



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

“Actividad antiviral de hidrolizados proteicos de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* contra el virus del dengue serotipo 2”

TESIS

Que presenta

BIOM. BIANCA VIANEY RIVERA SERRANO

Para obtener el Grado de

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

DIRECTORES DE TESIS

DR. MARCO ANTONIO VALDEZ FLORES

DR. JUAN FIDEL OSUNA RAMOS

COMITÉ TUTORAL

DRA. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL NÚÑEZ Y CÁCERES

DRA. CLAUDIA DESIREE NORZAGARAY VALENZUELA

DRA. LORANDA CALDERÓN ZAMORA

Culiacán, Sinaloa, México, a Septiembre del 2024.



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina, perteneciente a la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Valdez Flores y el Dr. Juan Fidel Osuna Ramos. Como asesores de tesis, participaron la Dra. Claudia Desireé Norzagaray Valenzuela, la Dra. Loranda Calderón Zamora y la Dra. Rosa María Del Ángel Núñez Y Cáceres.

Para realizar los estudios de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular, se recibió una beca por parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), con CVU 1239351.

Esta investigación fue apoyada por las subvenciones CONACYT (México) 302979 y A1-S-9005 a la Dra. Rosa María Del Ángel Núñez Y Cáceres. Los estudios experimentales se llevaron a cabo en colaboración con El Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

También se recibió apoyo por parte de La Coordinación General para el Fomento a la Investigación Científica e Innovación del Estado de Sinaloa (CONFÍE) para la realización de estancia en CINVESTAV, Zacatenco con el número de proyecto SIN-FJT-2024-CO1-00005.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Marco Antonio Valdez Flores y el Dr. Juan Fidel Osuna Ramos. Su guía, conocimiento y paciencia han sido esenciales para la realización de este trabajo. Gracias por sus críticas, su apoyo y por creer en mi capacidad para llevar a cabo esta investigación. Su convicción en el proyecto han sido una motivación importante.

A mis asesoras, la Dra. Claudia Desireé Norzagaray Valenzuela, la Dra. Loranda Calderón Zamora y la Dra. Rosa María Del Ángel Núñez Y Cáceres, les agradezco por su valiosa ayuda y orientación a lo largo de este proceso. Sus sugerencias y consejos me han permitido mejorar mi trabajo y avanzar en momentos de incertidumbre. Gracias por compartir su experiencia y sabiduría, y por estar para apoyarme.

También quiero agradecer a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa, y a sus Doctores, por darme la oportunidad de formar parte de su comunidad académica y por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo este proyecto. Su compromiso con la excelencia educativa y la investigación ha sido fundamental en mi desarrollo profesional y personal.

Además, a la Coordinación General para el Fomento a la Investigación Científica e Innovación del Estado de Sinaloa (CONFÍE) por el apoyo la realización de estancia en CINVESTAV, Zacatenco. De igual forma, al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por su apoyo financiero durante el desarrollo de esta tesis. Su compromiso con la promoción de la ciencia y la investigación en México es importante y ha sido crucial para mi formación académica y profesional.

Finalmente, a todos aquellos que contribuyeron a la realización y culminación de este trabajo, ya sea con su apoyo moral, técnico o logístico, les expreso mi más sincero agradecimiento. Sandy, quién me acompañó durante todo el proceso y por todo lo que compartimos al vivir esta aventura, Miguel, además, Carlos, Ricardo, Marcos, Jonny, Magda, Bravo, Fernando, Jaime y todo el equipo del laboratorio 8, de Infectómica y Patogénesis Molecular del Cinvestav Zacatenco.

A mi familia y seres especiales que han llegado a mi vida, por creer en mí, motivarme cada día y sobre todo por su tiempo, amor y apoyo incondicional que ha sido invaluable en este viaje lleno de aprendizaje.

¡Gracias!

DEDICATORIA

A mis padres

~Pilares de mi existencia~

En la odisea de mi vida, ustedes son el sol que me nutre y la lluvia que me alivia. Con su dedicación, han construido la esencia de mi ser, guiándome con paciencia y amor incondicional.

Sus sacrificios son las raíces profundas que me sostienen, y su presencia, la estrella que ilumina mi camino. En cada logro mío, hay una parte de ustedes, una chispa de su esfuerzo que me impulsa a “seguir adelante”.

Gracias por ser mi refugio y mi motivación, por creer en mí cuando nadie más lo hacía y por darme alas para volar hacia mis sueños. Este logro es tanto suyo como mío, y en cada página escrita, hay un eco de su amor infinito.

Con todo mi aprecio.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	v
I. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
II. INTRODUCCIÓN	3
III. MARCO TEÓRICO	5
3.1 Dengue	5
3.2 Epidemiología	5
3.2.1 Dengue en América	8
3.2.2 Dengue en México	8
3.2.3 Dengue en Sinaloa	9
3.3 Transmisión	10
3.4 Virus del dengue	11
3.4.1 Estructura y genoma	12
3.4.2 Proteínas estructurales	14
3.4.3 Proteínas no estructurales	16
3.4.4 Ciclo replicativo	22
3.5 Patogénesis	25
3.5.1 Mecanismos de infección	25
3.5.2 Respuesta inmune del huésped	27
3.5.3 Desarrollo de la enfermedad	29
3.6 Fisiopatología	29
3.6.1 Alteraciones fisiológicas	29
3.6.2 Síntomas clínicos	29
3.6.3 Complicaciones graves	30
3.7 Clasificación de la enfermedad	30
3.7.1 Dengue clásico	30
3.7.2 Dengue Grave	31
3.8 Diagnóstico	31

3.9 Prevención y control	32
3.10 Vacunas.....	33
3.10.1 Dengvaxia.....	33
3.10.2 Qdenga.....	33
3.11 Tratamiento.....	34
3.12 Antecedentes	35
3.12.1 Desarrollo de fármacos antivirales	35
3.12.2 Microalgas	39
3.12.3 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	54
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	59
V. JUSTIFICACIÓN.....	60
VI. HIPÓTESIS	61
VII. OBJETIVOS	62
7.1 Objetivo general	62
7.2 Objetivos específicos	62
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
8.1 Tipo de estudio	63
8.2 Material biológico	63
8.2.1 Microalga <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	63
8.2.2 Línea Celular Huh-7.....	63
8.2.3 Línea Celular BHK-21	63
8.2.4 Virus del dengue.....	64
8.3 Diseño experimental	65
8.4 Cultivo de microalgas <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	66
8.5 Obtención de biomasa	68
8.6 Extracción de lípidos	68
8.7 Extracción de proteína	69
8.8 Cuantificación de proteína	69
8.9 Hidrólisis enzimática de proteínas.....	70
8.10 Fraccionamiento de Hidrolizados proteicos por Ultrafiltración	71
8.11 Liofilización de hidrolizados proteicos	71
8.12 Separación de Hidrolizados Proteicos mediante SDS-PAGE	72
8.13 Evaluación de la actividad antiviral de los hidrolizados proteicos	72

8.14 Ensayo de viabilidad celular	73
8.15 Ensayo de infección y tratamiento <i>in vitro</i>	76
8.16 Ensayo de formación de placas virales	76
8.17 Citometría de flujo	77
8.18 Western blot.....	78
8.19 Análisis estadístico	80
IX. RESULTADOS	81
X. DISCUSIÓN.....	101
XI. CONCLUSIONES	112
XII. PERSPECTIVAS	113
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	114
XIV. SIGLAS Y ABREVIACIONES	132
XV. ANEXOS	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mapa de consenso global de evidencia, riesgo y carga del dengue.....	7
2	Organización y estructura del dengue (compartida entre flavivirus)	13
3	Ciclo replicativo del DENV.....	24
4	Respuestas del huésped a la inyección cutánea del virus del dengue.....	26
5	Respuestas inmunitarias adaptativas a las infecciones primarias y secundarias por el virus del dengue.....	28
6	Micrografías de <i>P. tricornutum</i>	55
7	Diseño experimental simplificado.....	65
8	Diagrama experimental del cultivo de la microalga <i>P. tricornutum</i>	67
9	Coloración de las fracciones peptídicas obtenidas.....	83
10	Visualización de las fracciones peptídicas obtenidas por SDS-PAGE.....	85
11	Viabilidad Celular con Hidrolizados proteicos a diferentes concentraciones....	87
12	Viabilidad Celular a través de diferentes concentraciones del hidrolizado proteico de las fracciones <3 kDa y 3 – 5 kDa.....	88
13	Viabilidad Celular a través de diferentes concentraciones del hidrolizado proteico de las fracciones 5 – 10 kDa y 10 – 30 kDa.....	89
14	Inhibición de la infección por DENV-2 a 150 µg/ml por fracción mediante citometría de flujo.....	91
15	Inhibición de la infección por DENV-2 a 300 µg/ml por fracción mediante citometría de flujo.....	92
16	Eficacia de las fracciones de hidrolizado proteico en la inhibición de la infección por DENV-2 por citometría de flujo en histogramas.....	94
17	Eficacia de las fracciones de hidrolizado proteico en la inhibición de la infección por DENV-2 por citometría de flujo.....	95
18	Eficacia antiviral de fracciones de péptidos contra el virus del dengue serotipo 2 en Ensayos de placas.....	98
19	Análisis de la expresión de las proteínas NS5 y NS3 del DENV-2 mediante Western Blot.....	100

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición química (% en materia seca) de diferentes microalgas de agua dulce y marina.....	42
2	Composición bioquímica de <i>P. tricornutum</i>	57
3	Concentración de las fracciones de hidrolizado proteico para viabilidad celular.....	75
4	Concentración y características observables de las fracciones peptídicas.....	82

I. RESUMEN

El dengue, una infección vírica que se transmite por mosquitos, afecta a millones anualmente, representando un desafío en salud pública. El virus del dengue (DENV), su agente causal, presenta cuatro serotipos (1-4), siendo el 2 el más asociado a casos graves. La falta de tratamientos específicos destaca la necesidad de nuevos antivirales. Los compuestos de fuentes naturales, como microalgas, son prometedores por sus propiedades bioactivas, donde *Phaeodactylum tricornutum*, rica en proteínas, representa una fuente potencial antiviral. El propósito de este trabajo fue determinar la actividad antiviral de hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* contra DENV-2.

Primero, se realizó el cultivo de *P. tricornutum*, seguido de la obtención de biomasa que fue procesada para la hidrólisis enzimática de las proteínas. El hidrolizado proteico se fraccionó en cuatro partes y se liofilizó. Posteriormente, se evaluó su citotoxicidad por ensayo MTT en células Huh-7, seguido de su actividad antiviral mediante ensayos *in vitro* de infección con DENV-2 y tratamiento con las fracciones obtenidas a 150 y 300 µg/ml, utilizando citometría de flujo y ensayo de formación de placas. Mediante Western blot se analizó la expresión de las proteínas virales NS5 y NS3 en células que se trataron con la fracción proteica de mejor resultado, finalizando con el análisis estadístico.

Los hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* mostraron una reducción significativa en la replicación del DENV-2, evidenciada por la disminución en la expresión proteica viral NS5 y NS3 en las células tratadas, en comparación con los controles de infección. Estos hallazgos indican que los hidrolizados proteicos de 10-30 kDa de *P. tricornutum* tienen propiedades antivirales contra DENV-2. La reducción de las proteínas NS5 y NS3 podría ser uno de los mecanismos de acción contra el virus. Estos resultados subrayan el potencial de estos hidrolizados como candidatos prometedores para desarrollar nuevas formas de tratamiento contra el dengue.

Palabras clave: DENV-2, hidrolizados proteicos, antiviral, *Phaeodactylum tricornutum*.

ABSTRACT

Dengue, a viral infection transmitted by mosquitoes, affects millions annually, posing a public health challenge. Dengue virus (DENV), its causative agent, comprises four serotypes (1-4), with type 2 most associated with severe cases. The lack of specific treatments underscores the need for new antivirals. Compounds from natural sources, such as microalgae, show promise due to their bioactive properties. *Phaeodactylum tricornutum*, rich in proteins, represents a potential antiviral source. This study aimed to determine the antiviral activity of protein hydrolysates from *P. tricornutum* against DENV-2.

First, *P. tricornutum* was cultured, and biomass obtained was enzymatically hydrolyzed to yield protein hydrolysates. The hydrolysate was fractionated into four parts and lyophilized. Subsequently, cytotoxicity was evaluated using MTT assay on Huh-7 cells, followed by antiviral activity assessment via *in vitro* infection assays with DENV-2 and treatment using fractions at 150 and 300 µg/ml concentrations, monitored by flow cytometry and plaque formation assay. Western blot analysis of viral proteins NS5 and NS3 expression in cells treated with the most effective protein fraction was conducted, followed by statistical analysis.

Protein hydrolysates from *P. tricornutum* demonstrated significant reduction in DENV-2 replication, evidenced by decreased NS5 and NS3 viral protein expression in treated cells compared to infection controls. These findings indicate that 10-30 kDa protein hydrolysates from *P. tricornutum* possess antiviral properties against DENV-2. Reduction in NS5 and NS3 proteins may be one of the mechanisms of action against the virus. These results highlight the potential of these hydrolysates as promising candidates for developing new dengue treatments.

Keywords: DENV-2, protein hydrolysates, antiviral, *Phaeodactylum tricornutum*.

II. INTRODUCCIÓN

El agente causal de la enfermedad del dengue es virus del dengue (DENV), del cual se han descrito para cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4), donde el más comúnmente relacionado con el dengue grave es el serotipo 2. Este virus forma parte del género *Flavivirus*, que corresponde a la familia *Flaviviridae*, y mosquitos del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* lo transmiten. Anualmente, causa entre 100 y 400 millones de infecciones y se encuentra distribuido en más de 100 países, constituyendo un significativo problema para la salud pública en regiones tropicales (OMS, 2024). La infección por DENV puede ser asintomática o sistémica, manifestándose como fiebre del dengue, que puede evolucionar a una enfermedad grave con síntomas como acumulación de líquido, pérdida de plasma, dificultad respiratoria, hemorragia grave o daño a múltiples órganos (Soto-Acosta *et al.*, 2017).

Hasta la fecha, no hay un tratamiento específico para el virus del dengue, y las únicas opciones disponibles son soluciones paliativas para los síntomas. Los métodos de diagnóstico definitivo no suelen ser accesibles para todos (Crispín *et al.*, 2023). Además, las estrategias para prevenir y controlar el dengue se enfocan sobre todo en la vigilancia epidemiológica y realizar el control de los mosquitos, que son costosas y poco eficaces. Sumado a esto, las vacunas en desarrollo ofrecen protección parcial contra el virus (López & Alatorre, 2022).

En este contexto, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas es imperativa. La exploración de compuestos naturales podría ofrecer soluciones innovadoras y efectivas. Entre los elementos de origen natural estudiados por sus compuestos bioactivos, las microalgas destacan por sus propiedades antioxidantes, antiproliferativas, anticancerígenas, antiobesidad, antiinflamatorias, antibacterianas, inmunoestimulantes y antienvjecimiento. Incluso, han demostrado tener propiedades antivirales. Los compuestos derivados de las microalgas que han demostrado estas propiedades incluyen polisacáridos, compuestos fenólicos, halogenados, diversos pigmentos, ácidos grasos, lípidos, esteroides, aminoácidos, péptidos y aminoácidos y proteínas.

De estos, los péptidos han tomado especial interés debido a sus ventajas, como la diversidad estructural, actividad antiviral de amplio espectro, baja toxicidad, menor resistencia viral y sostenibilidad. Son adecuados para combinaciones terapéuticas y pueden ser modificados químicamente, lo que los convierte en prometedores agentes antivirales.

Una de las microalgas que ha demostrado tener potencial terapéutico es *Phaeodactylum tricornutum*, debido a su capacidad para producir diversos compuestos bioactivos. A pesar de esto, su potencial antiviral no ha sido explorado. Además, al ser una microalga rica en proteínas, se convierte en una fuente potencial para obtener péptidos con actividad antiviral.

Este trabajo tuvo la finalidad de estudiar la actividad antiviral de péptidos derivados de *P. tricornutum* contra el DENV-2. Evaluando la capacidad de los hidrolizados para inhibir la replicación viral y que a futuro puedan mitigar los efectos patológicos asociados con la infección, buscando dilucidar los posibles mecanismos moleculares subyacentes a su actividad antiviral. Esto proporcionará una base sólida para la creación de nuevos tratamientos antivirales derivados de microalgas.

Esta investigación, además de aportar a la comprensión sobre los beneficios biológicos de *P. tricornutum*, busca contribuir a la lucha global contra el dengue, ofreciendo alternativas naturales y sostenibles para el tratamiento de esta enfermedad que ha representado un importante problema de salud pública durante años. La investigación propuesta tiene el potencial de abrir nuevas vías en el desarrollo de fármacos de origen natural, destacando la relevancia de las microalgas como fuente inagotable de compuestos bioactivos con aplicaciones terapéuticas.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Dengue

La enfermedad viral del dengue se transmite por el mosquito hembra *Aedes aegypti* principalmente, distribuido alrededor del mundo en áreas tropicales y subtropicales (Ginés *et al.*, 2022). El dengue puede desarrollarse por infección de cualquiera de los serotipos que existen (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), su sintomatología y desarrollo puede presentarse como una fiebre ligera hasta formas que se agravan poniendo en situación de riesgo la vida del paciente (Dávila-Flores, 2019). La sintomatología clásica puede incluir cefalea intensa, fiebre elevada, dolor en músculos y articulaciones, erupción cutánea y malestar general. En situaciones críticas, puede desarrollarse el síndrome de choque por dengue o la fiebre hemorrágica del dengue, que pueden llevar a complicaciones graves como sangrado severo, daño orgánico y, en casos extremos, la muerte (Pizarro-Gonzaga & Vila-Paucar, 2023).

Los esfuerzos para prevenir el dengue se centran en controlar el mosquito transmisor, eliminando los criaderos de agua estancada donde el *A. aegypti* deposita sus huevos. Aunque se han desarrollado vacunas, como Dengvaxia, su eficacia varía y actualmente no hay tratamientos específicos antivirales disponibles, por lo que el manejo clínico se centra en aliviar los síntomas y proporcionar cuidados de apoyo (Tully & Griffiths, 2021). La vigilancia epidemiológica y la respuesta rápida son cruciales para contener los brotes de dengue y mitigar su efecto en la salud pública. Así como el desarrollo de nuevos tratamientos, principalmente los derivados de fuentes naturales.

3.2 Epidemiología

Actualmente, cerca de la mitad de las personas en el mundo corren el riesgo de infectarse con dengue, y se ha calculado que anualmente se infectan alrededor de 10 a 400 millones de personas. Cabe destacar que el dengue se presenta principalmente en áreas urbanas y semiurbanas de todo el mundo, sobre todo en climas tropicales y subtropicales (Figura 1). La prevalencia del dengue ha experimentado un notable incremento a nivel global en los últimos años.

La OMS reportó 5,2 millones de casos en 2019, un aumento considerable con respecto a los 505,430 que había en el 2000 (OMS, 2023). Una gran cantidad de los casos que se presentan no suelen presentar síntomas o pueden ser menores y autolimitados, por esta razón no se informa y se desconoce el número real de casos de dengue, otros casos han sido mal diagnosticados como enfermedades febriles, lo que dificulta aún más determinar su prevalencia e incidencia real. Existen modelos que estiman que hay 390 millones de personas que se infectan por DENV anualmente y de estas al menos 96 millones llegan a presentar cuadro clínico aparente (Ong & Ng, 2021). Con respecto a la prevalencia, de acuerdo con otro estudio se encontró que 3.900 millones de individuos están en peligro de infectarse por DENV (Zerpa *et al.*, 2022).

En la actualidad, en más de 100 países la enfermedad es predominante en diversas regiones de la OMS, como el Pacífico Occidental, el Sudeste Asiático, el continente americano, el Este del Mediterráneo y África. Las zonas más vulnerables y perjudicadas son el Sudeste Asiático, las regiones del norte y sur de América y Pacífico del Oeste, siendo Asia responsable de aproximadamente el 70 % de la presencia del dengue con respecto al total (OMS, 2023). Como parte de América, al finalizar el año 2022, en México se reportaron 59,918 casos de dengue, de los cuales 2,869 pertenecen al estado de Sinaloa (SINAVE, 2023).

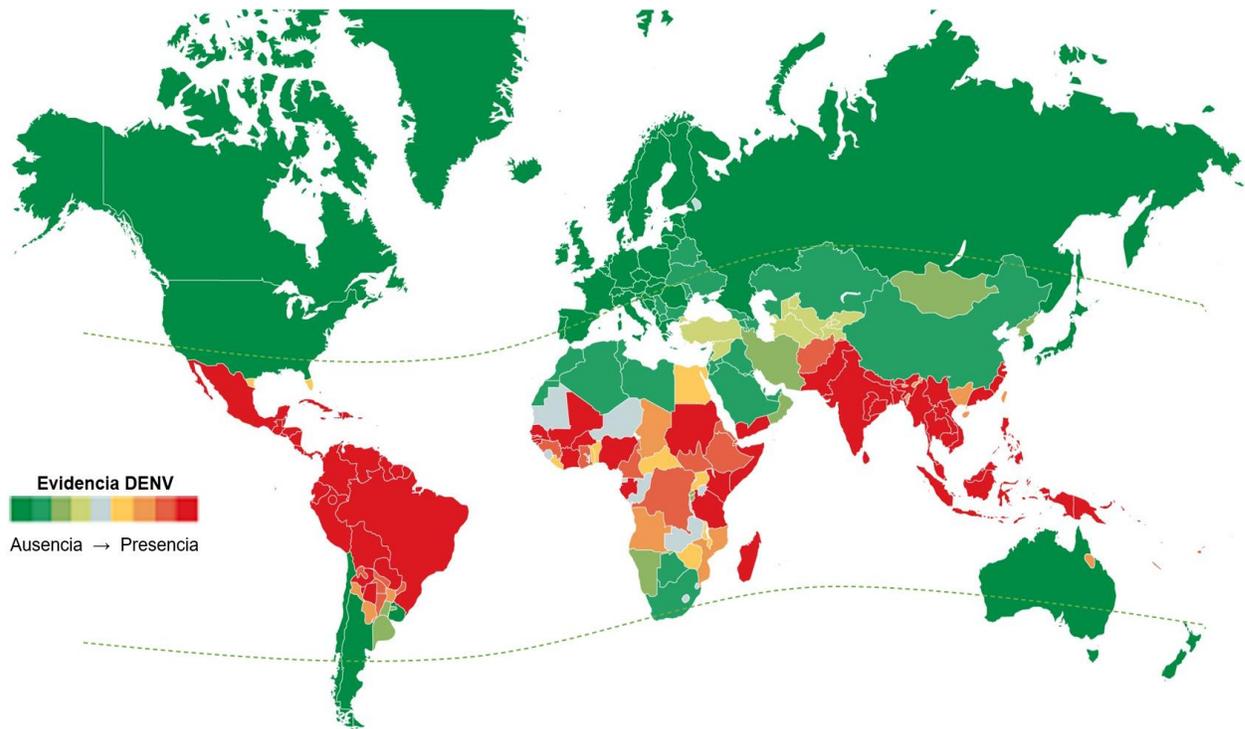


Figura 1. Mapa de consenso global de evidencia, riesgo y carga del dengue. Se muestra desde la ausencia total (verde oscuro) hasta la presencia completa (rojo oscuro) del dengue, delimitando con línea punteada las zonas tropicales y subtropicales. Modificado de Guzmán *et al.*, 2016.

3.2.1 Dengue en América

El dengue constituye una grave preocupación para la salud pública, actualmente es endémico en la mayoría de los países de América, destacando los que se encuentran en áreas tropicales y subtropicales. La región experimenta brotes periódicos debido a la presencia del vector *Aedes aegypti* y condiciones climáticas favorables para la proliferación del mosquito (PAHO, 2022). En 2022, la Organización Panamericana de la Salud reportó más de 3 millones de casos de dengue en la región, con Brasil, México, y Colombia entre los países más afectados (PAHO, 2022).

Los países con infraestructura deficiente para el control de vectores y sistemas de salud pública limitados son especialmente vulnerables. Por ejemplo, en Nicaragua y Honduras, los casos de dengue han experimentado un notable incremento en los años recientes, con tasas de incidencia mayores a los 300 casos por 100,000 habitantes (OMS, 2022). Además, en Venezuela, la crisis económica y social ha exacerbado la situación, dificultando las medidas de control de vectores y tratamiento de los casos (PAHO, 2022).

Las condiciones climáticas, como las altas temperaturas y la humedad, así como las lluvias estacionales, favorecen la reproducción del *Aedes aegypti*. En países como Perú y Bolivia, las temporadas de lluvias intensas se correlacionan con un aumento en los casos de dengue (PAHO, 2022).

3.2.2 Dengue en México

México enfrenta desafíos significativos con respecto al dengue, representando una de las regiones con alta incidencia en América Latina. De acuerdo con el SINAVE (2023), en el país 59,918 reportes de dengue fueron documentados, donde 2,869 casos pertenecieron al estado de Sinaloa (SINAVE, 2023). Las condiciones climáticas variadas y la presencia de *Aedes aegypti* en muchas regiones del país facilitan la transmisión del virus (PAHO, 2022).

Los brotes de dengue en México muestran fluctuaciones estacionales, con períodos de mayor incidencia durante la temporada de lluvias y temperaturas cálidas, cuando aumenta la reproducción del mosquito vector (WHO, 2024).

De junio a octubre es donde se han registrado más casos, coincidiendo con las lluvias intensas en muchas regiones del país, lo que crea condiciones ideales para la reproducción del mosquito (PAHO, 2022).

El estado de Veracruz, por ejemplo, es una de las áreas más afectadas, con un aumento significativo en los casos reportados durante la temporada de lluvias (PAHO, 2022). Asimismo, los estados de Chiapas, Jalisco y Guerrero presentan altos índices de incidencia, reflejando la dispersión geográfica del vector en el país (SINAVE, 2023).

La infraestructura deficiente para el control de vectores y los limitados recursos en el sistema de salud pública agravan la situación, dificultando la adopción de estrategias eficaces para prevenir y controlar el dengue (PAHO, 2022).

3.2.3 Dengue en Sinaloa

Sinaloa, ubicado en la zona costera del Pacífico de México, no es ajeno al dengue. En 2022, se reportaron 2,869 casos de dengue en el estado, lo que destaca su vulnerabilidad a la enfermedad (SINAVE, 2023). Esta región enfrenta brotes periódicos de la enfermedad, influenciados por las circunstancias climatológicas que favorecen a la proliferación del vector y la urbanización rápida que crea ambientes propicios para la reproducción del *Aedes aegypti* (PAHO, 2022).

Las altas temperaturas y la humedad característica de Sinaloa, especialmente durante la temporada de lluvias, crean un ambiente ideal para la reproducción del mosquito vector. Esto se combina con factores como el agua estancada y la densidad poblacional, que facilitan la transmisión del virus (WHO, 2024). La vigilancia epidemiológica es crucial en esta región, y los esfuerzos de control vectorial y las campañas de concientización son fundamentales para mitigar la transmisión del dengue (PAHO, 2022).

En respuesta a estos desafíos, las autoridades de salud en Sinaloa han implementado diversas estrategias, incluyendo la fumigación de áreas urbanas, la eliminación de criaderos de mosquitos y la promoción de prácticas preventivas entre la población (SINAVE, 2023). La respuesta rápida a los brotes es necesaria para gestionar la carga del dengue y preservar la salud de la población de esta región.

3.3 Transmisión

El principal transmisor del DENV es el mosquito hembra *Aedes aegypti*, perteneciente al género *Aedes* (Dávila-Flores, 2019). Este mosquito, de aproximadamente 5 mm de tamaño, se encuentra predominantemente en áreas urbanas y periurbanas, donde deposita sus huevos en recipientes con agua estancada. Las hembras son hematófagas, dependiendo de factores como la humedad, el olor y la cantidad de CO₂ para localizar a sus víctimas (Salvi *et al.*, 2021; Guadarrama-Peralta, 2023).

Las condiciones climatológicas son de importancia en el ciclo reproductivo de *Aedes aegypti*, favorecidas en épocas de lluvia, donde hay un aumento de la humedad y la presencia de agua estancada. Se considera que este mosquito no sobrevive a menos de 4 °C o más de 40 °C de temperatura. Su ciclo de vida, desde huevo hasta mosquito adulto, se completa en aproximadamente una semana en condiciones óptimas. El mosquito es especialmente activo durante el amanecer y el atardecer, momentos en los que busca alimentarse de sangre humana para completar su ciclo reproductivo (Collazos-Vera *et al.*, 2017).

El dengue se transmite cuando un mosquito hembra *A. aegypti* inserta su probóscide a una persona para alimentarse, si esta se ha infectado con alguno de los cuatro serotipos del virus, lo pasa al mosquito y después al picar a un nuevo individuo sano le transmite el DENV. El virus se multiplica dentro del mosquito y se transmite a través de su saliva al introducirse en el torrente sanguíneo de la nueva víctima. Este ciclo de transmisión se perpetúa en áreas donde los mosquitos y los humanos coexisten estrechamente, lo que hace del manejo de vector y la erradicación de focos de cría de mosquitos estrategias esenciales para prevenir la propagación del dengue (Cano *et al.*, 2020).

Además de *A. aegypti*, otro vector importante es el *Aedes albopictus*, una especie invasora que fue detectada por primera vez en Europa, en Albania, en 1979, y ahora está establecida en 28 países europeos. *A. albopictus* puede transmitir el DENV, aunque su efectividad está dada por la temperatura. La transmisión del dengue por este mosquito se reporta principalmente a temperaturas de 28 °C (Mercier *et al.*, 2022).

La vigilancia de vectores, recomendación emitida por la OMS, es una práctica rutinaria en muchos países endémicos del dengue para monitorear y controlar las poblaciones de mosquitos. Sin embargo, los índices tradicionales de vigilancia, como el índice House y el índice Breteau, han sido cuestionados por su idoneidad en la evaluación del riesgo de transmisión. Los índices basados en recuentos de mosquitos adultos pueden ser más efectivos para evaluar este riesgo, aunque su implementación es compleja y laboriosa (Ong & Ng, 2021).

3.4 Virus del dengue

El virus del dengue (DENV) forma parte de los Flavivirus, un género de la familia *Flaviviridae*. El DENV es un virus que contiene un ARN monocatenario de sentido positivo, que incluye cuatro serotipos diferentes (DENV-1 a DENV-4) (Dávila-Flores, 2019). Los viriones maduros del dengue tienen forma de esfera y miden 50 nm de diámetro, estos presentan varias copias de las proteínas que son parte de su estructura (cápside, C; pre-membrana, prM; y envoltura, E), una copia del genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva y del huésped toma su membrana. Las proteínas estructurales son divididas en el genoma por proteasas virales y del huésped, que las separa de las siete proteínas no estructurales (Morales, 2021).

La amplia variabilidad genética del dengue se evidencia en los diferentes genotipos o linajes dentro de cada serotipo. La evolución del virus parece estar dominada por la selección natural, favoreciendo a los virus "aptos" para humanos y vectores. Las infecciones graves se han relacionado con mayor frecuencia a DENV-2 y DENV-3, los genotipos denominados asiáticos. Además, se reporta que existe variedad de virus dentro de un solo organismo anfitrión (cuasi-especie) en infecciones humanas (Santaella, 2021).

3.4.1 Estructura y genoma

Un ARN monocatenario de polaridad positiva, contiene el virus del dengue, en las células infectadas actúa como ARN mensajero. Este codifica solo una poliproteína, que se procesa por enzimas proteolíticas tanto del virus como de la célula, originando tres proteínas que forma parte de la estructura (E, prM, y C) y siete proteínas que no forman parte de esta (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5) (Pérez-Domínguez *et al.*, 2015; Contreras *et al.*, 2021), Figura 2.

Las proteínas estructurales son fundamentales para la formación del virión y la interacción con el hospedador, mientras que las proteínas no estructurales están implicadas en el ciclo replicativo del virus y la modulación de la respuesta inmune (Contreras *et al.*, 2021).

El genoma del virus tiene aproximadamente 11 kilobases de longitud y está organizado en zonas que no se traducen en las regiones 5' y 3', que regulan procesos como la replicación y la traducción. Los cuatro serotipos del virus del dengue presentan diferencias genéticas significativas que afectan su patogenicidad y la respuesta inmune del hospedador, complicando el desarrollo de vacunas y tratamientos efectivos (Contreras *et al.*, 2021).

El virión del dengue es una partícula en forma de esfera rodeada por una membrana lipídica que protege su contenido genético. En su estado maduro, el virión tiene un diámetro de 50 nm y exhibe una superficie lisa y uniforme. Sin embargo, en su estado inmaduro, el diámetro aumenta a unos 60 nanómetros y la superficie adquiere una apariencia puntiaguda, debido a la disposición diferente de las proteínas en su envoltura. Dentro de esta partícula se encuentra el ARN viral, que codifica tanto las proteínas estructurales como no estructurales. Estas proteínas son fundamentales no solo para que pueda replicarse el DENV, sino también para que puedan ensamblarse nuevas unidades virales, así como en su habilidad de evitar la respuesta inmunitaria del anfitrión, asegurando así la persistencia de la infección en el organismo. La estructura del virión, junto con la información genética que transporta, es clave para la propagación efectiva del virus dentro del huésped y para la continuidad del ciclo viral (Guzmán *et al.*, 2016; Harapan *et al.*, 2020; Bhatt *et al.*, 2021).

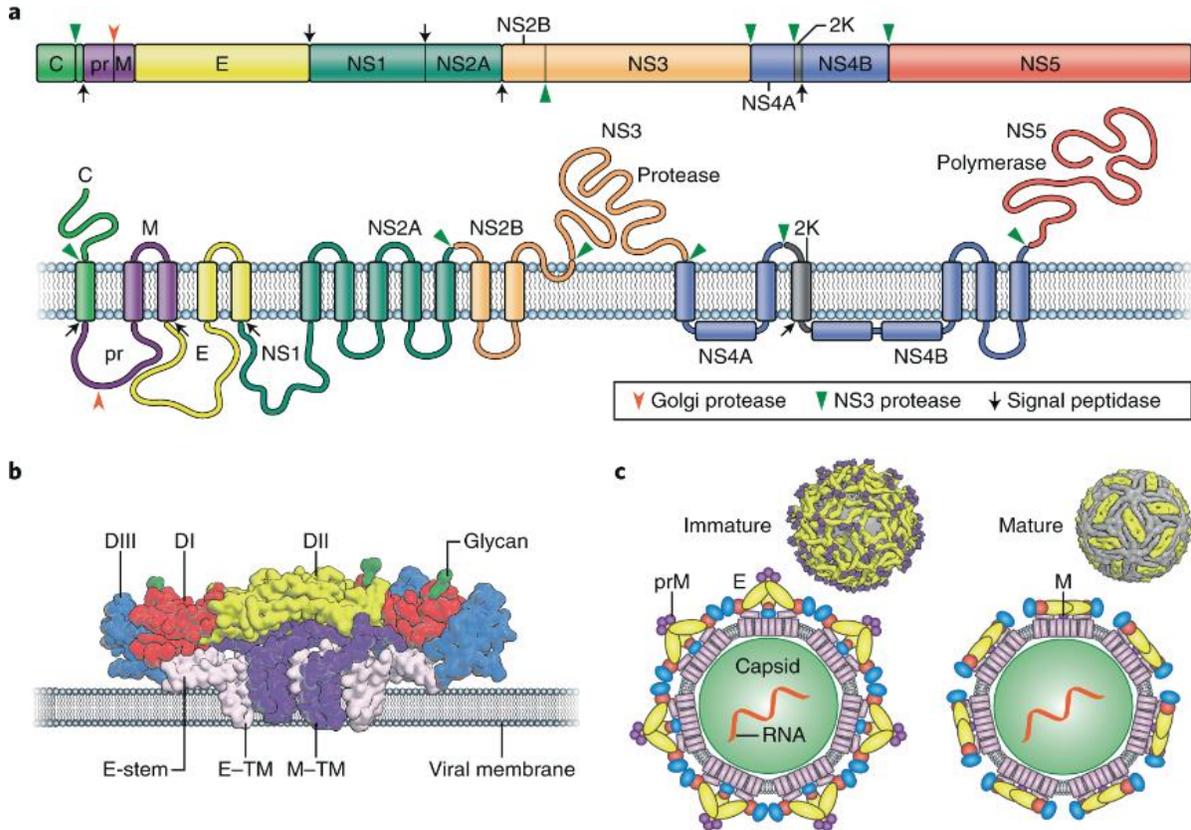


Figura 2. Organización y estructura del dengue (compartida entre flavivirus).

a) Los flavivirus codifican una poliproteína que se escinde en el retículo endoplásmico, resultando en diez proteínas: tres que forma parte de la estructura (C, prM, E) y siete que no forman parte de esta, incluyendo dos formas de NS4A. b) Las proteínas E del flavivirus tienen tres dominios y se unen a la membrana viral mediante un tallo y dos dominios transmembrana antiparalelos. La proteína M también tiene dos dominios transmembrana. c) La disposición de las proteínas E varía entre las formas inmadura y madura del virión. Imagen tomada de Pierson & Diamond, 2020.

3.4.2 Proteínas estructurales

3.4.2.1 Proteína E

La proteína E, de 50 kDa aproximadamente forma parte de la envoltura, de ahí su nombre. Esta proteína se organiza en homodímeros que forman complejos tipo cabeza-cola en la superficie viral y desempeña múltiples roles clave en el ciclo de vida y patogénesis del DENV (Velandia & Castellanos, 2011). Su arreglo incluye tres dominios distintos: el dominio I, dominio N-terminal fundamental en su estructura; el dominio II, con una zona de fusión hidrófoba; y el dominio III, encargado de la interacción con los receptores de la célula (Wan *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2015). Esta capacidad de reconocimiento y unión a receptores específicos es vital para determinar el tropismo celular y la infectividad del virus en el organismo.

A nivel estructural, la proteína E se dispone en la superficie del virión en forma de homodímeros planos, contribuyendo a la estabilidad y protección del material genético viral. En contraste, en partículas virales inmaduras, forma heterodímeros junto a la proteína prM, dando lugar a estructuras triméricas que confieren una apariencia puntiaguda característica (Velandia & Castellanos, 2011; Meng *et al.*, 2015).

Además de facilitar la entrada viral mediante la fusión con la membrana celular del hospedero, la proteína E también desempeña un papel crucial en la respuesta inmune. Es reconocida como el principal inmunógeno del virus del dengue, estimulando la producción de anticuerpos neutralizadores en el individuo infectado (Wan *et al.*, 2013). Sin embargo, las mutaciones que experimenta esta proteína durante la replicación viral pueden alterar significativamente la eficacia de replicación, afinidad del virus por ciertos tejidos y la virulencia, influyendo así en la severidad y curso de la infección (Tuiskunen-Bäck & Lundkvist, 2013).

3.4.2.2 Proteína PrM y M

La proteína M, deriva de la proteína precursora prM, que está compuesta por 166 aminoácidos cuyo peso molecular es de 26 kDa aproximadamente. La proteína M, en sí, es más pequeña, compuesta por 75 aminoácidos y con un peso de alrededor de 8 kDa.

La transformación de PrM a M es esencial para la maduración del virus y se lleva a cabo mediante la acción de la endoproteasa furina en el aparato de Golgi (Velandia & Castellanos, 2011; Meng *et al.*, 2015). Durante este proceso, prM se divide en dos fragmentos: el péptido 'pr' y la proteína M. En su estado maduro, la proteína M se asocia a la superficie del virión, mientras que el fragmento 'pr' se disocia al ambiente extracelular (Perera & Kuhn, 2008; Harapan *et al.*, 2020).

En las partículas virales inmaduras, prM desempeñando el papel de chaperona, protegiendo al dominio de necesario para fusionarse en la proteína E para prevenir una fusión prematura de la partícula viral con la membrana lipídica de la célula huésped (Velandia & Castellanos, 2011; Harapan *et al.*, 2020). Esta protección es fundamental para asegurar que la fusión viral solo ocurra una vez que las partículas virales han sido liberadas en el espacio extracelular.

Se ha descrito que un ectodominio de más o menos 40 aminoácidos y dos dominios transmembrana constituyen la proteína M. Además, este ectodominio tiene el potencial de inducir muerte celular en diferentes cultivos de células tumorales. Un péptido específico dentro de esta región, denominado ApoptoM y compuesto por los residuos 32 al 40, es el causante de desencadenar y generar apoptosis de las células. Esto lo hace por medio de una señalización de apoptosis que se activa únicamente al trasladarse este dominio a través de la ruta de secreción en la célula. Esta señal podría ser inhibida si el ectodominio logra hacer una unión al retículo endoplásmico o si se agrega KDEL (un péptido señal), lo que sugiere que ApoptoM podría jugar un papel en el daño tisular asociado con la infección viral (Velandia & Castellanos, 2011; Meng *et al.*, 2015).

En el virión inmaduro, la proteína prM se presenta en 90 heterodímeros junto a la proteína E, formando picos triméricos que le confieren una apariencia puntiaguda. Al madurar, la proteína E forma homodímeros planos que crean una capa proteica lisa en la superficie viral (Meng *et al.*, 2015). Este cambio morfológico es crucial para la infectividad del virus, ya que la maduración evita la fusión prematura con la membrana del huésped y permite que el virus sea liberado en su forma más infectiva.

3.4.2.3 Proteína C

La proteína C (cápside) del DENV es crucial para la estructura y replicación del virus, tiene un peso molecular aproximado de 11-12 kDa, esta proteína altamente básica y homodimérica, compuesta por 100 aminoácidos, está enriquecida en residuos de lisina y arginina. Se encuentra en el interior del virión, donde interactúa con el ARN viral para formar la nucleocápside, protegiendo así el genoma viral de las enzimas celulares y asegurando su estabilidad durante la replicación y el ensamblaje del virus (Meng *et al.*, 2015; Harapan *et al.*, 2020).

La proteína C se compone de cuatro hélices alfa: la hélice 1 se ubica en el extremo N-terminal con orientación hacia el citoplasma, se acopla con el ARN genómico que se ha generado recientemente para formar la nucleocápside o el complejo riboproteico. La hélice 2, que es hidrofóbica, funciona como un mecanismo de bisagra que facilita la proximidad del ARN viral a la proteína C unida en la membrana del retículo endoplásmico y recluta gotas lipídicas citoplasmáticas, promoviendo la creación del nuevo virión. Mientras que las hélices 3 y 4, que también presentan la característica de hidrofobicidad, unen la proteína al retículo endoplásmico, específicamente a la membrana (Velandia & Castellanos, 2011; Tuiskunen-Bäck & Lundkvist, 2013).

Además, la proteína C es procesada en la membrana del RE junto con el ARN viral y las glicoproteínas prM y E, facilitando el ensamblaje de nuevas partículas virales. La proteína C muestra una plasticidad estructural y funcional notable, existiendo en formas unidas a membrana y libres, y formando dímeros helicoidales en solución. Esta flexibilidad es crucial para su función en la encapsidación del genoma viral y la organización del ARN dentro del virión (Harapan *et al.*, 2020).

3.4.3 Proteínas no estructurales

3.4.3.1 Proteína NS1

La proteína no estructural NS1, es una glicoproteína esencial para la replicación viral y el control de la respuesta inmunitaria del hospedador, con un peso de 45-46 kDa.

NS1 se produce dentro de las células infectadas y también se secreta al exterior. Intracelularmente, participa en la creación del complejo replicativo del ARN viral junto a otras proteínas virales y componentes celulares. Extracelularmente, la proteína NS1 circula en el suero, interfiriendo con la activación del complemento y promoviendo la disfunción endotelial, lo que contribuye a síntomas graves del dengue como la fuga capilar y el choque hemorrágico (Perera & Kuhn, 2008; Meng *et al.*, 2015; Harapan *et al.*, 2020).

NS1 es una proteína multifuncional que existe en diferentes formas: como monómero soluble en el retículo endoplásmico (RE), como homodímero asociado a membranas intracelulares, y como hexámero soluble secretado. La forma secretada de NS1 (sNS1) es un objetivo importante del sistema inmune, ya que induce la producción de anticuerpos y respuestas celulares. Esta proteína también se une a la superficie de células no infectadas a través de interacciones con heparina y condroitín sulfato E (Velandia & Castellanos, 2011; Wan *et al.*, 2013).

La glicoproteína NS1 tiene dos sitios de glicosilación conservados entre los flavivirus, que modula su secreción, expresión en la superficie celular, estabilidad del hexámero, e interacción con el complemento humano. La proteína madura contiene 352 aminoácidos, incluyendo 12 residuos de cisteína que forman seis enlaces disulfuro intramoleculares, esenciales para la formación de dímeros y hexámeros (Tuiskunen-Bäck & Lundkvist, 2013). La NS1 secretada tiene una función esencial en la evasión del sistema inmune y la modulación de la respuesta inmunitaria durante la infección. Se ha encontrado en suero de personas infectadas altos niveles de NS1, por lo que es un marcador temprano de la infección por dengue (Velandia & Castellanos, 2011).

3.4.3.2 Proteína NS2a

La proteína no estructural NS2A, localizada en las membranas intracelulares del RE, desempeña múltiples funciones esenciales. Es mediadora en la formación de la vesícula de replicación, donde se sintetiza el ARN viral, y está involucrada en la organización y funcionamiento del complejo de replicación del ARN. Además, colabora con otras proteínas, como NS2B y NS3, para asegurar el correcto procesamiento y ensamblaje de las nuevas partículas virales (Velandia & Castellanos, 2011).

NS2A es una proteína hidrofóbica de aproximadamente 22 kDa y 218 aminoácidos que forma parte del complejo de replicación viral. Se compone de 5 segmentos que traspasan la membrana de retículo endoplásmico y 2 secciones que se comunican con el retículo sin atravesarlo. NS2A participa tanto en la promoción del ensamble como en el ciclo replicativo del virus, con funciones como reclutar ARN viral, proteínas estructurales y proteasas en el sitio de ensamblaje del virión y coordinando la formación de la nucleocápside y el virus, determinando si el ARN genómico producido se utiliza para formar nuevas estructuras de replicación o si formará parte de la nucleocápside en el proceso de ensamble del virus (Meng *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2019; Harapan *et al.*, 2020).

Además de su papel en la replicación y ensamblaje viral, NS2A participa en un rol de suma importancia al modular la inmunidad del hospedero. Interfiere con la vía de señalización del interferón, permitiendo al virus evadir el reconocimiento y eliminación por parte del sistema inmune (Martínez *et al.*, 2017).

3.4.3.3 *Proteína NS2b*

La proteína no estructural NS2B del DENV es crucial para la actividad proteasa del virus, se puede encontrar asociada a la membrana actuando como cofactor esencial de la proteína NS3, con 14 kDa de peso molecular, constituida por 130 aminoácidos (Wan *et al.*, 2013; Harapan *et al.*, 2020).

NS2B activa la proteasa NS3, una enzima responsable del procesamiento de las poliproteínas virales en proteínas funcionales que son requeridas para que el virus pueda replicarse, así como para su ensamblaje. La interacción entre NS2B y NS3 forma un complejo proteasa que cliva específicamente el precursor poliproteico del virus en sus componentes individuales, facilitando la maduración del virus y la producción de proteínas no estructurales vitales para la replicación del ARN viral (Tuiskunen-Bäck & Lundkvist, 2013).

Además de su función en la proteólisis, NS2B también tiene un rol crítico en el control de la respuesta inmunitaria del hospedero, ayudando al virus a evadir el sistema inmune.

NS2B es una proteína integral de membrana que, junto con NS3, forma el complejo de serina proteasa del dengue. Esta asociación es vital para la activación estructural de la proteasa NS3, con NS2B envolviendo el dominio proteasa de NS3 en una estructura tipo "cinturón", formando parte integral del sitio activo de la proteasa (Meng *et al.*, 2015).

La estructura de NS2B sugiere que esta proteína tiene regiones hidrofóbicas que anclan a NS2B-NS3, un complejo situado en la membrana del retículo endoplásmico, posicionando el sitio catalítico de la proteasa cercano a los dominios transmembrana que posteriormente serán escindidos en la poliproteína (Velandia & Castellanos, 2011).

3.4.3.4 Proteína NS3

La proteína no estructural NS3, de 70 kDa, es una enzima con múltiples funciones esencial en el ciclo de replicación viral y consta de 618 aminoácidos. NS3 posee dos dominios principales: el dominio proteasa N-terminal (residuos 1 a 180) y el dominio helicasa C-terminal (residuos 181 a 618). La proteasa NS3, en complejo con su cofactor NS2B, se encarga del clivaje proteolítico de la poliproteína del virus, generando proteínas maduras necesarias para la replicación y el ensamblaje del virus. Este procesamiento es vital para la producción de nuevas partículas virales funcionales (Velandia & Castellanos, 2011; Meng *et al.*, 2015; Harapan *et al.*, 2020).

El dominio con actividad helicasa de NS3 desenrolla el ARN viral de doble cadena, una etapa crítica para que se lleve a cabo la replicación del ARN y la síntesis de las proteínas del virus. Además, la helicasa optimiza el proceso de transcripción y copia del ARN viral, asegurando que este sea accesible para la replicación y traducción. NS3 también tiene actividades NTPasa y RNA-trifosfatasa que apoyan la síntesis del ARN viral (Tuiskunen-Bäck & Lundkvist, 2013).

NS3, en colaboración con NS2B, es crucial para la escisión de varios complejos poliproteicos del virus del dengue. Además, NS3 crea un entorno de lípidos adecuado circundante al retículo endoplásmico, reclutando enzimas provenientes de la célula como la sintasa de ácidos grasos para una replicación eficiente del virus.

La proteína NS3 también puede participar en el ensamblaje y transporte intracelular de las partículas virales (Perera & Kuhn, 2008; Velandia & Castellanos, 2011).

3.4.3.5 *Proteína NS4a*

Otra de las proteínas no estructurales del dengue es NS4A, esta es una proteína integral que se encuentra en la membrana caracterizada por ser considerablemente hidrofóbica, compuesta por 150 aminoácidos y de 16 kDa aproximadamente en peso molecular. Esta proteína tiene un rol importante en la reorganización de las membranas del hospedero para facilitar la replicación del ARN viral. NS4A se incrusta en el RE, contribuyendo a la formación de la "red de replicación" en la cual se realiza la replicación del ARN del virus (Meng *et al.*, 2015; Harapan *et al.*, 2020).

NS4A induce la remodelación de las membranas intracelulares, creando estructuras específicas denominadas vesículas de replicación, que proporcionan un entorno adecuado para la replicación viral. Este mecanismo es de suma relevancia para que se efectúe la replicación viral de forma eficiente. Además, NS4A trabaja en estrecha coordinación con otras proteínas no estructurales, especialmente NS4B, para establecer y mantener estas estructuras de replicación (Perera & Kuhn, 2008; Harapan *et al.*, 2020).

NS4A también tiene una función crucial en la modulación de la respuesta inmunitaria del anfitrión, interfiriendo con las vías de señalización del interferón (IFN- α/β), lo que permite al virus evadir la detección y eliminación por parte del sistema inmune (Tuiskunen-Bäck & Lundkvist, 2013; Wan *et al.*, 2013).

3.4.3.6 *Proteína NS4b*

La proteína NS4B (no estructural) del DENV es esencial para la replicación del ARN viral y para evadir la defensa inmunitaria del hospedador, consta de alrededor de 245 a 249 aminoácidos con 27 kDa en peso molecular. NS4B, es una proteína de membrana que se encuentra ubicada en el RE contribuye a la formación del complejo de replicación viral al interactuar con otras proteínas virales como NS4A y NS1.

Estas interacciones son esenciales para la creación de vesículas de replicación, sitio en el cual se realizará la síntesis del genoma del virus (Harapan *et al.*, 2020). Además de su papel en la replicación del ARN, NS4B desempeña una función crítica en la inhibición de la defensa inmunitaria del hospedador. Interfiere con la señalización del interferón, una molécula clave en la respuesta antiviral innata, ya que no permite que se active la vía de señalización mediante su bloqueo, que normalmente inducirían una respuesta antiviral fuerte (Tuiskunen-Bäck & Lundkvist, 2013). Este mecanismo de evasión permite al virus replicarse más eficazmente y establecer una infección persistente (Wan *et al.*, 2013).

NS4B, junto con NS4A, es una pequeña proteína hidrofóbica que forma parte integral de la membrana y participa directamente en la mejora de la actividad helicasa de NS3, lo cual es vital para la replicación del ARN viral (Meng *et al.*, 2015).

3.4.3.7 Proteína NS5

La proteína no estructural más grande y conservada es la NS5, incluso en los diferentes serotipos del DENV, con un peso molecular aproximado de 104 kDa y se compone por 900 aminoácidos (Meng *et al.*, 2015). Esta proteína presenta una estructura bifuncional con dos dominios principales: una con función de RNA polimerasa que depende de ARN (RdRp) en la región o extremo C-terminal y otra la de metiltransferasa en el extremo N-terminal (Harapan *et al.*, 2020).

El dominio de NS5 N-terminal, que se compone de los residuos 1 a 269, actúa como una metiltransferasa y guanidiltransferasa, responsables de la caperuza del ARN viral. Este proceso de metilación en las posiciones de guanina N-7 y ribosa 2'-O es crucial para la protección del ARN viral y su reconocimiento por la maquinaria de traducción del huésped, garantizando así la estabilidad del ARN viral y su traducción eficiente (Wan *et al.*, 2013). La RdRp, situada entre los residuos 270 a 900, cataliza la síntesis de nuevas cadenas de ARN viral, un paso esencial para el ciclo de replicación del ARN viral (Tuiskunen-Bäck & Lundkvist, 2013).

Además de sus funciones en la replicación del ARN, NS5 también participa evadir la respuesta inmunitaria del anfitrión. Inhibe la fosforilación de STAT2, un factor de transcripción en la señalización del interferón, reduciendo así la habilidad del hospedador para generar una respuesta antiviral efectiva (Perera & Kuhn, 2008). Esta inhibición permite al virus evadir el sistema inmune y continuar su ciclo de replicación sin ser detectado y eliminado por las defensas del hospedero.

La estructura cristalina completa de NS5 ha sido recientemente elucidada, revelando detalles importantes sobre sus dominios funcionales y su conectividad. La región que conecta los dominios de metiltransferasa y RdRp es altamente flexible, lo que impide la cristalización de la proteína completa, pero cumple con una función de gran importancia en la regulación de la actividad de la polimerasa al estabilizar el dominio RdRp y mejorar la eficiencia de la síntesis de ARN (Meng *et al.*, 2015).

3.4.4 Ciclo replicativo

El ciclo replicativo del DENV comienza cuando se unen las proteínas del virus a los receptores de las células dianas, los cuáles son específicos y se encuentran expuestos (Miller *et al.*, 2008; Screaton *et al.*, 2015). La línea fagocítica mononuclear, incluyendo las células de *Langerhans* son las células que se infectan primero (Diamond *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000; Jessie *et al.*, 2004; Noisakran *et al.*, 2010; Pova *et al.*, 2014). Además, el DENV infecta células del tejido endotelial, del bazo, hepatocitos, nódulos linfoides, médula ósea, nefronas, pulmones, cerebro y timo, esto lo convierte en una infección a nivel sistémico (Diamond *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000; Jessie *et al.*, 2004; Noisakran *et al.*, 2010; Pova *et al.*, 2014).

Los receptores del huésped asociados con la entrada viral incluyen el receptor de manosa (MR) en monocitos y macrófagos, sulfato de heparán en líneas celulares epiteliales, y el complejo lipopolisacárido (LPS)-CD14 en células inmunitarias (Screaton *et al.*, 2015), además las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90 también facilitan la entrada de DENV (Screaton *et al.*, 2015). La interacción del receptor celular con la proteína E del virus (Figura 3), provoca la entrada de la partícula viral por vía endocítica que se encuentra mediada por clatrina.

Una vez dentro de la célula huésped, el virión es internalizado en un endosoma temprano, el cual es marcado por Rab5, con un pH de alrededor de 6.5, que madura hacia un endosoma tardío marcado por Rab7, con un pH aproximadamente de 5.5 (Mackenzie & Westaway, 2001; Miller *et al.*, 2008; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010; Sreaton *et al.*, 2015). Este ambiente ácido induce cambios conformacionales en la proteína E del virus, facilitando que se fusione la envoltura del virus con la membrana del endosoma y la liberación del ARN viral en el citoplasma (Mackenzie & Westaway, 2001; Miller *et al.*, 2008; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010; Sreaton *et al.*, 2015).

Posteriormente, el genoma viral, de sentido positiva, es transportado y asociado con el retículo endoplásmico, lugar donde se realiza su replicación y posterior traducción. Dicha traducción del ARN viral induce la formación de estructuras de membrana que crean un microambiente necesario para que puedan formarse los complejos de replicación, que es donde se encuentran múltiples proteínas virales y factores del huésped que facilitan la generación del nuevo ARN y la morfogénesis del virus (van der Schaar *et al.*, 2007; van der Schaar *et al.*, 2008).

La encapsidación del ARN del virus, conocida como formación de nucleocápside (NC), requiere de la integración electrostática de la proteína C cargada positivamente al ARN viral cargado negativamente. El ARN viral de sentido positivo recién sintetizado se une a las poliproteínas C-prM-E y a las proteasas NS2B-3 en el sitio de ensamblaje, formando la nucleocápside. La NC brota junto con la membrana del RE hacia la luz del RE y es transportada por medio de la vía secretora como una partícula de virus inmadura (Yu *et al.*, 2008).

Una vez que se ha replicado el genoma viral, las partículas virales que se están procesando y se encuentra inmaduras viajarán en pequeñas vesículas al aparato de Golgi, lugar en el cual sufre un proceso de glicosilación la proteína E. Durante el tránsito por el Golgi, la proteasa furina escinde la proteína prM en M, transformando las partículas virales inmaduras en viriones maduros. La proteína E del virión inmaduro experimenta cambios conformacionales reversibles dependientes del pH durante la salida del virión. Finalmente, los viriones maduros se exocitan de las células del hospedador y están listas para infectar nuevas células (Yu *et al.*, 2008).

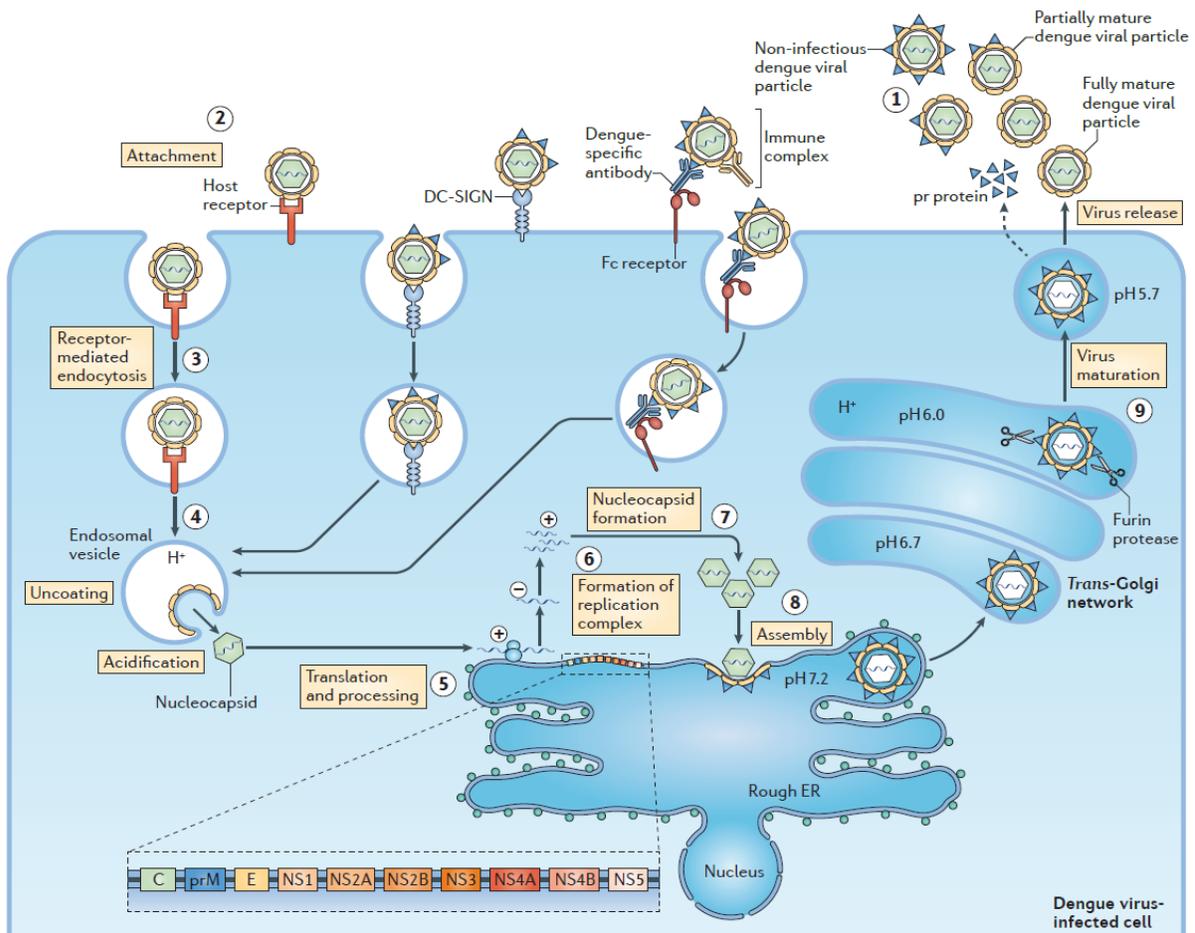


Figura 3. Ciclo replicativo del DENV. Se representan las distintas fases del ciclo de replicación viral; iniciando con la unión (adsorción), seguido de la entrada (endocitosis), descapsidación y liberación del ARN viral, luego la traducción de proteínas virales, generación de nuevas copias del genoma, ensamblaje, maduración y morfogénesis y por último liberación de las nuevas partículas virales (Inmaduras, parcialmente maduras y maduras) Tomado de Screaton *et al.* (2015).

3.5 Patogénesis

La patogénesis del dengue implica una compleja interacción entre el virus y el sistema inmunológico del huésped, que influye en el desarrollo de la enfermedad desde formas leves hasta potencialmente mortales.

3.5.1 Mecanismos de infección

El DENV infecta principalmente células dendríticas, macrófagos y monocitos, después de ser introducido en el cuerpo humano por medio de la picadura de un mosquito hembra infectado, especialmente *Aedes aegypti* (Penagos-Castañeda *et al.*, 2022). Los receptores celulares, como los receptores de manosa, receptor de célula dendrítica específico de intercelular adhesión-3 (DC-SIGN) y otros factores de entrada, facilitan la internalización del virus (Lee *et al.*, 2020).

Posterior a la internalización del virus a la célula, el genoma viral es liberado y se replica en el RE y el aparato de Golgi, formando nuevas partículas virales que pueden infectar células vecinas o bien si estas viajan a los ganglios linfáticos pueden establecer una infección sistémica, Figura 4.

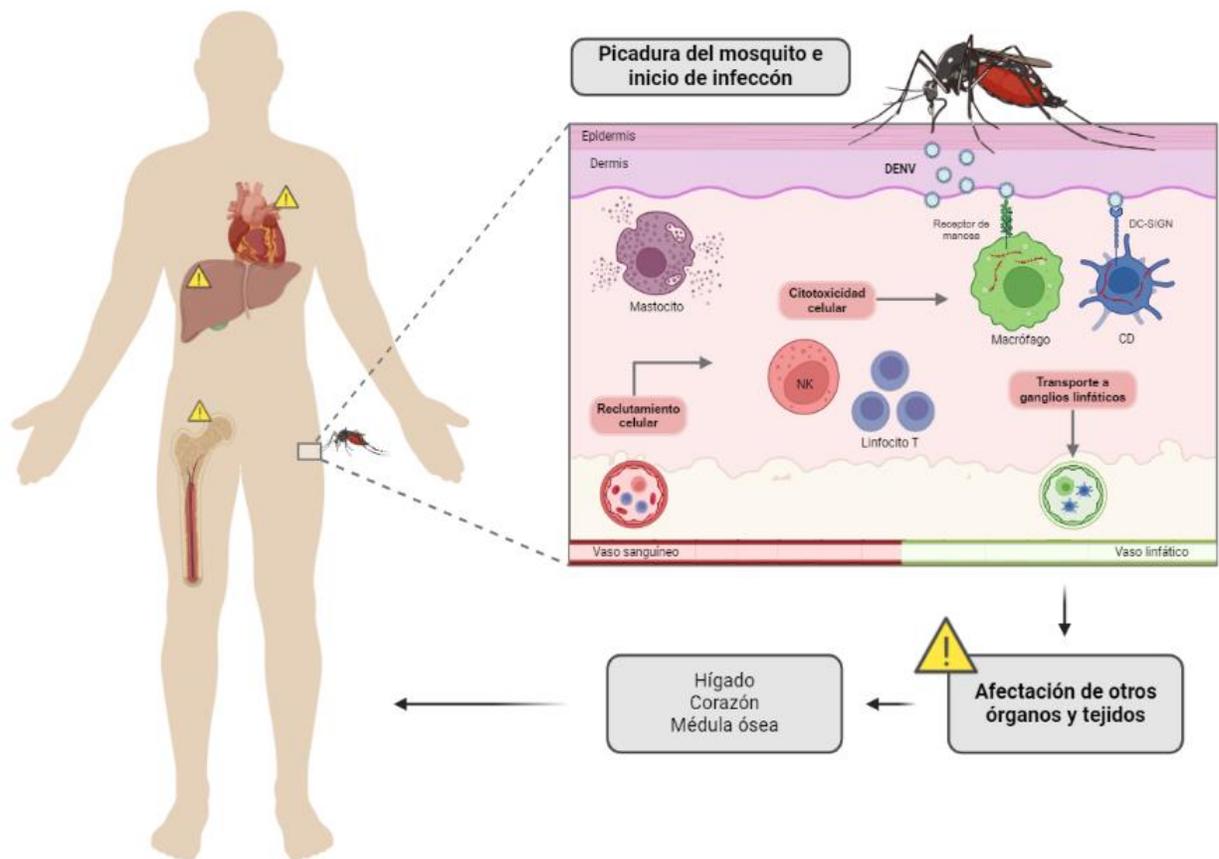


Figura 4. Respuestas del huésped a la inyección cutánea del virus del dengue.

La infección inicia tras la inyección subcutánea del virus en la piel, en su mayoría por la picadura de mosquitos. Las partículas virales liberadas pueden infectar células cercanas. Una respuesta inflamatoria local al DENV en la piel provoca el reclutamiento de leucocitos de la vasculatura, que promueven la eliminación de aquellas células que se hayan infectado por el virus en el lugar de la inyección. Luego el virus viaja a los ganglios linfáticos para establecer una infección sistémica (Elaborado con <https://biorender.com/>).

3.5.2 Respuesta inmune del huésped

El virus del dengue desencadena una respuesta inmunitaria compleja que involucra tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Inicialmente, la infección activa la respuesta innata con la liberación de citocinas, por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el interferón alfa (IFN- α), las cuales activan otras células como los macrófagos, *Natural killer* (NK) y células dendríticas. Luego, la respuesta adaptativa se pone en marcha, activando células B y T, así como la producción de anticuerpos neutralizantes que ayudan a eliminar el virus y proteger contra futuras infecciones.

Durante la infección secundaria, la respuesta inmunitaria es más rápida y robusta debido a la memoria inmunitaria. Los anticuerpos preexistentes y las células T de memoria se activan rápidamente, lo que puede proporcionar protección cruzada pero también contribuir a la patogénesis por medio de la mejora dependiente de anticuerpos (ADE). La ADE facilita la internalización viral en las células inmunitarias, lo que genera un aumento en la replicación del virus y por consiguiente la producción de citocinas proinflamatorias como el IFN- γ y el TNF- α , lo que puede llevar a formas graves de la enfermedad como el síndrome de shock por dengue y dengue hemorrágico.

La inmunidad natural al DENV en humanos sanos es principalmente protectora, aunque no completamente esterilizante. Durante la reinfección, las respuestas de células B y T aumentan significativamente, y las células de memoria se activan, produciendo rápidamente grandes cantidades de IgG específica del virus. Sin embargo, la ADE puede aumentar la severidad del cuadro clínico durante la infección secundaria, al facilitar el ingreso viral en las células inmunitarias y aumentar la replicación del virus y la inflamación, Figura 5 (St. John & Rathore, 2019).

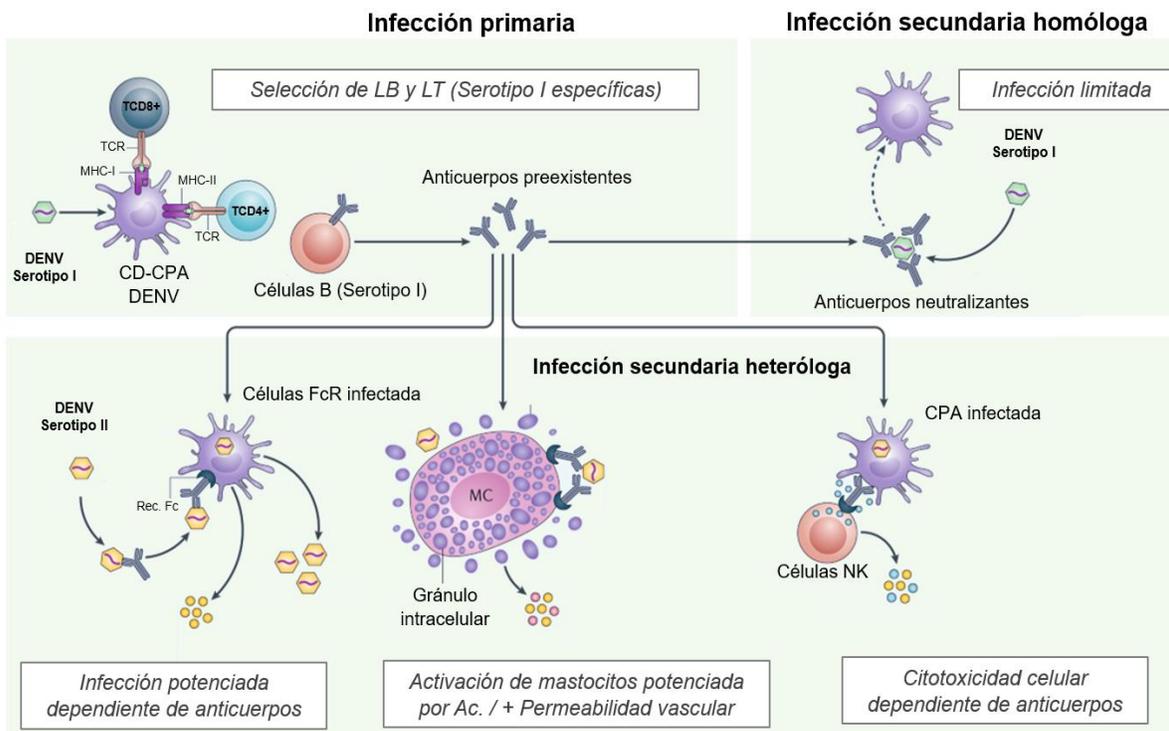


Figura 5. Respuestas inmunitarias adaptativas a las infecciones primarias y secundarias por el virus del dengue. Los anticuerpos preexistentes contra DENV pueden neutralizarlo tras una infección homóloga secundaria. Sin embargo, durante una infección heteróloga secundaria, pueden causar una mejora dependiente de anticuerpos (ADE), aumentando la replicación viral y provocando una tormenta de citocinas. Esto puede llevar a una mayor permeabilidad vascular y daño tisular Tomado de St. John & Rathore (2019).

3.5.3 Desarrollo de la enfermedad

Generalmente las infecciones por dengue no presentan síntomas o pueden presentarse de forma leve, pero en algunos casos llegan a desarrollarse formas que se agravan como la fiebre hemorrágica del dengue y el síndrome de choque por dengue (Chavarría-Cedeño, 2023; Negreiros *et al.*, 2024). La patogénesis de estas formas graves implica una combinación de factores virales y de respuesta inmune que conducen a incremento en la capacidad de filtración vascular, extravasación de fluidos y trombocitopenia severa (Cevallos-Ochoa & Salazar-Najera, 2020; Chediack *et al.*, 2021). La generación de citocinas, sobre todo proinflamatorias, así como el TNF- α y el factor activador de plaquetas (PAF), contribuye a la disfunción endotelial y la coagulopatía, características de la enfermedad grave (Reyes-Hernández, 2022).

3.6 Fisiopatología

3.6.1 Alteraciones fisiológicas

Una vez que el virus del dengue ingresa al cuerpo humano por medio de la picadura del mosquito hembra infectado, se replica en las células dendríticas y se dispersa por la circulación sanguínea y por todo el sistema linfático. Esta replicación viral provoca una fuerte respuesta inmune, incluyendo la producción de citoquinas proinflamatorias, que conduce a la activación y disfunción endotelial. La disfunción endotelial resulta en una permeabilidad vascular aumentada, que es una característica clave del dengue. Además, el virus puede infectar células de hígado, bazo y médula ósea, causando daño tisular directo e indirecto debido a la respuesta inflamatoria (Shrivastava *et al.*, 2020).

3.6.2 Síntomas clínicos

El dengue puede presentarse de manera asintomática o con síntomas que van desde leves hasta graves. Los síntomas clínicos más comunes pueden incluir fiebre elevada, mialgias, cefalea severa, dolor retroocular y artralgias (dolor muscular y articular), náuseas, vómitos y erupción cutánea. La duración para que los síntomas aparezcan oscila entre los cuatro y 10 días posteriores a la picadura del mosquito y estos pueden durar entre 2 y 7 días.

En algunos casos, los pacientes pueden experimentar sangrado leve, como petequias (pequeñas manchas rojas en la piel), sangrado de encías y epistaxis (sangrado nasal) (Negreiros *et al.*, 2024; OMS, 2024).

3.6.3 Complicaciones graves

En casos graves, el dengue puede evolucionar hacia dengue severo, que incluye condiciones como la fiebre hemorrágica del dengue (FHD) y el síndrome de choque por dengue (DSS) (Consuegra-Otero, 2021). Estas complicaciones son más comunes en individuos que se hayan infectado anteriormente por otro serotipo del virus, lo cual se debe a una respuesta potenciación dependiente de anticuerpos (ADE) (St. John & Rathore, 2019). En DSS, la permeabilidad vascular extremadamente alta lleva a una pérdida significativa de plasma, que resulta en un shock hipovolémico y puede ser fatal si no se trata rápidamente. La FHD se caracteriza por hemorragias graves, daño hepático y coagulopatías.

Los pacientes con dengue severo requieren atención médica intensiva, incluyendo rehidratación intravenosa y monitoreo constante para manejar las complicaciones hemorrágicas y el choque (Guzmán & Panqueba, 2023; Luna, 2023).

3.7 Clasificación de la enfermedad

El dengue se clasifica en dos formas principales: dengue clásico y dengue grave, cada una con características clínicas distintas y niveles de severidad variables.

3.7.1 Dengue clásico

El dengue clásico, es la variante más frecuente de la enfermedad y por lo general la menos grave, que también es conocido como fiebre del dengue por su síntoma principal. Se caracteriza por síntomas como fiebre elevada súbita, llegando a presentarse de 2 hasta 7 días, acompañada de dolor de cabeza severo, dolor retroocular, erupción en la piel, dolor en los músculos (mialgias), dolor articular y malestar general. Los pacientes pueden experimentar también síntomas del sistema digestivo como vómito, dolor en el abdomen y náuseas. Esta sintomatología puede remitir en casi todos los casos tras la fase febril y no se presentan complicaciones adicionales (Negreiros *et al.*, 2024; OMS, 2024).

3.7.2 Dengue Grave

El dengue grave incluye dos formas principales: el síndrome de choque por dengue (DSS, por sus siglas en inglés) y la fiebre hemorrágica del dengue (FHD). Estas formas pueden presentarse como complicaciones del dengue clásico, especialmente en pacientes que han sido infectados previamente por otro serotipo del virus.

3.7.2.1 Síndrome de Choque por Dengue (DSS)

Es la variante más crítica y potencialmente mortal del dengue. La cual está caracterizada por un evidente descenso de la presión arterial que lleva a un shock hipovolémico. Esto ocurre debido a una pérdida masiva de líquidos y plasma a través de los vasos sanguíneos que se vuelven permeables como efecto de la disfunción endotelial. Los síntomas incluyen una rápida y debilitante caída de la presión arterial, piel fría y húmeda, confusión, dificultad respiratoria y sangrado potencial (Ramos *et al.*, 1993; Gómez-Rosas, 2023).

3.7.2.2 Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD)

La FHD, se distingue por el incremento de la permeabilidad capilar que conduce a sangrados severos. Los pacientes pueden presentar hemorragias espontáneas como petequias, equimosis, sangrado de encías, sangrado gastrointestinal y sangrado en otros sitios. Además de los signos de DSS, los pacientes con FHD pueden desarrollar una coloración amarilla en la piel y ojos (ictericia), un aumento el hígado (hepatomegalia) y de volverse un caso grave, disfunción hepática y shock (Ramos *et al.*, 1993; Chavarría-Cedeño, 2023; Gómez-Rosas, 2023).

3.8 Diagnóstico

El diagnóstico del dengue se fundamenta en una serie de pruebas clínicas y de laboratorio. Clínicamente, se considera la presencia de fiebre aguda junto con síntomas como dolor muscular, cefalea intensa, dolor articular, erupciones en la piel y síntomas gastrointestinales (Sinche-Crispín *et al.*, 2023). En el ámbito de laboratorio, se emplean diferentes técnicas para la identificación el virus y evaluar la respuesta inmune del enfermo.

Entre estas pruebas, se destacan la detección de anticuerpos IgM e IgG por medio de técnicas como ELISA y pruebas rápidas, que ayudan a detectar infecciones recientes y previas respectivamente. La RT-PCR se emplea para detectar el ARN viral en el inicio de la enfermedad, siendo más efectiva en los primeros días de síntomas (Guzmán *et al.*, 2016; Blanco-Álvarez, & Labadie, 2023; Sinche-Crispín *et al.*, 2023).

Además, se realizan análisis de parámetros hematológicos como el recuento de plaquetas y el hematocrito, así como la medición de niveles de transaminasas, que pueden mostrar cambios característicos como trombocitopenia y elevación de transaminasas en casos severos. Estas pruebas combinadas permiten un diagnóstico temprano y preciso del dengue, facilitando la intervención médica oportuna y la implementación de medidas adecuadas para manejar la enfermedad y prevenir complicaciones severas como la fiebre hemorrágica del dengue y el síndrome de choque por dengue y (Guzmán *et al.*, 2016; Raafat, *et al.*, 2019).

3.9 Prevención y control

Las estrategias para controlar y prevenir el dengue son fundamentales para mitigar la propagación de esta enfermedad viral transmitida por mosquitos. Las medidas preventivas incluyen la erradicación de focos de hábitats larvarios de mosquitos, como recipientes de agua estancada donde el mosquito *Aedes aegypti* deposita sus huevos (Sanabria *et al.*, 2009; Guzmán *et al.*, 2016). Esto se logra a través de campañas de concientización comunitaria que promueven la eliminación de recipientes inútiles y el drenaje adecuado de áreas propensas a acumulaciones de agua. Además, es crucial el uso de repelentes de insectos, ropa protectora y mosquiteros para reducir la exposición a las picaduras de mosquito (Benítez-Leite *et al.*, 2002).

El control del vector implica estrategias de manejo ambiental y medidas químicas. Estas incluyen la fumigación periódica con insecticidas en áreas afectadas, así como la aplicación de larvicidas en aguas estancadas donde los mosquitos se reproducen. Las autoridades de salud pública también supervisan y controlan la población de mosquitos a través de vigilancia epidemiológica, monitoreo de la densidad de vectores y respuesta rápida ante brotes.

La integración de estas estrategias, junto con la inclusión activa de la sociedad en la descacharrización y la protección personal, es crucial para reducir la transmisión del virus del dengue y lograr mayor prevención para evitar que se propague el dengue en áreas endémicas (Benítez-Leite *et al.*, 2002; Harapan *et al.*, 2020).

El control de los vectores es la base para prevenir y mitigar el dengue. Donde la participación activa de los adultos puede ayudar al cumplimiento de los protocolos de prevención, enfocados en la higiene con la finalidad de eliminar los criaderos y reproducción del mosquito transmisor de dicho virus, disminuyendo así su propagación y por consiguiente la enfermedad (Herrera *et al.*, 2020).

3.10 Vacunas

3.10.1 Dengvaxia

La vacuna más avanzada y ampliamente utilizada es la vacuna tetravalente CYD-TDV, comercializada bajo el nombre de Dengvaxia. Esta fue desarrollada por Sanofi Pasteur y está diseñada para proteger contra los diferentes serotipos del DENV (DENV-1 a DENV-4). Se administra en tres dosis separadas a lo largo de un período de seis meses. Sin embargo, la eficacia de Dengvaxia ha mostrado variabilidad en diferentes estudios y poblaciones. En ensayos clínicos, la vacuna ha demostrado ser más efectiva en individuos que se habían infectado anteriormente con DENV, ofreciendo protección significativa contra formas graves de la enfermedad. Sin embargo, en individuos que nunca han tenido dengue, la vacuna parece aumentar el riesgo de desarrollar formas más severas de la enfermedad si se infectan posteriormente (Hernández-Ávila *et al.*, 2016; Oubiña *et al.*, 2017).

3.10.2 Qdenga

Otra de las vacunas que ha desarrollado contra el DENV es Qdenga®, está basada en virus vivos atenuados del dengue, diseñada para estimular respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales contra los cuatro serotipos del virus. Fue probada en el estudio DEN-301, un importante ensayo de fase III llevado a cabo en Asia (Filipinas, Sri Lanka y Tailandia) y América Latina (Panamá, República Dominicana, Colombia, Nicaragua y Brasil), involucrando a 20,099 niños con edades entre 4 y 16 años.

Qdenga demostró ser efectiva en prevenir el dengue sintomático confirmado virológicamente. La seguridad de esta vacuna se ha comprobado a través de estudios preclínicos, ya que en dosis única mostró baja toxicidad a dosis repetidas y efectos en la reproducción, así como buena tolerancia local, por lo que se consideró de bajo riesgo. Cabe destacar que las personas que participaron se estuvieron monitoreando para detectar episodios febriles, confirmados mediante RT-PCR específica para serotipos de dengue. Además, los reportes indican que no se detectó ARN de Qdenga en heces ni orina, indicando bajo riesgo de excreción ambiental, y estudios de neurovirulencia han confirmado su falta de neurotoxicidad (Asish *et al.*, 2023; Portero, 2023).

3.11 Tratamiento

El tratamiento del dengue se ha enfocado en el manejo de la sintomatología debido a la falta de un tratamiento específico antiviral, por lo que la identificación temprana de la enfermedad es crucial (Blanco-Álvarez *et al.*, 2023). Para un manejo adecuado, ya sea ambulatorio o en las unidades de cuidados intensivos, es esencial conocer el estado actual del paciente. De acuerdo con el Ministerio de Salud, se menciona que el manejo se basa en reconocer los signos de alarma, realizar monitoreo constante, reestratificar los casos e iniciar de forma oportuna la reposición hídrica.

Para pacientes sin signos de alarma, que sí presentan fiebre de alrededor de 7 días, el tratamiento es ambulatorio e incluye mantenimiento de la hidratación vía oral de 2 litros o más para adultos, reposo total y acetaminofén (4 mg al día en personas adultas y 10-15 mg/kg en niños). Se deben evitar los medicamentos antiinflamatorios no esteroides (AINEs) y el ácido acetilsalicílico debido al riesgo de sangrado.

Es crucial que los pacientes busquen atención médica si se llegan a presentar signos de alarma, por lo que es importante estar siempre atentos manteniendo una vigilancia diaria hasta 48 horas después de que desaparezca la fiebre (Tuiskunen *et al.*, 2013; Monroy-Díaz *et al.*, 2018). Los pacientes que necesitan ser hospitalizados o ser vigilados de forma crítica son aquellos que presentan signos alarmantes, infantes con menos de 5 años, comorbilidades crónicas, personas en situación de pobreza extrema, adultos mayores y mujeres embarazadas (Collazos-Vera *et al.*, 2017; George-Carrión *et al.*, 2018).

En estos casos, la terapia incluye reponer líquidos por vía intravenosa con soluciones electrolíticas (15 ml/kg hora), monitoreo permanente del estado hemodinámico y control del hematocrito cada 12-24 horas. Se monitorean estrechamente los signos vitales y parámetros de laboratorio como el recuento de plaquetas y la función hepática. Para pacientes sin signos de alarma que no puedan ingerir líquidos por vía oral y se recomienda administrar solución salina al 0.9% hasta que puedan beber líquidos (Espinoza-Orozco, 2022).

Los cuidados de apoyo incluyen reposo, monitoreo continuo y manejo de complicaciones, como la administración de transfusiones de sangre si es necesario. La detección temprana de signos de deterioro y la atención médica oportuna son cruciales para reducir la mortalidad asociada con esta enfermedad.

3.12 Antecedentes

3.12.1 Desarrollo de fármacos antivirales

3.12.1.1 Compuestos dirigidos a componentes virales

El desarrollo de fármacos antivirales dirigidos a los componentes virales del dengue se enfoca principalmente en las proteínas estructurales y no estructurales del virus. Donde los blancos más estudiados están las proteínas NS3 y NS5, debido a sus funciones enzimáticas multifuncionales, y la proteína E, debido a que participa en la unión a receptores celulares y en la liberación del ARN viral (Obi *et al.*, 2021).

Estas proteínas son críticas para la replicación y el ciclo de vida del virus, por lo que los compuestos dirigidos a ellas ofrecen una estrategia prometedora para la inhibición viral. Los agentes antivirales se clasifican en pequeñas moléculas no basadas en péptidos, medicamentos naturales y fármacos peptídicos (Jiménez-Camacho, 2022).

Los medicamentos peptídicos, como pep14-23, AS1411 y PC-D2C/SN, se han dirigido específicamente a la proteína C, mostrando alta selectividad y eficacia. Sin embargo, su alta hidrofiliabilidad limita su administración oral ya que tiene una corta vida útil en el tracto digestivo (Jiménez-Camacho, 2022).

Otros péptidos como DV413-447/DV419-447 y DN59 han demostrado actividad sobre la proteína E, evidenciando su potencial en la interferencia del proceso de fusión del virus con las células huésped (Pujar *et al.*, 2021). Aunque los fármacos peptídicos presentan desafíos en términos de estabilidad y administración, su especificidad los convierte en candidatos valiosos para terapias dirigidas.

Por otro lado, las moléculas pequeñas no peptídicas, como ST-148 y VGTI-A3, ofrecen una ventaja importante en cuestión de producción, almacenamiento y administración oral, además de tener una menor capacidad inmunogénica. Estos compuestos han mostrado eficacia contra la proteína C y E, cruciales para la replicación y propagación del virus. Fármacos como el condroitín sulfato E, heparina, y NITD448 también han sido investigados por su actividad antiviral, dirigiéndose a diversas etapas del ciclo viral y mostrando potencial en la inhibición de la proteína E (Espinoza-Orozco, 2022).

Además, los compuestos de origen natural, como la geranina y el ácido chebulínico, han demostrado su habilidad para afectar la replicación del virus, apuntando a la proteína E y NS3, respectivamente (Jiménez-Camacho, 2022). Estos avances en la investigación de compuestos antivirales proporcionan un enfoque integral para el desarrollo de tratamientos efectivos contra el dengue.

3.12.1.2 *Compuestos dirigidos a factores del hospedero*

Los antivirales dirigidos al hospedero (HTA), se enfocan en interferir con los factores celulares y mecanismos del hospedero que los virus necesitan para terminar su ciclo viral. En lugar de atacar directamente al virus, los HTA se enfocan en componentes y procesos celulares esenciales que el virus explota para replicarse y propagarse. Este enfoque tiene varios objetivos específicos, que incluyen la interrupción de la replicación del virus, reducir la resistencia viral y modular la respuesta inmunitaria (Roa-Linares *et al.*, 2016). Factores como los receptores la furina proteasa, TIM-1 y DC-SIGN, la vía endocítica, la vía de la ubiquitina-proteasoma, la α -glucosidasa y la inosina monofosfato deshidrogenasa han sido investigados como posibles blancos terapéuticos en el tratamiento del dengue.

Estos factores son cruciales para la entrada, el ensamblaje y la liberación de los viriones, lo que los hace atractivos como estrategia para inhibir la replicación del virus y la progresión de la enfermedad. Diversos agentes terapéuticos, incluyendo sulfonato sódico de carbazocromo, celgosivir, lovastatina, ketotifeno, cloroquina, prednisolona y UV-4B han sido evaluados en ensayos clínicos siguiendo esta estrategia.

Estos compuestos interfieren con diferentes rutas metabólicas y de señalización en las células del hospedero. Por ejemplo, lovastatina y prednisolona se investigan por su capacidad para modificar vías inflamatorias y lipídicas, mientras que celgosivir y cloroquina buscan inhibir la replicación viral alterando la glicosilación de proteínas virales y la acidificación de vesículas endocíticas, respectivamente. No obstante, hasta ahora, ninguno de estos agentes ha mostrado diferencias significativas en los marcadores virales ni beneficios clínicos en persona con dengue, o no se han completado los ensayos.

A pesar de estos desafíos, la investigación continúa con compuestos como zanamivir y montelukast, que están en fase de reclutamiento para ensayos clínicos. Estos medicamentos buscan reducir la permeabilidad vascular, una característica crítica del dengue severo que puede conducir a complicaciones como el síndrome de choque por dengue. La inhibición de factores que medían la filtración vascular y la modulación de la respuesta inmune son enfoques prometedores para aminorar las manifestaciones críticas de la enfermedad. Identificar y validar nuevos objetivos en las células del hospedero podría ofrecer nuevas vías para el desarrollo de terapias efectivas contra el dengue (Jiménez-Camacho, 2022).

3.12.1.3 Antivirales alternativos

Dentro de las fuentes alternativas de tratamiento están los aceites esenciales (AE), que se caracterizan por presentar múltiples actividades biológicas, estos se encuentran en muchas formulaciones a base de hierbas que se utilizan para prevenir diversas patologías potencialmente mortales. Los efectos antivirales de los AE se han demostrado adecuadamente en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se considera que “activan” el sistema inmunológico, suprimen la respuesta inflamatoria y reducen la generación de citocinas. En general, las actividades biológicas de los AE están influenciadas por ciertos componentes (Velandia *et al.*, 2023).

De acuerdo con un estudio realizado por Meneses y cols. (2009), que evaluaron el efecto de inhibición *in vitro* del aceite esencial que se obtuvo de plantas que fueron cultivadas en Colombia sobre Virus de la fiebre amarilla (VFA) y DENV encontraron que los aceites de *Pimenta racemosa* (laurel) y *Lippia citriodora* (verbena) presentaron actividad contra los dos virus mencionados, con una reducción del 100% de las placas virales.

En otra investigación por Castro y cols. (2015), se realizó un análisis que valoró la actividad de compuestos de aceites esenciales sobre el DENV estudios *in silico*, donde el β -cariofileno, fue seleccionado para estudiar la inhibición sobre la replicación del virus *in vitro*. De acuerdo con los resultados, sugieren que el β -cariofileno tiene un efecto sobre las fases iniciales de la replicación del virus, por lo que puede ser un potencial antiviral.

Por otra parte, se encuentran los “compuestos heterocíclicos”, que son compuestos orgánicos con uno o más heteroátomos y un sistema de anillos cíclicos (Navarro-Archbold, 2015). Los heteroátomos suelen ser nitrógeno (N), oxígeno (O) y azufre. Debido a su capacidad para inhibir una variedad de infecciones, ya se han utilizado en varios campos biológicos. Se han demostrado eficacias biológicas importantes y potenciales como antifúngicos, antiinflamatorios, antibacterianos, antivirales, antitumorales, antidiabéticos, antialérgicos, antioxidantes, etc. (Sánchez-Montero, 2009; Colorado-Peralta *et al.*, 2023).

De y cols. (2022) efectuaron una búsqueda de andamios heterocíclicos como antivirales contra el virus del dengue, encontrando que las estructuras N - heterocíclicas, O -heterocíclicas, N, S -heterocíclicas y N, O -heterocíclicas, ayudaron a capturar rápidamente el grupo funcional o el grupo químico responsable de inhibir el DENV. De igual forma, se ha reportado que las microalgas son productoras de sustancias antivirales.

Por ejemplo, existen reportes de que la transcripción del virus de la inmunodeficiencia humana tipo I puede ser inhibida por aproximadamente el 2 % de los extractos de cianobacterias. Además, el género *Chlorella* sp. ha demostrado inhibir la replicación del virus que afecta a peces salmónidos, el cual ocasiona una enfermedad conocida como "septicemia hemorrágica viral", de hecho, *Chlorella* es uno de los géneros más (Álvarez, 2007).

Por otro lado, Rosa y cols. (2005), estudiaron tres microalgas; *Haematococcus pluvialis*, *Tetraselmis suecica* y *Chlorella minutissima*, donde encontraron que los ácidos grasos n-3, principalmente el ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3) presentaba actividad antiviral.

Recientemente, Ribeiro y cols. (2022) probaron cuatro cepas de microalgas contra el virus de *Mayaro* (MAYV), que produce un espectro de manifestaciones como fiebre, sarpullido y artralgia grave similares a las del dengue. Los resultados revelaron que las diferentes cepas de las microalgas probadas presentaron actividad anti-*Mayaro* y la potencia relativa fue superior a la ribavirina, el antiviral comercial.

3.12.2 Microalgas

4.12.2.1 Generalidades

Las microalgas son organismos pequeños unicelulares con capacidad de realizar fotosíntesis, estas pueden encontrarse en diferentes entornos acuáticos, incluyendo aguas dulces y marinas, y son fundamentales para los ecosistemas en cuestión ya que tienen la facultad de transformar la energía solar en materia orgánica con mayor eficiencia que otros organismos. En particular, las microalgas agrupan una gran variedad de microorganismos unicelulares, de 2-200 μm en tamaño celular, dado que pueden realizar fotosíntesis, utilizan la luz del sol para transformar el CO_2 y los nutrientes en biomasa, lo que las convierte en productores primarios clave en las cadenas tróficas acuáticas (Velázquez-Lucio *et al.*, 2018).

Las microalgas comprenden una amplia variedad de especies pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos, como las diatomeas, clorofitas, cianobacterias, dinoflagelados y euglenoides.

Cada grupo presenta características morfológicas, fisiológicas y genéticas distintas, lo que les permite adaptarse a una variedad de condiciones ambientales. Por ejemplo, las diatomeas poseen paredes celulares de sílice, mientras que las cianobacterias son conocidas por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Rajkumar, & Yaakob, 2013).

El ciclo de vida de las microalgas varía entre especies, pero generalmente incluye fases de crecimiento vegetativo y reproducción. La reproducción puede ser asexual, mediante división celular, lo que permite una rápida proliferación en condiciones favorables, o sexual, lo que contribuye a la variabilidad genética y la adaptación a cambios ambientales (Steidinger & Garccés, 2006).

Hoy en día se conoce que, las microalgas son fundamentales para los ecosistemas acuáticos y su funcionamiento, ya que generan una porción considerable del oxígeno atmosférico mediante la fotosíntesis. Además, constituyen la base alimentaria de muchos organismos, como mamíferos marinos, grandes peces e incluso pequeños zooplancton. Asimismo, juegan un papel crucial en los ciclos biogeoquímicos, incluyendo los ciclos del carbono y el nitrógeno, contribuyendo a la regulación del clima global (Yadav & Singh, 2020).

En las últimas décadas, las microalgas han atraído una atención constante en el área de la biotecnología debido a su capacidad para producir combustibles naturales, compuestos bioactivos, nutraceuticos y suplementos nutricionales. Su capacidad de crecer en diversas condiciones, aprovechar diversas fuentes de carbono y nutrientes las hace especialmente atractivas para ser aplicadas en la industria y el medio ambiente.

Por ejemplo, algunas especies de microalgas son utilizadas en la producción de biodiésel debido a su alto contenido de lípidos, mientras que otras son explotadas por sus pigmentos, antioxidantes y proteínas de alto valor nutricional (Velázquez-Lucio *et al.*, 2018). Las microalgas han tomado gran relevancia como una fuente prometedora para generar de forma sostenible una variedad de elementos bioactivos.

Debido a sus potenciales actividades terapéuticas, los compuestos bioactivos naturales de las microalgas son un objetivo de investigación atractivo y tienen un gran potencial que aún no se ha explorado.

Los efectos antioxidantes, antivirales, antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatorios, antitumorales y antimaláricos se encuentran dentro de estas características. Sin embargo, aunque tienen muchas ventajas sobre las plantas terrestres, los productos naturales de las microalgas siguen siendo en gran medida inexplorados en comparación con las plantas terrestres (Fu *et al.*, 2017).

Es importante destacar que las algas son más fáciles de cultivar, pueden crecer rápidamente y no compiten directamente con los cultivos en la tierra agrícola. Estas y otras ventajas destacan el valor del desarrollo de microalgas para la producción de productos naturales de importancia medicinal y para el descubrimiento y desarrollo de productos farmacéuticos, entre otros bioproductos.

4.12.2.2 Composición Bioquímica

El valor de una especie microalgal está determinado en gran medida por su composición bioquímica, la cual, al ser mejor comprendida, puede permitir un uso más eficiente y rentable de estos organismos. La composición bioquímica de las microalgas puede variar considerablemente, al igual que en cualquier planta superior, y está influenciada por diversos factores ambientales.

Las microalgas contienen una amplia variedad de compuestos bioquímicos de interés, incluyendo ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos ricos en ácidos grasos insaturados, y proteínas. Además, contienen moléculas como clorofilas, carotenoides, enzimas, hidrocarburos, glicerol, aminas, aceites esenciales y vitaminas tanto hidrosolubles como liposolubles y cenizas en su peso seco (Abalde *et al.*, 1995).

Cerca del 90% del peso seco de las microalgas está representado por proteínas, lípidos y carbohidratos representan (Cuadro 1), siendo las proteínas el principal componente, que representa más del 50 % dicho peso. Según la especie y los criterios de cultivo, los lípidos o carbohidratos pueden ser el segundo componente más abundante.

Cuadro 1. Composición química (% en materia seca) de diferentes microalgas de agua dulce y marina.

<i>Clase</i>	<i>Proteína</i>	<i>Carbohidratos</i>	<i>Lípidos</i>
<u>Agua dulce</u>			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47		1.9
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	22-38
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<u>Marinas</u>			
<i>Isochrysis</i> sp Clon T-ISO	44	9	25
<i>Isochrysis galbana</i>	41	5	21
<i>Paulova lutheri</i>	49	31	12
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	33	17	10
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	33	24	10
<i>Skeletonema costatum</i>	37	21	7
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	29	17	10
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	9
<i>Tetraselmis suecica</i>	39	8	7

Tomado de Becker, 1994.

4.12.2.2.1 Lípidos

Las microalgas son reconocidas por su capacidad para acumular lípidos, particularmente ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como el ácido docosaheptaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA). Estos lípidos son esenciales tanto para el metabolismo celular como para la producción de biomasa, y su perfil puede variar significativamente entre especies y condiciones de crecimiento. Además, los lípidos sirven como reservas de energía y forman parte de las estructuras celulares, principalmente en forma de fosfolípidos y glicolípidos en las membranas celulares, y triglicéridos en los almacenes de energía (Norzagaray-Valenzuela *et al.*, 2014).

La constitución de ácidos grasos en los lípidos derivados de las microalgas se caracteriza por una alta proporción de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados, muchos de los cuales tienen menos de 18 carbonos. Estos ácidos grasos son fundamentales para el dinamismo de las membranas celulares, permitiendo que las microalgas se adapten rápidamente a cambios ambientales mediante la síntesis y reciclaje rápido de ácidos grasos. Además, la composición lipídica de las microalgas cambia a lo largo de las diferentes fases de crecimiento celular, con un aumento en la proporción de triglicéridos cuando la tasa metabólica es baja (Tejeda-Benítez *et al.*, 2015).

Las microalgas también se destacan por su potencial en la producción de biodiésel debido a su alto contenido en lípidos. Algunas especies pueden contener hasta un 40 % de ácidos grasos en su peso seco, y el contenido lipídico puede variar entre un 5 % y un 77 % en peso seco, de acuerdo con la especie y los parámetros de cultivo (Tejeda-Benítez *et al.*, 2015). A pesar de ello, el incremento en la producción de lípidos a menudo se realiza a costa de sacrificar su reproducción y su velocidad de crecimiento, lo que no necesariamente aumenta la productividad de aceite por unidad de masa (Norzagaray-Valenzuela *et al.*, 2014). La capacidad de las microalgas para sintetizar y acumular lípidos, junto con su adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, las hace valiosas tanto para aplicaciones biotecnológicas como farmacológicas (Lehninger, 1995; Norzagaray-Valenzuela *et al.*, 2014; Tejeda-Benítez *et al.*, 2015).

4.12.2.2.2 Carbohidratos

Aunque los carbohidratos no constituyen el componente principal de las microalgas, desempeñan roles esenciales como elementos de la pared de las células y materiales de reserva. Los polisacáridos, monosacáridos y oligosacáridos representan entre el 45 % y el 97 % de los carbohidratos totales de las microalgas, con perfiles muy variados según la especie y las condiciones de cultivo. Los azúcares más comunes en las microalgas son glucosa, galactosa, manosa y ribosa, aunque las proporciones de otros azúcares pueden variar significativamente (Abalde *et al.*, 1995).

En las especies y clases de microalgas cultivadas bajo condiciones similares se han encontrado diferencias significativas. Por ejemplo, las diatomeas contienen principalmente crisantano, mientras que los fitodinoflagelados contienen glucosa y galactoglucano. Las algas rojas acumulan polisacáridos sulfatados, y muchas microalgas almacenan polisacáridos en gránulos de almidón como productos de reserva (Espinoza-Gallardo *et al.*, 2017). Algunos taxones, como las *Euglenophyceae*, poseen otros polisacáridos de reserva llamado paramilón, mientras que las *Chrysophyceae* y *Cablephyceae* almacenan chrysophycein o leucina. La forma y el tamaño de estos gránulos varían entre las diferentes especies de microalgas (Nakashima *et al.*, 2018).

Los carbohidratos de las microalgas se encuentran en forma de partículas de almidón y, en algunos casos, segregados en el medio de cultivo. En ciertos géneros, los polisacáridos presentan una cadena central de glucosas que se unen a través de enlaces α (1-4) ramificadas mediante enlaces α (1-6), similar a la subunidad de amilopectina del almidón. Estos polisacáridos, gracias a las uniones de enlaces glucosídicos β , pueden formar productos como el paramilón o la crisolaminarina, conocidos como β -glucanos (Espinoza-Gallardo *et al.*, 2017; Nakashima *et al.*, 2018).

Las microalgas pueden contener hasta un 50% más de carbohidratos que su peso seco. Los cuales se presentan como celulosa, almidones, glucosa y otros polisacáridos, y al ser hidrolizados se pueden generar azúcares que pueden ser fermentados utilizados para producir biometano o bioetanol (Harun *et al.*, 2010).

4.12.2.2.3 Proteínas

Las proteínas son componentes esenciales y altamente significativos de las microalgas, desempeñando roles críticos en diversas funciones biológicas y metabólicas. Algunas microalgas sintetizan una amplia gama de proteínas estructurales y enzimáticas que facilitan su adaptación a diferentes condiciones ambientales (Abalde *et al.*, 1995). Estas proteínas no solo mantienen la integridad estructural de la célula, sino que también catalizan reacciones bioquímicas clave involucradas en la fotosíntesis y la metabolización de nutrientes. Además, el contenido proteico de las microalgas puede cambiar en relación a los criterios de cultivo y el tipo de microalga (Lupatini *et al.*, 2017).

La composición proteica de las microalgas es compleja y diversa, abarcando desde proteínas estructurales hasta enzimas y proteínas de reserva. Estas proteínas no solo proporcionan la estructura celular, sino que también facilitan la catálisis de reacciones bioquímicas esenciales. Por ejemplo, las enzimas involucradas en la fijación de carbono y la asimilación de nitrógeno son cruciales para el desarrollo de las microalgas (Huang *et al.*, 2017).

El perfil de aminoácidos que conforman las proteínas de microalgas también es de gran interés. Las microalgas suelen contener todos los aminoácidos esenciales, esto las posiciona como una fuente de la cual se puede obtener proteína de alta calidad (Becker, 2013). Esta característica es de gran importancia en la constante exploración de fuentes sostenibles de proteínas para una mejor alimentación en humanos y animales, de igual forma para el desarrollo de suplementos nutricionales.

4.12.2.2.3 Otros componentes

Las microalgas contienen una amplia gama de componentes bioquímicos, entre estos, los pigmentos juegan un papel fundamental. Los más notables son las clorofilas, los carotenoides y las ficobiliproteínas, que no solo son esenciales para la fotosíntesis, sino que también poseen propiedades antioxidantes. Estos pigmentos pueden ser extraídos y utilizados en la fabricación de colorantes naturales y suplementos dietéticos (Sathasivam & Ki, 2018).

Además, las microalgas producen una variedad de compuestos fenólicos y antioxidantes que contribuyen a su habilidad en el proceso de neutralizar radicales libres y protegerse contra el daño oxidativo. Estos compuestos tienen un gran potencial en aplicaciones nutraceuticas y cosméticas debido a sus propiedades antiinflamatorias y antienvjecimiento (Goiris *et al.*, 2012).

Las microalgas también pueden concentrar muchos elementos importantes, como sodio, potasio, magnesio, calcio, hierro, zinc, cobalto, fósforo, azufre y nitrógeno (Islam *et al.*, 2017). Diferentes tipos de microalgas, incluidos *Nostoc*, *Scenedesmus*, *Botryococcus* y *Porphyridium*, producen una gran diversidad de vitaminas, como la vitamina D, la vitamina C (ácido L-ascórbico), la vitamina B9 (ácido fólico), la vitamina B1 (tiamina), la vitamina B3 (niacina), la vitamina B2 (riboflavina), la vitamina E (tocoferol), la vitamina H (biotina) y la vitamina A (retinol) (Dolganyuk *et al.*, 2020).

4.12.2.3 Aplicaciones biotecnológicas

4.12.2.3.1 Biocombustibles

Las microalgas se destacan por su alta capacidad de producción de lípidos, lo que las ha convertido en una alternativa prometedora para la producción de biodiesel, considerada una solución viable para el suministro energético. Recientes avances en tecnologías de biorrefinería microalgal han mejorado la rentabilidad de estos procesos mediante la extracción y el aprovechamiento de varios bioproductos que representan un valor adicional derivados de la biomasa microalgal (Castillo *et al.*, 2017).

Los biocombustibles pueden clasificarse según el origen de los recursos (biomasa terrestre, acuática y microbiana), la naturaleza de la biomasa (sólidos, líquidos o gaseosos) y la ruta tecnológica de conversión (físicoquímica, bioquímica y termoquímica). Entre los biocombustibles de tercera generación se incluyen las algas y microalgas, organismos que realizan fotosíntesis con capacidad de aprovechar la energía luminosa y absorber el CO₂ del aire con mayor eficiencia que las plantas terrestres.

Este enfoque, además de facilitar la generación de biocombustibles, también posibilita la obtención de productos derivados más eficientes y con menos uso de recursos (Castillo *et al.*, 2017; Escobedo & Calderón, 2021).

Se ha demostrado que algunas microalgas pueden producir una mayor cantidad de aceite en comparación con las plantas que se cultivan en tierra de mayor producción, de hecho, unas 4 o 5 veces más que estas, esto debido a que tiene la capacidad para almacenar cantidades elevadas de ácidos grasos en su principal producto, la biomasa, lo cual es de gran relevancia en la fabricación de biodiesel (Castillo *et al.*, 2017). Los biocombustibles, por definición, son combustibles derivados de material biológico que se puede reponer de la naturaleza, y su uso puede ayudar a reducir la quema de combustibles fósiles, disminuyendo así las emisiones de CO₂ y combatiendo el calentamiento global (Lee & Lavoie, 2013; Pandey & Kumar, 2017; Naik *et al.*, 2010).

Las microalgas, con su alto contenido de lípidos y rápida reproducción son capaces de producir hasta 25 veces más aceite que los cultivos tradicionales como el aceite de palma, representando una ventaja sostenible a mediano y largo plazo para la generación eficiente de biodiesel (Ahmad *et al.*, 2011; Saad *et al.*, 2019; Sachin-Powar *et al.*, 2022).

4.12.2.3.2 Bioremediación

Las microalgas son efectivas en bioremediación debido a su capacidad para absorber y metabolizar contaminantes del medio ambiente, incluyendo metales pesados, nutrientes en exceso y compuestos orgánicos. Son de gran utilidad para tratar aguas negras, debido a que ayudan a remover elementos como fosfatos y nitratos. Especies como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* son capaces de acumular metales como plomo, cadmio, mercurio y arsénico, mejorando la calidad del agua (Santos *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2022).

Las microalgas también son efectivas en la degradación de compuestos orgánicos tóxicos como pesticidas e hidrocarburos, destacando especies como *Scenedesmus quadricauda* y *C. vulgaris* (Baglieri *et al.*, 2016), las cuales podrían ser utilizadas en la descontaminación de suelos agrícolas.

La integración de microalgas en procesos de tratar de aguas negras no solo elimina contaminantes, sino que también produce subproductos útiles como biocombustibles y biofertilizantes, creando un ciclo económico sostenible (Pittman *et al.*, 2011).

El agua contiene naturalmente diversos cationes y elementos, cuya concentración puede afectar la biodiversidad y la salud humana si se elevan demasiado. Las microalgas son excelentes bioindicadores gracias a que son muy sensibles a los cambios en el entorno (Aguilar & Flórez-Castillo, 2020). La ficorremediación, que utiliza microalgas para depurar agua, es eficaz en la eliminación de fármacos y metales pesados, mejorando la detoxificación del agua residual más allá de las tecnologías convencionales (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Especies como *Scenedesmus sp.* y *C. vulgaris* han demostrado altos grados de eliminación de la demanda química de oxígeno (DQO) y nutrientes, así como metales pesados (Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

4.12.2.3.3 *Industria alimentaria*

Las microalgas se han transformado en elementos clave dentro de la industria alimentaria gracias a su excepcional contenido nutricional y beneficios para la salud. Destacan por ser ricas en proteínas, vitaminas, minerales, ácidos grasos esenciales y antioxidantes, haciéndolas ideales para suplementos alimenticios y productos funcionales (Quevedo *et al.*, 2008; Lizana-Retamal, 2014; Malpartida, 2022).

Un claro ejemplo es Spirulina, ampliamente reconocida por su alta concentración de proteínas completas y vitamina B12, lo cual la hace especialmente beneficiosa para vegetarianos y veganos. Además, su pigmento azul, la ficocianina, no solo le proporciona un color característico, sino que también aporta propiedades antioxidantes valiosas (Ponce-López, 2013; Tarazona-Díaz, 2018; Ardila-Cáceres, 2022).

Por otro lado, Chlorella se conoce por contener principalmente clorofila, proteínas y una variedad de nutrientes esenciales. Esta microalga ha demostrado fortalecer el sistema inmunológico, desintoxicar el cuerpo y mejorar la salud digestiva (Benavides, 2016; Amaru-Chambilla *et al.*, 2023). Su capacidad para absorber metales pesados la convierte en una herramienta importante para la descontaminación ambiental (Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

Además de su uso en suplementos, las microalgas están siendo integradas en alimentos convencionales como panes, pastas y bebidas, incrementando su valor nutricional al añadir proteínas, fibra y otros nutrientes esenciales (Tarazona-Díaz, 2018). Su contribución sostenible a la producción de ácidos grasos omega-3, tales como EPA y DHA, es crucial para la salud cardiovascular y cerebral, brindando una opción vegetal al aceite derivado de pescado y mitigando preocupaciones asociadas con la sobrepesca y la contaminación por mercurio (Ruiz-Alonso, 2021; Cordero *et al.*, 2022).

4.12.2.4 Potencial terapéutico de las microalgas

4.12.2.4.1 Propiedades anticancerígenas

La investigación sobre compuestos anticancerígenos de microalgas aún se encuentra en desarrollo, existen evidencias que indican que su actividad varía según especie, condiciones de cultivo y fase de crecimiento. Las microalgas marinas son especialmente interesantes por su potencial en este campo (Martínez-Andrade *et al.*, 2018). Los estudios sobre las propiedades anticancerígenas de las microalgas, específicamente *Chlorella sorokiniana* y *Chaetoceros calcitrans*, indican una actividad prometedora en comparación con medicamentos comerciales. Mientras los fármacos marinos convencionales son activos a niveles bajos como 0.6-7 ng/ml, las fracciones de *C. sorokiniana* y *C. calcitrans* muestran significativa actividad a 1-3 µg/ml (Ebrahimi-Nigjeh *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2017; Martínez-Andrade *et al.*, 2018).

Asimismo, estudios han demostrado que microalgas como *Skeletonema marinoi* exhiben actividad anticancerígena bajo condiciones específicas de cultivo, como la restricción de nitrógeno, destacando la influencia crucial de las condiciones de cultivo en la bioactividad de las microalgas. A pesar de estos avances, se necesita una mayor investigación para validar y explorar el potencial terapéutico completo de las microalgas en el tratamiento del cáncer, incluyendo el estudio detallado de los criterios de cultivo y las etapas de crecimiento que afectan la actividad bioactiva de estas especies marinas (Martínez-Andrade *et al.*, 2018).

La criptofita *Rhodomonas salina* produce pigmentos como aloxantina y crocoxantina, que tienen efectos significativos contra células de melanoma A2058, especialmente aquellas resistentes a la dacarbazina. Estos pigmentos inhiben el crecimiento celular, reducen la migración, inducen apoptosis y aumentan la acumulación de células sub-G1. La aloxantina también mejora la eficacia del vemurafenib y restaura la sensibilidad al tratamiento con dacarbazina, lo que sugiere su potencial para superar la resistencia a tratamientos estándar (de Oliveira-Júnior *et al.*, 2020).

Se ha encontrado que los carotenoides de microalgas como fucoxantina, astaxantina y zeaxantina muestran potencial en la terapia contra el melanoma debido a sus efectos inhibidores sobre la proliferación celular, migración e invasión. Estos compuestos inducen muerte en células de cáncer de piel (melanoma) y arresto del ciclo celular, afectando vías como MAPK, NF- κ B y factores apoptóticos. Además, han demostrado capacidad para restaurar la sensibilidad de las células de melanoma a tratamientos convencionales como vemurafenib y dacarbazina, sugiriendo su utilidad como adyuvantes en terapias combinadas contra el cáncer (Ferraz *et al.*, 2022).

Compuestos como los monoacilglicéridos (MAG) de *Skeletonema marinoi* han mostrado actividad citotóxica selectiva contra células cancerosas U-937 y HCT-116, con potencial de generar apoptosis por medio de la activación de caspasas 3/7, destacando como posibles agentes anticancerígenos o precursores de nuevos compuestos selectivos contra el cáncer (Miceli *et al.*, 2019).

4.12.2.4.2 Efecto antiinflamatorio y antioxidante

La creciente demanda de medicamentos con efectos secundarios mínimos ha impulsado la búsqueda de compuestos bioactivos en fuentes naturales, incluyendo las microalgas, que contienen una diversidad de moléculas con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Las microalgas han captado la atención no solo por su rica composición bioquímica, sino también por su capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, lo que permite la manipulación de su cultivo para optimizar la producción de metabolitos específicos.

La producción de carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), polisacáridos, péptidos, y compuestos fenólicos en las microalgas puede ser inducida de diversas maneras, como la modificación de la luz, la temperatura, los nutrientes disponibles o la exposición a estrés oxidativo. Estas estrategias de cultivo no solo potencian el perfil bioactivo de las microalgas, además favorecen la obtención de bioelementos con aplicaciones terapéuticas específicas, aumentando su valor como fuente sostenible de ingredientes para la industria farmacéutica y nutracéutica.

Un ejemplo es *Scenedesmus* sp., una microalga cultivable bajo luz constante produjo extractos ricos en fenoles, flavonoides y carotenoides, lo cuáles mostraron actividad antioxidante (6,37 $\mu\text{mol Trolox/g}$, 41,40% de inhibición DPPH) y antiinflamatoria (38,42% de inhibición de desnaturalización de albúmina), destacando su potencial como fuentes naturales de compuestos bioactivos (Abril-Ibarra, 2022).

Se ha investigado también *Isochrysis galbana* utilizando métodos como la extracción con líquidos presurizados (PLE), los cuales permiten obtener compuestos de una forma efectiva, manteniendo el respeto al ambiente. Mediante la optimización de la temperatura y el porcentaje de etanol se mejoró el rendimiento en la composición de fenoles y el efecto antioxidante, evidenciando así su potencial funcional antioxidante y antiinflamatorio (Montero *et al.*, 2014).

Otra microalga que ha demostrado tener un efecto antioxidante es *Tetraselmis chunii*, la cual posee un alto valor nutricional y potencial en aplicaciones nutracéuticas. En un estudio, se probaron cinco biomásas obtenidas mediante distintos métodos de extracción y secado, y todas mostraron una alta capacidad de quelación de hierro y eliminación de radicales superóxido. Además, todas las biomásas mitigaron los efectos genotóxicos del bisfenol A (Cunha, 2023).

4.12.2.4.3 Potencial antibacteriano

Las microalgas producen diversos compuestos antibacterianos como ácidos grasos, fenoles como los bromofenoles, terpenoides, floroglucinol, taninos, acetonas alogenadas y butonas. Estos elementos muestran actividad contra bacterias y hongos, destacándose por su capacidad de inhibición (Álvarez, 2007).

Se han identificado en varios grupos de microalgas, especialmente cianobacterias, diatomeas y clorofitas, aunque también se encuentran en menor medida en otras especies (Álvarez, 2007).

Las microalgas muestran potencial antibacteriano contra diversas especies como *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*, según estudios con extractos acuosos de Spirulina (Shaieb *et al.*, 2014; Bencheikh, *et al.*, 2022). En cuanto a las propiedades antibacterianas de las microalgas, investigaciones anteriores han demostrado que los extractos acuosos (AE) de *C. vulgaris* y *A. platensis* son efectivos en inhibir el crecimiento de *E. faecalis* y *B. subtilis*, respectivamente (De Melo *et al.*, 2019; da Silva *et al.*, 2023). Otro estudio analizó la efectividad de los extractos acuosos de Spirulina en diversas bacterias, levaduras y mohos. Encontrando que los extractos pueden inhibir el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Rhodotorula* y *Penicillium* (Duda-Chodak, 2013).

Por otro lado, se ha reportado que *Tetrademus obliquus* y *Arthrospira platensis* presentan actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa* (Mohite *et al.* 2015; Marrez *et al.* 2019). También se ha encontrado que el ácido graso 9-octadecenoico extraído de los lípidos de *Scenedesmus bijugatus* presenta actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* (MubarakAli *et al.*, 2012).

La actividad antibacteriana de los extractos de microalgas se asocia con frecuencia a la presencia de compuestos bioactivos, como ácidos láurico, linolénico y oleico, compuestos fenólicos, taninos e iridoides (da-Silva *et al.*, 2022).

4.12.2.4.4 Potencial antiviral

El potencial antiviral de las algas ha sido estudiado durante los últimos 50 años con resultados exitosos en experimentos con medios de cultivo bajo condiciones controladas de laboratorio (Pagarete *et al.*, 2021). El mecanismo de inhibición del virus por los extractos de microalgas se ha relacionado con la presencia de terpenos, proteínas, polisacáridos y compuestos de ácidos grasos como omega-3 y omega-6, entre ellas, las principales productoras de omega-3 son las diatomeas (Cordero *et al.*, 2022).

A pesar de esto, se conoce que las microalgas pueden alterar la producción de metabolitos y compuestos de acuerdo con las condiciones y la composición de medio de cultivo, alterando así su bioactividad (Michelon, 2021).

En la búsqueda global de agentes antivirales efectivos, los compuestos derivados de microalgas muestran promesa como nuevos antivirales. Uno de ellos compuestos bioactivos con actividad antiviral, son las lectinas derivadas de las microalgas *Nostoc ellipsosporum*, *Oscillatoria agardhii*, *Scytonema varium*, *Microcystin viridis* y *Microcystis aeruginosa* que han demostrado tener un efecto antiviral contra HIV1, HIV2, HSV1, HCV, IAV, IBV y ZEBOV (Carbone *et al.*, 2021).

Compuestos de microalgas como el polisacárido de *Porphyridium* sp. y Naviculan derivado de *Navicula directa*, inhiben HSV-1 y HSV-2, mostrando actividad antiviral significativa tanto *in vitro* como *in vivo*. Cyanovirin-N de *Nostoc ellipsosporum* también combate el VIH y el Herpesvirus Humano 6, sugiriendo nuevas estrategias para terapias antivirales efectivas (Huheihel *et al.*, 2002; Llopiz, 2016).

Para el caso del virus Epstein-Barr (VEB), Kok *et al.* (2011) evaluaron extractos de microalgas como *Ankistrodesmus convolutus* y *Synechococcus elongatus*, demostrando inhibición del ADN del VEB. La proteína cianovirina-N (CV-N) de *Nostoc ellipsosporum* también mostró actividad contra el virus HIV gp120 (Mazur-Marzec *et al.*, 2021). Estos hallazgos resaltan el potencial de las microalgas como fuente de compuestos antivirales.

Los compuestos naturales de microalgas y cianobacterias han mostrado propiedades antivirales significativas contra el VIH, actuando en la replicación viral, fusión celular y ciclo de transmisión. Desde polisacáridos sulfatados de *Porphyridium* sp. y *Cochlodinium polykrikoides* hasta proteínas como la cianovirina-N y péptidos como el SM de *Spirulina maxima*, estos agentes naturales interfieren con diferentes etapas del ciclo viral. Además, se ha observado que algunos de estos compuestos además de inhibir la internalización viral en células hospedadoras, también potencian la respuesta inmune innata, proporcionando una doble acción antiviral (Amaro *et al.*, 2011; Jang & Park, 2016; Álvarez *et al.*, 2023).

Derivados de microalgas como *Coccomyxa* sp. KJ y extractos de cianobacterias como *Microcystis*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Scytonema*, *Lyngbya*, y *Calothrix*, muestran potencial antiviral contra la *influenza A*, destacando por sus propiedades inhibidoras de proteasas y replicación viral (Hayashi *et al.*, 2022; Zainuddin *et al.*, 2002, 2007; Silva *et al.*, 2018).

Recientemente, también se ha reportado actividad antiviral de microalgas frente a flavivirus, Cirne-Santos *et al.* (2024) encontraron que el extracto de *Arthrospira maxima* previene y cura la infección por el virus Zika *in vitro* en la línea celular VERO. Los estudios sobre compuestos naturales proporcionan posibles estrategias antivirales. Las investigaciones anteriores sugieren que las fuentes naturales son vías prometedoras para el tratamiento de infecciones de origen viral.

3.12.3 *Phaeodactylum tricornutum*

La microalga *Phaeodactylum tricornutum* fue descrita por primera vez en 1897 por Bohlin, proponiendo un nuevo género con una única especie (*P. tricornutum*), que tiene un tamaño de 8 µm de largo y 3 µm de ancho (Figura 6). En los últimos años, esta diatomea marina ha sido ampliamente investigada debido a su potencial en biotecnología y sus propiedades biológicas. De esta microalga se pueden extraer diversos componentes de gran valor, incluyendo biocombustibles, cosméticos, nutracéuticos, productos farmacéuticos, entre otros. La versatilidad de *P. tricornutum* se debe no solo a su capacidad para producir compuestos de interés industrial, sino también a su facilidad de cultivo en diversas condiciones, lo que permite su explotación a gran escala en bioprocesos sostenibles.

El genoma de *P. tricornutum* que contiene 10,402 genes, de aproximadamente 27,4 megabases (Mb), la convierte en un modelo perfecto para estudios genéticos y biotecnológicos. Ya se conocen algunos de sus ventajas en la salud humana, como la disminución del riesgo a presentar enfermedades cardiovasculares y mejorar la función cerebral. *P. tricornutum* es una de las especies de mayor importancia en la producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), por ejemplo, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), de gran relevancia en la industria alimentaria y farmacéutica.

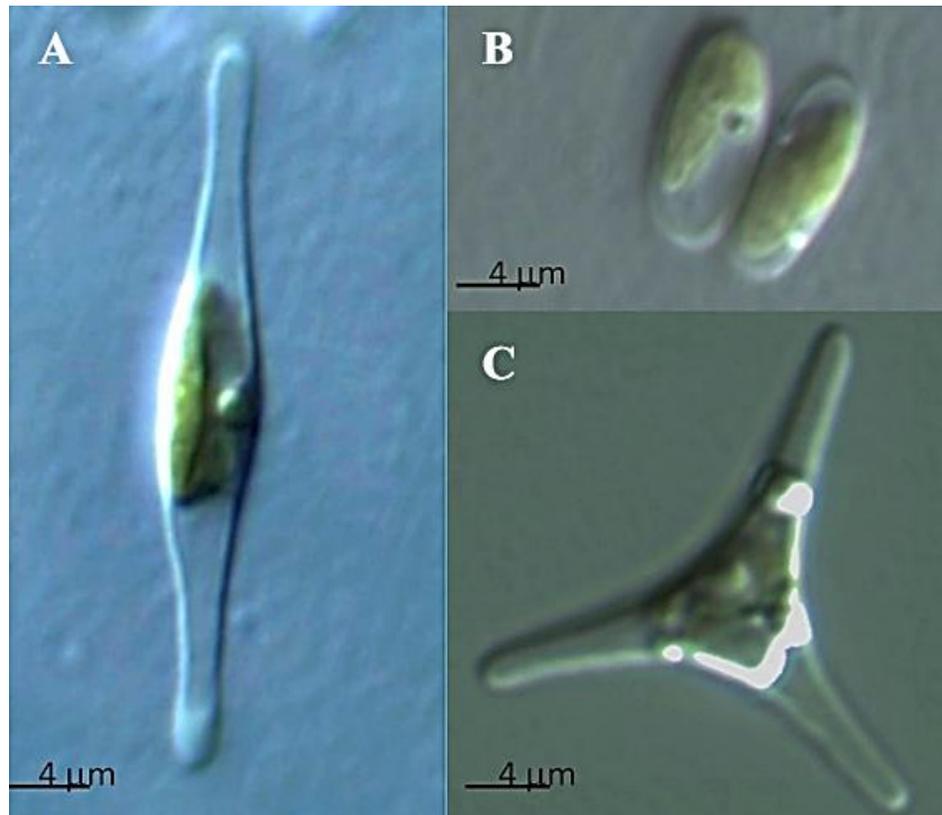


Figura 6. Micrografías de *P. tricornutum*. Se muestran los morfotipos fusiforme (a), ovalado (b) y trirradiado (c). Tomado de De-Martino, ENS-París.

Por otra parte, representa una fuente significativa de proteínas, esto añade un valor nutricional significativo y abre posibilidades para su utilización en la producción de suplementos proteicos y alimentos funcionales (Cuadro 2).

Se conoce que la fucoxantina presente en *P. triornutum* es antiproliferativa y antioxidante *in vitro*. Incrementa la actividad de caspasa 3/7, reduce la actividad metabólica en líneas celulares hasta un 58%, con efectos antioxidantes dosis-dependientes, disminuyendo la quimioluminiscencia en neutrófilos en un 63% y aumentando 3.3 veces la proporción de glutatión reducido a oxidado. Esto sugiere beneficios potenciales para la salud en nutrición humana (Neumann *et al.*, 2019).

Como se mencionó previamente, *P. triornutum* es abundante en una gran variedad de nutrientes y ácidos grasos omega-3. De acuerdo con un estudio, los extractos acuosos y etanólicos de esta microalga inhiben significativamente la producción de citoquinas proinflamatorias en células humanas y murinas. Los efectos antiinflamatorios se lograron mediante la estrategia de inhibir la activación del factor nuclear-κB y la vía de la proteína quinasa MAP (Neumann *et al.*, 2018).

Por otro lado, se ha encontrado que los extractos de polisacáridos crudos de *Phaeodactylum triornutum* presentan actividad antiinflamatoria en la prueba de edema por carragenina. Estos extractos también mostraron efectos inmunoestimulantes en pruebas de hipersensibilidad retardada y actividad fagocítica, tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro* (Guzmán *et al.*, 2003).

Adicionalmente, se ha reportado que *Phaeodactylum triornutum* presenta compuestos antibacterianos, a partir de extractos, incluyendo ácido palmitoleico (C16:1 n-7) y ácido hexadecatrienoico (C16:3 n-4), efectivos contra bacterias farmacorresistentes Grampositivas, como *Staphylococcus aureus*. Estos ácidos grasos también pueden interferir en la formación de biopelículas, una de las principales estrategias de resistencia de las bacterias patógenas. Además, investigaciones recientes sugieren que estos compuestos podrían potenciar la efectividad de antibióticos tradicionales cuando se usan en combinación, abriendo nuevas vías para tratar infecciones con resistencia los medicamentos (Desbois *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Composición bioquímica de *P. tricornutum*.

Composición bioquímica	Cantidad total DW (%)	Cantidad total AFDW (%)
Lípidos	9.08 ± 0.38	14.25 ± 1.01
Carbohidratos	7.85 ± 0.22	17.31 ± 0.48
Proteína	38.40 ± 2.46	64.00 ± 4.10
Fucoxantina	0.86 ± 0.06	8.29 ± 0.55
Bio-sílice	5.19 ± 0.56	10.06 ± 0.71
Cenizas y otros	38.67 ± 1.50	-

Los contenidos se expresan como porcentaje del peso seco total (DW%) y del peso seco libre de cenizas (AFDW). Tomado de: Branco-Vieira y cols., (2020).

Así mismo, se ha demostrado que el contenido de fucoxantina en *Phaeodactylum tricornutum* tiene propiedades antiedad, en un estudio se incrementó la síntesis de procolágeno y se disminuyó la expresión de MMP-1, MMP-2 y MMP-9 en fibroblastos humanos. En un estudio con mujeres, una crema con 0,03 % de fucoxantina redujo significativamente las arrugas en 8 semanas, mejorando la humedad y elasticidad de la piel sin efectos adversos (Kang *et al.*, 2020).

Se sabe que la fucoxantina, uno de los principales carotenoides presentes en las microalgas, tiene una variedad de propiedades biológicas, como antioxidante, anticancerígena, antiobesidad y antiinflamatoria.

De acuerdo con estos hallazgos, se han explorado las actividades antioxidantes, antiproliferativa, anticancerígena, antiobesidad, antiinflamatoria, inmunoestimulante, antibacteriana y antienvjecimiento de *Phaeodactylum tricornutum*. Sin embargo, su potencial antiviral no ha sido estudiado, por lo que resulta conveniente investigar esta faceta, partiendo de que en general las microalgas demuestran un potencial antiviral.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El virus del dengue constituye un riesgo considerable para la salud pública global, afectando a millones de personas anualmente. De los cuatro serotipos del virus, el serotipo 2 se distingue por su alta prevalencia y virulencia, siendo responsable de graves complicaciones clínicas como el síndrome de choque por dengue y la fiebre hemorrágica. La propagación del virus en regiones tropicales y subtropicales, sumada a su expansión hacia nuevas áreas geográficas impulsada por el cambio climático, ha exacerbado tanto la incidencia como la severidad de los brotes. Según el CDC, aproximadamente 400 millones de personas se infectan con el virus del dengue a nivel mundial, de los cuales 100 millones desarrollan la enfermedad y aproximadamente 40,000 fallecen debido a sus formas graves. Esto destaca la importancia crítica de un buen control y vigilancia de la enfermedad.

A pesar de los esfuerzos en prevenir y controlar el dengue, a la fecha, no hay un tratamiento antiviral específico ni una vacuna completamente eficaz para todos los serotipos, lo que destaca la necesidad inminente de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Los métodos actuales, resultan insuficientes para minimizar el impacto del dengue en las comunidades con mayor afectación, especialmente en aquellas con recursos limitados. Esta carencia de tratamientos eficaces se ve agravada por la resistencia emergente a los métodos de control existentes y por las limitaciones en la distribución y efectividad de las vacunas. El problema se enfoca en la necesidad urgente de desarrollar tratamientos efectivos, derivados de fuentes naturales, para combatir el DENV, especialmente ante el incremento de casos y la falta de terapias específicas. Enfrentar estos desafíos es esencial para mitigar el impacto del dengue y proteger a la población vulnerables.

Preguntas de investigación:

¿Cuáles son los efectos de los hidrolizados proteicos de *Phaeodactylum tricornutum* sobre la replicación del DENV-2 en células infectadas?

¿Cómo varía la eficacia antiviral entre diferentes fracciones peptídicas de los hidrolizados de *Phaeodactylum tricornutum*?

V. JUSTIFICACIÓN

El dengue, una infección viral que se transmite por mosquitos, es una de las más significativas mundialmente, continúa representando un desafío para la salud pública, afectando a millones de personas anualmente. La falta de tratamientos antivirales específicos para esta enfermedad destaca la necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para enfrentar esta creciente amenaza.

En este contexto, los compuestos naturales representan una alternativa prometedora en la lucha contra enfermedades virales, gracias a su diversidad de compuestos bioactivos, baja toxicidad y capacidad para influir en múltiples vías biológicas. Esta variedad ofrece la posibilidad de desarrollar tratamientos más específicos y menos perjudiciales para el organismo, haciendo que los productos naturales sean una opción viable en la búsqueda de nuevos antivirales.

Las microalgas se destacan entre los recursos naturales por sus propiedades antivirales, antioxidantes y antiinflamatorias, lo que sugiere un gran potencial terapéutico aún inexplorado. *Phaeodactylum tricornutum*, una microalga rica en proteínas de alta calidad y compuestos bioactivos se presenta como una fuente potencial antiviral. Debido a que no se ha investigado su eficacia contra el DENV-2, este proyecto busca llenar este vacío de conocimiento.

Evaluar los hidrolizados proteicos de *Phaeodactylum tricornutum* como una posible terapia antiviral no solo contribuye a la lucha contra el dengue, sino también abrir nuevas formas para desarrollar tratamientos con base en recursos naturales. Este enfoque es especialmente relevante ante el aumento de la resistencia a tratamientos convencionales y la falta de opciones terapéuticas efectivas, subrayando la necesidad de alternativas sostenibles y eficaces.

VI. HIPÓTESIS

Los hidrolizados proteicos de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* presentan actividad antiviral contra el virus del dengue serotipo 2.

VII. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antiviral de hidrolizados proteicos de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* contra el virus del dengue serotipo 2.

7.2 Objetivos específicos

7.2.1 Obtener hidrolizados proteicos de diferente peso molecular a partir de la biomasa microalgal de *P. tricornutum*.

7.2.2 Determinar la citotoxicidad de los hidrolizados proteicos a través del ensayo MTT en células Huh-7.

7.2.3 Evaluar el efecto antiviral de los hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* contra DENV-2.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Tipo de estudio

Se trata de un estudio experimental y analítico, con la finalidad de evaluar la actividad antiviral de hidrolizados proteicos de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* contra el virus del dengue serotipo 2. Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Fisiología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa y en el laboratorio 8 de virología del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

8.2 Material biológico

8.2.1 Microalga *Phaeodactylum tricornutum*

La microalga *Phaeodactylum tricornutum* se obtuvo del cepario del Laboratorio de Fisiología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). Esta cepa proviene del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), específicamente de la Colección de Cultivos de Ensenada, Baja California, México.

8.2.2 Línea Celular Huh-7

Los ensayos de viabilidad celular, infección y tratamiento se realizaron en la línea celular de hepatocarcinoma humano (Huh-7), proporcionada por el Laboratorio de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV, Zacatenco. Las células se cultivaron en placas de 12 pozos con medio DMEM Advanced Gibco™ suplementado con 8 % de suero fetal bovino (SFB) Gibco™, estreptomycin (50 µg/ml) Sigma-Aldrich®, 2 mM de glutamina Gibco™, penicilina (5x10⁴ U/ml), y 1 ml/L de anfotericina B Gibco™, a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂.

8.2.3 Línea Celular BHK-21

La evaluación de producción de partículas infecciosas *in vitro* del DENV-2 se realizó por medio del ensayo de unidades formadoras de placa (UFP) con la línea celular de fibroblastos de riñón de hámster bebé (BHK-21), proporcionada por el Laboratorio de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV, Zacatenco.

Las células se cultivaron en placas de 24 pozos con medio DMEM Advanced Gibco™ suplementado con 8% de SFB Gibco™, penicilina (5×10^4 U/ml), 1 ml/L de anfotericina B Gibco™, 2 mM de glutamina Gibco™ y estreptomicina (50 µg/ml) Sigma-Aldrich® a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂.

8.2.4 Virus del dengue

Se utilizó el dengue serotipo 2 (DENV-2) para infectar las células. La propagación del DENV-2 se efectuó en cerebros de ratones lactantes CD-1 de 2-3 días de nacidos. Estos fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV (Número de proyecto: 0048-02). A los 4-5 días después de la inoculación, se realizó eutanasia, los cerebros fueron diseccionados, macerados y filtrados con microfiltros Millipore® con membrana de 0.22 µm para la obtención de los virus. Mediante el ensayo de unidades formadoras de placa (UFP) se determinó el título viral. Como control (Mock), se empleó extracto de cerebro de ratón lactante CD-1 no infectado.

8.3 Diseño experimental

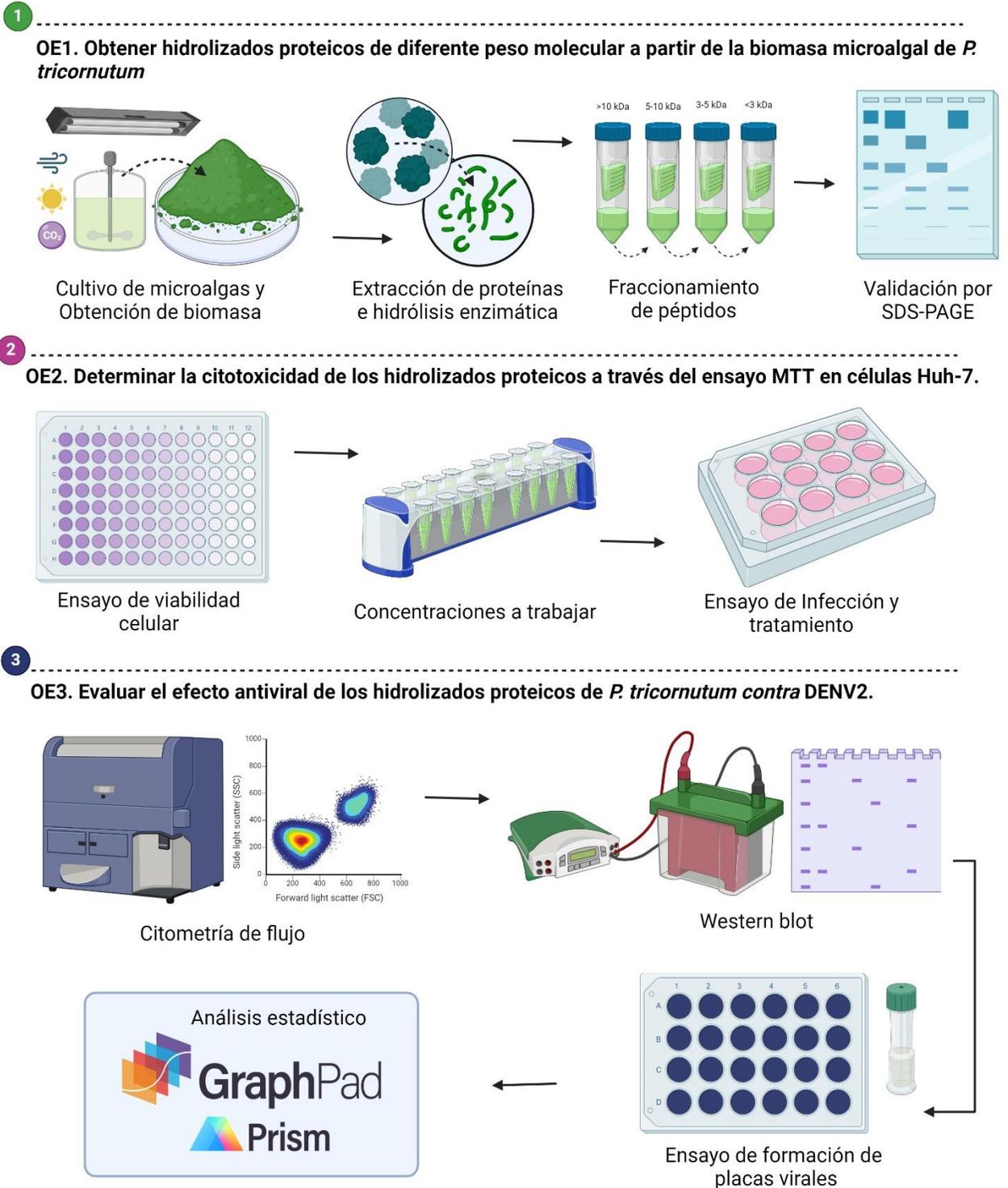


Figura 7. Diseño experimental simplificado. Cada sección corresponde a los experimentos realizados por objetivo específico planteado.

8.4 Cultivo de microalgas *Phaeodactylum tricornutum*

Se realizaron los cultivos de diatomeas utilizando una cepa autóctona de *P. tricornutum* mediante el método de transferencias seriadas, empleando el medio F/2. Este medio es una mezcla de agua salada (34 g de sal de mar por litro) con vitaminas, nitratos, elementos traza (CuSO_4 , ZnSO_4 , NaMoO_4 , MnCl_2 , CoCl_6) y fosfatos (1 ml de cada uno por litro), según lo propuesto por Guillard y Ryther (1962). El agua, tratada previamente con 0.5 ml de cloro por litro, fue enriquecida con el medio nutriente F/2. Los cultivos se mantuvieron a 20 ± 1 °C, con 1% de CO_2 , bajo luz artificial de 120-130 $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y con aeración constante suministrada por un soplador de aire (modelo AC-9602).

Del medio con la cepa inicial, se realizó un pase a un tubo de ensayo con 13.5 ml de medio F/2 y 1.5 ml del cultivo. Luego de 5 días, se pasaron a matraces con un volumen final de 50 ml. Posteriormente, fueron transferidos a recipientes de 3 L durante 3 días de subcultivo, y luego se escalaron en dos recipientes de plástico de 20 L durante 5 días. Finalmente, se cultivaron en diez recipientes del mismo volumen por 5 días más (Figura 8).

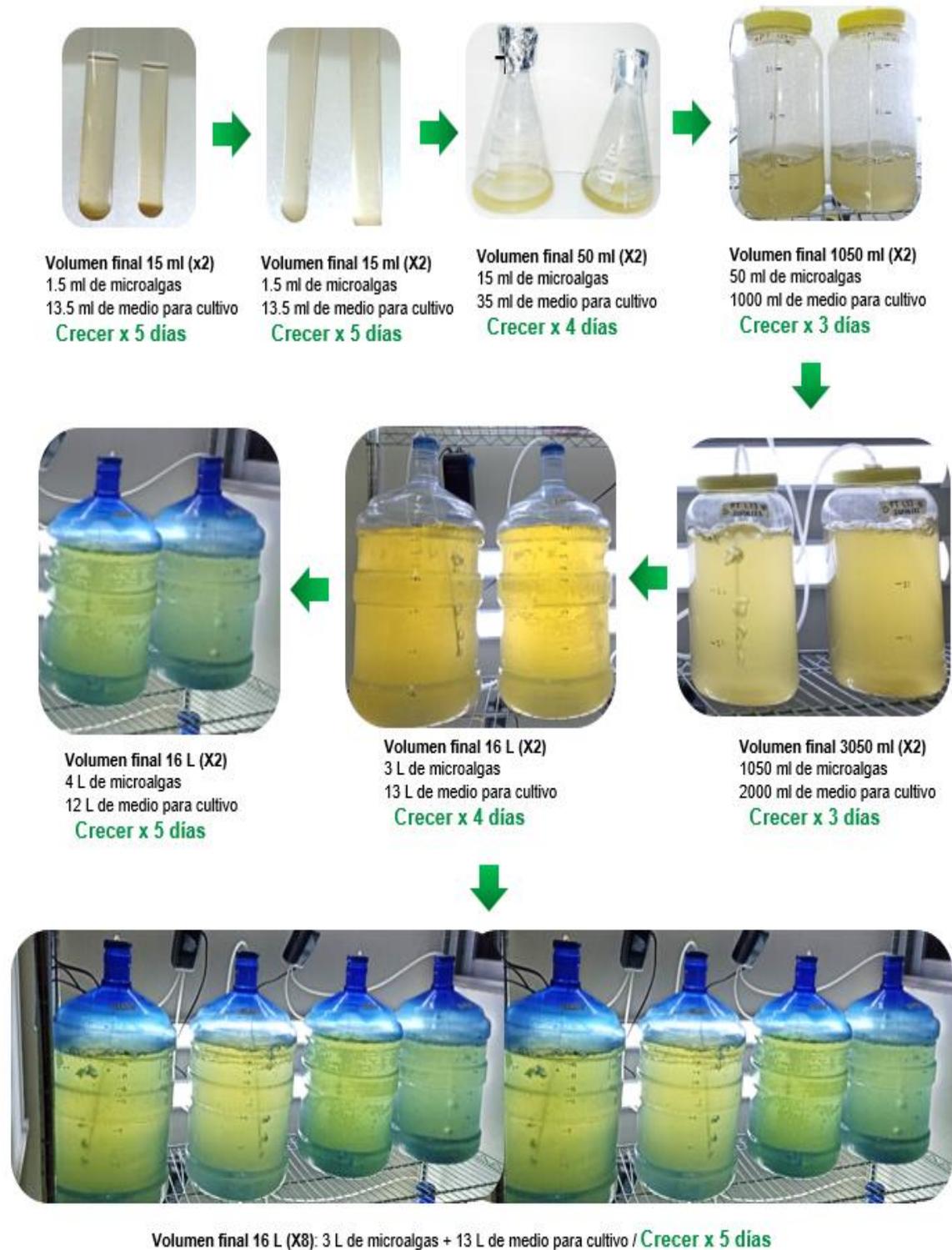


Figura 8. Diagrama experimental del cultivo de la microalga *P. tricornutum*.

8.5 Obtención de biomasa

La recuperación de la biomasa se efectuó a través del método de floculación, utilizando un floculante a base de quitosano (orgánico). El floculante se preparó con 5 g de quitosano y 10 ml de ácido acético glacial, completando el volumen a 1 L con agua destilada estéril (se agregaron 3.5 ml de la solución preparada por cada litro de cultivo). Adicionalmente, se preparó una solución que contenía hidróxido de sodio (NaOH) utilizando 40 g de NaOH y completando el volumen a 1 L con agua destilada estéril (se agregaron 10 ml de esta solución por litro de cultivo).

Una vez adicionado el floculante, se agitó por unos minutos, luego el cultivo se mantuvo en reposo y se dejó actuar durante 24 horas. Pasado este tiempo, la biomasa se precipitó y el sobrenadante fue descartado por decantación. La biomasa sedimentada fue recuperada y centrifugada para retirar el exceso de agua. Centrifugando a 4000 rpm durante 4 minutos, consecutivamente se dejó secar a 40 °C durante 24 horas. Luego, la biomasa fue macerada y almacenada a -20 °C hasta el siguiente proceso.

8.6 Extracción de lípidos

El proceso de separación de lípidos y obtención de biomasa residual se llevó a cabo de acuerdo con la metodología de Bligh y Dyer (1959) en complemento con la propuesta por Alavijeh *et al.* (2015) con modificaciones. A partir de la biomasa seca obtenida, se preparó una solución 1:2, pesando 50 g de biomasa y disolviendo en 100 ml de acetato de etilo. Para la extracción de aceite, se adicionaron 2 ml del solvente por cada gramo de muestra.

Una vez preparada la mezcla, se protegió de la luz y se sometió a un proceso de sonicación durante 1 hora (*Ultrasonic Homogenizer Processor Model UP-250S, LawsonScientific*) a una frecuencia de 24 kHz, con intervalos de trabajo de 15 minutos y descansos de 3 minutos. Durante la sonicación, la solución se mantuvo en hielo para evitar el sobrecalentamiento y facilitar la ruptura celular y obtención de aceite.

Posteriormente, la mezcla se agitó constantemente durante 24 horas, cubierta de la luz a 23 °C.

La separación de la biomasa de los solventes y el componente lipídico se realizó mediante centrifugación a 4000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente la fase líquida (componente lipídico) fue recuperada y se guardó en refrigeración. La fase sólida sedimentada (biomasa residual) se secó en un horno a 40 °C durante 24 horas, permitiendo la volatilización del solvente.

La biomasa residual seca se maceró finamente y se lavó con agua destilada estéril mediante filtración al vacío. Para lo cual, se rehidrataron 100 g de biomasa en 500 ml de agua destilada estéril en una relación 1:5. La mezcla se mantuvo en agitación a 40 °C durante 10 minutos, luego se filtró en un matraz con bomba de vacío y filtro Whatman #4. Este procedimiento de lavado se repitió 5 veces. Por último, la biomasa fue secada nuevamente en una estufa a 40 °C durante 24 horas, retirando el exceso de sales y solventes.

8.7 Extracción de proteína

Para realizar la extracción de proteína, se siguió la metodología de Safi y cols. (2014) y Afify y cols. (2018), utilizando un método de *salting-out* que precipita las proteínas a partir de una solución con alto contenido de sales. Se pesaron 40 g de biomasa residual y se disolvieron en 500 ml de NaOH 2 M, manteniendo agitación durante 2 horas a 40 °C. Luego, fue centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos a 20 °C, recuperando el sobrenadante y descartando el precipitado.

En el sobrenadante recuperado, las proteínas se precipitaron ajustando el pH a 3, utilizando HCl 5 N y 1 N. Luego, la solución fue centrifugada a 4000 rpm durante 20 minutos a 20 °C. Se eliminó el sobrenadante y se recuperó el precipitado con NaOH 0.01 M, neutralizando la solución con HCl 1 N hasta ajustar el pH a 7. La solución con las proteínas extraídas se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

8.8 Cuantificación de proteína

Se realizó la cuantificación de proteínas utilizando el kit BCA (*Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible*). Se prepararon diluciones de la muestra para la cuantificación, agregando 9 µL en el pocillo de la microplaca.

Luego, se añadieron 4 μ L de solución de reactivo de compatibilidad a cada muestra en los pocillos. Posteriormente, se cubrió la placa y se mezcló en un agitador a velocidad media durante un minuto, continuando con una incubación a 37 °C durante 15 minutos.

Se adicionaron 260 μ L de reactivo de trabajo BCA (WR) a cada pocillo, después se cubrió la placa y se mezcló en un agitador (CRM-OS2, Oscilador, CRM-Globe) durante un minuto. Luego, se incubó a 37 °C durante 30 minutos y dejándolo enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se utilizó un control estándar como blanco y se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de placas (*Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer*).

Se preparó una curva estándar trazando el valor medio de absorbancia a 562 nm, corregido por el blanco, para cada estándar de BSA frente a su concentración (μ g/ml). La curva estándar se utilizó para determinar la concentración de proteína de cada muestra desconocida.

8.9 Hidrólisis enzimática de proteínas

Los hidrolizados proteicos de la microalga *P. tricornutum* se obtuvieron a partir de la biomasa residual según lo descrito por Humisky y Aluko (2007) con modificaciones. Dado que se partió de una solución de concentrado de proteínas, se calculó la cantidad de enzima con respecto a la concentración determinada mediante cuantificación con el Kit-BCA (*Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible*).

La hidrólisis se inició al agregar la enzima Alcalase® al 4% (enzima a sustrato, E/S), agregando 0.40 μ L de enzima por cada 1 mg de proteína. La reacción se llevó a cabo durante 60 minutos, manteniendo el pH a 9 (ajustando con HCl 1N y NaOH 1N) y una temperatura constante de 50 °C. La hidrólisis enzimática se detuvo ajustando el pH de la solución a 4.0 (utilizando HCl a 1N y 5N) y calentando en un agitador de placa calefactora termostática (Mettler-Toledo, EE. UU.) a 94 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos, se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -4 °C hasta su posterior uso.

8.10 Fraccionamiento de Hidrolizados proteicos por Ultrafiltración

La separación del hidrolizado proteico en fracciones de distinto peso molecular se realizó por medio de la técnica de ultrafiltración, utilizando la metodología descrita por Hou y cols. (2019), con menores modificaciones.

Se utilizaron tubos con dispositivos de filtrado que difieren en su selectividad de peso molecular: filtros centrífugos Amicon® Ultra-15 (Millipore, Billerica, MA) con cortes de peso molecular (MWCO) de 30, 10 y 3 kDa, respectivamente, y concentradores centrífugos Vivaspin® Turbo de 5 kDa MWCO (Sartorius, Goettingen, Alemania). Se obtuvieron secuencialmente 4 fracciones peptídicas de diferente peso molecular (10–30 kDa, 5–10 kDa, 3–5 kDa y <3 kDa).

Primero, el tubo con el dispositivo de filtro MWCO de 30 kDa se cargó con 10 ml del hidrolizado proteico y se centrifugó a 3000 x g a 4 °C durante 20 minutos. El retenido resultante (fracción >30 kDa) se resuspendió en agua destilada para recuperarlo. El filtrado se recolectó y se cargó en el tubo MWCO de 10 kDa y se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones. El retenido resultante (fracción >10 kDa y <30 kDa) se resuspendió en agua destilada para recuperarlo y ser liofilizado. El filtrado se recolectó y se cargó en el tubo MWCO de 5 kDa y se centrifugó nuevamente. El mismo procedimiento se aplicó tanto al retenido como al filtrado para obtener las fracciones peptídicas de 5–10 kDa y <5 kDa, respectivamente, sometiendo esta última fracción a un nuevo paso de separación para obtener dos fracciones peptídicas más, de 3–5 kDa y <3 kDa, respectivamente. Las fracciones obtenidas se almacenaron a -80 °C en envases de 500 ml y posteriormente se liofilizaron.

8.11 Liofilización de hidrolizados proteicos

El liofilizado se realizó en una liofilizadora (The Virtis Company Gardiner, EE. UU., modelo #12525). En este proceso se utilizó un volumen de hidrolizado de 50–250 ml por fracción, a una temperatura del condensador de -44 °C, manteniendo un vacío de 115 mTorr.

8.12 Separación de Hidrolizados Proteicos mediante SDS-PAGE

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), fue la técnica que se empleó para separar y visualizar los péptidos derivados de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* de las cuatro fracciones peptídicas (10–30 kDa, 5–10 kDa, 3–5 kDa y <3 kDa). Se prepararon geles de poliacrilamida, utilizando un gel concentrador al 5% y un gel separador al 20%, para mejorar la resolución de las bandas de péptidos.

Las muestras de hidrolizado proteico liofilizado fueron previamente resuspendidas en agua inyectable, luego cuantificadas con el kit *Pierce™ BCA Protein Assay*. Se determinó cargar 20 µg de hidrolizado proteico, tratadas con un tampón de carga (Laemmli) que contenía 10% SDS, 20% de glicerol, 0.5% de azul de bromofenol, Tris-HCl pH 6.8 (0.5M), 10% β-mercaptoetanol y agua destilada.

Las muestras fueron cargadas en los pozos del gel y se sometieron a una electroforesis, inicialmente a 50 V durante 30 minutos para permitir la concentración en el gel concentrador, seguido de 80 V durante una hora y media para la separación en el gel separador.

Tras la electroforesis, el gel se colocó en una solución de tinte con *Coomassie Brilliant Blue R-250* durante una hora y después se decoloró en dos soluciones de decoloración de mayor a menor concentración, una de metanol al 40% y ácido acético al 10%, seguido de una solución de metanol al 7% y ácido acético al 10%, para visualizar las bandas de péptidos. Las imágenes de los geles teñidos fueron capturadas utilizando un fotodocumentador (BioRAD Gel Doc XR) y visualizado en el software ImageLab.

8.13 Evaluación de la actividad antiviral de los hidrolizados proteicos

Para los ensayos de infección y tratamiento, se usó la línea celular Huh-7, cultivada en medio *Advanced DMEM* completo suplementado con glutamina (2 mM), penicilina (104 U/ml), estreptomycin (50 µg/ml), anfotericina B (Fungizona) (500 µl/ml) y suero fetal bovino (7 %), mantenida a 37 °C bajo una atmósfera de CO₂ al 5 %.

Para los ensayos de formación de placa, se usó la línea celular Bhk-21, un cultivo de fibroblastos de riñón de hámster bebé, cultivada en medio MEM (medio esencial mínimo) suplementado con aminoácidos no esenciales, estreptomicina (50 µg/ml), suero fetal bovino (8 %), penicilina (104 U/ml), y anfotericina B (500 µl/ml), a 37 °C bajo una atmósfera de CO₂ al 5 %. Tanto las líneas celulares como el virus fueron provistos por el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV, Zacatenco.

Para los ensayos de inhibición, se evaluaron las cuatro fracciones liofilizadas de los hidrolizados proteicos: Fracción 1 (péptidos <3 kDa), Fracción 2 (3 – 5 kDa), Fracción 3 (5 – 10 kDa), y Fracción 4 (10-30 kDa).

8.14 Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó a través del método MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio) para analizar el efecto del tratamiento con el hidrolizado proteico. Las células fueron tratadas con las cuatro fracciones obtenidas, durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Para esto se emplearon diferentes concentraciones tomando como referencia lo descrito previamente por Roblet y cols. (2012), con modificaciones.

En una primera serie de experimentos, cada fracción liofilizada se pesó y se resuspendió a temperatura ambiente en 1 ml de agua estéril, preparando un stock de trabajo. Este se diluyó en serie 1:2 en medio de cultivo 2X para obtener concentraciones finales de 5, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 500 y 1000 µg/ml de cada fracción (Cuadro 3).

Las células Huh-7 se cultivaron previamente hasta alcanzar una confluencia del 60-70 % en microplacas de 96 pozos, con 1×10^6 células/pozo. Se probaron 11 concentraciones de cada fracción y un control celular para cada una.

Se descartó el medio de cultivo y se añadieron 200 μ l de cada concentración preparada (tratamiento y medio DMEM), incubándose durante 48 horas a 37 °C con 5 % de CO₂.

Tras la incubación, se preparó la solución de MTT agregando 5 mg de MTT en polvo, 1 ml de TBS y 9 ml de DMEM. Se retiró el medio de la placa y se añadieron 100 μ l de la solución de MTT por pozo. La placa se cubrió de la luz y se llevó a incubación durante 3 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Luego, se retiró la solución de MTT y se agregó 100 μ l DMSO (dimetilsulfóxido, grado reactivo) por pozo. La placa se cubrió de la luz y se dejó en agitación durante 15 minutos. Finalmente, se evaluó la absorbancia a 540 nm por espectrofotometría (BioTek ELx800TM, Winooski, VT, EE. UU.). El experimento se realizó por triplicado.

Cuadro 3. Concentración de las fracciones de hidrolizado proteico para viabilidad celular.

Hidrolizado proteico	Stock inicial	Stock trabajo	Concentración final
Concentración	100 mg/ml	1 mg/ml	5 µg/ml
			25 µg/ml
			50 µg/ml
			75 µg/ml
			100 µg/ml
			150 µg/ml
			200 µg/ml
			250 µg/ml
			300 µg/ml
			500 µg/ml
			1 mg/ml

8.15 Ensayo de infección y tratamiento *in vitro*

Se utilizaron células Huh-7, cultivadas con DMEM y sembradas a una confluencia del 60-70 % en placas de 12 pocillos (7×10^5 células por pozo). Previamente, se realizaron ensayos de infección para determinar la multiplicidad de infección (MOI) y el tiempo de incubación óptimo.

Se descartó el medio y se lavaron las células con HANK's. Después, fueron infectadas con DENV-2 a una MOI de 1.5 (óptima para la infección). El virus se disolvió en HANK's a un volumen de 500 μ l y se dejó adsorber durante 2 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. A continuación, se agregaron los tratamientos (con concentraciones de 150 y 300 μ g/ml por fracción) a un volumen de 1500 μ l y se incubaron durante 48 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Las células infectadas sin tratar (Ci) y las células no infectadas (Mock) sirvieron como controles.

El tratamiento se realizó con las 4 fracciones de hidrolizado proteico obtenidas (Fracción 1 de <3 kDa, Fracción 2 de 3 – 5 kDa, Fracción 3 de 5 – 10 kDa, y Fracción 4 de 10 – 30 kDa) y dos concentraciones de cada una (150 y 300 μ g/ml).

Después de 48 horas, se recuperó el sobrenadante que contenía el virus y se guardó a -80 °C. Posteriormente, se recolectaron las células para ensayos posteriores. Las células se lavaron con PBS frío, con cuidado de no desprender la monocapa. Posteriormente, se agregaron 500 μ l de tripsina en cada pozo para despegar las células, observándolas al microscopio por aproximadamente 1 minuto. Luego, se añadió 1 ml de DMEM suplementado con SFB para inactivar la tripsina, y con ayuda de una pipeta se recuperaron las células y se guardaron en tubos de 1.5 ml. Del ensayo de inhibición se realizaron tres réplicas técnicas y dos réplicas biológicas.

8.16 Ensayo de formación de placas virales

Para este ensayo se empleó la línea celular Bhk-21. Se sembraron las células previamente en una multiplaca (Corning) de 24 pozos, alcanzando una confluencia del 60-70 % (1×10^6 células/pozo).

Se prepararon diluciones del virus (sobrenadante recuperado del ensayo de infección y tratamiento) en HANK's, obteniendo diluciones desde -1 a -7. Se retiró el medio de la placa y se infectaron las células con las diluciones preparadas, incluyendo una dilución 0, Ci, y Mock. Para permitir la adsorción viral, las placas fueron incubadas durante 2 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. A continuación, se agregó 1 ml de carboximetilcelulosa (CMC) al 0.2 % con DMEM para permitir la formación de placas, y se incubaron durante 5 días a 37 °C con 5 % de CO₂.

Tras la incubación, la CMC fue decantada y se dejaron secar las placas durante 5 minutos. Se tiñeron con Naftol Blue Black (NBB), adicionando 500 µl por pozo y se incubaron durante 2 horas. Luego, se decantó el NBB y se lavaron las placas gentilmente con agua. Una vez secas, se contaron las placas formadas.

El título viral se expresó en unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml), para su determinación se contaron el número de placas líticas en cada pozo de la dilución contable y se promedió el duplicado, tomando en cuenta la dilución utilizada para calcularlas, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Título viral (UFP/ml)} = \frac{(\text{Promedio de placas}) \times (\text{antilog dilución viral}) \times (1000)}{\text{ul de diluyente}}$$

8.17 Citometría de flujo

A partir de las células recuperadas del ensayo de infección y tratamiento, se procedió con la fijación. Las células se centrifugaron a 600 rpm durante 8 minutos a 4 °C. Luego, se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron homogéneamente en 300 µl de PBS 1X. Posteriormente, se fijaron con 600 µl de paraformaldehído (PFA) frío al 4 % durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 2,300 rpm durante 8 minutos a 4 °C, se aspiró el sobrenadante, dejando 100 µl de líquido en el tubo, y se agregó 1 ml de PBS 1X.

Para la permeabilización, se añadieron 500 µl de solución permeabilizadora (saponina 0.2 % y SFB 1 %), se resuspendieron las células e incubaron durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente.

Luego, se agregaron 900 μ l de PBS 1X, se centrifugaron a 2,300 rpm durante 8 minutos a 4 °C, se aspiró el sobrenadante y se dejaron 100 μ l.

Se realizó el marcaje con el anticuerpo primario 2H2, el cual marca la proteína Pre-M de dengue. El anticuerpo se preparó en una dilución 1:50 (anticuerpo: Solución permeabilizadora). Se agregaron 50 μ l de anticuerpo primario preparado, se resuspendieron las células y fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C en agitación constante.

Para el marcaje con el anticuerpo secundario, se añadió 1 ml de PBS 1X a cada tubo, se resuspendieron y centrifugaron a 2,300 rpm durante 8 minutos a 4 °C, se aspiró el sobrenadante. El anticuerpo secundario Alexa 488 se preparó en una dilución 1:1000 en solución permeabilizadora, y se agregaron 50 μ l a cada tubo. Las células se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitación constante y protegidas de la luz. Luego, se agregó 1 ml de PBS 1X, se resuspendieron y centrifugaron a 2,300 rpm durante 8 minutos a 4 °C. Finalmente, se aspiró el sobrenadante y se añadieron 200 μ l de PBS 1X a cada tubo.

Las muestras fueron colocadas en tubos para citometría de flujo y se realizaron las mediciones en un citómetro de flujo Sysmex (*XF-1600TM Flow Cytometer; Sysmex Corporation, Japan*). Los datos se analizaron con el software FlowJo V.10.

8.18 Western blot

A partir de las células recuperadas del ensayo de infección y tratamiento, se procedió con la preparación para Western blot para evaluar los niveles de expresión de las proteínas NS3 y NS5 en la línea celular Huh-7 infectada y tratada con las diferentes fracciones peptídicas de *P. tricornutum*.

Primero, se realizó la lisis celular para extraer las proteínas. Las células fueron centrifugadas a 2,300 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se descartó el medio, se añadieron 200 μ l de PBS 1X y se resuspendieron. Luego, se adicionaron 50 μ l de buffer de lisis RIPA (con inhibidor de proteasas), se resuspendieron e incubaron durante 15 minutos en hielo. Después, fueron centrifugadas a 10,000 g durante 10 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y fue transferido a un tubo nuevo.

Las proteínas obtenidas se cuantificaron mediante el método de BCA, utilizando el Kit comercial *Thermo Scientific, Pierce, Microplate BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible* (N°23252), siguiendo las instrucciones del fabricante, para determinar la cantidad de proteína a cargar por pozo. Se prepararon geles de acrilamida (dos geles en uno), primero el gel separador (12%) y luego el gel concentrador (4%). Se cargaron 30 µl de las muestras de proteína y al inicio un marcador de peso molecular. Se utilizó a la proteína β-actina como un control de carga. Se realizó la electroforesis en condiciones adecuadas (70V durante 20 minutos y luego 100V durante 2 horas) para separar las proteínas por tamaño molecular.

Luego, las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (con 4 papeles de filtro y 2 esponjas), utilizando electroblotting durante 70 minutos a 100 V a 4 °C. Se verificó la eficiencia de la transferencia mediante tinción con Rojo Ponceau, manteniendo la membrana en agitación durante 5 minutos.

Se bloqueó la membrana en una solución de bloqueo (leche en polvo al 10%) durante 1 hora en agitación para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, y se lavó la membrana con PBS 1X/Tritón 0.01%, 3 veces durante 5 minutos. La membrana fue incubada con un anticuerpo primario específico para las proteínas virales NS5 y NS3 (anticuerpo monoclonal de conejo) a una dilución 1:5000, diluido en la solución de bloqueo, incubándose toda la noche a 4 °C manteniendo agitación constante.

Se realizaron 3 lavados a la membrana para retirar el exceso de anticuerpo primario con PBS 1X/Tritón 0.01% durante 5 minutos. Para la detección mediante anticuerpos secundarios y revelado, se incubó la membrana con un anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), específico para el anticuerpo primario, a una dilución 1:5000 (GeneTex, GTX124252), durante 1 hora en agitación a 4 °C.

Se lavó la membrana 6 veces con PBS 1X/Tritón 0.01% durante 10 minutos para retirar el exceso de anticuerpo secundario. La presencia de proteínas virales se reveló mediante la adición de luminol (quimioluminiscencia), un sustrato adecuado para la enzima conjugada.

Se añadieron 800 µl de Femto (*SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate kit, ThermoFisher Scientific #34095*) a la membrana y se incubó durante 5 minutos.

Se capturó la imagen de la membrana utilizando un sistema de imagen quimioluminiscente en un fotodocumentador ImageQuant LAS 400. Finalmente, la intensidad relativa de las bandas se cuantificó por densitometría utilizando el software ImageJ V1.8.0 y se interpretaron los datos normalizados con las bandas de β -actina.

8.19 Análisis estadístico

El análisis estadístico se efectuó con la ayuda del software GraphPad Prism versión V8.0.1. Los datos numéricos fueron expresados como media \pm desviación estándar (SD). Antes de efectuar las pruebas paramétricas, se verificó la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza utilizando Levene, respectivamente. Cuando se cumplieron los supuestos de normalidad y varianzas iguales, las diferencias entre múltiples grupos se analizaron utilizando ANOVA de una vía, complementado con la prueba *posthoc* de Tukey para comparaciones por pares. Para los datos que no cumplieron estos supuestos, se emplearon pruebas no paramétricas, específicamente la prueba de Kruskal-Wallis y después de la prueba *posthoc* de Dunn.

En los casos que involucraron múltiples variables independientes, se utilizó ANOVA de dos vías para discernir los efectos de las interacciones entre factores como el tamaño y la concentración del péptido en los resultados medidos. Para los datos de citometría de flujo, donde se tomaron múltiples mediciones de la misma muestra, se utilizó un modelo de efectos mixtos para tener en cuenta la correlación intra-muestra, ajustando para múltiples comparaciones con la prueba de Sidak. Se estableció la significancia estadística en un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0.05$).

IX. RESULTADOS

9.1 Hidrolizado proteico obtenido

La hidrólisis enzimática se realizó empleando la enzima Alcalase® al 4%, obteniéndose un hidrolizado proteico que fue fraccionado y liofilizado en cuatro partes. Las fracciones se cuantificaron utilizando el ensayo BCA (*Bicinchoninic Acid Assay*) para medir la concentración de proteínas (o fracciones peptídicas) en microgramos por mililitro ($\mu\text{g/ml}$). Los resultados obtenidos se observan en el Cuadro 4.

De acuerdo con los resultados, se encontró una variabilidad significativa en las características físicas (Figura 9) y químicas de las fracciones obtenidas, lo cual podría influir en su actividad antiviral. Estos resultados se encuentran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Concentración y características observables de las fracciones peptídicas

Fracción	Peso	Concentración	Tamaño	Color	Consistencia
1	2.58 g	1619 µg/ml	10 - 30 kDa	Verde oscuro	Polvo fácil de disolver
2	2.26 g	2118 µg/ml	5 - 10 kDa	Ámbar	Polvo fácil de disolver
3	0.18 g	923 µg/ml	3 - 5 kDa	Amarillo oscuro	Pegajosa
4	4.23 g	621 µg/ml	<3 kDa	Amarillo claro	Polvo fácil de disolver

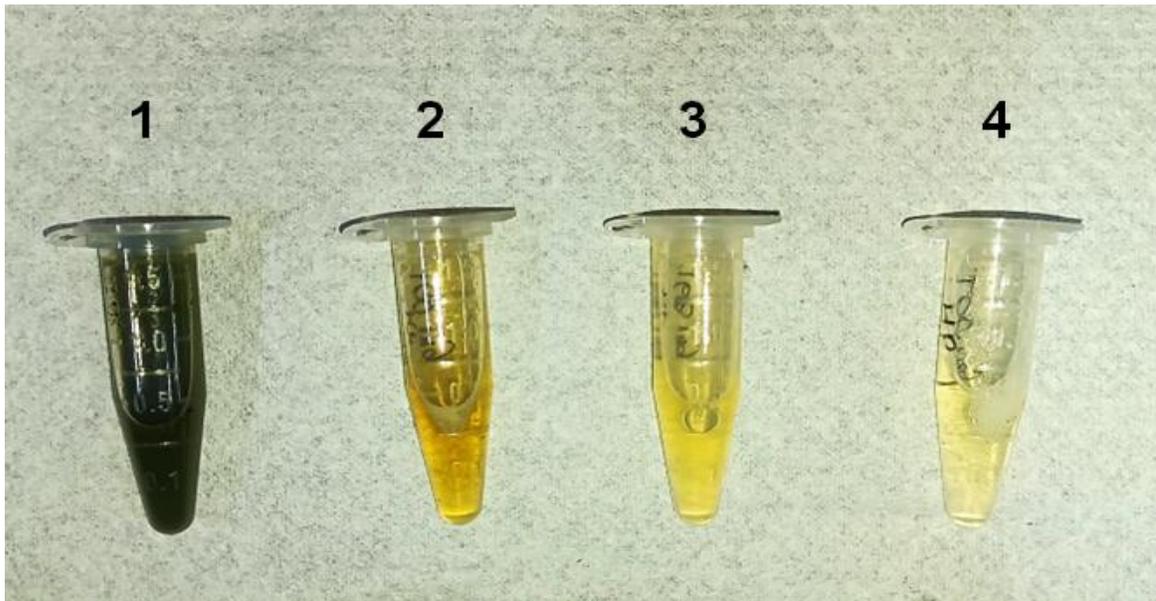


Figura 9. Coloración de las fracciones peptídicas obtenidas. La Fracción 1 corresponde a 10 – 30 kDa, Fracción 2 a 5 – 10 kDa, Fracción 3 a 3 – 5 kDa y Fracción 4 a <3 kDa.

9.2 Separación mediante SDS-PAGE

La separación de las fracciones peptídicas mediante SDS-PAGE permitió visualizar la distribución de los tamaños de los péptidos en cada fracción. En el gel de electroforesis, se cargaron muestras duplicadas de cada fracción, junto con un marcador de peso molecular para comparar y estimar los tamaños de las proteínas presentes. El marcador de peso molecular (10 - 250 kDa) se ubicó en la primera columna del gel, sirviendo como referencia para estimar los tamaños de las proteínas en las muestras. Las fracciones peptídicas en el gel se pueden apreciar de la siguiente manera: fracción 1 en las columnas 2 y 3, fracción 2 en las columnas 4 y 5, fracción 3 en las columnas 6 y 7, y fracción 4 en las columnas 8 y 9, como se muestra en la figura 10.

La Fracción 1: 10-30 kDa, presentó una mayor concentración de péptidos dentro del rango de 10-30 kDa. Sin embargo, se observaron también bandas correspondientes a péptidos de mayor peso molecular en menor concentración. La presencia de bandas no definidas indica una mezcla de péptidos de diferentes tamaños en esta fracción, sugiriendo la posible presencia de péptidos de mayor y menor peso molecular. Por otro lado, la Fracción 2: 5-10 kDa, mostró bandas dentro del rango de 5-10 kDa, con la mayor concentración de péptidos en este intervalo. A pesar de esto, es posible que también contenga péptidos de menor peso molecular. Comparada con la Fracción 1, esta fracción es más homogénea. En la Fracción 3: 3-5 kDa, contenía péptidos principalmente en el rango de 3-5 kDa, aunque las bandas observadas eran más tenues que en las fracciones anteriores, indicando una posible disminución en la cantidad de péptidos. Para la Fracción 4: <3 kDa, los péptidos fueron casi imperceptibles debido a su bajo peso molecular. No se observaron bandas por encima del rango correspondiente, lo que sugiere que esta fracción es bastante específica.

La separación mediante SDS-PAGE permitió confirmar la distribución de los tamaños de las proteínas en cada fracción peptídica obtenida por ultrafiltración. La variabilidad en la cantidad y tamaño de las bandas entre las fracciones indica diferencias significativas en la composición peptídica.

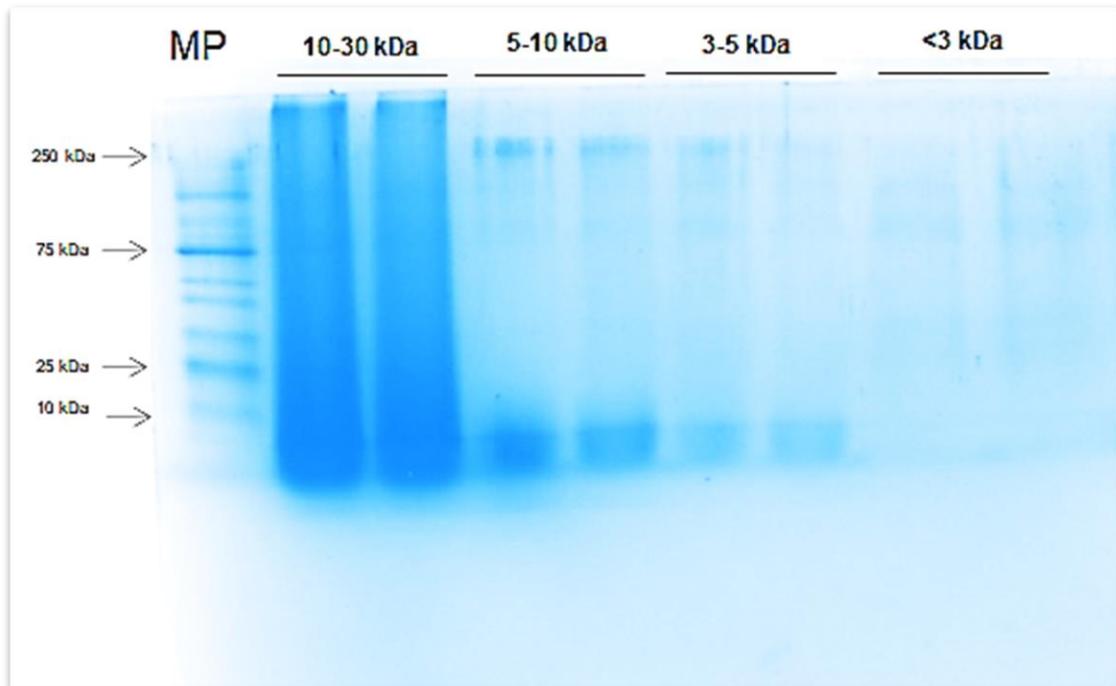


Figura 10. Visualización de las fracciones peptídicas obtenidas por SDS-PAGE.

La primera columna contiene el marcador de peso molecular (10 – 250 kDa), la 2 y 3 corresponde a 10 – 30 kDa, la 4 y 5 Fracción 2 a 5 – 10 kDa, 6 y 7 Fracción 3 a 3 – 5 kDa y la 8 y 9 a la Fracción 4 a <3 kDa.

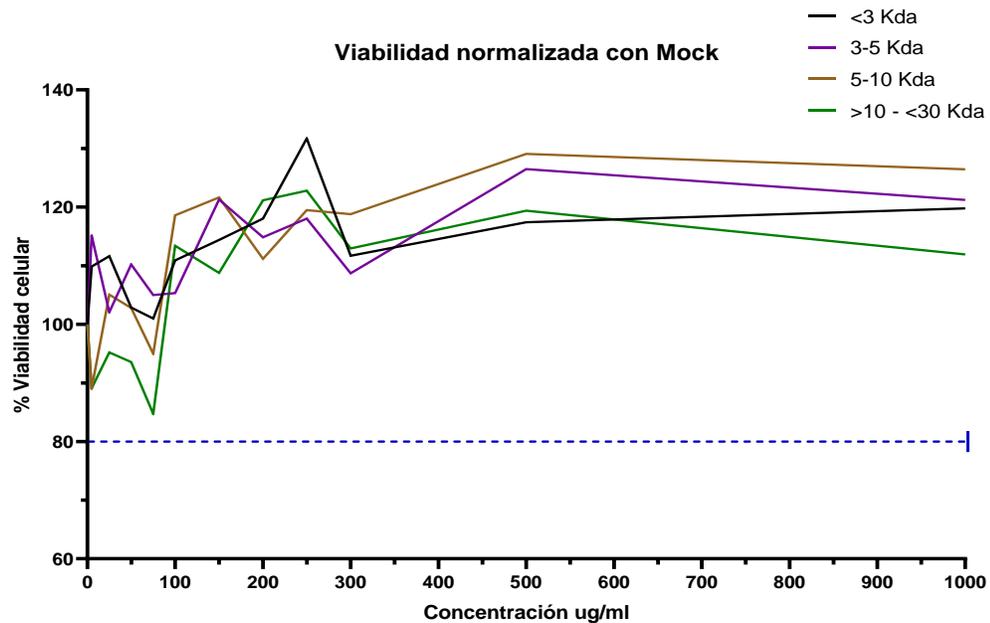
9.3 Determinación de la viabilidad celular de los hidrolizados proteicos en células Huh-7.

Para evaluar la citotoxicidad de los hidrolizados proteicos en células Huh-7, se realizaron ensayos utilizando concentraciones que abarcaban un rango amplio: 5, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de cada una de las cuatro fracciones obtenidas. Los resultados del ensayo de MTT revelaron que concentraciones iguales o inferiores a 1 mg/ml no mostraron efectos citotóxicos significativos en células Huh-7 (Figura 11-A).

Este hallazgo respalda la selección de las concentraciones 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$ para las siguientes evaluaciones de actividad antiviral, destacando también su potencial efecto beneficioso a concentraciones más elevadas (Figura 11-B). Cada gráfica muestra la respuesta específica de viabilidad celular para cada fracción y sus 11 concentraciones evaluadas. La inexistencia de efectos citotóxicos significativos en todas las fracciones y concentraciones probadas subraya la seguridad del hidrolizado proteico en células Huh-7 en concentraciones de hasta 1 mg/ml (Figuras 12-A, 12-B, 13-A y 13-B).

Estos resultados refuerzan la base sólida para continuar con los estudios de actividad antiviral de las fracciones peptídicas obtenidas de *Phaeodactylum tricornutum* contra DENV-2, destacando la importancia de considerar las características de tamaño molecular en futuras investigaciones. La información obtenida sobre la viabilidad celular en diferentes concentraciones proporciona una guía importante para determinar las dosis seguras y efectivas de estas fracciones en aplicaciones terapéuticas potenciales.

A)



B)

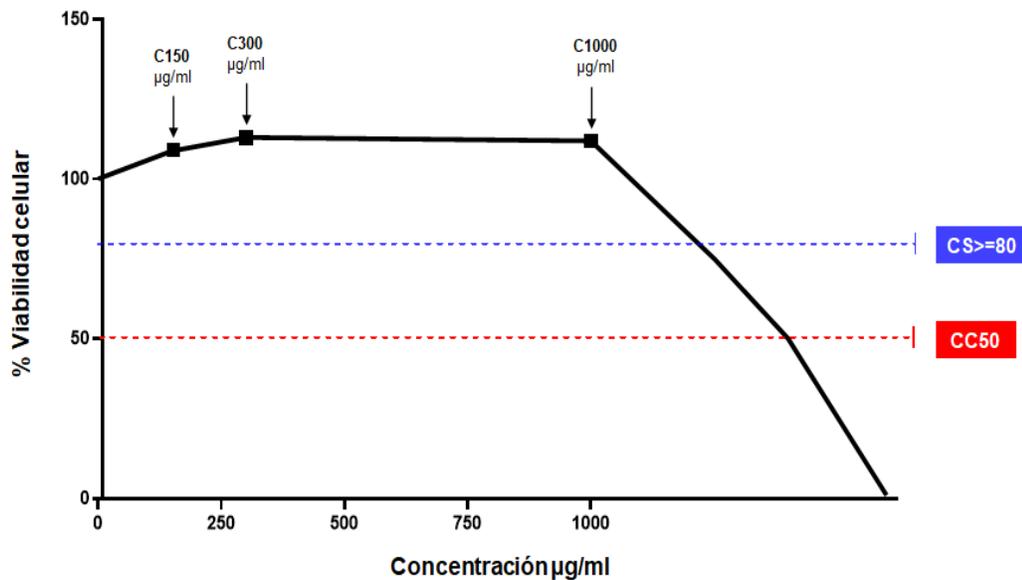
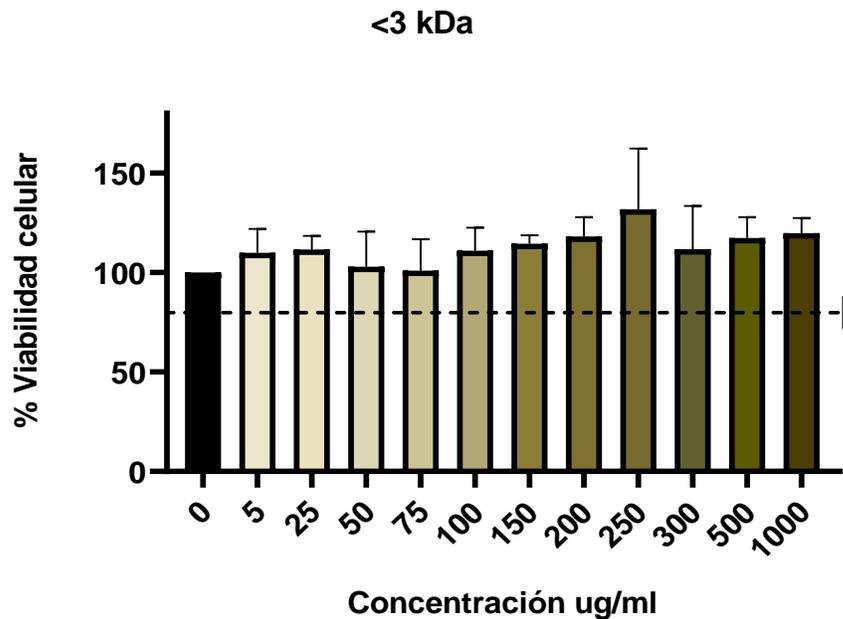


Figura 11. Viabilidad Celular con Hidrolizados Proteicos a Diferentes Concentraciones. (A) Viabilidad celular de Huh-7 tratadas con 4 fracciones de hidrolizado proteico en un rango de concentraciones de 5 a 1000 µg/ml. Se incluye una línea azul en el 80% de viabilidad como umbral seguro. (B) Viabilidad celular de Huh-7 expuestas a la fracción de 10-30 kDa a concentraciones de 150 y 300 µg/ml, con 1000 µg/ml como referencia. Se muestran líneas de seguridad (azul, 80%) y citotoxicidad (roja, 50%).

A)



B)

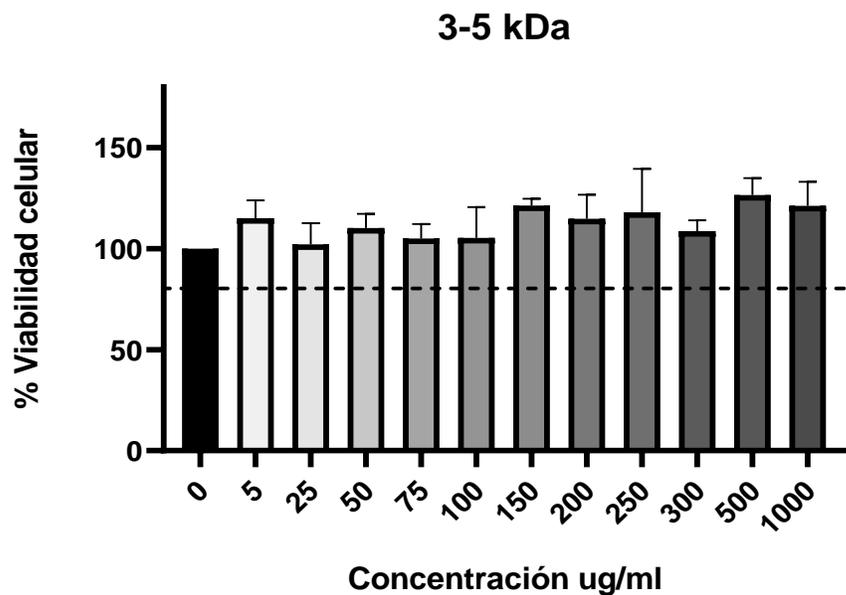
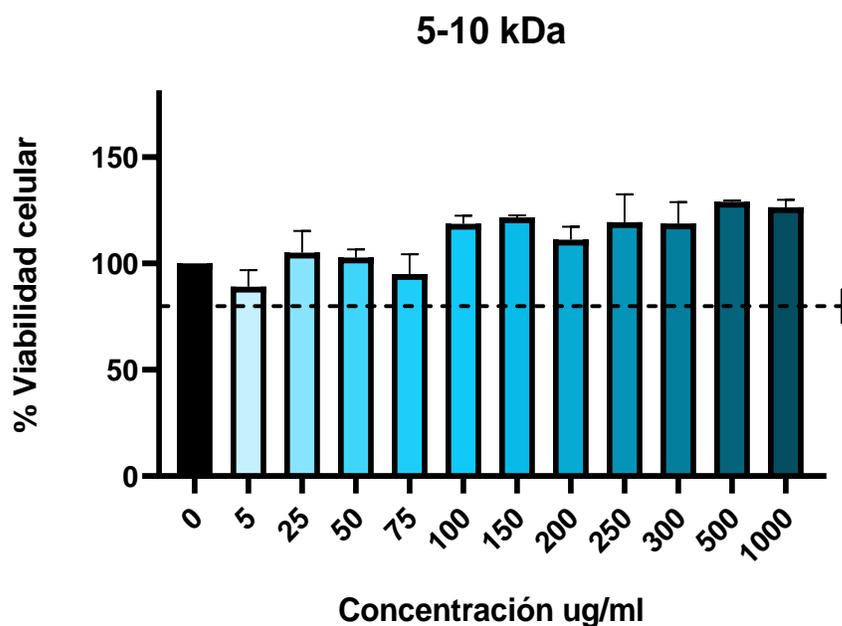


Figura 12. Viabilidad Celular a través de diferentes concentraciones del hidrolizado proteico de las fracciones <3 kDa y 3 – 5 kDa. Se evaluó la citotoxicidad inducida en células Huh-7 en un rango de concentración de 0 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ para péptidos de <3 kDa (A) y 3 – 5 kDa (B). La viabilidad celular se expresa como un porcentaje del control no tratado, indicando la ausencia de citotoxicidad significativa. Se incluye una línea horizontal en el 80% de viabilidad, marcando el umbral seguro. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes.

A)



B)

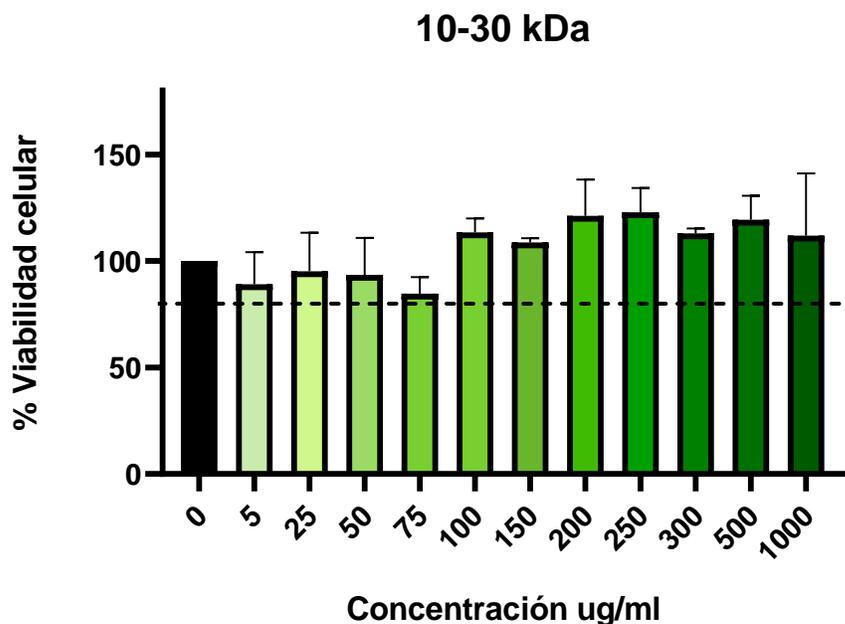


Figura 13. Viabilidad Celular a través de diferentes concentraciones del hidrolizado proteico de las fracciones 5 – 10 kDa y 10 – 30 kDa. Se evaluó la citotoxicidad inducida en células Huh-7 en un rango de concentración de 0 a 1000 µg/ml para péptidos de 5 – 10 kDa (A) y 10 – 30 kDa. La viabilidad celular se expresa como un % del control no tratado, indicando la ausencia de citotoxicidad significativa. Se incluye una línea horizontal en el 80% de viabilidad. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes.

9.4 Evaluación de la inhibición de DENV-2 por Citometría de Flujo

Se evaluó la actividad antiviral de las fracciones de péptidos derivados de *Phaeodactylum tricornutum* contra el DENV-2 por medio de citometría de flujo. Donde las células Huh-7 infectadas, fueron tratadas con péptidos de distintos pesos moleculares (<3 kDa, 3-5 kDa, 5-10 kDa y 10-30 kDa) en dos concentraciones (150 µg/ml y 300 µg/ml), y se cuantificó el porcentaje de células infectadas.

Analizando las gráficas de dispersión bidimensional o *dotplot*, se muestra la distribución de las células infectadas en comparación con las tratadas con los péptidos de *P. tricornutum* tanto con la concentración de 150 µg/ml (Figura 14) y 300 µg/ml (Figura 15). En las gráficas podemos ver el control celular de referencia (Figuras 14-A y 15-A), seguido del control de infección, donde se observó una alta cantidad de células positivas para la proteína Pre-M de dengue, marcada con el anticuerpo 2H2 conjugado con Alexa 488 (Figuras 14-B y 15-B). En contraste, las muestras tratadas con las fracciones de péptidos mostraron una reducción en la población de células infectadas (Figuras 14-C, 14-D, 15-C y 15-D), especialmente en las fracciones de mayor peso molecular; 10-30 kDa (Figuras 14-F y 15-F).

Para una mejor visualización y contraste de los resultados se hicieron comparaciones por medio de histogramas, comparando el control de la infección con las diferentes fracciones en ambas concentraciones de 150 y 300 µg/ml (Figura 16; A-D). En el control de infección, la población de células positivas para la proteína Pre-M mostró un pico significativo, indicando una alta infección. Al tratar con péptidos de 150 µg/ml, se observó una menor altura del pico de células infectadas, lo cual fue aún más pronunciado en la concentración de 300 µg/ml. De manera general, con este experimento se observó una disminución de la infección con las cuatro fracciones utilizadas y ambas concentraciones. Además, estos resultados podrían indicar que la inhibición de la infección es dependiente de la dosis de los péptidos.

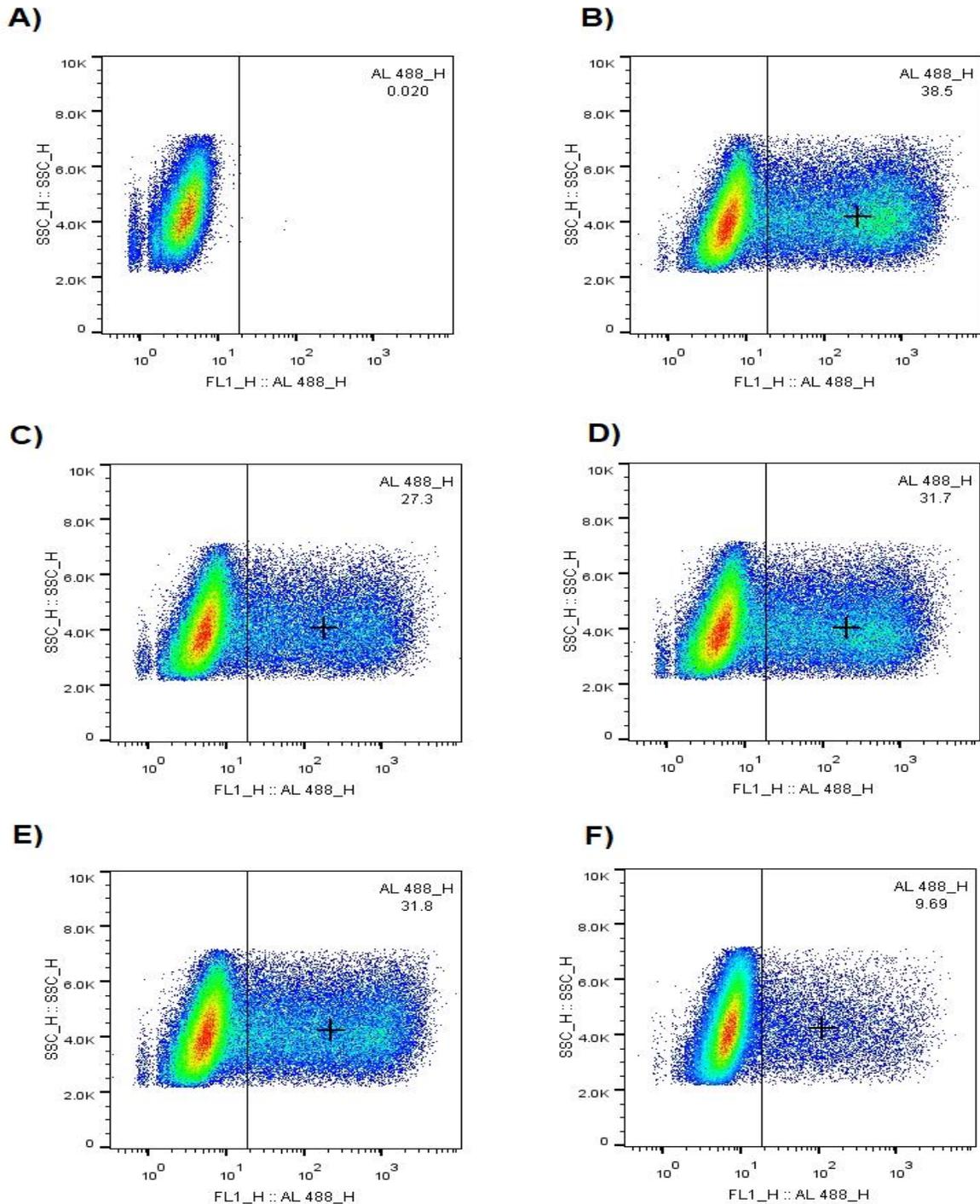


Figura 14. Inhibición de la infección por DENV-2 a 150 $\mu\text{g/ml}$ por fracción mediante citometría de flujo. Los dotplots representativos (A-F) muestran la respuesta de células infectadas Huh-7 con el virus del dengue serotipo 2 (DENV-2) frente a diferentes fracciones de hidrolizados proteicos a una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$. A: Mock (control negativo sin infección), B: Control de infección (infección con DENV-2 sin tratamiento), C-F: Fracciones 1 a 4 (<3 kDa, 3-5 kDa, 5-10 kDa y 10-30 kDa) de los hidrolizados proteicos.

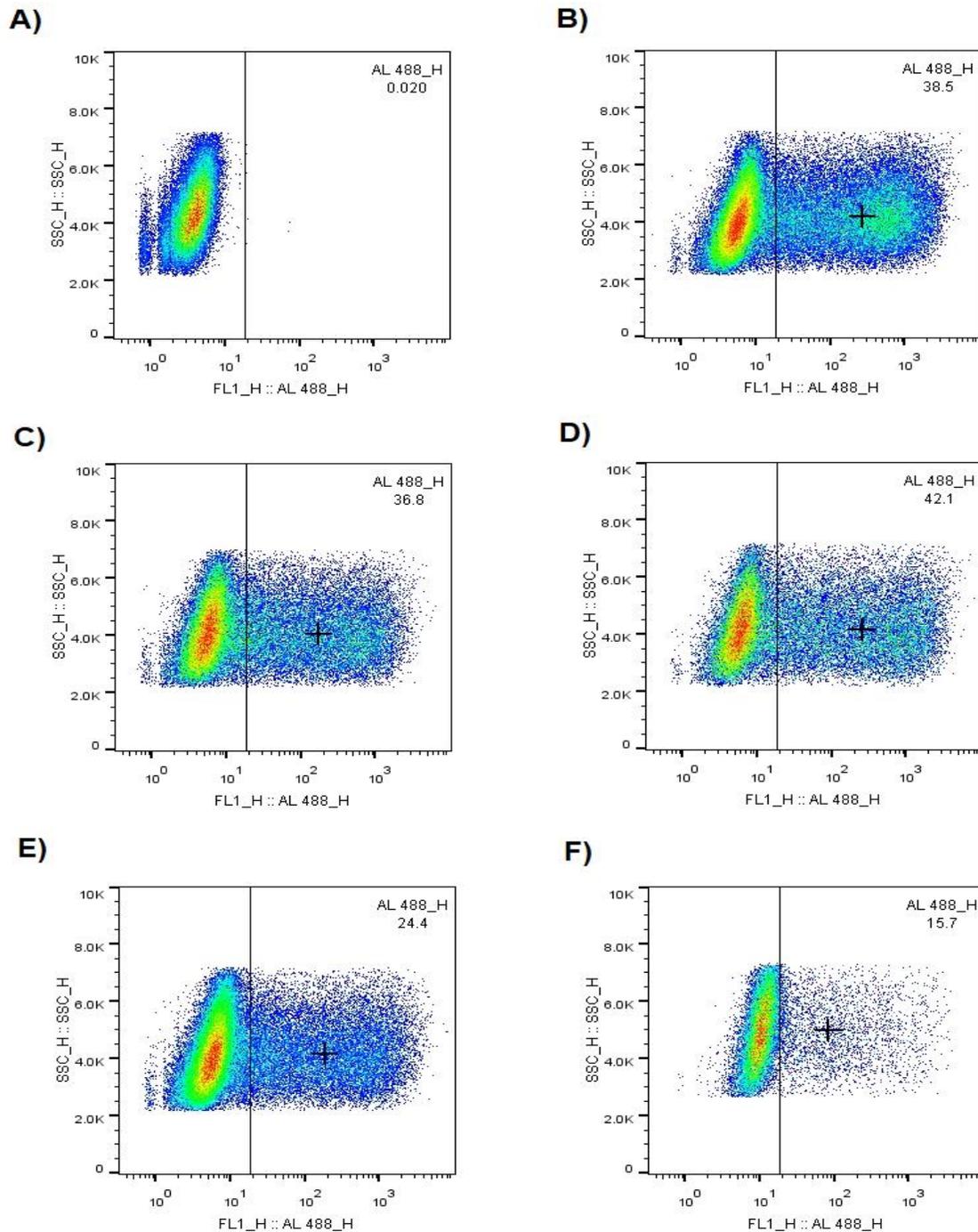


Figura 15. Inhibición de la infección por DENV-2 a 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por fracción mediante citometría de flujo. Los dotplots representativos (A-F) muestran la respuesta de células infectadas Huh-7 con el virus del dengue serotipo 2 (DENV-2) frente a diferentes fracciones de hidrolizados proteicos a una concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A: Mock (control negativo sin infección), B: Control de infección (infección con DENV-2 sin tratamiento), C-F: Fracciones 1 a 4 (<3 kDa, 3-5 kDa, 5-10 kDa y 10-30 kDa) de los hidrolizados proteicos.

En los histogramas A - D de la Figura 16 se muestra la comparación entre el control de la infección con los péptidos de las diferentes fracciones a concentraciones de 150 µg/ml y 300 µg/ml, respectivamente. Las fracciones de <3 kDa y 3-5 kDa presentaron una disminución modesta en comparación con el control de infección, mientras que las fracciones de 5-10 kDa y 10-30 kDa demostraron una reducción más significativa, indicando una correlación entre el tamaño del péptido y la eficacia antiviral.

Adicionalmente, las gráficas de barras mostraron el porcentaje de células infectadas a concentraciones de péptido de 150 y 300 µg/ml (Figura 17; A y B). El control de infección representa el 100% de células infectadas, con el que se normalizaron el resto de las muestras. Con la fracción de 10-30 kDa a 150 µg/ml, el porcentaje de células infectadas se redujo a 13.09%, y a 300 µg/ml, a 13.7%. Los resultados mostraron una reducción significativa en la infección celular al aumentar la concentración y el peso molecular del péptido, con diferencias estadísticamente significativas, contra el control, pero no entre concentración (**p<0.001, ****p<0.0001).

La tendencia se mantiene en ambas concentraciones, destacando que la fracción de 10-30 kDa mostró la mayor reducción en las tasas de infección. El análisis de ANOVA de dos vías indicó que no hubo interacción significativa entre el tamaño del péptido y la concentración (P=0.9996), sugiriendo que los efectos antivirales observados se deben al tamaño molecular de los péptidos en lugar de la concentración. El tamaño del péptido fue un factor significativo (P=0.0026), mientras que la concentración no afectó independientemente los resultados (P=0.7675).

Este análisis indica que los hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* tienen un efecto inhibitorio significativo sobre la infección por DENV-2, especialmente con péptidos de mayor peso molecular.

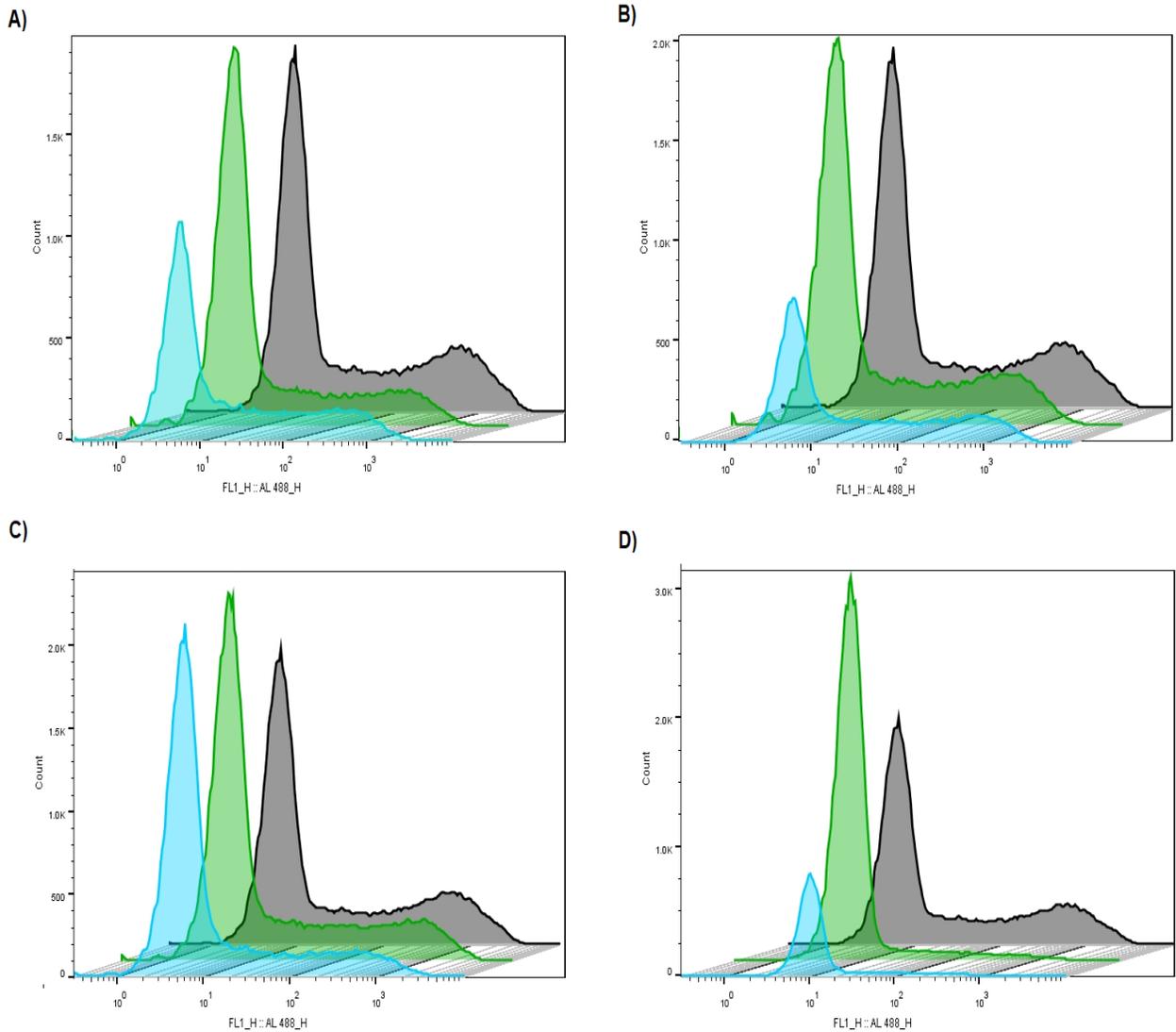
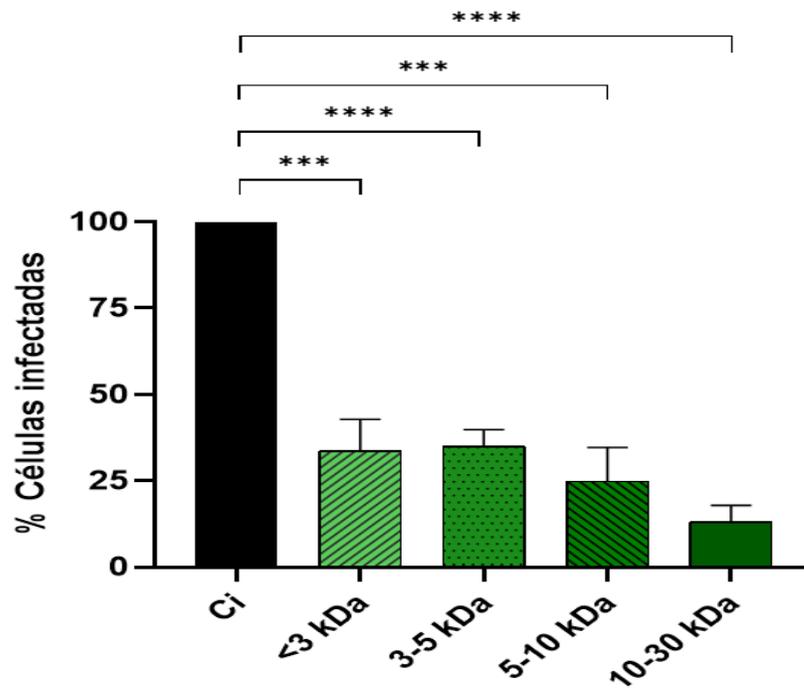


Figura 16. Eficacia de las fracciones de hidrolizado proteico en la inhibición de la infección por DENV-2 por citometría de flujo en histogramas. (A-D) Histogramas que muestran la distribución de células infectadas con DENV-2 en presencia de las diferentes fracciones de los hidrolizados proteicos a concentraciones de 150 µg/ml (color verde) y 300 µg/ml (color azul). Cada una incluye el control de infección (color negro) para comparación. Las fracciones son: (A) Fracción < 3 kDa, (B) Fracción 3-5 kDa, (C) Fracción 5-10 kDa, y (D) Fracción 10-30 kDa.

A)



B)

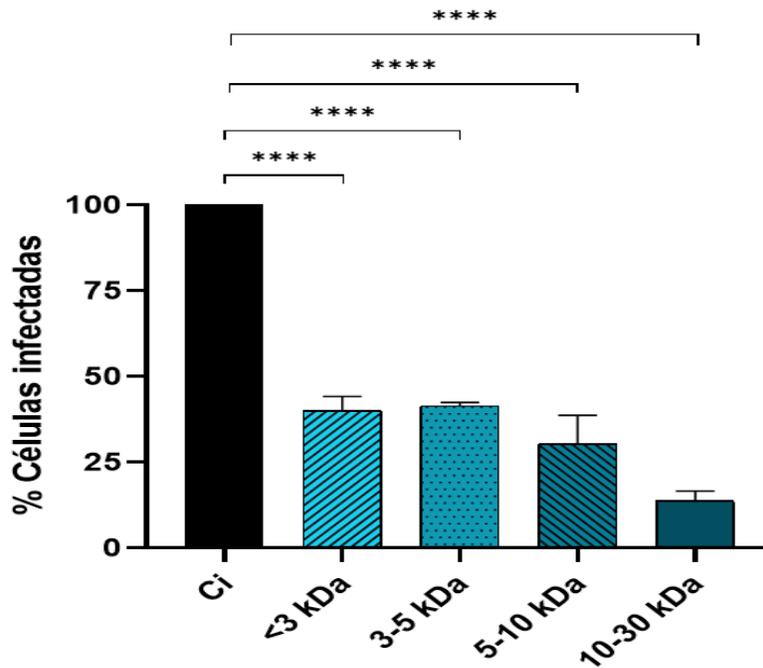


Figura 17. Eficacia de las fracciones de hidrolizado proteico en la inhibición de la infección por DENV-2 por citometría de flujo. A) y B) representa el porcentaje de células infectadas con DENV-2 tratadas con las cuatro fracciones de hidrolizados proteicos a una concentración de 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, comparadas y normalizadas con el control de infección, demostrando una reducción significativa de la infección al aumentar el peso molecular del péptido (** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

9.5 Eficacia de péptidos de diferentes pesos moleculares contra DENV-2 en Ensayos de formación de placa

Para confirmar los resultados que se obtuvieron a partir de la citometría de flujo, se evaluó el potencial antiviral de fracciones de péptidos contra el DENV-2 mediante ensayos de formación de placa.

En los paneles A y B (Figura 18) se observa la formación de placas líticas en cuatro diluciones diferentes para concentraciones de péptidos de 150 µg/ml y 300 µg/ml, respectivamente, con una reducción evidente observada para la fracción de 10-30 kDa en ambas concentraciones. Los ensayos de formación de placa realizados a una concentración de 150 µg/ml para las diferentes fracciones de péptidos exhibieron un efecto inhibitorio estratificado sobre la replicación viral.

La fracción de mayor peso molecular (10-30 kDa) mostró la mayor reducción en el título viral, sugiriendo una inhibición dependiente del tamaño del péptido. Es importante destacar que la reducción en el rendimiento viral fue sustancial y estadísticamente significativa, especialmente en la fracción de 10-30 kDa como se muestra en la Figura 18-C. Los porcentajes normalizados de reducción viral correspondientes subrayaron la eficacia elevada de la fracción de péptidos más grande (Figura 18-E), con una significancia estadística marcada ($p < 0.01$) en comparación con el control.

Al elevar la concentración a 300 µg/ml se mantuvo la tendencia inhibitoria, sin un aumento significativo en el efecto antiviral, lo que indica un posible umbral más allá del cual concentraciones adicionales no suprimen aún más el rendimiento viral. Como se ilustra en la Figura 18-D, las fracciones de péptidos continuaron demostrando actividad antiviral, con la fracción 10-30 kDa mostrando el efecto más pronunciado.

Esta observación fue corroborada por la normalización de las reducciones en el rendimiento viral (Figura 18-F), confirmando las propiedades antivirales sostenidas de los péptidos, especialmente en el rango de peso molecular más alto ($p < 0.01$).

Se realizó un ANOVA de dos vías para discernir la influencia de la concentración de péptidos en su eficacia antiviral.

El análisis mostró que no hubo un efecto de interacción significativo entre la concentración y el tamaño del péptido, ($p=0.7730$), lo que indica un efecto antiviral consistente en las concentraciones probadas. Esto fue especialmente cierto para el tamaño del péptido, que resultó ser un factor crítico en la disminución de la proliferación viral, con un efecto altamente significativo ($p=0.0002$). En contraste, las alteraciones en la concentración no influyeron significativamente en el resultado ($p=0.9546$), sugiriendo que la eficacia de los péptidos no respondió a la dosis dentro del rango probado.

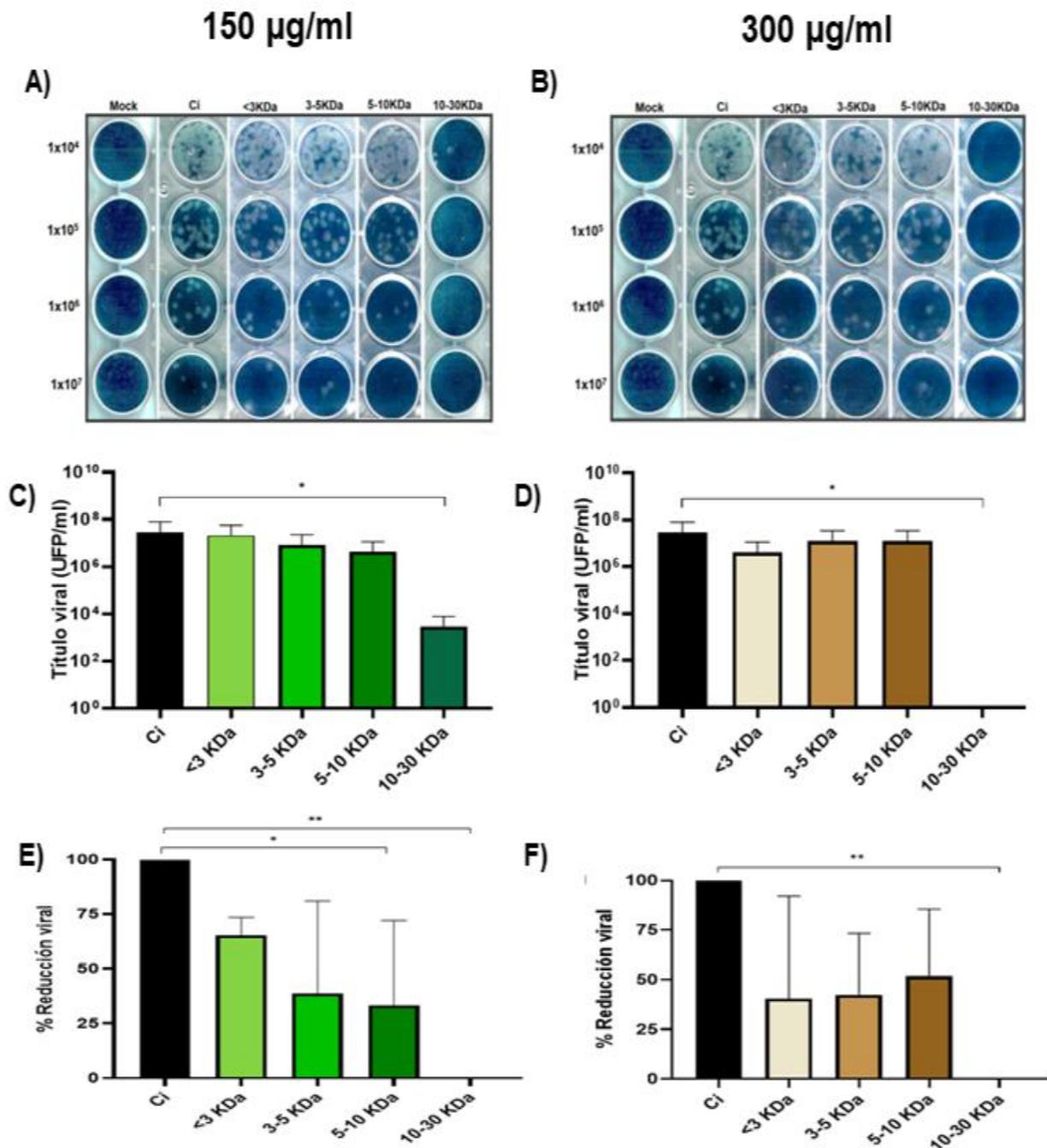


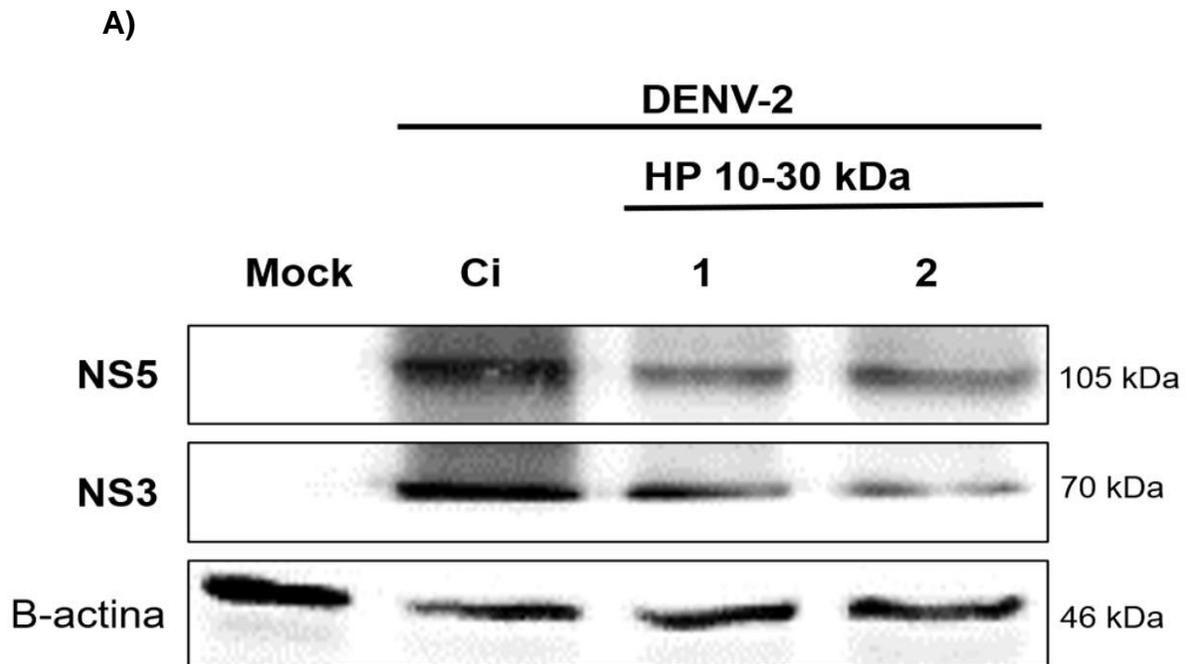
Figura 18. Eficacia antiviral de fracciones de péptidos contra el virus del dengue serotipo 2 en Ensayos de placas. Los paneles A, C y E presentan los títulos virales a concentraciones de péptidos de 150 µg/ml y 300 µg/ml, respectivamente, con reducciones en PFU/ml mayores para la fracción >10-30 KDa. Los paneles B, D y F muestran el porcentaje de reducción en la carga viral en estas concentraciones, normalizado contra el grupo de control de infección (IC). La significancia estadística se indica con asteriscos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Efecto del hidrolizado proteicos sobre la expresión de las proteínas NS5 y NS3.

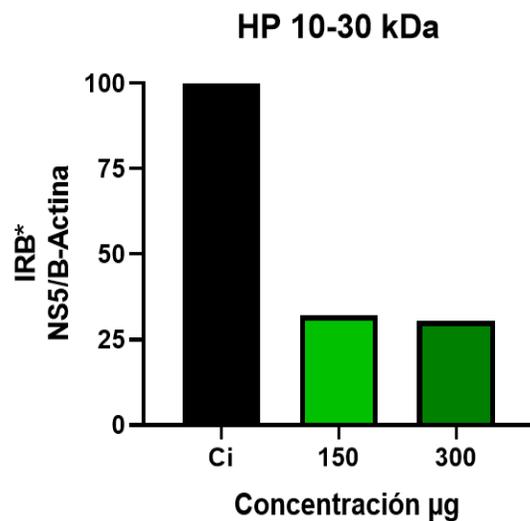
Se realizó un ensayo de Western blot para analizar el efecto del hidrolizado proteico sobre la expresión de las proteínas NS5 y NS3 del DENV, dos proteínas no estructurales clave en el ciclo viral del dengue. A partir del ensayo de infección y tratamiento, se utilizaron células tratadas con el hidrolizado proteico de 10-30 kDa a concentraciones de 150 µg/ml y 300 µg/ml, comparándolas con un control de infección y un mock (células no infectadas), dado que fue la fracción con mejor resultado en las pruebas de citometría de flujo y ensayo de formación de placa.

En la Figura 19-A, que muestra el gel de electroforesis del Western blot se observan bandas correspondientes a las proteínas NS5 y NS3 en las muestras tratadas y controles. Para asegurar la carga equitativa de las proteínas en el gel, como control de carga se utilizó beta-actina. Donde las bandas correspondientes a beta-actina confirmaron que se cargó una cantidad similar de proteína total en cada carril, validando así la comparación de la expresión de NS5 y NS3 entre las muestras. Las células tratadas con el hidrolizado proteico mostraron una reducción notable en la expresión de ambas proteínas comparadas con el control de infección. Este resultado sugiere una inhibición efectiva viral mediada por el hidrolizado proteico. No obstante, no se observaron diferencias significativas en la reducción de la expresión de NS5 y NS3 entre las dos concentraciones de tratamiento probadas (150 µg/ml y 300 µg/ml), aun así, ambas concentraciones son eficaces.

Además, se analizó a intensidad relativa de las bandas, representada en dos gráficas normalizadas contra el control de infección (Figura 19; B y C). La primera gráfica representa la expresión de NS5 normalizada y la segunda gráfica muestra la expresión de NS3 bajo las mismas condiciones. En ambos casos se evidencia una reducción significativa, a más del 50% en la expresión de las proteínas virales en las células tratadas con el hidrolizado proteico, reafirmando los resultados antes observados. El tratamiento con el hidrolizado proteico de 10-30 kDa a ambas concentraciones (150 µg/ml y 300 µg/ml) genera una reducción en la expresión de las proteínas no estructurales NS5 y NS3 del virus del dengue, sin diferencias significativas entre las dos dosis evaluadas.



B)



C)

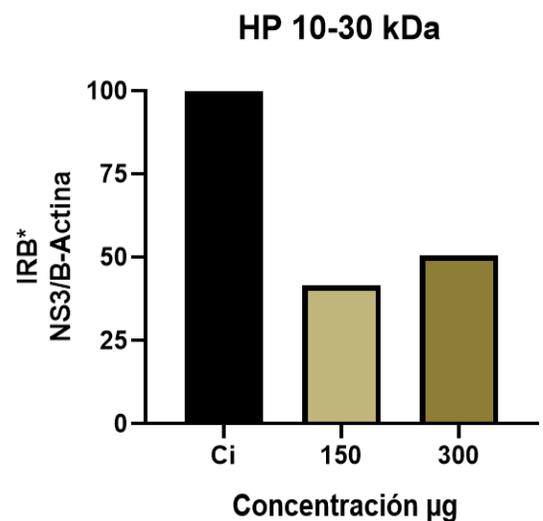


Figura 19. Análisis de la expresión de las proteínas NS5 y NS3 del DENV-2 mediante Western Blot. A) Expresión de NS5 y NS3 en células no infectadas (Mock), control de infección (Ci), y células tratadas con hidrolizado proteico de 10-30 kDa a concentraciones de 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El control de carga con beta-actina se muestra en la parte inferior del gel. B y C) Gráficas de la intensidad relativa de las bandas (IRB) de NS5 (B) y NS3 (C), normalizadas, mostrando una reducción significativa en la expresión de ambas proteínas virales en comparación con el control de infección.

X. DISCUSIÓN

La infección por el virus del dengue representa una preocupación significativa en la salud pública mundial debido a la ausencia de terapias y vacunas específicas para combatir la enfermedad. Desde su identificación, el DENV ha provocado brotes epidémicos en zonas tropicales y subtropicales, con afectación a millones de personas cada año (Asish *et al.*, 2023). Los enfoques tradicionales para controlar la propagación del dengue se han centrado principalmente en el control de los vectores, específicamente el mosquito *Aedes aegypti*. Sin embargo, la resistencia de estos mosquitos a los insecticidas químicos y su alta capacidad de adaptación (Flores, 2014) han limitado la eficacia de estas estrategias.

En este contexto, la búsqueda de nuevos compuestos antivirales, especialmente aquellos derivados de fuentes naturales, se ha vuelto una labor urgente. Los compuestos bioactivos derivados de microalgas han emergido como una alternativa prometedora con potencial actividad antiviral. Este estudio se centró en evaluar la actividad antiviral de los hidrolizados proteicos de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* contra el virus del dengue serotipo 2. No solo se buscó identificar el efecto inhibitorio de los péptidos en diversas etapas del ciclo viral, sino también explorar sus posibles mecanismos de acción, contribuyendo así al desarrollo de nuevas terapias que puedan ofrecer una alternativa efectiva en la lucha contra el dengue.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* poseen una notable actividad antiviral contra el DENV-2, lo cual puede estar relacionado con el hecho de utilizar péptidos en lugar de proteínas y por otro lado el tipo de enzima utilizada (Alcalasa, endoproteasa). Es importante mencionar que la alcalasa, ha demostrado ser una de las enzimas más eficientes en la liberación de péptidos con bioactividad a partir de diferentes fuentes proteicas (León-Espinosa, 2019; Villasante-Bravo, 2022). Se han reportado anteriormente que tiene la capacidad de generar péptidos bioactivos, con actividades como inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (Li *et al.*, 2006), antioxidante, antidiabéticas, antiinflamatorias, antimicrobianas, entre otras (Tacias-Pascacio, *et al.*, 2020).

Además, la Alcalasa, por ser una endoproteasa permite la generación de productos con péptidos más grandes que cuando se usan exoproteasas. Adicionalmente, se ha comprobado que los péptidos, incluso más que las proteínas, han presentado potencial para bioactividades que no se detectaban o se presentaban con menor intensidad en la proteína intacta (Tacias-Pascacio, *et al.*, 2020). Resaltando, que dependiendo el uso de la enzima para generar la hidrólisis enzimática se obtiene como resultado diferentes péptidos que pueden tener o no una bioactividad, como se reporta en el estudio por Afify *et al.*, 2018, que al utilizar tres enzimas diferentes (papaína, pepsina y tripsina) obtuvieron un rango de péptidos de 33 – 250 kDa y encontraron que solo aquellos derivados de dos enzimas tenían un efecto antiviral, por lo que usar una u otra enzima si tiene un impacto en su bioactividad.

Por otro lado, en este estudio se observó que la eficacia antiviral varía según el tamaño de la fracción proteica evaluada (<3 kDa, 3-5 kDa, 5-10 kDa y 10-30 kDa), destacando la fracción de mayor tamaño (10-30 kDa) como la más efectiva. Este resultado sugiere que el tamaño de los péptidos es un factor que determina su capacidad para interferir con la replicación viral. Específicamente, los péptidos dentro del rango de 10-30 kDa fueron los principales contribuyentes de la actividad antiviral observada. Aunque no se detectaron diferencias que fueran estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas, no se puede descartar la posibilidad de que la eficacia antiviral aumente con mayores concentraciones.

En esta investigación, se observó que los péptidos que tienen un peso molecular menor a 10 kDa no exhibieron actividad antiviral significativa. Este resultado puede atribuirse a varios factores. En primer lugar, debido a su menor tamaño, estos péptidos podrían contener una composición de aminoácidos más limitada, lo que podría reducir su capacidad para interferir con moléculas cruciales para la replicación viral o los sitios activos de proteínas con funciones críticas. Asimismo, la concentración utilizada en este estudio, hasta un máximo de 300 µg/ml, podría no haber sido suficiente para alcanzar el umbral necesario para manifestar actividad antiviral, como se ha visto en otros péptidos (Vilas-Boas, 2019). A concentraciones más bajas, es posible que las fracciones más pequeñas no logren inhibir efectivamente la infección viral.

Adicionalmente, existe la posibilidad de que los péptidos de menor tamaño sean más susceptibles a la desnaturalización o degradación rápida en condiciones celulares (Lee & Poh, 2023), lo cual podría disminuir su capacidad para interactuar eficazmente con las estructuras virales o los mecanismos celulares necesarios para combatir la infección.

En el presente trabajo, los resultados indican que el tamaño y la composición de los péptidos derivados de *Phaeodactylum tricornutum* juegan un papel crucial en su actividad antiviral, enfatizando la importancia de considerar dichos factores en el diseño y aplicación de futuros estudios y aplicaciones terapéuticas basadas en estos compuestos naturales.

Por otro lado, se confirmó que los péptidos obtenidos no presentan citotoxicidad en las células Huh-7 dentro del rango de concentraciones probadas (5 µg/ml a 1 mg/ml). Estos hallazgos son prometedores y sugieren que los hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* podrían ser seguros también *in vivo*, lo que refuerza su potencial para ser utilizados en futuras terapias antivirales. De esta manera, la ausencia de citotoxicidad *in vitro* significativa puede ser un indicador clave de seguridad que requiere evaluación en modelos *in vivo*, sin embargo, nos permite avanzar al siguiente nivel, lo cual es fundamental para el desarrollo de cualquier agente terapéutico (Zipperer *et al.*, 2022).

En este caso, el hecho de que los hidrolizados proteicos no causen daño a las células da pauta para ser utilizados a concentraciones conocidas efectivas sin riesgo de efectos adversos significativos. La actividad antiviral observada, aunado a la ausencia de citotoxicidad, sugiere que los hidrolizados proteicos de *Phaeodactylum tricornutum* pueden ser altamente específicos en su acción. Esto significa que los compuestos activos en los hidrolizados atacan directamente al virus o interfieren con procesos críticos en la replicación viral sin afectar los mecanismos celulares normales de las células huésped, lo que es ideal para un agente terapéutico.

Además, en un contexto terapéutico, la capacidad de utilizar el hidrolizado proteico sin efectos tóxicos notables permite su combinación con otros agentes antivirales (Gao *et al.*, 2021), lo que podría mejorar la eficacia general del tratamiento sin incrementar en gran medida el riesgo de toxicidad, por lo que podría ser considerado como un candidato potencial para estudios clínicos y terapias combinadas.

Para consideraciones futuras, comparado con otros agentes antivirales que pueden tener efectos secundarios tóxicos, los hidrolizados proteicos de *Phaeodactylum tricornutum* ofrecen una alternativa potencialmente más segura, lo que podría ser un factor importante en la adopción clínica. La seguridad es una consideración primordial en la aprobación de nuevos fármacos, y la ausencia de toxicidad celular significativa podría facilitar el proceso de aprobación regulatoria (Duarte, 2023).

También, cabe resaltar, que la baja toxicidad sugiere que el hidrolizado proteico podría ser viable para su uso en una amplia gama de poblaciones, incluidos niños, ancianos o individuos con condiciones preexistentes que podrían ser más vulnerables a los efectos secundarios tóxicos de otros tratamientos antivirales, lo cual es de suma importancia ya que el dengue afecta a la población en general, no obstante, puede tener mayores efectos en niños y adultos mayores (Rangel-Herrera, 2017).

Diversos estudios han reportado la actividad antiviral de péptidos y proteínas de múltiples tamaños, que van desde 1.38 a 11 kDa. Por ejemplo, Ayusso *et al.* (2023) describen un péptido dimérico de 1.38 kDa que inhibe diferentes etapas de la replicación de CHIKV y ZIKV, mientras que Conlon *et al.* (2014) y Benítez-Bolivar (2019) han documentado la eficacia del péptido Frenatina 2.3S de 1.5 kDa contra DENV-2.

Igualmente, Reyes-Barrera *et al.* (2021) reportaron un péptido bloqueador de entrada de 3.4 kDa contra el virus de la influenza A. También existen proteínas de bajo peso molecular como las lectinas de 9.4 – 9.7 kDa han demostrado efectos antivirales contra el virus del Ébola (Garrison *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2021), y la HRA2pl de 11 kDa ha mostrado eficacia contra Ortopneumovirus, Metapneumovirus y Rubulavirus humanos (Márquez-Escobar, 2015; Solis-Rodríguez, 2018).

Estos estudios indican que los péptidos antivirales pueden tener un amplio rango de tamaños efectivos, que varían según el virus objetivo y el mecanismo de acción.

En este contexto, los hallazgos indicaron que los péptidos que presentan un peso molecular comprendido entre 10 y 30 kDa presentan el efecto antiviral más destacado en comparación con las demás fracciones analizadas. Este intervalo de peso molecular sugiere que la actividad antiviral observada puede estar asociada con una combinación de péptidos de diferentes tamaños, los cuales podrían actuar de manera sinérgica para mejorar el efecto antiviral global, como ya se ha demostrado con otros péptidos (Anasir *et al.*, 2021). Los péptidos de mayor tamaño, que caen dentro de este rango, podrían tener la capacidad de interactuar con uno o varios sitios de unión o dominios funcionales en la superficie del virus.

Esta interacción múltiple estaría facilitando una inhibición más eficaz de las etapas críticas del ciclo replicativo, como la unión y la entrada en las células del huésped, así como la replicación viral. Además, estos péptidos más grandes pueden tener la habilidad de formar complejos o estructuras que interfieren de manera más eficiente con la maquinaria viral, aumentando así la efectividad de la respuesta antiviral. Otra posible explicación es la sinergia entre los péptidos, que implica que estos actúen de manera cooperativa, logrando un efecto antiviral que supera la combinación de los efectos de cada péptido. Es decir, los péptidos combinados pueden potenciarse mutuamente, lo que resulta en una actividad antiviral más robusta. Este fenómeno de sinergia ha sido documentado en investigaciones anteriores, que han demostrado que la combinación de múltiples péptidos suele ofrecer un rendimiento antiviral superior en comparación con la evaluación de péptidos de forma aislada (Jenssen *et al.*, 2004).

Al mismo tiempo, la presencia de diversos mecanismos de acción dentro de un rango específico de peso molecular podría permitir a estos péptidos atacar diversas etapas del ciclo viral simultáneamente. Esto no solo aumenta la probabilidad de inhibir efectivamente el virus, sino que también puede reducir el riesgo de que el virus genere resistencia a una sola estrategia antiviral.

Por lo tanto, la combinación de péptidos con diferentes tamaños y mecanismos de acción puede ser una estrategia efectiva para desarrollar terapias antivirales más robustas y resistentes, como ya se ha demostrado en SARS-CoV-2, donde la combinación de péptidos tiene un mejor resultado que al probarlos por separado (Han *et al.*, 2024).

Otro factor que puede influir en su efecto antiviral es su componente estructural. La composición química de los hidrolizados proteicos derivados de *Phaeodactylum tricornutum* abarca una amplia gama de aminoácidos esenciales y no esenciales, con un enfoque particular en la presencia de péptidos hidrosolubles (Afify *et al.*, 2018). Este perfil químico se debe en gran medida a la técnica de extracción de proteínas empleada, la cual se centra en la precipitación y recuperación de proteínas hidrosolubles. Posteriormente, estas proteínas son sometidas a un proceso de hidrólisis enzimática para obtener los péptidos.

Los péptidos hidrosolubles generados predominantemente contienen aminoácidos con características polares o cargadas, lo que facilita su modo de interactuar con las moléculas de agua. Entre los aminoácidos más abundantes en estos péptidos se encuentran aquellos que son polares, pero no cargados, como la serina y la treonina; así como los aminoácidos cargados positivamente, tales como la lisina, arginina e histidina, y los aminoácidos cargados negativamente, como el ácido glutámico y el ácido aspártico (Sørensen *et al.*, 2023).

La existencia de estos aminoácidos dentro de las secuencias de los péptidos confiere propiedades de solubilidad en agua, facilitando así su disolución en soluciones acuosas. Los aminoácidos polares y cargados tienen un rol importante en la mejora de la solubilidad de los péptidos en medios acuosos, ya que tienen el potencial para establecer enlaces de hidrógeno y otras interacciones que le favorecen con las moléculas de agua. Esta propiedad no solo mejora la solubilidad, sino que también potencia la capacidad de los péptidos para interactuar con su entorno acuoso, lo que puede influir en su funcionalidad y eficacia en aplicaciones biológicas y farmacológicas (Mavropoulou & Kosikowski, 1973).

La habilidad de los péptidos hidrosolubles para permanecer en solución y sus interacciones favorables con el medio acuoso son factores importantes que pueden afectar su actividad biológica y su potencial como agentes terapéuticos o funcionales en diversas aplicaciones industriales.

Los resultados obtenidos revelaron que los hidrolizados proteicos producidos exhiben una potente actividad antiviral contra el DENV-2. Este hallazgo es similar al encontrado en investigaciones previas, como la llevada a cabo por Afify *et al.* (2018), quienes demostraron que los hidrolizados proteicos derivados de la microalga *Scenedesmus obliquus*, mediante la acción de enzimas, también poseen actividad antiviral. Específicamente, en su estudio, observaron una significativa actividad antiviral contra CVB3, lo que subraya la versatilidad y el potencial terapéutico de los hidrolizados proteicos en la lucha contra diversas enfermedades virales. Estos hallazgos refuerzan la importancia de continuar explorando su uso como posibles agentes antivirales eficaces y seguros.

El mecanismo exacto mediante el cual los péptidos de *P. tricornutum* ejercen su efecto antiviral no está completamente claro y puede implicar múltiples vías (Anexo 1). Los péptidos antivirales emplean una variedad de mecanismos para combatir los virus, los cuales pueden ser de naturaleza física o química. Entre estos mecanismos, se incluye la capacidad de los péptidos para unirse a subunidades específicas del virus, lo que puede interferir con la estructura y funcionalidad del patógeno. Además, estos péptidos pueden interferir en la internalización del virus a las células del huésped, bloqueando así el primer paso en el ciclo de infección.

Otra estrategia importante es su interacción con las envolturas virales, donde pueden alterar la habilidad del virus para fusionarse con las membranas celulares del huésped. Estas diversas estrategias permiten que los péptidos antivirales actúen eficazmente contra una amplia gama de virus, proporcionando una defensa multifacética frente a las infecciones virales (Sumon *et al.*, 2021).

Por ejemplo, los péptidos podrían interferir directamente con la entrada del virus en la célula huésped. Se sabe que la interacción del virus con los receptores celulares es un paso crítico en la infección viral. Péptidos como el bloqueador de entrada (EB) expresado en *Chlamydomonas reinhardtii* han demostrado impedir la entrada del virus al acoplarse a las bolsas de unión de hemaglutinina, disminuyendo la afinidad por los receptores de ácido siálico (Reyes-Barrera, 2006; Reyes-Barrera *et al.*, 2021).

Otro ejemplo es el de Bosch y cols. (2004), que reportaron que los péptidos HR1 y HR2 presentan eficacia al unirse a la proteína de unión *Spike* del SARS-CoV, resultando en una inhibición significativa de la infección. Es posible que los péptidos de *P. tricornutum* ejerzan un efecto similar sobre las proteínas de unión del DENV o sus receptores celulares. Esta interacción (unión viral a receptores celulares), juega un papel crucial en las etapas de adhesión y replicación viral.

En el presente estudio, a pesar de que se implementó un enfoque de tratamiento post-infección, es importante destacar que esta estrategia no excluye la posibilidad de que los péptidos utilizados puedan interactuar con las proteínas de unión del virus del dengue o con los receptores ubicados en la membrana celular. Por lo que es conveniente una investigación más detallada sobre su efectividad y mecanismos de acción específicos en este contexto.

Además, la reducción significativa en la expresión de las proteínas no estructurales NS5 y NS3 del DENV-2 sugiere que los péptidos de *P. tricornutum* pueden interferir en procesos cruciales de la replicación viral. NS5, una proteína con actividad de polimerasa esencial para la replicación del genoma viral es una diana prometedora para el desarrollo de terapias antivirales debido a sus funciones esenciales y su alta conservación entre los serotipos del dengue.

La disminución de la expresión de NS5 observada podría indicar una inhibición directa de la síntesis de ARN viral, reduciendo así la producción de nuevos genomas virales y, por ende, la formación de nuevas partículas virales. Este mecanismo ha sido documentado en otros estudios, como el de Jang & Park (2016), donde un péptido derivado de *Spirulina maxima* inhibió la actividad de la transcriptasa inversa del VIH-1.

La inhibición de NS5 podría no solo bloquear la replicación viral, sino también mejorar la respuesta inmune del hospedero, ofreciendo una doble ventaja en el combate contra el dengue (Harapan *et al.*, 2020).

NS3, por su parte, es una proteasa vital para el procesamiento de poliproteínas virales y la replicación del virus. La reducción en los niveles de NS3 sugiere que los péptidos podrían estar interfiriendo con su actividad proteasa, afectando la maduración y ensamblaje de partículas virales. NS3 es un objetivo destacado para el desarrollo de agentes antivirales, ya que inhibir sus funciones proteasa y helicasa puede bloquear la replicación viral, subrayando su relevancia en el proceso de investigación y desarrollo de fármacos contra el dengue. La inhibición de proteasas virales por péptidos ha sido reportada anteriormente, como en el caso de péptidos cíclicos derivados de *Microcystis ichthyoblabe* que inhiben proteasas del virus de la influenza A (Zainuddin *et al.*, 2007).

Retomando el impacto de los péptidos con un peso molecular entre 10 y 30 kDa sobre las proteínas del virus, estos podrían tener la capacidad de interactuar con las proteínas del virus del dengue de manera efectiva debido a su tamaño, lo que les permitiría unirse más fácilmente a sitios específicos en estas proteínas. Las glicoproteínas estructurales del virus, como la prM (15 kDa) y la E (53 kDa), presentan sitios de unión y regiones críticas que podrían ser reconocidos y bloqueados por péptidos de tamaño adecuado. Esta capacidad de unión específica podría interferir con la formación de complejos virales funcionales, limitando así la habilidad del virus para infectar nuevas células.

Además de las glicoproteínas, las proteínas no estructurales como NS3 (70 kDa) y NS5 (103 kDa) poseen dominios funcionales que representan objetivos potenciales para los péptidos. Estas proteínas no estructurales están involucradas en procesos esenciales para la replicación viral, como la actividad enzimática. Los péptidos podrían interferir con estos procesos al unirse a sitios específicos en las proteínas, afectando su funcionalidad (Cordero *et al.*, 2022). Por ejemplo, los residuos básicos en estas proteínas pueden interactuar selectivamente con péptidos cargados negativamente, actuando como inhibidores competitivos.

Esta interacción podría resultar en la inhibición de la actividad catalítica de las proteínas, lo que afectaría negativamente las etapas posteriores del ciclo viral y reduciría la producción de nuevas partículas virales.

En investigaciones previas, se ha demostrado que ciertos péptidos y peptidomiméticos tienen la capacidad de interactuar con la proteasa NS2B-NS3 del DENV-2, un componente crucial para la maduración y replicación del virus (da Silva-Júnior & de Araújo-Júnior, 2019; Ji *et al.*, 2019). Estos estudios sugieren que los péptidos con las características adecuadas podrían cumplir una función significativa en la inhibición de la actividad de proteínas virales clave, ofreciendo una estrategia potencial para el desarrollo de terapias antivirales efectivas.

Otro enfoque, es que los péptidos bioactivos posiblemente influyen en otros aspectos del ciclo de vida del virus, como la replicación del DENV, que depende del colesterol celular. Los péptidos con efectos hipocolesterolémicos podrían inhibir indirectamente la replicación viral al alterar la composición de las balsas lipídicas en la membrana celular (Morales, 2023).

Diversas fuentes de péptidos bioactivos, como la soja, la B-Lactoglobulina, el hidrolizado de proteína derivado de carne de cerdo y la proteína vegetal (*Brassica carinata*), han demostrado tener efectos hipocolesterolémicos, los cuales se atribuyen principalmente a la regulación al alza de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la inhibición de la absorción del colesterol (Cánovas *et al.*, 2011). Dado que el colesterol celular es crucial para la replicación del DENV, sería conveniente investigar si los péptidos de *P. tricornutum* pueden influir en los niveles de colesterol celular y, por ende, en la replicación del DENV, ofreciendo un posible mecanismo de acción adicional en el presente estudio.

Actualmente, no existe otro estudio sobre la búsqueda de péptidos bioactivos a partir de microalgas contra el DENV. Los péptidos derivados *P. tricornutum*, que han demostrado tener un efecto inhibitorio sobre alguna de las etapas del DENV-2, ofrecen una alternativa como terapia para las infecciones, dado que no hay ni profilaxis ni fármacos específicos para curar la enfermedad (Blanco-Álvarez *et al.*, 2023).

Es crucial profundizar en el estudio de estos péptidos para determinar con precisión su secuencia y cómo interactúan con el ciclo viral. En el contexto más amplio de la terapia antiviral, los péptidos derivados de diversas fuentes naturales han demostrado una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo propiedades antimicrobianas, inmunomoduladoras, antioxidantes y antihipertensivas (Cánovas *et al.*, 2011). Aunque no se evaluó en esta investigación, la capacidad de los péptidos para modificar la respuesta inmunitaria del huésped no puede ser descartada.

Péptidos bioactivos han mostrado propiedades inmunomoduladoras (Guzmán *et al.*, 2003), y sería interesante investigar si los péptidos de *Phaeodactylum tricornutum* pueden modular la respuesta inmune para favorecer la eliminación del virus. Este mecanismo podría complementar los efectos directos sobre las proteínas virales y los receptores celulares.

Este estudio contribuye a la creciente evidencia de que los péptidos derivados de microalgas, como *P. tricornutum*, pueden ser una fuente valiosa de nuevos agentes antivirales. La eficacia observada de los péptidos de 10-30 kDa contra el DENV-2 destaca su potencial como componentes de futuras terapias antivirales.

Los resultados de la presente investigación indican que los hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* poseen una potente actividad antiviral contra el DENV-2, destacando la fracción de mayor tamaño como la más efectiva. Estos hallazgos no solo abren nuevas vías para la investigación y desarrollo de terapias basadas en péptidos, sino que también subrayan la importancia de explorar compuestos bioactivos que podrían tener aplicaciones significativas en la clínica frente a enfermedades virales para las cuales actualmente no existen tratamientos específicos.

XI. CONCLUSIONES

1. Los hidrolizados proteicos obtenidos de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* presentan una actividad antiviral significativa contra el virus del dengue serotipo 2.
2. La proteína de *P. tricornutum* es una fuente importante de péptidos antivirales contra el DENV-2 cuando se hidroliza con la proteasa Alcalasa
3. Las fracciones de hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* de 10 kDa – 30 kDa demostraron una capacidad notable para reducir el título viral de DENV-2, indicando su potencial para inhibir la replicación viral.
4. En contraste, las fracciones de hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* de <3 kDa, 3 – 5 kDa y 5 – 10 kDa, no mostraron actividad antiviral demostrable contra DENV-2.
5. Se observó una reducción significativa en el porcentaje de células infectadas por DENV-2 tras el tratamiento con fracciones de hidrolizados proteicos de 10 kDa – 30 kDa, lo que revela una disminución en la propagación viral en cultivos celulares.
6. Las fracciones de hidrolizados proteicos de 10 kDa – 30 kDa también reducen significativamente la expresión de las proteínas virales NS5 y NS3 en células Huh-7 infectadas por DENV-2, lo que indica que estos péptidos pueden interferir en etapas cruciales de la replicación viral, como la síntesis de ARN viral y la actividad proteasa.
7. Los resultados obtenidos sugieren que los hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* podrían representar una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevas terapias antivirales contra el dengue, motivando a realizar estudios adicionales para explorar a profundidad su mecanismo de acción y su eficacia en modelos animales.
8. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la viabilidad de explorar *Phaeodactylum tricornutum* como una fuente sostenible de compuestos bioactivos con aplicaciones antivirales, lo que podría contribuir al desarrollo de alternativas naturales y efectivas para el tratamiento de infecciones virales.

XII. PERSPECTIVAS

- Realizar espectrofotometría de masas para identificar las secuencias de péptidos con actividad antiviral contra el virus del dengue serotipo 2.
- Utilizar Docking Molecular para estudiar la interacción entre los péptidos identificados y posibles blancos virales, explorando así los mecanismos de acción.
- Aplicar análisis proteómico mediante iTRAQ para identificar las proteínas específicas con las que interactúan los péptidos antivirales generados.
- Realizar experimentos dirigidos a las diferentes etapas del ciclo replicativo del virus del dengue para determinar el punto en el cual los péptidos ejercen su efecto inhibitorio.
- Evaluar el efecto de los péptidos en un modelo *in vivo* para corroborar su actividad antiviral y su potencial aplicación terapéutica.
- Determinar si los péptidos obtenidos también exhiben actividad antiviral contra los serotipos 1, 3 y 4 del virus del dengue, ampliando así su espectro de acción.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J., Cid, Á., Fidalgo Paredes, P., Torres, E., & Herrero, C. (1995). Microalgas: Cultivo y aplicaciones. Universidad de la Coruña, Servizo de Publicacións. <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi journal of biological sciences*, 19(3), 257-275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Abril-Ibarra, Z. A. (2022). Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de extractos obtenidos de *Scenedesmus* sp. (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Carrera de Biotecnología).
- Afify, A. E. M. M., El Baroty, G. S., El Baz, F. K., Abd El Baky, H. H., & Murad, S. A. (2018). *Scenedesmus obliquus*: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 399-408. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.01.002>
- Aguilar, P. C., & Flórez-Castillo, J. M. (2020) Microalgas y sus aplicaciones biotecnológicas.
- Ahmad, A. L., Yasin, N. M., Derek, C. J. C., & Lim, J. K. (2011). Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 15(1), 584-593. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.09.018>
- Alavijeh, R. S., Tabandeh, F., Tavakoli, O., Karkhane, A., & Shariati, P. (2015). Enzymatic production of biodiesel from microalgal oil using ethyl acetate as an acyl acceptor. *Journal of Oleo Science*, 64(1), 69-74. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14103>
- Álvarez, M. D. R. S. (2007). Compuestos con actividad antibacteriana producidos por las microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum*.
- Amaro, H. M., Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2011). Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2, 1272-1284.
- Amaru-Chambilla, G. R., & Yujra Flores, E. (2023). Efecto de la microalga *Chlorella vulgaris* en el manejo de larvas y alevinos de *Orestias luteus* nativa del lago Titicaca, Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 25(2), 83-89. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2023.441>
- Anasir, M. I., Zarif, F., & Poh, C. L. (2021). Antivirals blocking entry of enteroviruses and therapeutic potential. *Journal of Biomedical Science*, 28, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00708-8>

- Ardila-Cáceres, C. A. (2022). Desarrollo de una pasta con salsa de queso incorporando la microalga espirulina máxima (*Chlorella Vulgaris*) como posible fuente de proteína y ácidos grasos. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12749/19169>
- Asish, P. R., Dasgupta, S., Rachel, G., Bagepally, B. S., & Kumar, C. P. G. (2023). Global prevalence of asymptomatic dengue infections-a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 134, 292-298. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.07.010>
- Ayusso, G. M., Lima, M. L. D., da Silva Sanches, P. R., Santos, I. A., Martins, D. O. S., da Conceição, P. J. P., ... & Rahal, P. (2023). The Dimeric Peptide (KKYRYHLKPF) 2K Shows Broad-Spectrum Antiviral Activity by Inhibiting Different Steps of Chikungunya and Zika Virus Infection. *Viruses*, 15(5), 1168. <https://doi.org/10.3390/v15051168>
- Baglieri, A., Sidella, S., Barone, V., Fragalà, F., Silkina, A., Nègre, M., & Gennari, M. (2016). Cultivating *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* microalgae to degrade inorganic compounds and pesticides in water. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 18165-18174. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6996-3>
- Becker, E. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press. 293 pp.
- Becker, E. W. (2013). Microalgae for aquaculture: nutritional aspects. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*, 671-691. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch36>
- Benavides, A. M. S. (2016). Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga *Chlorella sorokiniana*. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 265-275.
- Bencheikh, A., Mamache, W., Gharzouli, A., Kouachi, A., Khadidja, H., Daichi, M. B., & Rouag, N. (2022). Evaluation of the spirulina (*Arthrospira platensis* Gomont) antimicrobial activity. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 10(10), 2051-2055. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v10i10.2051-2055.5307>
- Benítez-Bolivar, P. A. (2019). Potencial efecto antiviral de un péptido antimicrobiano (Frenatina 2.3 s) contra el virus del Dengue-2. <http://hdl.handle.net/1992/44253>
- Benítez-Leite, S., Machi, M. L., Gibert, E., & Rivarola, K. (2002). Conocimientos, actitudes y prácticas acerca del dengue en un barrio de Asunción. *Revista chilena de pediatría*, 73(1), 64-72. <http://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062002000100013>
- Bhatt, P., Sabeena, S. P., Varma, M., & Arunkumar, G. (2021). Current understanding of the pathogenesis of dengue virus infection. *Current microbiology*, 78(1), 17-32. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02284-w>
- Blanco-Álvarez, R. M., & Labadie, S. H. C. (2023). Actualización acerca del diagnóstico y tratamiento del dengue en Cuba. *Revista 16 de abril*, 62, 1769. Disponible en: https://rev16deabril.sld.cu/index.php/16_04/article/view/1769

- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bohlin K. (1897). Zur Morphologie und Biologie einzelliger Algen. Distrito de Vetensk-Akad. Más adelante, *Stockh* 54: 507
- Bosch, B. J., Martina, B. E., Van Der Zee, R., Lepault, J., Haijema, B. J., Versluis, C., ... & Rottier, P. J. (2004). Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(22), 8455-8460. <https://doi.org/10.1073/pnas.040057610>
- Branco-Vieira, M., San Martin, S., Agurto, C., Freitas, M. A., Martins, A. A., Mata, T. M., & Caetano, N. S. (2020). Biotechnological potential of *Phaeodactylum tricornutum* for biorefinery processes. *Fuel*, 268, 117357. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117357>
- Cano, K. K. C., Rodríguez, K. G. B., Torres, J. E. J., & Espinoza, C. G. A. (2020). Morbimortalidad del dengue grave. *Recimundo*, 4(1), 183-191. [https://doi.org/10.26820/recimundo/4.\(1\).enero.2020.183-191](https://doi.org/10.26820/recimundo/4.(1).enero.2020.183-191)
- Cánovas, J. M., Rentero, P. Z., Martínez, A. M. C., Hernández, M. L., & Alemán, J. A. (2011). Péptidos bioactivos. Clínica e Investigación en Arteriosclerosis, 23(5), 219-227. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2011.04.004>
- Carbone, D. A., Pellone, P., Lubritto, C., & Ciniglia, C. (2021). Evaluation of microalgae antiviral activity and their bioactive compounds. *Antibiotics*, 10(6), 746. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060746>
- Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. H., & Rodríguez-Núñez, J. R. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 27(3), 337-352. <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972017000300337&lng=es&nrm=iso>.
- Castro, N. P., Flechas, M. C., Ocazonez, R., Stashenko, E., & Olivero-Verbel, J. (2015). Potential interaction of components from essential oils with dengue virus proteins. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(3), 141-155. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85638535001>
- CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*. (2024). Areas with Risk of Dengue. https://www.cdc.gov/dengue/areas-with-risk/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/dengue/areaswithrisk/around-the-world.html
- Cevallos-Ochoa, D. A., & Salazar Najera, D. E. (2020). Infección por virus Dengue y su relación con la trombocitopenia en pacientes del IESS de Quininde (Bachelor's thesis, Jipijapa. UNESUM).

- Chavarría-Cedeño, D. I. (2023). Dengue y sus complicaciones clínicas. *Revista Científica de Salud BIOSANA*, 3(6), 7-11. <https://soeici.org/index.php/biosana/article/view/31>
- Chediack, V., Blanco, M., Balasini, C., Juárez, P., González, A., Domínguez, C., ... & Cunto, E. (2021). Dengue grave. *RATI*, 38, e707. Disponible en: <https://revista.sati.org.ar/index.php/MI/article/view/707>
- Cirne-Santos, C. C., Barros, C. S., da Silva, A. C. R., Kurpan, D., Oliveira, W. D. S. C., Vasconcellos, B. M., ... & do Valle, A. F. (2024). *Arthrospira maxima* extract prevents and cures Zika virus infection: *In vitro* analysis with VERO cells. *Algal Research*, 79, 103479. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103479>
- Collazos-Vera, D. X., Macualo Mendivelso, C. D., Orjuela Orjuela, D. M., & Suárez Sánchez, A. V. (2017). Determinantes sociodemográficos y ambientales en la incidencia del dengue en Anapoima y La Mesa Cundinamarca 2007-2015.
- Colorado-Peralta, R., Rosete-Luna, S., Torres-Heredia, V. E., Rivera-Villanueva, J. M., Márquez-López, M. E., Campos-Nolazco, P. M., & Hernández-Romero, D. (2023). Tiazol y cobre: Dos grandes aliados con múltiples aplicaciones. *Medical Chemistry*.
- Conlon, J. M., Mechkarska, M., Radosavljevic, G., Attoub, S., King, J. D., Lukic, M. L., & McClean, S. (2014). A family of antimicrobial and immunomodulatory peptides related to the frenatins from skin secretions of the Orinoco lime frog *Sphaenorhynchus lacteus* (Hylidae). *Peptides*, 56, 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.03.020>
- Consuegra-Otero, A., Martínez Torres, E., & Castro Peraza, M. (2021). Comportamiento clínico y de laboratorio del choque por dengue en pacientes pediátricos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 73(1). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602021000100003&lng=es&tlng=pt.
- Contreras, M., Vásquez Guillén, A., Rincón, M. A., Moreira, R., & Callejas, D. (2021). Aspectos genéticos del virus del dengue. *QhaliKay Revista de Ciencias de la Salud* ISSN, 2588-0608. <https://doi.org/10.33936/qkracs.v5i2.3496>
- Cordero, J. E. M., Rosa, R. L., & García, M. V. (2022). Potencial antiviral en la algoterapia. *Revista Cubana de Medicina Física y Rehabilitación*, 14(1). Disponible en: <https://revrehabilitacion.sld.cu/index.php/reh/article/view/737>
- Crispín, F. V. S., Gordillo-Flores, R. E., Vila, G. S. M., Valenzuela, E. N. A., & Perales, A. N. Z. (2023). Inteligencia artificial aplicada en la prevención, detección y control del dengue. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 63, 189-200.
- Cunha, B. (2023). Evaluation of the antioxidant, antifungal and antigenotoxic properties of the microalga *Tetraselmis chuii* (Doctoral dissertation). Disponible en <https://hdl.handle.net/1822/85343>
- da Silva, M. F., Moura, Y. A. S., Porto, A. L. F., & Bezerra, R. P. (2023). Photosynthetic microorganisms as source of antioxidant and antibacterial bioactive compounds of

- interest in the food industry. *Revista Valore*, 8, 8053. <https://doi.org/10.22408/rev8020231069e-8053>
- da Silva-Júnior, E. F., & de Araújo-Júnior, J. X. (2019). Peptide derivatives as inhibitors of NS2B-NS3 protease from Dengue, West Nile, and Zika flaviviruses. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(18), 3963-3978. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.038>
- Dávila-Flores, P. S. (2019). Prevalencia del virus del dengue en fase de viremia en pacientes febriles del chaco chuquisaqueño del departamento de chuquisaca 2016-2017 (Master's thesis, Sucre: Universidad Andina Simón Bolívar, Sede Central Sucre). Disponible en <http://repositorio.uasb.edu.bo/handle/54000/753>
- De, S., Aamna, B., Sahu, R., Parida, S., Behera, S. K., & Dan, A. K. (2022). Seeking heterocyclic scaffolds as antivirals against dengue virus. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 240, 114576. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114576>
- De Melo, R. G., de Andrade, A. F., Bezerra, R. P., Viana Marques, D. D. A., da Silva, V. A., Paz, S. T., ... & Porto, A. L. F. (2019). Hydrogel-based *Chlorella vulgaris* extracts: a new topical formulation for wound healing treatment. *Journal of Applied Phycology*, 31, 3653-3663. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01837-2>
- de Oliveira-Júnior, R. G., Nicolau, E., Bonnet, A., Prunier, G., Beaugeard, L., Joguet, N., ... & Picot, L. (2020). Carotenoids from *Rhodomonas salina* induce apoptosis and sensitize A2058 melanoma cells to chemotherapy. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30(2), 155-168. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00036-2>
- Desbois, A. P., Lebl, T., Yan, L., & Smith, V. J. (2008). Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(4), 755-764. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1714-9>
- Diamond, M.S., Edgil, D., Roberts, T.G., Lu, B., Harris, E., 2000. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol*. 2000 Sep;74(17):7814-23. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.17.7814-7823.2000>
- Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., ... & Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. *Biomolecules*, 10(8), 1153. <https://doi.org/10.3390/biom10081153>
- Duarte, Y. M. S. (2023). "Análisis comparativo del marco regulatorio y de los requisitos para la obtención de registro sanitario de un medicamento genérico entre México Y Estados Unidos" (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Autónoma De México).
- Duda-Chodak, A. (2013). Impact of water extracts of *Spirulina* (WES) on bacteria, yeasts and molds. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 12(1), 33-40.
- Ebrahimi-Nigjeh, S., Yusoff, F. M., Mohamed Alitheen, N. B., Rasoli, M., Keong, Y. S., & Omar, A. R. B. (2013). Cytotoxic effect of ethanol extract of microalga, *Chaetoceros*

- calcitrans*, and its mechanisms in inducing apoptosis in human breast cancer cell line. *BioMed research international*, 2013(1), 783690. <https://doi.org/10.1155/2013/783690>
- Escobedo, M. J., & Calderón, A. C. (2021). Biomasa microalgal con alto potencial para la producción de biocombustibles. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 265-282. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.030>
- Espinoza-Orozco, C. R. (2022). Caracterización clínica y epidemiológica del Dengue severo en pacientes atendidos en el servicio de cuidados intensivos pediátricos del Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales en el período de junio 2019 a diciembre 2021 (Doctoral dissertation).
- Espinoza-Gallardo, D., Contreras-Porcía, L., & Ehrenfeld, N. (2017). β -glucanos, su producción y propiedades en microalgas con énfasis en el género *Nannochloropsis* (Ochrophyta, Eustigmatales). *Revista de biología marina y oceanografía*, 52(1), 33-49. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572017000100003>
- Ferraz, C. A. A., Grougnet, R., Nicolau, E., Picot, L., & de Oliveira Junior, R. G. (2022). Carotenoids from marine microalgae as antimelanoma agents. *Marine drugs*, 20(10), 618. <https://doi.org/10.3390/md20100618>
- Flores, A. E. (2014). Detección de resistencia a insecticidas en mosquitos con énfasis en *Aedes aegypti*. *Artrópodos y Salud*, 1(2), 21-36.
- Fu, W., Nelson, D. R., Yi, Z., Xu, M., Khraiwesh, B., Jijakli, K., ... & Salehi-Ashtiani, K. (2017). Bioactive compounds from microalgae: Current development and prospects. *Studies in natural products chemistry*, 54, 199-225. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63929-5.00006-1>
- Gao, B., Zhao, D., Li, L., Cheng, Z., & Guo, Y. (2021). Antiviral peptides with in vivo activity: Development and modes of action. *ChemPlusChem*, 86(12), 1547-1558. <https://doi.org/10.1002/cplu.202100351>
- Garrison, A. R., Giomarelli, B. G., Lear-Rooney, C. M., Saucedo, C. J., Yellayi, S., Krumpke, L. R., ... & O'Keefe, B. R. (2014). The cyanobacterial lectin scytovirin displays potent *in vitro* and *in vivo* activity against Zaire Ebola virus. *Antiviral research*, 112, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.09.012>
- George-Carrión, W., Bell Castillo, J., García Céspedes, M. E., & George Bell, M. D. J. (2018). Aspectos clínico-epidemiológicos en pacientes con dengue y signos de alarma. *Medisan*, 22(7), 540-551. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192018000700540&lng=es&nrm=iso
- Ginés, R. T., Montero, M. D. L. Á. L., & Trujillo, E. I. F. (2022). Características clínicas y métodos diagnósticos del dengue. *La Ciencia al Servicio de la Salud y la Nutrición*, 12(SISANH), 100-108. <http://dx.doi.org/10.47244/cssn.Vol12.IssSISANH.654>

- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of applied phycology*, 24, 1477-1486. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>
- Guadarrama-Peralta, V. (2023). Competencia larval interespecifica entre *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* bajo condiciones de laboratorio.
- Guillard, R. R., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian journal of microbiology*, 8(2), 229-239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Guzmán, M. A. G., & de Panqueba, D. S. (2023). Dengue en el Servicio de Urgencias: Puntos de buena práctica clínica. *RFS Revista Facultad de Salud*, 15(2), 136-160. <https://journalusco.edu.co/index.php/rfs/article/view/3907>
- Guzmán, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature reviews Disease primers*, 2(1), 1-25. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>
- Guzmán, S., Gato, A., Lamela, M., Freire-Garabal, M., & Calleja, J. M. (2003). Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytotherapy Research*, 17(6), 665-670. <https://doi.org/10.1002/ptr.1227>
- Han, T., Song, L., Niu, X., Qiu, M., Wang, Y., Wang, J., ... & Feng, Z. (2024). Synergistic peptide combinations designed to suppress SARS-CoV-2. *Heliyon*, 10(9). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30489>
- Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: a minireview. *Viruses*, 12(8), 829. <https://doi.org/10.3390/v12080829>
- Harun, R., Singh, M., Forde, GM., Danquah, MK. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14: 1037-1047. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.004>
- Hayashi, K., Asai, S., Umezawa, K., ... & Kawahara, T. (2022). Virucidal effect of monogalactosyl diacylglyceride from a green microalga, *Coccomyxa* sp. KJ, against clinical isolates of SARS-CoV-2 as assessed by a plaque assay. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1), e24146. <https://doi.org/10.1002/jcla.24146>
- Hernández-Ávila, M., Lazcano-Ponce, E., Hernández-Ávila, J. E., Alpuche-Aranda, C. M., Rodríguez-López, M. H., García-García, L., ... & Santos-Preciado, J. I. (2016). Análisis de la evidencia sobre eficacia y seguridad de la vacuna de dengue CYD-TDV y su potencial registro e implementación en el Programa de Vacunación Universal de México. *Salud Pública de México*, 58(1), 71-83.
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*. 49, 157-173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>

- Herrera, J. V. C., Bonifaz, M. A. T., Caluña, W. W. C., & Moran, M. R. T. (2020). Prevención y control del dengue durante la pandemia de Covid-19. *RECIMUNDO*, 4(4), 59-67. [https://doi.org/10.26820/recimundo/4.\(4\).octubre.2020.59-67](https://doi.org/10.26820/recimundo/4.(4).octubre.2020.59-67)
- Hou, C., Wu, L., Wang, Z., Sagner, E., & Zhang, D. (2019). Purification and identification of antioxidant alcalase-derived peptides from sheep plasma proteins. *Antioxidants*, 8(12), 592. <https://doi.org/10.3390/antiox8120592>
- Huang, Y., Cheng, J., Lu, H., He, Y., Zhou, J., & Cen, K. (2017). Transcriptome and key genes expression related to carbon fixation pathways in *Chlorella* PY-ZU1 cells and their growth under high concentrations of CO₂. *Biotechnology for biofuels*, 10, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0868-z>
- Huheihel, M., Ishanu, V., Tal, J., & Arad, S. M. (2002). Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*, 50(2-3), 189-200. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00186-5](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00186-5)
- Islam, M. N., Alsenani, F., & Schenk, P. M. (2017). Microalgae as a sustainable source of nutraceuticals. *Microbial functional foods and nutraceuticals*, 1-19. <https://doi.org/10.1002/9781119048961.ch1>
- Jang, I. S., & Park, S. J. (2016). A *Spirulina maxima*-derived peptide inhibits HIV-1 infection in a human T cell line MT4. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(1), 1-5. <https://doi.org/10.1186/s41240-016-0039-3>
- Jenssen, H., Andersen, J. H., Mantzilas, D., & Gutteberg, T. J. (2004). A wide range of medium-sized, highly cationic, α -helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. *Antiviral research*, 64(2), 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.08.003>
- Jessie, K., Fong, M. Y., Devi, S., Lam, S. K., & Wong, K. T. (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *The Journal of infectious diseases*, 189(8), 1411-1418. <https://doi.org/10.1086/383043>
- Ji, M., Zhu, T., Xing, M., Luan, N., Mwangi, J., Yan, X., ... & Jin, L. (2019). An antiviral peptide from *Alopecosa nagpaga* spider targets NS2B–NS3 protease of flaviviruses. *Toxins*, 11(10), 584. <https://doi.org/10.3390/toxins11100584>
- Jiménez-Camacho, R. (2022). Evaluación del efecto antiviral de diferentes análogos de metformina y fenformina en la infección por el virus del dengue (Master's thesis, Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular).
- Kang, S. Y., Kang, H., Lee, J. E., Jo, C. S., Moon, C. B., Ha, J., ... & Choi, J. (2020). Antiaging Potential of Fucoxanthin Concentrate Derived from *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Cosmetic Science*, 71(2). PMID: 32271708.

- Kok, Y. Y., Chu, W. L., Phang, S. M., Mohamed, S. M., Naidu, R., Lai, P. J., ... & Khoo, A. S. B. (2011). Inhibitory activities of microalgal extracts against Epstein-Barr virus DNA release from lymphoblastoid cells. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 12, 335-345. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1000336>
- Lee, M. F., & Poh, C. L. (2023). Strategies to improve the physicochemical properties of peptide-based drugs. *Pharmaceutical Research*, 40(3), 617-632. <https://doi.org/10.1007/s11095-023-03486-0>
- Lee, P. X., Ting, D. H. R., Boey, C. P. H., Tan, E. T. X., Chia, J. Z. H., Idris, F., ... & Alonso, S. (2020). Relative contribution of nonstructural protein 1 in dengue pathogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, 217(9). <https://doi.org/10.1084/jem.20191548>
- Lee, R. A., & Lavoie, J. M. (2013). From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*, 3(2), 6–11. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0010>
- Lehninger, A.L. (1995). Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función
León-Espinosa, E. B., Monterrosa, R. C., Ramírez, M. D., Guzmán, J. J., Garibay, M. G., de la Lama, G. M., ... & Amor, A. R. (2019). *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit and *Moringa oleifera* Lam: Especies con alto valor proteico para la liberación de péptidos bioactivos. *Agro Productividad*, 12(11). <https://doi.org/10.32854/agrop.vi0.1503>
- Lin, P. Y., Tsai, C. T., Chuang, W. L., Chao, Y. H., Pan, I. H., Chen, Y. K., ... & Wang, B. Y. (2017). *Chlorella sorokiniana* induces mitochondrial-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells and inhibits xenograft tumor growth *in vivo*. *BMC complementary and alternative medicine*, 17, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1611-9>
- Liu, J., Obaidi, I., Nagar, S., Scalabrino, G., & Sheridan, H. (2021). The antiviral potential of algal-derived macromolecules. *Current Research in Biotechnology*, 3, 120-134. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2021.04.003>
- Lizana-Retamal, A. R. (2014). Determinación de actividad antioxidante en *Arthrospira platensis* sometida a diversas concentraciones de CO₂ obtenido del proceso de fermentación del vino e indura: evaluación sensorial de una barrita de cereal elaborada con la microalga. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/130022>
- Llopiz, A. (2016). Compuestos bioactivos aislados de cianobacterias y microalgas: propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Bionatura*, 1(2), 79-88. <https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.02.8>
- López, E. D., & Alatorre, A. F. A. G. (2022). Dengue: actualidades y características epidemiológicas en México. *Revista Médica de la Universidad Autónoma de Sinaloa REVMEDUAS*, 9(3), 159-170.
- Luna, B. G. L. (2023). Dengue en adultos: diagnóstico, tratamiento y abordaje de situaciones especiales. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica*, 1(2), 71-

http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902016000100006&lng=es&nrm=iso

- Lupatini, A. L., Colla, L. M., Canan, C., & Colla, E. (2017). Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 724-732. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7987>
- Mackenzie, J. M., & Westaway, E. G. (2001). Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *Journal of virology*, 75(22), 10787-10799. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.22.10787-10799.2001>
- Malpartida, R., Aldana, L., Sánchez, K., Gómez, L., & Lobo, J. (2022). El valor nutricional y compuestos bioactivos de la Espirulina: Potencial suplemento alimenticio. *Ecuadorian Science Journal*, 6(1), 42-51. <https://doi.org/10.46480/esj.6.1.133>
- Márquez-Escobar, V. A. (2015). Evaluación *in vitro* de un péptido antiviral (HRA2pl) e *in vivo* de una proteína antigénica (hMPVpl) producidas en plantas contra el metapneumovirus humano. <http://hdl.handle.net/11627/4894>
- Martínez-Andrade, K. A., Lauritano, C., Romano, G., & Ianora, A. (2018). Marine microalgae with anti-cancer properties. *Marine drugs*, 16(5), 165. <https://doi.org/10.3390/md16050165>
- Martínez, J., Hernandez, J. C., & Urcuqui-Inchima, S. (2017). Role of dendritic cells in infection by dengue virus: targets for replication and immune response. *Revista Chilena de Infectología: Órgano Oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 34(3), 249-256. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182017000300007>
- Mavropoulou, I. P., & Kosikowski, F. V. (1973). Free amino acids and soluble peptides of whey powders. *Journal of dairy science*, 56(9), 1135-1138. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(73\)85322-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(73)85322-6)
- Mazur-Marzec, H., Cegłowska, M., Konkel, R., & Pyrc, K. (2021). Antiviral cyanometabolites—a review. *Biomolecules*, 11(3), 474. <https://doi.org/10.3390/biom11030474>
- Meneses, R., Torres, F. Á., Stashenko, E., & Ocazonez, R. E. (2009). Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 236-243. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=343835696005>
- Meng, F., Badierah, R. A., Almehdar, H. A., Redwan, E. M., Kurgan, L., & Uversky, V. N. (2015). Unstructural biology of the dengue virus proteins. *The FEBS journal*, 282(17), 3368-3394. <https://doi.org/10.1111/febs.13349>
- Mercier, A., Obadia, T., Carraretto, D., Velo, E., Gabiane, G., Bino, S., ... & Failloux, A. B. (2022). Impact of temperature on dengue and chikungunya transmission by the

- mosquito *Aedes albopictus*. *Scientific Reports*, 12(1), 6973. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10977-4>
- Miceli, M., Cutignano, A., Conte, M., Ummarino, R., Romanelli, A., Ruvo, M., ... & Ianora, A. (2019). Monoacylglycerides from the diatom *Skeletonema marinoi* induce selective cell death in cancer cells. *Marine drugs*, 17(11), 625. <https://doi.org/10.3390/md17110625>
- Michelon, W. (2021). Microalgae biomass from swine wastewater phycoremediation: metabolic profile and its potential applications.
- Miller, J. L., deWet, B. J. M., Martinez-Pomares, L., Radcliffe, C. M., Dwek, R. A., Rudd, P. M., & Gordon, S. (2008). The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS pathogens*, 4(2), e17. <https://doi.org/10.1371/annotation/98b92fca-fa6e-4bf3-9b39-13b66b640476>
- Monroy-Díaz, Y. P., Sosa Holguín, A. S., Ávila Ibáñez, A. I., Moros Andrade, L. J., & Bueno González, F. Y. (2018). Enfermedades transmitidas por vectores en el Departamento de Casanare como el Dengue.
- Montero, L., López-Expósito, I., Cediell, A. L., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2014). Extracción con líquidos presurizados para la obtención de fracciones antioxidantes y anti-inflamatorias a partir de la microalga *Isochrysis galbana*. <http://hdl.handle.net/10261/109528>
- Morales, F., & Noe, C. (2023). Estudio del efecto de la metformina durante la infección por Zika y dengue *in vitro* e *in vivo*.
- Morales, M. A. (2021). Reemergencia del Dengue en Argentina: identificación y análisis de determinantes virológicos y epidemiológicos con implicancia en la vigilancia laboratorial. <https://hdl.handle.net/11185/7109>
- MubarakAli, D., Praveenkumar, R., Shenbagavalli, T., Nivetha, T. M., Ahamed, A. P., Al-Dhabi, N. A., & Thajuddin, N. (2012). New reports on anti-bacterial and anti-candidal activities of fatty acid methyl esters (FAME) obtained from *Scenedesmus bijugatus* var. *bicellularis* biomass. *RSC advances*, 2(30), 11552-11556.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 578-597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
- Nakashima, A., Yamada, K., Iwata, O., Sugimoto, R., Atsuji, K., Ogawa, T., ... & Suzuki, K. (2018). β -Glucan in foods and its physiological functions. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 64(1), 8-17. <https://doi.org/10.3177/jnsv.64.8>
- Navarro-Archbold, L. M. (2015). Revisión de métodos desarrollados para evaluar aromaticidad en los compuestos heterocíclicos (*Doctoral dissertation*).
- Negreiros, G. C. L., Vásquez, S. R., & Hipólito, J. V. V. (2024). Características clínicas y situación epidemiológica del dengue en Perú: Una Revisión Sistemática. *Revista*

- del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 17(1).
<https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2024.171.2409>
- Neumann, U., Derwenskus, F., Flaiz Flister, V., Schmid-Staiger, U., Hirth, T., & Bischoff, S. C. (2019). Fucoxanthin, a carotenoid derived from *Phaeodactylum tricornutum* exerts antiproliferative and antioxidant activities *in vitro*. *Antioxidants*, 8(6), 183.
<https://doi.org/10.3390/antiox8060183>
- Neumann, U., Louis, S., Gille, A., Derwenskus, F., Schmid-Staiger, U., Briviba, K., & Bischoff, S. C. (2018). Anti-inflammatory effects of *Phaeodactylum tricornutum* extracts on human blood mononuclear cells and murine macrophages. *Journal of Applied Phycology*, 30, 2837-2846. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1352-7>
- Noisakran, S., Onlamoon, N., Songprakhon, P., Hsiao, H. M., Chokeyphaibulkit, K., & Perng, G. C. (2010). Cells in dengue virus infection *in vivo*. *Advances in virology*, 2010(1), 164878. <https://doi.org/10.1155/2010/164878>
- Norzagaray-Valenzuela, C.D. (2014). Caracterización funcional, nutracéutica y nutricosmética de las pastas proteínicas obtenidas a partir de cultivo de las microalgas *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis* sp. Y *Tetraselmis suecica*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Sinaloa.
- 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>
- OMS (2023). Dengue, región las américas. <https://www.who.int/es/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON475>
- OMS. (2024). Dengue y dengue grave. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- Ong, J., Aik, J., & Ng, L. C. (2021). Adult *Aedes* abundance and risk of dengue transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(6), e0009475. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009475>
- Oubiña, M., Augustovski, F., Pichon-Riviere, A., García Martí, S., Alcaraz, A., Bardach, A., & Ciapponi, A. (2017). Vacuna tetravalente CYD-TDV contra el Dengue.
- Pagarete, A., Ramos, A. S., Puntervoll, P., Allen, M. J., & Verdelho, V. (2021). Antiviral potential of algal metabolites—a comprehensive review. *Marine Drugs*, 19(2), 94. <https://doi.org/10.3390/md19020094>
- PAHO, Pan American Health Organization. (2022). Dengue en las Américas: Situación epidemiológica. Recuperado de <https://www.paho.org/es/temas/dengue>
- Pandey, R., & Kumar, G. (2017). A Comprehensive Review on Generations of Biofuels: Current Trends, Development and Scope. *International Journal on Emerging Technologies* (Special Issue NCETST-2017), 8(1), 561–565. www.researchtrend.net

- Penagos-Castañeda, C. E., Peña Salabarieta, L. V., Pinzón Jaramillo, S., Serna Enciso, A. D., Taborda Ipús, V., & Trujillo Ríos, L. N. (2022). Incidencia de infección por dengue en pacientes atendidos en la Clínica San Francisco de Tuluá entre los años 2018-2020 (*Bachelor's thesis, Medicina*). <http://hdl.handle.net/20.500.12993/4271>
- Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Current opinion in microbiology*, 11(4), 369-377. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>
- Pérez-Domínguez, M., Rojas, R., Bandeira, E., Requena, D., Ferreras, A. C., Triana, J. L., & Triana-Alonso, F. (2015). Traducción independiente de la estructura 5' cap del ARN genómico del virus dengue. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32, 11-18.
- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. *Nature microbiology*, 5(6), 796-812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
- Pittman, J. K., Dean, A. P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1), 17– 25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>
- Pizarro-Gonzaga, Y. T., & Vila-Paucar, K. D. (2023). Factores de Riesgo Asociados a la Infección por Dengue con Signos de Alarma en un Hospital de la Selva Central, 2022. <http://hdl.handle.net/20.500.12894/8976>
- Ponce-López, E. (2013). Superalimento para un mundo en crisis: Spirulina a bajo costo. *Idesia (Arica)*, 31(1), 135-139. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292013000100016>
- Portero, P. C. (2023). Virus dengue atenuados (▼ Qdenga®) en prevención del dengue. *Panorama actual del medicamento*, 47(467), 1083-1089.
- Povoa, T. F., Alves, A. M., Oliveira, C. A., Nuovo, G. J., Chagas, V. L., & Paes, M. V. (2014). The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PloS one*, 9(4), e83386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083386>
- Pujar, G. V., Sethu, A. K., Bhagyalalitha, M., & Singh, M. (2021). Dengue structural proteins as antiviral drug targets: Current status in the drug discovery & development. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 221, 113527. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113527>
- Quevedo, C., Morales, S. P., & Acosta, A. (2008). Crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae*, 15(1), 25-31.
- Raafat, N., Blacksell, S. D., & Maude, R. J. (2019). A review of dengue diagnostics and implications for surveillance and control. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 113(11), 653-660. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz068>

- Rajkumar, R., & Yaakob, Z. (2013). The biology of microalgae. *Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products*, 7-16.
- Ramos, C., García, H., & Jorge, M. (1993). Fiebre hemorrágica y síndrome de choque por dengue. *Salud pública de México*, 35(1), 39-55. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10635105>
- Rangel-Herrera, M. V. (2017). Cuidados de enfermería en pacientes pediátricos hospitalizados con dengue en el servicio de emergencia pediátrica del hospital III José Cayetano Heredia, Piura 2014—2016. <https://hdl.handle.net/20.500.12952/5068>
- Reyes-Hernández, M. (2022). Caracterización clínica del dengue y factores de severidad en pacientes pediátricos del hospital Napoleón franco pareja de la ciudad de Cartagena de indias, Colombia (*Doctoral dissertation*, Universidad de Cartagena). <http://dx.doi.org/10.57799/11227/12349>
- Reyes-Barrera, K. L., Soria-Guerra, R. E., López-Martínez, R., Huerta, L., Salinas-Jazmín, N., Cabello-Gutiérrez, C., & Alpuche-Solís, Á. G. (2021). The entry blocker peptide produced in *Chlamydomonas reinhardtii* inhibits influenza viral replication *in vitro*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 641420. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.641420>
- Ribeiro, M. C. M., Salles, T. S., Moreira, M. F., Barbarino, E., do Valle, A. F., & Couto, M. A. P. G. (2022). Antiviral activity of microalgae extracts against Mayaro virus. *Algal Research*, 61, 102577. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102577>
- Roa-Linares, V. C., Brand, Y. M., Agudelo-Gomez, L. S., Tangarife-Castaño, V., Betancur-Galvis, L. A., Gallego-Gomez, J. C., & González, M. A. (2016). Anti-herpetic and anti-dengue activity of abietane ferruginol analogues synthesized from (+)-dehydroabietylamine. *European journal of medicinal chemistry*, 108, 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.009>
- Roblet, C., Amiot, J., Lavigne, C., Marette, A., Lessard, M., Jean, J., ... & Bazinet, L. (2012). Screening of *in vitro* bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiral-wound ultrafiltration membranes. *Food Research International*, 46(1), 237-249. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.014>
- Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences*, 67, 2773-2786. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z>
- Romero, D. C. V., Cardozo, A. P., & Montes, V. D. (2022). Utilización de microalgas como alternativa para la remoción de metales pesados. *RIAA*, 13(1), 10.
- Rosa, A., Deidda, D., Serra, A., Deiana, M., Dessi, M. A., & Pompei, R. (2005). Omega-3 fatty acid composition and biological activity of three microalgae species. *J Food Agric Environ*, 3(2), 120-124.

- Ruiz-Alonso, B. (2021). Producción de aceite rico en ácidos grasos omega-3 a partir de microalgas y sustratos residuales (*Bachelor's thesis*). <http://hdl.handle.net/10498/25816>
- Saad, M. G., Dosoky, N. S., Zoromba, M. S., & Shafik, H. M. (2019). Algal Biofuels: Current Status and Key Challenges. *Energies*, 12(10), 1920. <https://doi.org/10.3390/en12101920>
- Sachin-Powar, R., Singh Yadav, A., Siva Ramakrishna, C., Patel, S., Mohan, M., Sakharwade, S. G., Choubey, M., Kumar Ansu, A., & Sharma, A. (2022). Algae: A potential feedstock for third generation biofuel. *Materials Today: Proceedings*, 63, A27–A33. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.07.161>
- Safi, C., Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 3, 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.12.004>
- Salvi, F. I., Da Silveira, N. M., Busato, M. A., Júnior, W. A. R., & Lutinski, J. A. (2021). Percepções de agentes de combate a endemias e da população quanto aos fatores que influenciam na proliferação do mosquito *Aedes aegypti*. *Revista Sustinere*, 9(1), 125-144. <https://doi.org/10.12957/sustinere.2021.48136>
- Sanabria, L., Segovia, E. A., González, N., Alcaraz, P., & Vera de Bilbao, N. (2009). Actividad larvicida de extractos vegetales acuosos en larvas de *Aedes aegypti* (primeros ensayos). *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 7(2), 26-31.
- Sánchez-Montero, J. M. (2009). Compuestos orgánicos volátiles en el medio ambiente. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Santaella, A. M. (2021). Caracterización de las prácticas y actitudes de los estudiantes del pre-internado e internado de la carrera de medicina de la Universidad Iberoamericana sobre los virus del dengue, zika y chikungunya en la República Dominicana (*Doctoral dissertation*, Santo Domingo: Universidad Iberoamericana (UNIBE)). <https://repositorio.unibe.edu.do/jspui/handle/123456789/1097>
- Santos, A. M., Martín-Sastre, C., & González-Arechavala, Y. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. *Anales de Mecanica y Electricidad*. <https://www.iit.comillas.edu/docs/IIT-14-027A.pdf>
- Sathasivam, R., & Ki, J. S. (2018). A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. *Marine drugs*, 16(1), 26. <https://doi.org/10.3390/md16010026>
- Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Yacoub, S., & Roberts, C. (2015). New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature Reviews Immunology*, 15(12), 745-759. <https://doi.org/10.1038/nri3916>

- Shaieb, F. A., Issa, A. A., & Meragaa, A. (2014). Antimicrobial activity of crude extracts of cyanobacteria *Nostoc commune* and *Spirulina platensis*. *Archives of Biomedical Sciences*, 2(2), 34-41.
- Shrivastava, G., Valenzuela Leon, P. C., & Calvo, E. (2020). Inflammasome fuels dengue severity. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 489. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00489>
- Silva, T., Salomon, P. S., Hamerski, L., Walter, J., Menezes, R. B., Siqueira, J. E., ... & Miranda, M. (2018). Inhibitory effect of microalgae and cyanobacteria extracts on influenza virus replication and neuraminidase activity. *PeerJ*, 6, e5716. <https://doi.org/10.7717/peerj.5716>
- SINAVE, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2023). Informe anual de casos de dengue 2022. Secretaría de Salud, México.
- Solis-Rodríguez, M. (2018). Análisis *in vitro* del péptido antiviral HRA2pl producido en tabaco, contra Ortopneumovirus y Rubulavirus humanos (Master's thesis). <http://hdl.handle.net/11627/3253>
- Sørensen, M., Kousoulaki, K., Hammerø, R., Kokkali, M., Kleinegris, D., Marti-Quijal, F. J., ... & Kiron, V. (2023). Mechanical processing of *Phaeodactylum tricornutum* and *Tetraselmis chui* biomass affects phenolic and antioxidant compound availability, nutrient digestibility and deposition of carotenoids in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 569, 739395. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739395>
- Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Cervantes-Salazar, M., Angel-Ambrocio, A. H., & Del Angel, R. M. (2017). DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation: A potential antiviral target. *PLoS pathogens*, 13(4), e1006257. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006257>
- St. John, A. L., & Rathore, A. P. (2019). Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections. *Nature Reviews Immunology*, 19(4), 218-230. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0123-x>
- Steidinger, K. A., & Garccés, E. (2006). Importance of life cycles in the ecology of harmful microalgae. In *Ecology of harmful algae* (pp. 37-49). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-32210-8_4
- Sumon, T. A., Hussain, M. A., Hasan, M., Rashid, A., Abualreesh, M. H., Jang, W. J., ... & Hasan, M. T. (2021). Antiviral peptides from aquatic organisms: Functionality and potential inhibitory effect on SARS-CoV-2. *Aquaculture*, 541, 736783. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736783>
- Tarazona-Díaz, M. P. (2018). La espirulina una oportunidad como alimento funcional. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12010/8816>
- Tejeda-Benítez, L., Henao-Argumedo, D., Alvear-Alayón, M., & Castillo-Saldarriaga, C. R. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Revista facultad de ingeniería*, 24(39), 43-54.

- Tuiskunen-Bäck, A., & Lundkvist, Å. (2013). Dengue viruses—an overview. *Infection ecology & epidemiology*, 3(1), 19839. <https://doi.org/10.3402/iee.v3i0.19839>
- Tully, D., & Griffiths, C. L. (2021). Dengvaxia: The world's first vaccine for prevention of secondary dengue. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, 9, 25151355211015839. <https://doi.org/10.1177/25151355211015839>
- van der Schaar, H. M., Rust, M. J., Chen, C., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X., & Smit, J. M. (2008). Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS pathogens*, 4(12), e1000244. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000244>
- van der Schaar, H. M., Rust, M. J., Waarts, B. L., van der Ende-Metselaar, H., Kuhn, R. J., Wilschut, J., ... & Smit, J. M. (2007). Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *Journal of virology*, 81(21), 12019-12028. <https://doi.org/10.1128/jvi.00300-07>
- Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33-43. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70074-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70074-1)
- Velandia, S. A., Rueda, E. Q., Rondon-Villarreal, P., Silva, L. M., Stashenko, E. E., & Ocazonez, R. E. (2023). Aceite esencial de *Cordia curassavica* (Jacq) Roem. & Schult: evaluación *in vitro* e *in silico* del efecto sobre la replicación del virus dengue y la producción de citoquinas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 22(6), 848-863. <https://doi.org/10.37360/blacpma.23.22.6.57>
- Velázquez-Lucio, J., Rodríguez-Jasso, R. M., Colla, L. M., Sáenz-Galindo, A., Cervantes-Cisneros, D. E., Aguilar, C. N., ... & Ruiz, H. A. (2018). Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review. *Biofuel Research Journal*, 5(1), 780-791. <https://doi.org/10.18331/BRJ2018.5.1.5>
- Vilas-Boas, L. C. P., Campos, M. L., Berlanda, R. L. A., de Carvalho Neves, N., & Franco, O. L. (2019). Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76, 3525-3542. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03138-w>
- Villasante-Bravo, N. (2022). Purificación de péptidos bioactivos, con actividades antioxidante, antihipertensiva e hipoglucemiante *in vitro*, a partir del Tarwi (*Lupinus mutabilis*). <https://hdl.handle.net/20.500.12996/5561>
- Wan, S. W., Lin, C. F., Wang, S., Chen, Y. H., Yeh, T. M., Liu, H. S., ... & Lin, Y. S. (2013). Current progress in dengue vaccines. *Journal of biomedical science*, 20, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-37>
- WHO, World Health Organization. (2024). Dengue and severe dengue. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

- Wu, S. J. L., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J. R., Brachtel, E., Putvatana, R., ... & Frankel, S. S. (2000). Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature medicine*, 6(7), 816-820. <https://doi.org/10.1038/77553>
- Xie, X., Zou, J., Zhang, X., Zhou, Y., Routh, A. L., Kang, C., ... & Shi, P. Y. (2019). Dengue NS2A protein orchestrates virus assembly. *Cell host & microbe*, 26(5), 606-622. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.09.015>
- Yadav, N., & Singh, D. P. (2020). Microalgae and microorganisms: Important regulators of carbon dynamics in wetland ecosystem. *Restoration of Wetland Ecosystem: A Trajectory Towards a Sustainable Environment*, 179-193. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7665-8_12
- Yu, I. M., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., ... & Chen, J. (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*, 319(5871), 1834-1837. <https://doi.org/10.1126/science.1153264>
- Zainuddin, E. N., Mentel, R., Wray, V., Jansen, R., Nimtz, M., Lalk, M., & Mundt, S. (2007). Cyclic depsipeptides, ichthyopeptins A and B, from *Microcystis ichthyoblabe*. *Journal of Natural Products*, 70(7), 1084-1088. <https://doi.org/10.1021/np060303s>
- Zainuddin, E., Mundt, S., Wegner, U., & Mentel, R. (2002). Cyanobacteria a potential source of antiviral substances against influenza virus. *Medical microbiology and immunology*, 191, 181-182. <https://doi.org/10.1007/s00430-002-0142-1>
- Zerpa, A., Uzcátegui, E. J. S., Moncada, M. A. U., & Uzcátegui, E. M. (2022). Dengue, Zika y Chikungunya: conocimientos e información. *Enfermería, historia e investigación: EHI*, 9(1), 6-16.
- Zipperer, A., Scheurer, J., & Kretschmer, D. (2022). Cytotoxicity assays as predictors of the safety and efficacy of antimicrobial agents. *Antibiotics: Methods and Protocols* 107-118. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9_6

XIV. SIGLAS Y ABREVIACIONES

AINEs: Antiinflamatorios no esteroides

ADE: Mejora dependiente de anticuerpos

AE: Aceites esenciales

EA: Extractos acuosos

ANOVA: Análisis de varianza

ARN: Ácido ribonucleico

BHK-21: Células de riñón de hámster bebé (del inglés, *Baby Hamster Kidney-21*)

CICESE: Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada

CMC: Carboximetilcelulosa

DENV: Virus del dengue

DENV-2: Virus del dengue serotipo 2

DHA: Ácido docosahexaenoico

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo

DSS: Síndrome de choque por dengue (del inglés, *Dengue Shock Syndrome*)

DQO: Demanda química de oxígeno

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EPA: Ácido eicosapentaenoico (del inglés, *Eicosapentaenoic acid*)

FHD: Fiebre hemorrágica del dengue

HCV: Virus de la hepatitis C

HIV1: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

HIV2: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2

Huh-7: Línea celular humana de hepatocarcinoma (del inglés, *Human hepatocellular carcinoma cell line*)

HSV1: Virus del herpes simple tipo 1

HTA: Antivirales dirigidos al hospedero (del inglés, *Host-targeted antivirals*)

IBV: Virus de la influenza B

IAV: Virus de la influenza A

IFN- α : Interferón alfa

MAG: Monoacilglicéridos

MAPK: Quinasa de proteínas activada por mitógenos (del inglés, *Mitogen-activated protein kinase*)

MAYV: Virus Mayaro

MOI: Multiplicidad de infección (del inglés, *Multiplicity of infection*)

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NBB: Negro Azul de Naftol (del inglés, *Naftol Blue Black*)

NF- κ B: Factor nuclear kappa B (del inglés, *Nuclear factor kappa B*)

NK: Células asesinas naturales (del inglés, *Natural killer*)

NS3: Proteína no estructural 3 (del inglés, *Nonstructural protein 3*)

NS5: Proteína no estructural 5 (del inglés, *Nonstructural protein 5*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAF: Factor activador de plaquetas (del inglés, *Platelet-activating factor*)

PBS: Solución salina tamponada con fosfato (del inglés, *Phosphate-buffered saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*)

prM: Proteína Precursora de Membrana

PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados (del inglés, *Polyunsaturated Fatty Acids*)

Rab5: Proteína relacionada con Ras a GTP 5 (del inglés, *Ras-related protein Rab-5*)

Rab7: Proteína relacionada con Ras a GTP 7 (del inglés, *Ras-related protein Rab-7*)

RE: Retículo endoplásmico

RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN (del inglés, *RNA-dependent RNA polymerase*)

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (del inglés, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SFB: Suero fetal bovino

SINAVE: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

STAT2: Transductor de señal y activador de la transcripción 2 (del inglés, *Signal Transducer and Activator of Transcription 2*)

TEMED: Tetrametiletilendiamina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, *Tumor Necrosis Factor-alpha*)

UFP: Unidades formadoras de placa

VFA: Virus de la fiebre amarilla

ZEBOV: Virus del Ébola Zaire

XV. ANEXOS

15.1 Posibles mecanismos de acción de los péptidos derivados de *Phaeodactylum tricornutum* contra el virus del dengue serotipo 2.

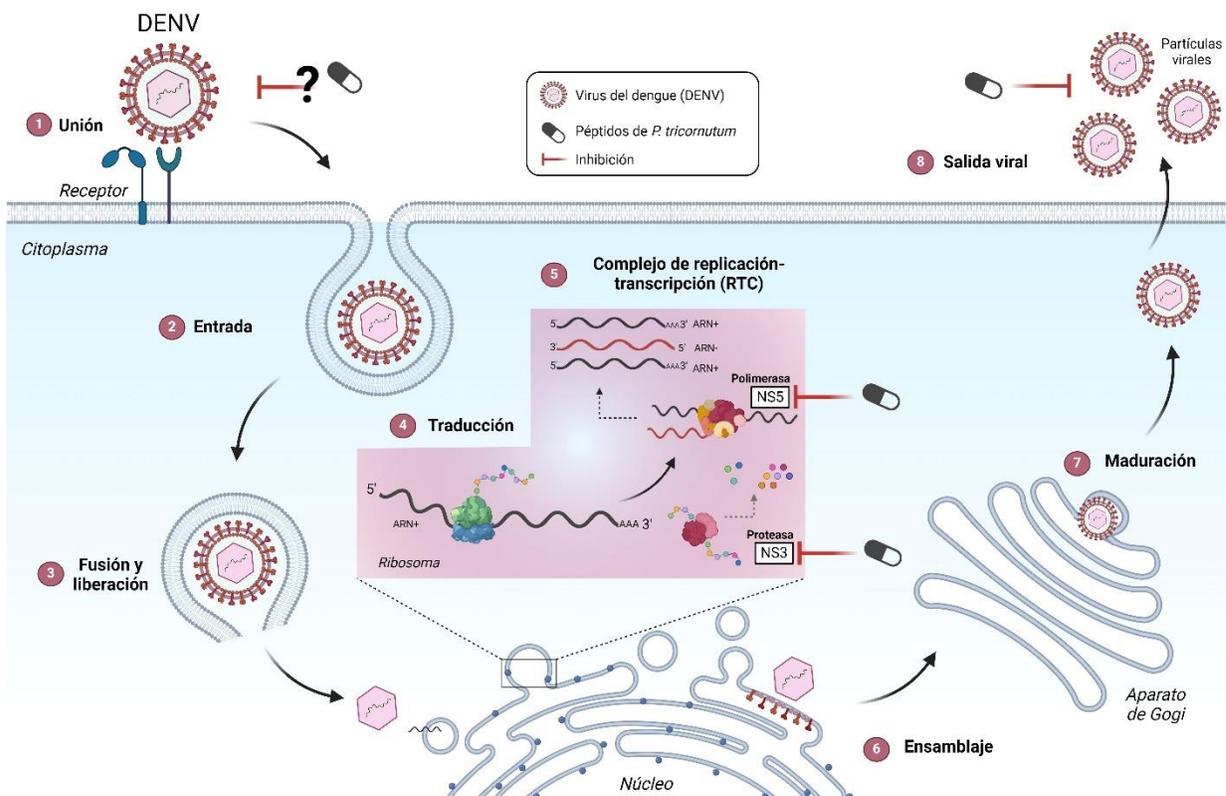


Figura 20. Mecanismos de acción de los péptidos derivados de *Phaeodactylum tricornutum* en la interacción y patogénesis del DENV-2. 1) Unión a receptores, 2) Entrada del DENV-2 a través de endocitosis, 3) Acidificación del medio, fusión con endosoma y liberación de la nucleocápside, 4) Traducción directa del ARN monocatenario en sentido positivo (+) en una poliproteína que dará origen en 3 proteínas estructurales y 7 No estructurales, 5) Formación de complejos de replicación y transcripción 6) Ensamblaje, 7) Maduración y 8) Salida viral. De acuerdo con los experimentos realizados los péptidos podrían actuar inhibiendo las proteínas virales NS3 (proteasa) y NS5 (ARN Polimerasa) y por lo tanto una disminución en la salida viral, se desconoce si estos péptidos tienen un efecto en la entrada viral. Elaborado con <https://biorender.com/>

15.2 Publicación de artículo: “Antiviral Effect of Microalgae *Phaeodactylum tricornutum* Protein Hydrolysates against Dengue Virus Serotype 2”



Article

Antiviral Effect of Microalgae *Phaeodactylum tricornutum* Protein Hydrolysates against Dengue Virus Serotype 2

Bianca Vianey Rivera-Serrano ^{1,2,*}, Sandy Lucero Cabanillas-Salcido ^{1,2,†}, Carlos Daniel Cordero-Rivera ³, Ricardo Jiménez-Camacho ³, Claudia Desiree Norzagaray-Valenzuela ⁴, Loranda Calderón-Zamora ⁴, Luis Adrián De Jesús-González ⁵, José Manuel Reyes-Ruiz ^{6,7}, Carlos Noe Farfan-Morales ⁸, Alejandra Romero-Utrilla ⁹, Víctor Manuel Ruiz-Ruelas ¹, Josué Camberos-Barraza ¹, Alejandro Camacho-Zamora ¹, Alberto Kousuke De la Herrán-Arita ¹, Carla Angulo-Rojo ^{1,9}, Alma Marlene Guadrón-Llanos ^{1,10}, Ángel Radamés Rábago-Monzón ^{1,11}, Janitzio Xiomara Korina Perales-Sánchez ¹², Marco Antonio Valdez-Flores ^{1,2,*}, Rosa María Del Ángel ^{3,*} and Juan Fidel Osuna-Ramos ^{1,2,9,*}



Citation: Rivera-Serrano, B.V.; Cabanillas-Salcido, S.L.; Cordero-Rivera, C.D.; Jiménez-Camacho, R.; Norzagaray-Valenzuela, C.D.; Calderón-Zamora, L.; De Jesús-González, L.A.; Reyes-Ruiz, J.M.; Farfan-Morales, C.N.; Romero-Utrilla, A.; et al. Antiviral Effect of Microalgae *Phaeodactylum tricornutum* Protein Hydrolysates against Dengue Virus Serotype 2. *Mar. Drugs* 2024, 22, 369. <https://doi.org/10.3390/md22080369>

Academic Editor: Adele Cutignano

Received: 15 July 2024

Revised: 5 August 2024

Accepted: 10 August 2024

Published: 14 August 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Faculty of Medicine, Autonomous University of Sinaloa, Culiacán 80246, Mexico; vianeyrivera.fm@uas.edu.mx (B.V.R.-S.); cabanillassandy.fm@uas.edu.mx (S.L.C.-S.); victor_199705@hotmail.com (V.M.R.-R.); josue.camberos@uas.edu.mx (J.C.-B.); alejandrocarnacho@uas.edu.mx (A.C.-Z.); alberto.kousuke@uas.edu.mx (A.K.D.L.H.-A.); carla.angulo@uas.edu.mx (C.A.-R.); almaguadrón@uas.edu.mx (A.M.G.-L.); rabagoradames.fm@uas.edu.mx (Á.R.R.-M.)
 - ² Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Culiacán 80246, Mexico
 - ³ Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV-IPN), Mexico City 07360, Mexico; carlos.cordero@cinvestav.mx (C.D.C.-R.); ricardo.jimenez@cinvestav.mx (R.J.-C.)
 - ⁴ Faculty of Biology, Autonomous University of Sinaloa, Culiacán 80019, Mexico; claudia.norzagaray@uas.edu.mx (C.D.N.-V.); loranda.calderon@uas.edu.mx (L.C.-Z.)
 - ⁵ Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Zacatecas 98000, Mexico; luis.dejesus@cinvestav.mx
 - ⁶ Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades No. 14, Centro Médico Nacional “Aldolfo Ruiz Cortines”, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Veracruz 91897, Mexico; jose.reyes@imss.gob.mx
 - ⁷ Facultad de Medicina, Región Veracruz, Universidad Veracruzana, Veracruz 91700, Mexico
 - ⁸ Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Unidad Cuajimalpa, Ciudad de México 05348, Mexico; cfarfan@cuauam.mx
 - ⁹ Departamento de Anatomía Patológica, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Culiacán 80200, Mexico; alejandraroneroutrilla@gmail.com
 - ¹⁰ Programa de Maestría en Ciencias en Medicina Tradicional y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Culiacán 80246, Mexico
 - ¹¹ Programa de Doctorado en Ciencias en Biomedicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Culiacán 80246, Mexico
 - ¹² Bioprocesses Laboratory, Faculty of Chemical-Biological Sciences, Autonomous University of Sinaloa, Culiacán 80246, Mexico; janitzio.perales@uas.edu.mx
- * Correspondence: marco.valdez@uas.edu.mx (M.A.V.-F.); rmangel@cinvestav.mx (R.M.D.Á.); osunajuanfidel.fm@uas.edu.mx (J.F.O.-R.)
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: Dengue, caused by the dengue virus (DENV), is a global health threat transmitted by *Aedes* mosquitoes, resulting in 400 million cases annually. The disease ranges from mild to severe, with potential progression to hemorrhagic dengue. Current research is focused on natural antivirals due to challenges in vector control. This study evaluates the antiviral potential of peptides derived from the microalgae *Phaeodactylum tricornutum*, known for its bioactive compounds. Microalgae were cultivated under controlled conditions, followed by protein extraction and hydrolysis to produce four peptide fractions. These fractions were assessed for cytotoxicity via the MTT assay and antiviral activity against DENV serotype 2 using flow cytometry and plaque formation assays. The 10–30 kDa peptide fraction, at 150 and 300 µg/mL concentrations, demonstrated no cytotoxicity and significantly reduced the percentage of infected cells and viral titers. These findings suggest that peptides derived