for other viral and non-viral diseases is the fastest and less expensive strategy to identify a treatment for Dengue. Despite the effort, this strategy did not show promising results against Dengue. Some of the drugs that were evaluated in clinical trials include chloroquine, celgosivir, ribavirin, prednisolone, and lovastatin (See table 5) (Sagaya Jansi et al., 2021).

Table 4. Therapeutic compounds candidates against dengue infection from natural and chemical sources

| Compound | Organism | Target molecule | Biological Activity | Reference |
|---------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 7-O-Methyl-glabranine | Tephrosia madrensis | - | The flavonoid showed a dose dependent inhibitory effect in vitro on dengue-2 virus. The study showed a 70% inhibition at a concentration of 25 µM. | Sagaya et al. 2020 |
| Brefeldin A | Penicillium sp. FKI-7127 | - | Brefeldin A can inhibit the four serotypes of dengue virus. It showed an early antiviral effect on the life cycle of dengue. | Raekiansyah et al. 2017 |
| Fucoidan | Cladosiphon okamuranus | - | The polysaccharides demonstrate an inhibitory effect on in vitro study of 80% on DENV2. In the serotypes 3 and 4 are moderately susceptible and for the serotype 1, fucoidan did not present and effect. There is no establish molecular mechanism of the inhibitory effect yet. | Teixeira et al. 2014 |
| Narasin | Streptomyces aureofaciens | • | The polyether showed that it has a 50% inhibitory effect against all four DENV serotypes. It has a minimal cytotoxicity. Inhibits post-entry stages of viral replication by disrupting viral protein synthesis. | Teixeira et al. 2014 |
| ST-610 | - | NS3 Helicase | Benzoxazole inhibitor. Potent inhibitor of DENV 2 in the viral titer reduction assay. It showed to be non-toxic against DENV 1-4 on in vitro studies. | Tian et al., 2018; C.M. Byrd, 2013 |
| MLH40 | - | Entry inhibitor, protein M- E interaction | Peptidyl inhibitor. Active against DENV 1-4. It showed an IC50 value of 31.41 μM against DENV2.Inhibits the viral entry. | Tian et al., 2018; A. Panya, 2015 |
| ST-148 | - | Capsid | Inhibites the entry and assembly or release of the virions by enhancing capsid-protein interaction and causing structural rigidity | Tian et al., 2018; P.Scaturro, 2014 |
| Peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino (PPMO) | - | Viral genome, targets 5' terminal nucleotide and 3' cyclization sequence regions (3'CS) | Reduction of viral titers of DENV2. The 3'CS targeted PPMO inhibited the replication of all four serotypes of DENV.inhibited DENV replication by interfering with both mRNA transcription and protein translation machinery. | Panda et al., 2021 |

Table 5. Antivirals candidates for repurposing strategy against dengue infection

| Compound | Biological Activity and Target molecules | Study characteristics | Clinical trial results |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Chloroquine | Inhibits DENV entry and the replication in vitro and in vivo. Inhibit the fusion between virus and host membrane. | Placebo vs Chloroquine, 307 participants on the clinical trial. | There was no change in the viremia and NS1 levels |
| Prednisolone | Reduce and prevent the development of more severe clinical manifestations or complications Literature supports the modulation of the function of endothelial glycocalyx and its anti inflammatory properties. | Placebo vs prednisolone. 225 participants of ages from 5 to 20. | No significant change in clinical or virological end points. |
| Lovastatin | Showed an moderate inhibitory effect in DENV2 replication. In animal models study that used mice it protected them from DENV2 infection. It is a cholesterol synthesis inhibitor, which allows to limit membrane mobilization needed for the viral replication | Placebo vs lovastatin, 300 participants . | Efficacy was not address. There is no beneficial effect on the clinical manifestations or viremia levels of DENV. |
| Balapiravir | Inhibit DENV4 RNA synthesis on in vitro studies. It is supposed to be an inhibitor of the NS5. | Placebo vs balapiravir, 64 participants of ages from 18 to 65 years old. | No changes in immunological and virological end points |
| Ribavirin | Showed synergistic effects when CM-10-18 is present, both are able to suppress DENV2 replication in vitro and on murine model. | Phase 2 clinical trail multicenter, to evaluate safety. Practical randomized controlled clinical research. 300 participants | |

For example, chloroquine is being evaluated due to its ability to inhibit endosomal acidification, which interferes with the fusion of the viral and endosomal membranes. *In vitro* studies showed that chloroquine inhibited DENV1 replication in THP cells and DENV2 replication in U937 and Vero cells. In animal model studies, chloroquine was able to reduce viremia in monkeys infected with DENV2. Even do, the previous promising results of the *in vitro* studies, the chloroquine was not able to reduce viremia and NS1 antigen in Dengue patients (Sagaya Jansi et al., 2021).

Different approaches are being studied that are focused on targeting the viral proteins or the targeting of the viral genome to inhibit the replication of the virus (See table 4). The main idea of using oligonucleotides is to target viral genomes, in order to inhibit the replication or translations, known as silencing of the viral genome expression. The oligonucleotides interact with specific regions of the target genome and downregulate the gene expression or disrupt the expression.

This strategy designs and uses different types of RNA or DNA molecules like siRNA, miRNA, CRISPR, ribozyme, among others (Panda et al., 2021).

Another strategy is to design antivirals that target viral proteins, in which the main focus is to use inhibitors to the different proteins that allow Dengue to replicate. The main candidate targets are NS3/NS2B protease, NS3 helicase, NS5 polymerase RNA-dependent, non-enzymatic NS4B, and the E glycoprotein. Each of these protein targets plays an important role in the replication of the virus and could help reduce the viremia in patients with Dengue. The inhibitors of each protein are being studied and still have some limitations to overcome before their approval and use in clinical trials (Anasir et al., 2020; Tian et al., 2018).

CONCLUSION

Dengue disease represents a complex health problem in Mexico. In the last century, the incidence in cases have shown irregular

patterns. The country has experienced 5 major outbreaks of Dengue, in which people of all ages have been affected. Given the susceptibility of the general population and increasing cases in 2019, the problem must uraently addressed. **Epidemiology** surveillance is crucial for guiding health authorities to take pertinent actions of prevention, monitoring and control. As the program for controlling PAHO previously demonstrated, coordinated efforts of governmental institutes, private companies and population could help to reduce the risk of transmission. Unfortunately, the tools we currently have are limited due to the percentage of asymptomatic cases and low comprehension of molecular and immunological mechanisms of pathology.

In addition to epidemiology, our arsenal against Dengue is focused on preventive and therapeutic strategies. To date, vaccines, monoclonal antibodies, and antiviral drugs represent the most promising prophylactic therapeutic approaches. Although preliminary in vitro and in vivo have shown hopeful results, remarkable obstacles need to be overcome. ADE, cross reactivity genetic susceptibility and the lack of an animal model that fully mimics pathogenesis of Dengue are some factors that hinders the development of definitive treatment and conduction of preclinical and clinical trials.

It is a mandatory impulse, innovation and improvement in preventive, diagnostic, and therapeutic tools. Experimental results would help us to fully understand the disease and mechanisms that lead to resolution or exacerbation, as well as finding an area of opportunity to protect thousands of people worldwide.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all participants who devoted their time and effort to this documentary research. We also thank Dr.Emma Herrera and Dr.Laura Castillo for their useful suggestions.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Anasir, M., Ramanathan, B., & Poh, C. (2020). Structure-Based Design of Antivirals against Envelope Glycoprotein of Dengue Virus. Viruses. Retrieved 20 November 2021, from http://10.3390/v12040367.
- Afzal, H., Zahid, K., Ali, Q., Sarwar, K., Shakoor, S., Nasir, U., & Nasir, I. A. (2016). Role of Biotechnology in Improving Human Health. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*, 07(06). https://doi.org/10.4172/2155-9929.1000309
- Bell, S. M., Katzelnick, L., & Bedford, T. (2019). Dengue genetic divergence generates within-serotype antigenic variation, but serotypes dominate evolutionary dynamics. *ELife*, 8. https://doi.org/10.7554/eLife.42496
- Beatty, P., Puerta-Guardo, H., Killingbeck, S., Glasner, D., Hopkins, K., & Harris, E. (2015). Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Science Translational Medicine*, 7(304). doi: 10.1126/scitranslmed.aaa3787
- Briseno-Garcia, B. (1996). Potential Risk for Dengue Hemorrhagic Fever: The Isolation of Serotype Dengue-3 in Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 2(2). https://doi.org/10.3201/eid0202.960210
- Budigi, Y., Ong, E., Robinson, L., Ong, L., Rowley, K., & Winnett, A. et al. (2018). Neutralization of antibody-enhanced Dengue infection by VIS513, a pan serotype reactive monoclonal antibody targeting domain III of the Dengue E protein. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(2), e0006209. doi: 10.1371/journal.pntd.0006209
- Byrd, C., Grosenbach, D., Berhanu, A., Dai, D., Jones, K., & Cardwell, K. et al. (2013). Novel Benzoxazole Inhibitor of Dengue Virus Replication That Targets the NS3 Helicase. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 57(4), 1902-1912. doi: 10.1128/aac.02251-12
- Chen, H., Lai, Y. and Yeh, T., 2018. Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine

- candidate. Journal of Biomedical Science, 25(1).
- Chia, P., Htun, H., Ling, W., Leo, Y., Yeo, T., & Lye, D. (2018). Hyperlipidemia, statin use and dengue severity. Scientific Reports, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-35334-2
- Chokephaibulkit, K., Chien, Y.-W., AbuBakar, S., Pattanapanyasat, K., & Perng, G. C. (2020). Use of Animal Models in Studying Roles of Antibodies and Their Secretion Cells in Dengue Vaccine Development. Viruses, 12(11), 1261. https://doi.org/10.3390/v12111261
- Costin, J., Zaitseva, E., Kahle, K., Nicholson, C., Rowe, D., & Graham, A. et al. (2013). Mechanistic Study of Broadly Neutralizing Antibodies Human Monoclonal against Dengue Virus That Target the Fusion Loop. Journal Of Virology, 87(1), 52-66. doi: 10.1128/jvi.02273-12
- Daep, C. A., Muñoz-Jordán, J. L., & Eugenin, E. A. (2014). Flaviviruses, an expanding threat in public health: focus on Dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus. Journal of Neuro Virology, *20*(6). https://doi.org/10.1007/s13365-014-0285-z
- Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski. Α.. Barba-Spaeth. Duangchinda, T., Sakuntabhai, A., Cao-Lormeau, V.-M., Malasit, P., Rey, F. A., Mongkolsapaya, J., & Screaton, G. R. (2016). Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. Nature Immunology, 17(9). https://doi.org/10.1038/ni.3515
- Dejnirattisai, W., Wongwiwat, W., Supasa, S., Zhang, X., Dai, X., & Rouvinski, A. et al. (2014). A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with Dengue virus. Nature Immunology, 16(2), 170-177. 10.1038/ni.3058
- Deng, Y.-Q., Dai, J.-X., Ji, G.-H., Jiang, T., Wang, H.-J., Yang, H., Tan, W.-L., Liu, R., Yu, M., Ge, B.-X., Zhu, Q.-Y., Qin, E.-D.,

- Guo, Y.-J., & Qin, C.-F. (2011). A Broadly Flavivirus Cross-Neutralizing Monoclonal Antibody that Recognizes a Novel Epitope within the Fusion Loop of E Protein. PLoS ONE. 6(1),e16059. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016059
- Deng, S.-Q., Yang, X., Wei, Y., Chen, J.-T., Wang, X.-J., & Peng, H.-J. (2020). A Review on Dengue Vaccine Development. Vaccines, 8(1).
 - https://doi.org/10.3390/vaccines8010063
- Dengue Viruses. (n.d.). Retrieved October 7, 2021, https://www.nature.com/scitable/topicpage/De ngue-viruses-22400925/
- Eerde, A., Gottschamel, J., Bock, R., Hansen, K. E. A., Munang'andu, H. M., Daniell, H., & Liu Clarke, J. (2019). Production of tetravalent dengue virus envelope protein domain III based antigens in lettuce chloroplasts and immunologic analysis for future oral vaccine development. Plant Biotechnology Journal, 1408-1417. https://doi.org/10.1111/pbi.13065
- Fajardo-Dolci, G., Meljem-Moctezuma, Vicente-González, E., Venegas-Páez, V., Mazón-González, B., Aguirre-Gas, H. (2012). El Dengue en México Conocer para mejorar la calidad de la atención. Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social, 50(2), 631-639.
- Fibriansah, G., Tan, J., Smith, S., Alwis, A., Ng, T., & Kostyuchenko, V. et al. (2014). A potent anti-Dengue human antibody preferentially recognizes the conformation of E protein monomers assembled on the virus surface. EMBO Molecular Medicine, 6(3), 358-371. doi: 10.1002/emmm.201303404
- Halstead, S. B. (1981). The Alexander D. Langmuir Lecture THE PATHOGENESIS OF Dengue. American Journal of Epidemiology, https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a11 3235

- Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: A Minireview. *Viruses*, 12(8). https://doi.org/10.3390/v12080829
- Hasan, S., Jamdar, S., Alalowi, M., & al Ageel Al Beaiji, S. (2016). Dengue virus: A global human threat: Review of literature. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 6(1). https://doi.org/10.4103/2231-0762.175416
- Hooft van Huijsduijnen, R., Kojima, S., Carter, D., Okabe, H., Sato, A., Akahata, W., Wells, T. N. C., & Katsuno, K. (2020). Reassessing therapeutic antibodies for neglected and tropical diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(1), e0007860. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007860
- Hu, D., Zhu, Z., Li, S., Deng, Y., Wu, Y., Zhang, N., Puri, V., Wang, C., Zou, P., Lei, C., Tian, X., Wang, Y., Zhao, Q., Li, W., Prabakaran, P., Feng, Y., Cardosa, J., Qin, C., Zhou, X., ... Ying, T. (2019). A broadly neutralizing germline-like human monoclonal antibody against Dengue virus envelope domain III. PLOS Pathogens, 15(6). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007836
- Hurtado Monzón, A. M., Cordero-Rivera, C. D., Farfan-Morales, C. N., Osuna-Ramos, J. F., de Jesús González, L. A., Reyes-Ruiz, J. M., & Ángel, R. M. (2020). The role of antiflavivirus humoral immune response in protection and pathogenesis. *Reviews in Medical Virology*, 30(4). https://doi.org/10.1002/rmv.2100
- ICTV. (2020). Genus: Flavivirus. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv online report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus
- Injampa, S., Muenngern, N., Pipattanaboon, C., Benjathummarak, S., Boonha, K., Hananantachai, H., Wongwit, W., Ramasoota, P. and Pitaksajjakul, P., 2017. Generation and characterization of cross neutralizing human monoclonal antibody against 4 serotypes of Dengue virus without enhancing activity. *PeerJ*, 5, p.e4021.

- Ivonne Torres-Galicia, David Cortés-Poza, & Ingeborg Becker. (2014). Dengue en México: análisis de dos décadas. *Gaceta Médica de México*, 150(2).
- J.S. Koopman, & H. Gómez Dantés. (1986). Boletín Mensual Epidemiología México (No. 2).
- Khetarpal, N., & Khanna, I. (2016). Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. Journal Of Immunology Research, 2016, 1-14. https://doi.org/10.1155/2016/6803098
- Klein, D. E., Choi, J. L., & Harrison, S. C. (2013). Structure of a Dengue Virus Envelope Protein Late-Stage Fusion Intermediate. *Journal of Virology*, 87(4), 2287–2293. https://doi.org/10.1128/JVI.02957-12
- Kotaki, T., Kurosu, T., Grinyo-Escuer, A., Davidson, E., Churrotin, S., & Okabayashi, T. et al. (2021). An affinity-matured human monoclonal antibody targeting fusion loop epitope of Dengue virus with in vivo therapeutic potency. *Scientific Reports*, 11(1). doi: 10.1038/s41598-021-92403-9
- Lan, N. T. P., & Hirayama, K. (2011). Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Tropical Medicine and Health*, 39(4SUPPLEMENT), S73–S81. https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S08
- Laureti, M., Narayanan, D., Rodriguez-Andres, J., Fazakerley, J. K., & Kedzierski, L. (2018). Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Frontiers in Immunology*, 9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02180
- Laredo-Tiscareño, S., Guo, X., Bocanegra-García, Virgilio. (2012). Virus del Dengue: estructura de serotipos y epidemiología molecular. *CienciaUAT*, *6*(3).
- Lim, M. Q., Kumaran, E. A. P., Tan, H. C., Lye, D. C., Leo, Y. S., Ooi, E. E., MacAry, P. A., Bertoletti, A., & Rivino, L. (2018). Cross-Reactivity and Anti-viral Function of Dengue Capsid and NS3-Specific Memory T Cells

- Toward Zika Virus. *Frontiers in Immunology*, 9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02225
- Low, J. G. H., Ooi, E. E., & Vasudevan, S. G. (2017). Current Status of Dengue Therapeutics Research and Development. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(suppl_2), S96–S102. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw423
- Lu, J., Wang, R., Xia, B., Yu, Y., Zhou, X., Yang, Z. and Huang, P., 2018. Potent Neutralization Ability of a Human Monoclonal Antibody Against Serotype 1 Dengue Virus. Frontiers in Microbiology, 9.
- Martina, B. E. E., Koraka, P., & Osterhaus, A. D. M. E. (2009). Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 564–581. https://doi.org/10.1128/CMR.00035-09
- Nasar, S., Rashid, N. and Iftikhar, S., 2019. Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-Dengue treatment: A review. *Journal of Medical Virology*, 92(8), pp.941-955.
- Natali, E. N., Babrak, L. M., & Miho, E. (2021). Prospective Artificial Intelligence to Dissect the Dengue Immune Response and Discover Therapeutics. Frontiers in Immunology, 12. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.574411
- Nguyen, N., Tran, C., Phung, L., Duong, K., Huynh, H., & Farrar, J. et al. (2012). A Randomized, Double-Blind Placebo Controlled Trial of Balapiravir, a Polymerase Inhibitor, in Adult Dengue Patients. The Journal Of Infectious Diseases, 207(9), 1442-1450. doi: 10.1093/infdis/jis470
- Obi, J. O., Gutiérrez-Barbosa, H., Chua, J. v., & Deredge, D. J. (2021). Current Trends and Limitations in Dengue Antiviral Research. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(4), 180. https://doi.org/10.3390/tropicalmed6040180
- Ong, E., Budigi, Y., Tan, H., Robinson, L., Rowley, K., & Winnett, A. et al. (2017).

- Preclinical evaluation of VIS513, a therapeutic antibody against Dengue virus, in non-human primates. *Antiviral Research*, 144, 44-47. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.05.007
- PAHO/WHO. (n.d.). Dengue y Dengue Grave. Casos y Muertes para los Países y Territorios de las Américas. Retrieved October 1, 2021, from
 - https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-Dengue/Dengue-nacional/237-Dengue-casos-muertes-pais-ano.html
- Panya, A., Sawasdee, N., Junking, M., Srisawat, C., Choowongkomon, K., & Yenchitsomanus, P. (2015). A Peptide Inhibitor Derived from the Conserved Ectodomain Region of DENV Membrane (M) Protein with Activity Against Dengue Virus Infection. Chemical Biology & Drug Design, 86(5), 1093-1104. doi: 10.1111/cbdd.12576
- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. *Nature Microbiology*, 5(6). https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0
- Panda, K., Alagarasu, K., & Parashar, D. (2021). Oligonucleotide-Based Approaches to Inhibit Dengue Virus Replication. Molecules, 26(4), 956. https://doi.org/10.3390/molecules26040956
- Raekiansyah, M., Mori, M., Nonaka, K., Agoh, M., Shiomi, K., Matsumoto, A., & Morita, K. (2017). Identification of novel antiviral of fungus-derived brefeldin A against dengue viruses. Tropical Medicine And Health, 45(1). doi: 10.1186/s41182-017-0072-7
- Rajapakse, S., Rodrigo, C., & Rajapakse. (2012). Treatment of Dengue fever. *Infection and Drug Resistance*. https://doi.org/10.2147/IDR.S22613
- Ramadhany, R., Hirai, I., Sasaki, T., Ono, K., Ramasoota, P., Ikuta, K. and Kurosu, T., 2015. Antibody with an engineered Fc region as a therapeutic agent against Dengue virus infection. *Antiviral Research*, 124, pp.61-68.

- Redoni, M., Yacoub, S., Rivino, L., Giacobbe, D., Luzzati, R., & Di Bella, S. (2020). Dengue: Status of current and under-development vaccines. Reviews In Medical Virology, 30(4). https://doi.org/10.1002/rmv.2101
- Rothman, A. L. (2011). Immunity to Dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature Reviews Immunology*, 11(8). https://doi.org/10.1038/nri3014
- Rouvinski, A., Dejnirattisai, W., Guardado-Calvo, P., Vaney, M.-C., Sharma, A., Duquerroy, S., Supasa, P., Wongwiwat, W., Haouz, A., Barba-Spaeth, G., Mongkolsapaya, J., Rey, F. A., & Screaton, G. R. (2017). Covalently linked dengue virus envelope glycoprotein dimers reduce exposure of the immunodominant fusion loop epitope. *Nature Communications*, 8(1), 15411. https://doi.org/10.1038/ncomms15411
- Sagaya Jansi, R., Khusro, A., Agastian, P., Alfarhan, A., Al-Dhabi, N., & Arasu, M. et al. (2021). Emerging paradigms of viral diseases and paramount role of natural resources as antiviral agents. NCBI. Retrieved 20 November 2021, from http://10.1016/j.scitotenv.2020.143539.
- San Martín, J. L., Brathwaite Dick, O., del Diego, J., Montoya, R. H., Dayan, G. H., & Zambrano, B. (2012). The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4). https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0770
- Sarthak Aggarwal. (2021). BIOTECHNOLOGY APPLICATIONS IN MEDICINE. *International Journal of Social Science and Economic Research*, 6(10).
- Scaturro, P., Trist, I., Paul, D., Kumar, A., Acosta, E., & Byrd, C. et al. (2014). Characterization of the Mode of Action of a Potent Dengue Virus Capsid Inhibitor. Journal Of Virology, 88(19), 11540-11555. doi: 10.1128/jvi.01745-14

- Schillberg, S., Raven, N., Spiegel, H., Rasche, S., & Buntru, M. (2019). Critical Analysis of the Commercial Potential of Plants for the Production of Recombinant Proteins. *Frontiers in Plant Science*, 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00720
- Schneider, J., Droll, D. (2010). A TIMELINE FOR Dengue IN THE AMERICAS TO DECEMBER 31, 2000 AND NOTED FIRST OCCURENCES. Pan American Health Organization (PAHO) Division of Disease Prevention and Control. https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/A%20timeline%20for%20Dengue.pdf
- Secretaria de Salud. (2014). Prevención y Control de Dengue 2013-2018. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/266420/PAE_PrevencionControlDengue2013_2018.pdf
- Smith, S., de Alwis, A., Kose, N., Harris, E., Ibarra, K., Kahle, K., Pfaff, J., Xiang, X., Doranz, B., de Silva, A., Austin, S., Sukupolvi-Petty, S., Diamond, M. and Crowe, J., 2013. The Potent and Broadly Neutralizing Human Dengue Virus-Specific Monoclonal Antibody 1C19 Reveals a Unique Cross-Reactive Epitope on the bc Loop of Domain II of the Envelope Protein. *mBio*, 4(6).
- Smith, S. A., de Alwis, A. R., Kose, N., Harris, E., Ibarra, K. D., Kahle, K. M., Pfaff, J. M., Xiang, X., Doranz, B. J., de Silva, A. M., Austin, S. K., Sukupolvi-Petty, S., Diamond, M. S., & Crowe, J. E. (2013). The Potent and Broadly Neutralizing Human Dengue Virus-Specific Monoclonal Antibody 1C19 Reveals a Unique Cross-Reactive Epitope on the bc Loop of Domain II of the Envelope Protein. *MBio*, 4(6). https://doi.org/10.1128/mBio.00873-13
- Subsecretaría de Salubridad DIGEPI. (1984).

 **REPORTES EPIDEMIOLÓGICOS SEMANAS 51 Y 52 (No. 1).
- Sultana, H., Foellmer, H. G., Neelakanta, G., Oliphant, T., Engle, M., Ledizet, M., Krishnan, M. N., Bonafé, N., Anthony, K. G., Marasco, W. A., Kaplan, P., Montgomery, R. R.,

- Diamond, M. S., Koski, R. A., & Fikrig, E. (2009). Fusion Loop Peptide of the West Nile Virus Envelope Protein Is Essential for Pathogenesis and Is Recognized by a Therapeutic Cross-Reactive Human Monoclonal Antibody. *The Journal of Immunology*, 183(1), 650–660. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900093
- Teixeira, R., Pereira, W., Oliveira, A., da Silva, A., de Oliveira, A., & Lopes, M. et al. (2014). Natural Products as Source of Potential Dengue Antivirals. Molecules, 19(6), 8151-8176. doi: 10.3390/molecules19068151
- Thanachartwet, V., Oer-areemitr, N., Chamnanchanunt, S., Sahassananda, D., Jittmittraphap, A., Suwannakudt, P., Desakorn, V., & Wattanathum, A. (2015). Identification of clinical factors associated with severe dengue among Thai adults: a prospective study. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 420. https://doi.org/10.1186/s12879-015-1150-2
- Thisyakorn, U., & Thisyakorn, C. (2014). Latest developments and future directions in dengue vaccines. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 2(1), 3–9. https://doi.org/10.1177/2051013613507862
- Tian, Y., Zhou, Y., Tatsuya Takagi, T., Kameoka, M., & Kawashita, N. (2018). Dengue Virus and Its Inhibitors: A Brief Review. J-Stage. Retrieved 20 November 2021, from http://Dengue Virus and Its Inhibitors: A Brief Review.
- Torres-Galicia, I., Cortés-Poza, D., & Becker, I. (2014). Dengue en México: incremento en la población juvenil durante la última década. Boletín Médico Del Hospital Infantil de México, 71(4). https://doi.org/10.1016/j.bmhimx.2014.08.003
- Tricou, V., Minh, N., Van, T., Lee, S., Farrar, J., & Wills, B. et al. (2010). A Randomized Controlled Trial of Chloroquine for the Treatment of Dengue in Vietnamese Adults. Plos Neglected Tropical Diseases, 4(8). doi: 10.1371/journal.pntd.0000785

- Tsai, W.-Y., Lai, C.-Y., Wu, Y.-C., Lin, H.-E., Edwards, C., Jumnainsong, A., Kliks, S., Halstead, S., Mongkolsapaya, J., Screaton, G. R., & Wang, W.-K. (2013). High-Avidity and Potently Neutralizing Cross-Reactive Human Monoclonal Antibodies Derived from Secondary Dengue Virus Infection. *Journal of Virology*, 87(23), 12562–12575. https://doi.org/10.1128/JVI.00871-13
- Tuan Vu, T., Clapham, H., Huynh, V., Vo Thi, L., Le Thi, D., & Vu, N. et al. (2019). Blockade of Dengue virus transmission from viremic blood to Aedes aegypti mosquitoes using human monoclonal antibodies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(11), e0007142. doi: 10.1371/journal.pntd.0007142
- Varadarajan, R., Srinivasan, S., Maity, S., & Ghosh, M. (2016). Broadly neutralizing antibodies for therapy of viral infections. Antibody Technology Journal, 1. doi: 10.2147/anti.s92190
- Wan, S., Lu, Y., Huang, C., Lin, C., Anderson, R., Liu, H., Yeh, T., Yen, Y., Wu-Hsieh, B. and Lin, Y., 2014. Protection against Dengue Virus Infection in Mice by Administration of Antibodies against Modified Nonstructural Protein 1. *PLoS ONE*, 9(3), p.e92495.
- Wan, S., Chen, P., Chen, C., Lai, Y., Chu, Y., Hung, C., Lee, H., Wu, H., Chuang, Y., Lin, J., Chang, C., Wang, S., Liu, C., Ho, T., Lin, C., Lee, C., Wu-Hsieh, B., Anderson, R., Yeh, T. and Lin, Y., 2017. Therapeutic Effects of Monoclonal Antibody against Dengue Virus NS1 in a STAT1 Knockout Mouse Model of Dengue Infection. *The Journal of Immunology*, 199(8), pp.2834-2844.
- Wang, M., Yang, F., Huang, D., Huang, Y., Zhang, X., Wang, C., Zhang, S. and Zhang, R., 2017. Anti-Idiotypic Antibodies Specific to prM Monoantibody Prevent Antibody Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 7.
- Warkentien, T. (2016). Dengue Fever: Historical Perspective and the Global Response. Journal of Infectious Diseases and

- *Epidemiology*, 2(2). https://doi.org/10.23937/2474-3658/1510015
- Whitehorn, J., Nguyen, C., Khanh, L., Kien, D., Quyen, N., & Tran, N. et al. (2015). Lovastatin for the Treatment of Adult Patients With Dengue: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Clinical Infectious Diseases, 62(4), 468-476. doi: 10.1093/cid/civ949
- WHO. (2020, June 24). *Dengue y Dengue grave*. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/Dengue-and-severe-Dengue
- Xu, M., Zuest, R., Velumani, S., Tukijan, F., Toh, Y., Appanna, R., Tan, E., Cerny, D., MacAry, P., Wang, C. and Fink, K., 2017. A potent neutralizing antibody with therapeutic potential against all four serotypes of Dengue virus. *npj Vaccines*, 2(1).

- Young, E., Carnahan, R., Andrade, D., Kose, N., Nargi, R., & Fritch, E. et al. (2020). Identification of Dengue Virus Serotype 3 Specific Antigenic Sites Targeted by Neutralizing Human Antibodies. *Cell Host & Microbe*, 27(5), 710-724.e7. doi: 10.1016/j.chom.2020.04.007
- Yung, C.-F., Lee, K.-S., Thein, T.-L., Tan, L.-K., Gan, V. C., Wong, J. G. X., Lye, D. C., Ng, L.-C., & Leo, Y.-S. (2015). Dengue Serotype-Specific Differences in Clinical Manifestation, Laboratory Parameters and Risk of Severe Disease in Adults, Singapore. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(5), 999–1005. https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0628
- Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses*, *4*(1), 62–82. https://doi.org/10.3390/v4010062

