



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

**“ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS HIDROLIZADOS
PROTEICOS DE LA MICROALGA *Phaeodactylum
tricornutum* CONTRA EL VIRUS ZIKA”**

TESIS

Que presenta

LBG. SANDY LUCERO CABANILLAS SALCIDO

Para obtener el Grado de

MAESTRA EN CIENCIAS EN

BIOMEDICINA MOLECULAR

DIRECTORES DE TESIS

DR. MARCO ANTONIO VALDEZ FLORES

DRA. CLAUDIA DESIREE NORZAGARAY VALENZUELA

COMITÉ TUTORAL

DRA. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL NÚÑEZ Y CÁCERES

DR. JUAN FIDEL OSUNA RAMOS

DRA. KENIA LÓPEZ LÓPEZ



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



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Molecular de la Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa, y en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), unidad Zacatenco, México. Elaborado bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Valdez Flores y la Dra. Claudia Desiree Norzagaray Valenzuela; con la asesoría de la Dra. Rosa María Del Ángel Núñez Y Cáceres, el Dr. Juan Fidel Osuna Ramos y la Dra. Kenia López López. Sandy Lucero Cabanillas Salcido recibió beca del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa y a todos los miembros administrativos y docentes de la Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular, por darme la oportunidad de ser parte de su comunidad y por los recursos que me proporcionaron. Agradezco, también al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) y a la Coordinación General para el Fomento a la Investigación Científica e Innovación del Estado de Sinaloa (CONFÍE), por su aporte y respaldo financiero durante el desarrollo de esta tesis.

Quiero agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Marco Antonio Valdez Flores y la Dra. Claudia Desireé Norzagaray Valenzuela. Su guía, dedicación y compromiso han sido esenciales en este proyecto.

A mis asesores, la Dra. Rosa María Del Ángel Núñez y Cáceres, la Dra. Kenia López López y el Dr. Juan Fidel Osuna Ramos, les agradezco su valiosa ayuda y orientación. Gracias por compartir su conocimiento, experiencia y por estar siempre dispuestos a brindarme su apoyo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Del Ángel y a todo el equipo del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular en CINVESTAV por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Gracias a su guía, he adquirido habilidades que han enriquecido mi formación y han sido cruciales para mi desarrollo académico y profesional.

También, quiero expresar mi sincero agradecimiento por la amistad de mi compañera de maestría, Bianca. Su apoyo y compañerismo han sido una de las ganancias más valiosas de esta experiencia.

A mi familia, que ha estado a mi lado en cada pena y alegría, les agradezco profundamente. Su presencia y apoyo han sido los pilares de este logro; sin ustedes, nada de esto habría sido posible.

A mi esposo, mi fuente de alegría y refugio constante, le agradezco con todo mi corazón. Su amor ha sido mi mayor fortaleza a lo largo de este viaje. Cada palabra de aliento, cada gesto de apoyo y su comprensión incondicional me han brindado la confianza necesaria para seguir adelante y alcanzar mis metas.

Gracias por creer en mí.

DEDICATORIA

*Para mis queridos padres y mi amado esposo,
mis grandes héroes y mi compañero del alma.*

Su amor y apoyo trascienden las palabras.

Los llevo en el corazón, eternamente.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	v
I. RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
II. INTRODUCCIÓN.....	5
III. MARCO TEÓRICO.....	7
A. Enfermedades infecciosas	7
1. Virus que causan infecciones en humanos	8
B. Virus del Zika	9
C. Mecanismos de la enfermedad.....	11
1. Tipos de transmisión del virus.....	11
a. Transmisión vectorial	11
b. Transmisión vertical	13
c. Transmisión sexual	14
d. Transmisión por transfusión de sangre	14
2. Tropismo celular	16
3. Patogénesis molecular	17
4. Manifestaciones clínicas	21
5. Enfermedades asociadas	22
a. Síndrome de Guillain-Barré	22
b. Síndrome congénito por Zika	23
D. Epidemiología	24
E. Diagnóstico	30
1. Ensayos moleculares.....	30
2. Ensayos serológicos	30
F. Prevención y tratamiento.....	31
1. Control del vector.....	31
2. Vacunas y fármacos antivirales	32
G. Fuentes de tratamientos alternativos	33

H.	Microalgas	34
1.	Generalidades	34
2.	Composición bioquímica	36
3.	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	37
4.	Compuestos bioactivos de las microalgas	39
a.	Potencial antiviral de péptidos e hidrolizados proteicos microalgales. ...	39
IV.	ANTECEDENTES	41
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
VI.	JUSTIFICACIÓN	44
VII.	HIPÓTESIS	46
VIII.	OBJETIVOS	47
A.	Objetivo general	47
B.	Objetivos específicos	47
IX.	MATERIALES Y MÉTODOS	48
A.	Material biológico y cepa viral	48
B.	Estrategia experimental	50
C.	Cultivo de microalgas	51
D.	Obtención de biomasa residual	51
E.	Concentración de la proteína microalgal	53
F.	Generación de hidrolizados proteicos	54
G.	Fraccionamiento de hidrolizados proteicos	56
H.	Ensayos de viabilidad celular	57
I.	Ensayos de infección y tratamiento	58
J.	Citometría de flujo	59
K.	Ensayos de formación de focos	59
L.	Western blot	61
M.	Análisis estadístico	62
X.	RESULTADOS	63
A.	HIDROLIZADOS PROTEICOS	63
B.	VIABILIDAD CELULAR DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS	66
C.	EFFECTO DE LOS HP SOBRE EL PORCENTAJE DE INFECCIÓN POR ZIKV EN CÉLULAS Huh-7	67
D.	EFFECTO DE LOS HP SOBRE EL RENDIMIENTO VIRAL DE ZIKV	71

E.	EFFECTO DE LOS HP SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA VIRAL NS3	71
XI.	DISCUSIÓN.....	74
XII.	CONCLUSIONES.....	81
XIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	82
XIV.	SIGLAS Y ABREVIACIONES	92
XV.	ANEXOS	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
Figura 1.	Partícula viral de ZIKV.....	10
Figura 2.	Ciclo de transmisión del virus del Zika	12
Figura 3.	Inmunidad intrínseca y antagonismo del virus Zika	19
Figura 4.	Distribución geográfica actual del Zika a nivel mundial.....	29
Figura 5.	Diagrama de estrategia experimental	50
Figura 6.	Cultivo de <i>P. tricornutum</i>	52
Figura 7.	Proceso de obtención de hidrolizados proteicos fraccionados.....	55
Figura 8.	Hidrolizados proteicos de <i>P. tricornutum</i>	64
Figura 9.	Efecto de los hidrolizados proteicos a diferentes concentraciones sobre la viabilidad celular en la línea Huh-7.....	68
Figura 10.	Actividad antiviral de los hidrolizados proteicos contra ZIKV en células Huh-7.....	70
Figura 11.	Efecto de los hidrolizados proteicos frente al rendimiento viral de ZIKV...	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
Cuadro 1.	Países y territorios con transmisión actual o anterior del virus Zika	26
Cuadro 2.	Países y territorios con mosquitos vectores <i>A. aegypti</i> , pero sin casos conocidos de transmisión del virus Zika	28
Cuadro 3.	Caracterización bioquímica de <i>P. tricornutum</i>	38

I. RESUMEN

El virus Zika (ZIKV) es un Flavivirus transmitido principalmente por mosquitos del género *Aedes* a los seres humanos, causando la enfermedad infecciosa emergente conocida como Zika. Esta enfermedad tiene importancia epidemiológica a nivel mundial y un alto potencial pandémico; además, está asociada con el desarrollo de complicaciones neurológicas graves, como el síndrome de Guillain-Barré y el síndrome congénito por Zika.

La falta de vacunas y tratamientos eficaces para la infección por ZIKV destaca la necesidad urgente de realizar más investigaciones. Diversos estudios han demostrado que los extractos de microalgas, los hidrolizados de proteínas y los péptidos tienen propiedades bioactivas contra varios patógenos, incluidos los virus. Las microalgas representan una prometedora área de investigación para identificar compuestos antivirales que podrían ser efectivos en el tratamiento de infecciones por ZIKV. Este estudio se centró en la evaluación de la eficacia de los hidrolizados proteicos de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* contra el virus del Zika. Se partió de un cultivo de *P. tricornutum* para obtener las proteínas necesarias, las cuáles fueron hidrolizadas mediante la enzima Alcalasa® (4 % E/S). El hidrolizado proteico resultante se fraccionó en cuatro diferentes rangos de peso molecular (10 – 30 kDa, 5 – 10 kDa, 3 – 5 kDa y < 3 kDa) mediante ultrafiltración; posteriormente, las fracciones se liofilizaron. Se evaluó la citotoxicidad de las distintas fracciones del hidrolizado utilizando el ensayo MTT en células Huh-7. La actividad antiviral de las fracciones seleccionadas (5 – 10 kDa y < 3 kDa) se evaluó mediante ensayos *in vitro* con infección por ZIKV (MOI: 1) y tratamiento posterior a la infección con las fracciones a dos concentraciones (150 y

300 µg/mL), utilizando citometría de flujo y ensayos de formación de focos. Además, se empleó Western blot para analizar la expresión de la proteína viral NS3. Finalmente, se realizaron los análisis estadísticos correspondientes. El análisis de los datos señala que el tratamiento con los hidrolizados proteicos no reduce el porcentaje de infección, la producción de partículas virales ni los niveles de expresión de la proteína NS3 del ZIKV. Estos resultados indican que los hidrolizados proteicos obtenidos con la enzima Alcalasa®, con tamaño de 5 a 10 kDa y menores a 3 kDa, no presentan actividad antiviral contra ZIKV *in vitro*. La presente investigación sugiere que son necesarios estudios adicionales para la búsqueda y desarrollo de candidatos antivirales efectivos contra ZIKV, aunque los hidrolizados proteicos podrían tener potencial como tratamiento contra otras infecciones virales.

Palabras clave: *ZIKV, Microalgas, hidrolizados proteicos, antiviral.*

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is a flavivirus primarily transmitted to humans by mosquitoes of the *Aedes* genus, causing the emerging infectious disease known as Zika. This disease has global epidemiological significance and a high pandemic potential; moreover, it is associated with the development of severe neurological complications such as Guillain-Barré syndrome and congenital Zika syndrome.

The lack of effective vaccines and treatments for ZIKV infection highlights the urgent need for further research. Numerous studies have shown that microalgae extracts, protein hydrolysates, and peptides possess bioactive properties against various pathogens, including viruses. Microalgae represent a promising research area for identifying antiviral compounds that could be effective in treating ZIKV infections. This study focused on evaluating the efficacy of protein hydrolysates from the microalga *Phaeodactylum tricornutum* against the Zika virus. We started with a culture of *P. tricornutum* to obtain the necessary proteins, which were hydrolyzed using Alcalase® enzyme (4% E/S). The resulting protein hydrolysate was fractionated into four different molecular weight ranges (10 – 30 kDa, 5 – 10 kDa, 3 – 5 kDa, and < 3 kDa) using ultrafiltration, and the fractions were subsequently freeze-dried. The cytotoxicity of the different hydrolysate fractions was assessed using the MTT assay on Huh-7 cells. The antiviral activity of the selected fractions (5 – 10 kDa and < 3 kDa) was evaluated through *in vitro* assays with ZIKV infection (MOI: 1) and post-infection treatment with the fractions at two concentrations (150 and 300 µg/mL), using flow cytometry and focus formation assays. Additionally, Western blot was used to analyze the expression of the viral protein NS3. Finally, statistical analyses were conducted. Data analysis

indicates that treatment with the protein hydrolysates does not reduce the percentage of infection, viral particle production, or levels of NS3 protein expression of ZIKV. These results suggest that the protein hydrolysates obtained with Alcalase®, in the size ranges of 5 – 10 kDa and < 3 kDa, do not exhibit antiviral activity against ZIKV *in vitro*. This research suggests that additional studies are needed to search for and develop effective antiviral candidates against ZIKV, although protein hydrolysates may have potential as treatments for other viral infections.

Keywords: *ZIKV, Microalgae, protein hydrolysates, antiviral.*

II. INTRODUCCIÓN

Actualmente, se han identificado más de 200 tipos de virus responsables de causar múltiples enfermedades infecciosas en los seres humanos (Labadie y col., 2020). La Organización Mundial de la Salud (OMS) evaluó algunas enfermedades con potencial pandémico que podrían causar una emergencia de salud pública en cualquier momento, debido a la falta de medicamentos y vacunas eficaces. La enfermedad causada por el virus Zika ocupa un lugar dentro de esta lista (Losa, 2021).

Desde los primeros reportes de infección en 1954, la incidencia de casos de Zika ha aumentado su alcance de manera alarmante; a la fecha el virus está ampliamente distribuido por África, Asia, América y el Pacífico, con un total de 92 países y territorios con transmisión activa del virus del Zika, incluyendo a México, y 60 más con riesgo latente de transmisión por la presencia de su principal vector (Noorbakhsh y col., 2019; OMS 2024; CDC 2024; SS 2024).

ZIKV es transmitido principalmente por mosquitos del género *Aedes*, aunque también puede propagarse entre los individuos a través de transfusiones de sangre o sus derivados, contacto sexual sin protección y de manera vertical, cuando mujeres embarazadas transmiten la infección a su feto en desarrollo (Masmajan y col., 2020). Las infecciones causadas por este virus tienen por lo general una sintomatología leve similar al dengue con el 80 % de los casos asintomáticos. Sin embargo, también pueden estar asociadas con el desarrollo de complicaciones neurológicas graves, como el Síndrome de Guillain-Barré (SGB) y el Síndrome Congénito por Zika (SCZ) (Hastings y col., 2019; Gestuveo y col., 2021).

A pesar de que en el área clínica ya están bien establecidos sus métodos de diagnóstico, aun a la fecha no existe fármaco ni vacuna específicos y efectivos para el tratamiento de la infección por ZIKV (Jayachandran y col., 2021; do Nascimento y col., 2022). En la actualidad, existe una necesidad apremiante por encontrar candidatos efectivos a fármacos que ofrezcan opciones de tratamiento contra la infección por ZIKV, incluyendo un uso seguro para mujeres embarazadas (Guo y col., 2022). En este contexto, los agentes terapéuticos de origen natural se presentan como una alternativa atrayente para combatir infecciones virales (Huamán Novillo y Vasquéz Grandez, 2021). Las especies marinas son consideradas importante fuente potencial de productos terapéuticos (Rahman y col., 2022). Dentro de estas, las microalgas presentan múltiples ventajas por encima del resto y ya se han consolidado como una fuente viable de compuestos bioactivos (Rahman y col., 2022).

Algunos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos para la búsqueda de antivirales en la generación de péptidos a partir de proteínas extraídas de especies particulares de microalgas, mediante un proceso de hidrólisis inducida, obteniendo muy buenos resultados (Afify y col., 2018; Galarza, 2019). *Phaeodactylum tricornutum* es una de las especies de microalgas que es objeto de interés para este enfoque, debido a su alto contenido proteico (Encinas, 2023). Ante la evidente problemática que representa la falta de medicamentos disponibles para hacer frente a la infección por ZIKV, esta investigación se propuso abordar este problema y contribuir a los esfuerzos actuales en la búsqueda de antivirales. En este sentido, se evaluó la actividad antiviral de los hidrolizados proteicos de la microalga *P. tricornutum* contra el virus Zika.

III. MARCO TEÓRICO

A. Enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos patógenos o sus productos tóxicos, catalogándose a un agente como patógeno cuando su supervivencia depende de la capacidad para replicarse en o dentro de otras especies, atravesando las barreras que normalmente impiden el ingreso de otros microorganismos al hospedero (Gómez-Velasco y col., 2019).

Los agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas incluyen: bacterias, virus, parásitos, y hongos; microorganismos que pueden transmitirse de manera directa o indirecta, entre personas, o a través de vectores que fungen como hospederos temporales y reservorios de la enfermedad (Gómez-Velasco y col., 2019). La colonización de estos microorganismos en los seres humanos ocurre generalmente a través de la piel y las mucosas, como las del tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario y en glándulas secretoras como las sebáceas, biliares y mamarias. En todos estos ambientes, la microbiota autóctona humana (compuesta mayormente por bacterias, aunque también incluye virus, arqueas, mohos, levaduras y protozoos) cumple una función de resistencia frente a los patógenos. Sin embargo, cuando se generan heridas o una situación de inmunosupresión en el hospedero, esta microbiota pueden presentar un comportamiento patógeno oportunista y contribuir al desarrollo de la enfermedad (Requena y Velasco, 2021).

1. **Virus que causan infecciones en humanos**

Los virus son parásitos intracelulares obligados; cuya estructura consiste únicamente de un ácido nucleico (DNA o RNA) encapsulado en una cápside de proteínas, que puede o no estar rodeada por una bicapa lipídica. Estos se clasifican en función de su composición genética y características físicas (Labadie y col., 2020).

Se han identificado más de 200 tipos virales responsables de causar enfermedades en humanos (Labadie y col., 2020). En 2018, la Organización Mundial de la Salud, en colaboración con expertos internacionales, elaboró una lista de enfermedades infecciosas prioritarias que exigen investigación y desarrollo acelerados debido a su potencial para desencadenar emergencias de salud pública y que carecen de medicamentos o vacunas eficaces para su tratamiento. Esta lista incluye: fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (FHCC), enfermedad por el virus del Ébola y enfermedad por el virus de Marburg, fiebre de Lassa, coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), Nipah y enfermedades henipavirales, fiebre del valle del Rift (FVR), y Zika (Losa, 2021; Farrar, 2019).

Entre estas, la enfermedad por el virus de Zika cobra vital importancia por el hecho de que, aunque el número de muertes a las que se asocia es bajo, su infección durante el embarazo puede ser la causa del desarrollo de microcefalia y otras malformaciones congénitas, además de otras complicaciones del embarazo como parto prematuro y aborto espontáneo; mientras que en adultos y niños aumenta el riesgo de sufrir complicaciones neurológicas (Gómez-Velasco y col., 2019; Bloom y Cadarette, 2019).

B. Virus del Zika

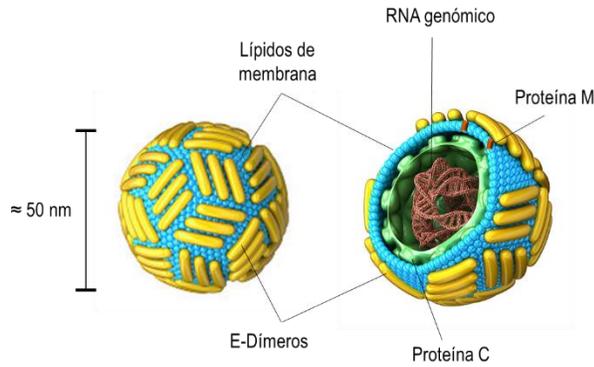
El virus del Zika, también denominado como ZIKV, es un Flavivirus transmitido principalmente de manera vectorial a través de mosquitos de las especies *Aedes Aegypti*, abundante en zonas tropicales y subtropicales, y *Aedes Albopictus*, predominante en zonas templadas (Wolford y col., 2017).

Este virus consta de una cubierta lipídica, una cápside proteica y una molécula de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva (ssRNA (+)) como material genético, con un peso de 10.8 kb. El genoma contiene un único marco de lectura abierto flanqueado por regiones no codificantes. Su transcrito se traduce en una única poliproteína que es procesada y escindida, dando origen a tres proteínas estructurales: Cápside (C), proteína precursora de membrana (prM), proteína de Envoltura (E), y siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Figura 1) (PielInna y col., 2020).

La proteína C forma la cápside viral icosaédrica; las cual está rodeada por una membrana esférica de bicapa lipídica originaria del huésped. Ancladas a esta membrana externa, se encuentran las glicoproteínas virales M y E, expuestas en la superficie viral (Noorbakhsh y col., 2019).

Durante el proceso de replicación viral, cuando se ensamblan las partículas virales maduras, una proteasa ubicada en la red trans-Golgi escinde la proteína prM, generando el péptido pr y la proteína M. Se cree que previo a este proceso la proteína prM juega un papel importante en el correcto plegamiento de la proteína E (Noorbakhsh y col., 2019). La proteína E es la principal proteína de la superficie del

A)



B)

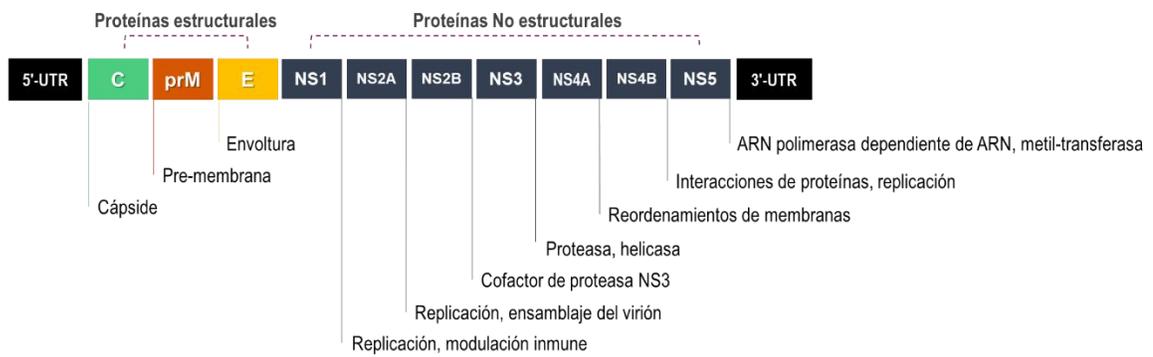


Figura 1. Partícula viral de ZIKV. A) Componentes de ZIKV. B) El genoma de ZIKV se escinde en tres proteínas estructurales y 7 no estructurales. Se mencionan algunas de sus funciones. Modificado de: Pielna y col., (2020).

virión implicada en la unión entre el virus y su célula huésped objetivo, participando en la fusión de la membrana. Por su parte, las proteínas no estructurales (NS1-NS5) exhiben dos funciones cruciales: (1) forman el complejo replicativo; (2) y antagonizan la inmunidad innata del huésped (Noorbakhsh y col., 2019).

C. Mecanismos de la enfermedad

1. Tipos de transmisión del virus

Los arbovirus son transmitidos por artrópodos, principalmente por mosquitos. El ZIKV se transmite esencialmente de esta manera; sin embargo, también puede transmitirse de persona a persona a través de varias rutas diferentes, ya sea por contacto sexual, mediante transfusiones y verticalmente de la madre al feto (Masmajan y col., 2020; Wolford y col., 2017).

a. Transmisión vectorial

Al igual que la mayoría de los Flavivirus, la vía preponderante de transmisión del ZIKV es a través de la picadura de un mosquito infectado, de tal forma se distinguen dos ciclos de transmisión de la infección por ZIKV: ciclo enzoótico o selvático y ciclo epidémico o urbano (Figura 2). El primero de estos se da entre mosquitos *Aedes* y primates no humanos, al que se le atribuye el mantenimiento del linaje ZIKV en África, siendo las especies *A. africanus*, *A. furcifer*, *A. taylori* y *A. luteocephalus* sus principales vectores y el ser humano meramente un huésped incidental, responsable de llevar el virus al ciclo urbano mediante la transmisión humano-mosquito-humano. Por otro lado, en el ciclo urbano, el ser humano es el huésped principal, portador y amplificador de la infección a mosquitos no infectados, siendo los más implicados en estas transmisiones *A. aegypti*, en regiones tropicales y subtropicales, y *A. albopictus*,

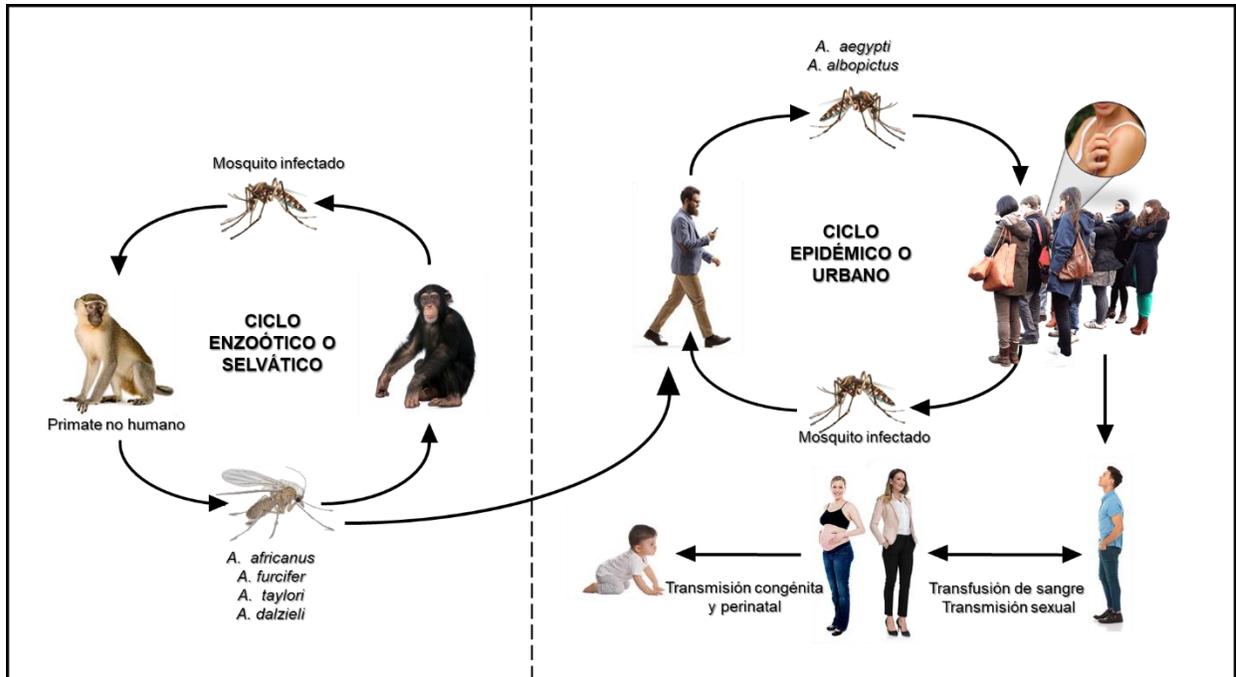


Figura 2. Ciclo de transmisión del virus del Zika. Modificado de: Sharma y col., (2020).

en regiones tropicales, subtropicales y en áreas templadas (Pielna y col., 2020; Sharma y Lal, 2017; Sharma y col., 2020; Leandro y de Castro, 2022).

Se espera que, en respuesta al crecimiento de la población y su movimiento, en suma, con el cambio climático se propicie la continua expansión de estos vectores (Rincón Silva y col., 2019; Masmegan y col., 2020).

b. Transmisión vertical

A diferencia de la mayoría de los virus, que no pueden atravesar la barrera placentaria, ZIKV se transmite de la madre al feto al infectar varios tipos de células de la placenta; hecho confirmado por la presencia de altas cargas virales de RNA de ZIKV en estudios realizados en tejido placentario, líquido amniótico, suero y cerebro de fetos o recién nacidos de madres tanto sintomáticas como asintomáticas (Guzeloglu-Kayisli y col., 2022).

Se estima que alrededor del 26 % de las mujeres embarazadas infectadas por ZIKV transmite la infección a sus fetos en desarrollo, lo que lleva a la generación de malformaciones congénitas graves y daño neurológico, como microcefalia, retinopatía, restricción del crecimiento fetal o la generación de abortos espontáneos. Sin embargo, aún no se ha dilucidado el mecanismo exacto por el cual ZIKV es capaz de cruzar la barrera placentaria e infectar los tejidos nerviosos fetales (Chen y Wilson, 2019; Guzeloglu-Kayisli y col., 2022).

Por otro lado, se ha identificado la presencia de partículas virales de ZIKV en leche materna, pero no se ha informado de transmisión por esta vía, por lo que la lactancia materna no está contraindicada en madres con infección (González Ayala y col., 2022).

c. *Transmisión sexual*

En el 2008 se informó de la existencia del primer caso de infección por ZIKV adquirida mediante transmisión sexual en Colorado, Estados Unidos. Informes subsecuentes confirmaron el potencial de este virus para transmitirse sexualmente de parejas de hombres a mujeres, de mujer a hombre y de hombre a hombre, permitiendo una transmisión de ZIKV limitada en áreas que carecen de la presencia del vector *Aedes spp* (Khaiboullina y col., 2019).

Una revisión sistemática elaborada por Moreira y col., (2017) estima que la transmisión sexual del ZIKV de hombre a mujer representa alrededor del 92,5 % de los casos de transmisión por esta vía, siendo mucho más común que la de hombre a hombre con un 3,7 % y de mujer a hombre con el otro 3,7 % restante. Igualmente, se rescata el hecho de que el coito vaginal sin el uso de protección es el modo principal de esta transmisión en el 96,2 % de los casos, el 18,5 % se les atribuye a las prácticas orales y 7,4 % a las anales.

ZIKV es el primer arbovirus detectado en semen humano, incluso detectado en el semen de hombres infectados hasta 188 días después del desarrollo de los síntomas, cuando ya la viremia había concluido su curso, sugiriendo un tiempo prolongado y latente de transmisión sexual, siendo detectable ZIKV en semen por un periodo de tiempo más extenso en la comparativa con suero sanguíneo y exhibiendo también altas cargas virales (Sharma y Lal, 2017).

d. *Transmisión por transfusión de sangre*

Después de la infección, durante 1 a 2 semanas, puede detectarse en suero o plasma la presencia de partículas virales de ZIKV, permaneciendo incluso por más

tiempo en sangre total y glóbulos rojos, representando una problemática tanto para los proveedores de transfusiones de sangre como para la salud pública de manera generalizada, pues los receptores de transfusiones podrían desarrollar enfermedades relacionadas con ZIKV después de ser tratadas con sangre o sus fracciones contaminadas con el virus (Viennet y col., 2020).

Esta forma de transmisión se evidenció en el 2016 con la confirmación de 4 casos de infección en Brasil, número posiblemente subestimado debido a la complejidad de atribuir a un determinado número de casos de infección la adquisición por esta vía, sobre todo en áreas donde ZIKV es endémico (Jimenez y col., 2017). En este contexto, las altas tasas de infección subclínica no hacen más que aumentar el riesgo inherente que este tipo de transmisión representa para el suministro de sangre, constatado por la detección del material genético de ZIKV en donantes asintomáticos (Jimenez y col., 2017).

En febrero de 2016, para abordar estas problemáticas, se emitieron pautas estrictas por parte de la OMS para la transfusión/donación de sangre en regiones endémicas para ZIKV (Sharma y col., 2020). Por su parte, la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) exige la detección del ZIKV en los donantes de sangre a nivel nacional, para realizar transfusiones de sangre con un mayor grado de seguridad (Jimenez y col., 2017).

2. Tropismo celular

La capacidad única del ZIKV, no presente en otros Flavivirus, de propagarse entre humanos a través de rutas no vectoriales, exhibe su amplio tropismo celular y tisular, que le permite persistir en varios tejidos y fluidos corporales (Miner y Diamond, 2017).

Diversos estudios, realizados *in vitro* e *in vivo*, han detectado la presencia y actividad de partículas virales ZIKV en células de la piel (fibroblastos dérmicos, queratinocitos epidérmicos), células del sistema inmune (células dendríticas inmaduras, macrófagos), células de la placenta (células de Hofbauer, trofoblasto, células endoteliales), células neuronales (células progenitoras neurales, neuronas maduras, astrocitos), tejidos oculares (córnea, retina neurosensorial, nervio óptico, humor acuoso de la cámara anterior), células del tracto reproductivo (espermatogonias, células de Sertoli, células de Leydig, espermatozoides, fibroblastos uterinos) y múltiples fluidos corporales (líquido conjuntival o lágrimas, saliva, semen, lavados vaginales, orina) (Miner y Diamond, 2017; Giraldo y col., 2023).

Se sabe que ZIKV tiene preferencia por infectar células neuronales en el embrión en desarrollo. Sin embargo, aún se desconocen con exactitud cuáles son los mecanismos moleculares que confieren a ZIKV esta particularidad. Los receptores son los principales determinantes para la infección, pero hasta ahora, no se ha identificado un receptor principal o único mediador de la internalización viral que explique el tropismo del virus (Hamel y col., 2015; Giraldo y col., 2023).

3. Patogénesis molecular

En el mosquito, ZIKV inicia su ciclo replicativo en el epitelio del intestino medio, donde continua con su diseminación a otros tejidos secundarios y puede extenderse hasta las glándulas salivales, en un período que va de 8 a 12 días, donde se posibilita la transmisión del virus a las personas por inyección de esta saliva que contiene partículas virales, al ser picadas por el mosquito con fines exploratorios, defensivos o alimentarios (Rincón Silva y col., 2019; Chouin-Carneiro y col., 2020; Elshahawi y col., 2019).

En el ser humano, la infección surge debido a la picadura de mosquitos hembra infectados con el virus (Rincón Silva y col., 2019). Después de la picadura al humano, las células dendríticas y las células endoteliales son los principales objetivos de la infección, siendo en las células endoteliales donde se origina una mayor propagación del virus, diseminándose posteriormente a los ganglios linfáticos y al torrente sanguíneo, extendiéndose la viremia hasta el útero, los testículos, el cerebro y demás órganos inmunológicamente privilegiados, cruzando las barreras que restringen el acceso de leucocitos y solutos a estos tejidos, siendo los monocitos la principal población de leucocitos que mantiene a ZIKV en circulación (Khaiboullina y col., 2019).

De manera similar a otros Flavivirus es probable que ZIKV ingrese a las células huésped a través de endocitosis mediada por receptores de la superficie celular y su interacción con glicoproteínas de la cubierta viral (Patiño y col., 2020). Los receptores AXL, DC-SIGN, Tyro3 y TIM-1 se han propuesto como candidatos para la entrada viral de ZIKV en estudios *in vitro*; sin embargo, aún no se ha identificado a ninguno de estos como receptor principal, por lo que es posible que múltiples receptores o múltiples vías

de internalización desempeñen papeles redundantes en la entrada de ZIKV (Hamel y col., 2015). Después de la entrada del virus a la célula, ZIKV libera su RNA que es traducido en una sola poliproteína y procesada por proteasas virales y del huésped para generar las proteínas estructurales y no estructurales necesarias para la replicación viral y la evasión del sistema inmune. Finalmente, se montan fábricas de replicación en las evaginaciones del retículo endoplásmico que se encargan de crear nuevas partículas virales que después de su liberación en el entorno extracelular pasan a un nuevo ciclo de vida infeccioso al invadir otras células y tejidos diana como cerebro, tejidos reproductivos y embrión (Patiño y col., 2020; Giraldo y col., 2023).

Como parte de la respuesta antiviral temprana, las defensas intrínsecas, que son moléculas presentes en niveles suficientes para actuar de inmediato sobre la infección o que se activan rápidamente en respuesta a una señal, interfieren con el ciclo de replicación del virus mediante mecanismos de autofagia, apoptosis e interferencia por RNA (RNAi). Sin embargo, al igual que ocurre con otras respuestas inmunitarias, el ZIKV puede manipular estas defensas para mejorar su replicación y patogénesis (Figura 3) (Giraldo y col., 2023).

La infección por ZIKV es detectada por el sistema inmunitario innato a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) del huésped, como los receptores tipo Toll (TLR) endosómicos y RIG-I y MDA5 citosólicos. Los PRR en respuesta al reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como el RNA viral de ZIKV, activan una compleja red de vías de señalización que activan y translocan al núcleo los factores de transcripción IRF3 (factor regulador de interferón 3) e IRF7 cuyo resultado final es la expresión de interferones tipo I (IFN-I) y otras

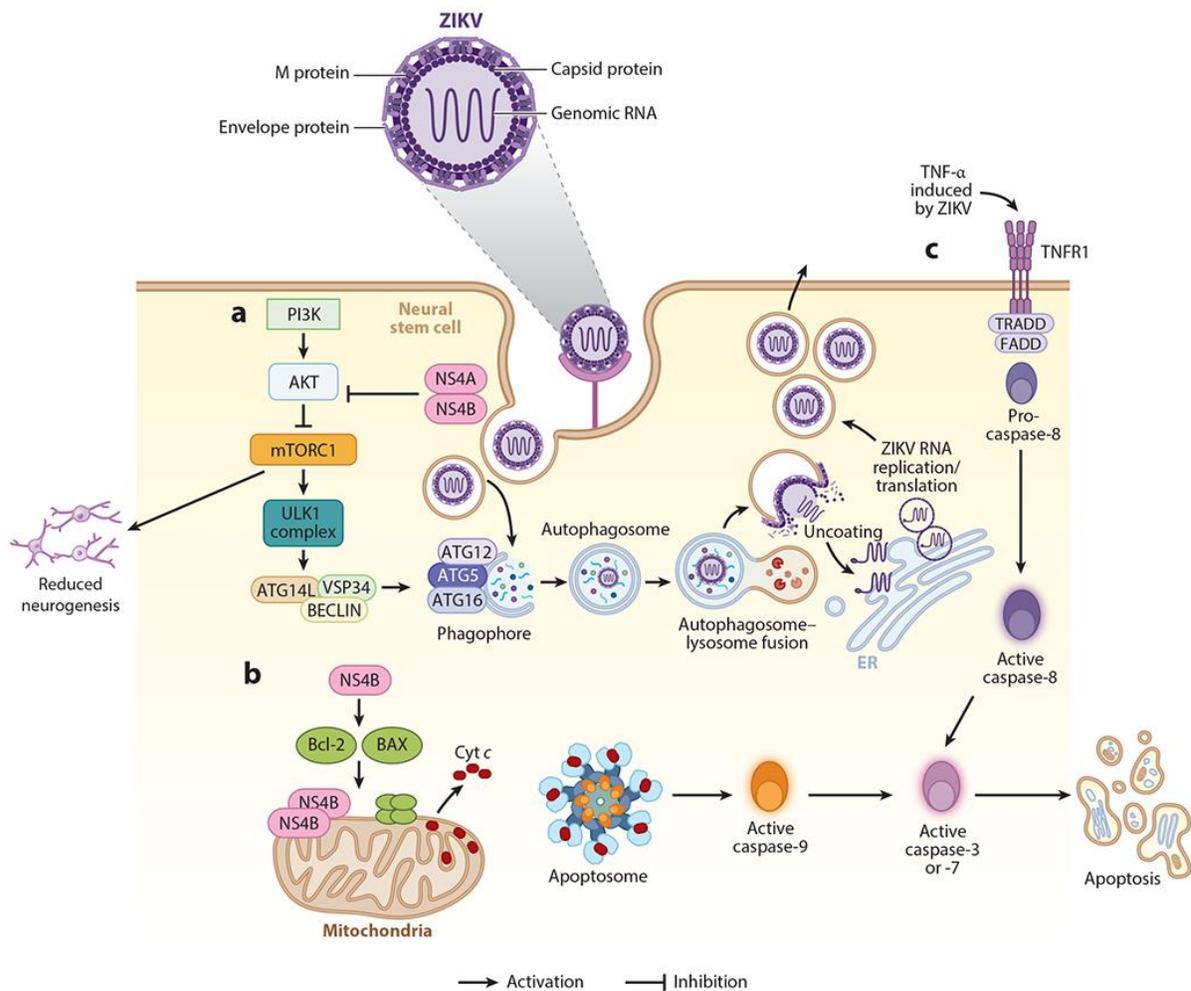


Figura 3. Inmunidad intrínseca y antagonismo del virus Zika. a) Las partículas virales de ZIKV se internalizan a través de endosomas y autofagosomas. Las proteínas virales NS4A y NS4B inhiben la activación de AKT al inactivar mTORC1. Esta inactivación elimina la inhibición sobre el complejo ULK, permitiendo que la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y ATG16 inicien la formación del autofagosoma. La fusión de un autofagosoma con un lisosoma (autofagolisosoma) acidifica el medio y activa proteasas que degradan los componentes virales. Sin embargo, este ambiente ácido también favorece la fusión de la envoltura del ZIKV con la membrana endosomal, liberando el RNA viral en el citoplasma. El bloqueo de la vía AKT-mTOR afecta negativamente la proliferación de las células infectadas. b) Cuando la proteína NS4B se localiza cerca de la membrana mitocondrial, activa la proteína X asociada a Bcl-1 (BAX). BAX forma un complejo con Bcl-2, el cual interactúa con el canal de aniones mitocondrial dependiente del voltaje. Esta interacción provoca la pérdida del potencial de

membrana mitocondrial y la liberación del citocromo c (Cyt c), lo que a su vez activa la vía de apoptosis intrínseca a través de la caspasa-9 y la caspasa-3. c) Las señales externas, como la unión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) a los receptores de muerte celular FAS y TNFR1, pueden inducir la apoptosis celular mediante la activación de caspasa-8 y caspasa-3. Tomado de Giraldo y col., (2023).

citoquinas proinflamatorias. El IFN-I emite señales autocrinas y paracrinas para inducir la transcripción de genes estimulados por IFN (ISG), efectores finales de la respuesta antiviral, por lo que para poder establecer infecciones productivas las proteínas de ZIKV deben tener la capacidad de bloquear la vía del interferón (Giraldo y col., 2023; Estévez-Herrera y col., 2021).

La respuesta inmunitaria adaptativa ante la infección viral incluye la activación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos que destruyen células infectadas y linfocitos T CD4⁺ auxiliares que se diferencian al fenotipo Th¹ y producen citoquinas efectoras como IFN- γ y TNF- α . Los linfocitos B producen anticuerpos neutralizantes que impiden la interacción del virus con las células huésped, lo que previene la infección, mientras que también activan la vía del complemento y el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, llevando a la lisis de las células infectadas (Estévez-Herrera y col., 2021).

4. Manifestaciones clínicas

Clínicamente, las infecciones por ZIKV se presentan de manera leve e inespecífica, confundiéndose usualmente con infecciones causadas por otros Flavivirus, como el dengue y el chikungunya, siendo aproximadamente hasta un 80 % de las infecciones causadas por este virus de naturaleza asintomática (Hastings y col., 2019).

En las infecciones sintomáticas por ZIKV, el inicio de los síntomas suele ocurrir de 3 a 12 días después de la transmisión, presentándose generalmente como una enfermedad similar al dengue leve y autolimitada con febrícula, dolor de cabeza, erupción cutánea, dolor articular, conjuntivitis, malestar general y trastornos

gastrointestinales con una duración de varios días o semanas; manifestaciones clínicas que se observan por igual entre grupos de edad, en ambos sexos y en mujeres embarazadas (Hastings y col., 2019; Musso y col., 2019).

La hospitalización por causa de esta enfermedad es raramente necesaria y el desarrollo de complicaciones muy poco usual, no obstante, cuando ocurren pueden llegar a ser fatales (Musso y col., 2019).

5. Enfermedades asociadas

De manera generalizada, la infección por ZIKV presenta manifestaciones clínicas del tipo leve autolimitante, sin embargo, también puede presentarse asociada con cuadros de gran severidad caracterizados por el desarrollo de complicaciones neurológicas graves en adultos y recién nacidos, como SGB y el SCZ (Gestuveo y col., 2021).

a. Síndrome de Guillain-Barré

El SGB es una polineurorradiculopatía desmielinizante aguda autoinmune, en la que se da una respuesta inmune mediada por anticuerpos con activación de la vía del complemento y reclutamiento de macrófagos que se dirigen a atacar los axones de las células nerviosas o las vainas de mielina de las neuronas periféricas (Morales, 2019).

La causa puntual del SGB se desconoce. Sin embargo, se sabe que puede ser desencadenado por reacciones de mimetismo molecular posterior a una infección viral, apareciendo de 5 a 10 días después de la infección, estimándose una incidencia del SGB asociado con ZIKV de 2 a 3 casos por cada 10,000 infecciones por ZIKV (del Carpio Orantes y col., 2020; Musso y col., 2019). También se consideran otras causas

no infecciosas como el embarazo, las cirugías o la aplicación de vacunas como desencadenantes del SGB (del Carpio Orantes y col., 2020).

La sintomatología inicial de este síndrome suele ser debilidad muscular acompañada de hormigueo, tanto en los miembros inferiores como superiores, que pueden ir escalando en intensidad hasta llegar al punto de generar la parálisis del cuerpo entero (Del Carpio-Orantes y col., 2020; Lascano y col., 2021). Las principales complicaciones durante la fase aguda del SGB son neumonía y úlceras por presión; los síntomas comunes que se presentan como secuela después de estos episodios incluyen parestesias, fatiga, calambres y dolor neuropático, síntomas residuales incapacitantes altamente prevalentes que afectan de manera negativa la calidad de vida de los pacientes (Silva y col., 2020).

b. Síndrome congénito por Zika

ZIKV es un agente teratogénico, por lo que una infección por este virus adquirida durante el embarazo puede provocar aborto espontáneo o anomalías neurológicas congénitas; al conjunto de anomalías del desarrollo observadas después de la infección por ZIKV en el embrión o feto expuesto se le denomina "Síndrome Congénito por Zika" (Gomes y col., 2023). Estas anomalías se relacionan principalmente con el deterioro del desarrollo del sistema nervioso central, y sus manifestaciones pueden ser microcefalia grave con colapso parcial del cráneo, disminución de la corteza cerebral con calcificaciones subcorticales, alteraciones oculares con moteado pigmentario focal de la retina y afección de la mácula; limitación de los movimientos de las articulaciones con contracturas congénitas e hipertonía muscular marcada con signos de extrapiramidalismo (Bermúdez y col., 2021; Cardenas y col., 2022).

Durante etapas tempranas del embarazo, la infección con ZIKV favorece la viremia materna prolongada, la neuropatología fetal y la pérdida de los productos, sin embargo, aún no se sabe con certeza cuál es la fisiopatología en la transmisión perinatal, pues solo en un 29% de los casos de infección por ZIKV durante el embarazo se desarrollan malformaciones en los fetos (Rivadeneira-Espinar y col., 2019).

Se estima un riesgo del 5 al 14 % de presentar SCZ en los recién nacidos de mujeres infectadas con ZIKV durante el embarazo y un 4 a 6% de microcefalia asociada al ZIKV (Musso y col., 2019).

D. Epidemiología

El virus del Zika fue aislado por primera vez en el bosque Zika, Uganda, en el año de 1947, siendo proveniente de un primate macaco Rhesus. Los primeros casos de infección en humanos se reportaron en 1954 en Nigeria (Noorbakhsh y col., 2019).

El virus se propagó en la década de 1960 a Asia, describiéndose solo con una distribución geográfica limitada y de manera esporádica casos hasta el año de 2007 cuando se produjo el primer brote de Zika en las Islas Yap, Micronesia, donde resultó infectado el 75% de la población (Masmejan y col., 2020). Posterior a este brote, entre los años de 2013 y 2014, se produjo un segundo brote de tamaño considerable en las islas de la Polinesia Francesa con más del 50 % de su población infectada, donde se evidenció la asociación entre las infecciones por este virus y el desarrollo de anomalías en el sistema nervioso, afectaciones que estuvieron presentes desde el inicio de las infecciones por ZIKV, pero que debido al número reducido de casos no fue posible establecerse de inmediato (Guanche, 2022). Estudios posteriores revelaron la

presencia de infección en otras islas del Pacífico y América del Sur, detectándose en el noreste de Brasil en 2015 (Masmejan y col., 2020).

Posteriormente, ZIKV se extendió por todas las regiones de América a la par con un aumento significativo en el número de casos de microcefalia y SGB, declarándose en el año 2016 Emergencia de Salud Pública de Preocupación Internacional (PHEIC) por la OMS ante la gravedad de sus manifestaciones clínicas asociadas (Guanche, 2022).

En el 2019, 87 países y territorios de África, Asia, América y el Pacífico informaron la presencia de Zika, observándose también de manera simultánea microcefalia en bebés con sospecha o confirmación de una infección congénita por ZIKV. En este mismo año se reportaron las primeras infecciones adquiridas en el sur de Francia, Europa, área donde no se encuentra *A. aegypti*, el principal mosquito vector de este virus, posiblemente fungiendo como vector *A. albopictus*; lo que sugiere que ZIKV tiene la capacidad de surgir como una amenaza potencial en cualquier área en la que se encuentren posibles mosquitos vectores del género *Aedes*, y de igual manera resurgir en lugares donde ya ha estado presente, causando afectaciones en la salud de la población (Masmejan y col., 2020).

En la actualidad, de acuerdo con la última revisión publicada por la OMS el 3 de junio del 2024, sobre la epidemiología global de la transmisión de ZIKV, se han sumado cinco países a la lista de países con evidencia de transmisión autóctona transmitida por mosquitos: Francia, Kenia, Guinea, Malí y Sri Lanka, dando un total de 92 países y territorios (Cuadro 1) (OMS 2024).

Cuadro 1. Países y territorios con transmisión actual o anterior del virus Zika.

Oficina regional de la OMS	País / Territorio	Total
Región Africana	Angola; Burkina Faso; Burundi; Cabo Verde; Camerún; República Centroafricana; Costa de Marfil; Etiopía; Gabón; Guinea; Guinea-Bissau; Kenia; Malí; Nigeria; Senegal; Uganda	16
Región de las Américas	Anguila; Antigua y Barbuda; Argentina; Aruba; Bahamas; Barbados; Belice; Bolivia (Estado Plurinacional de); Bonaire, San Eustaquio y Saba; Brasil; Islas Vírgenes Británicas; Islas Caimán; Colombia; Costa Rica; Cuba; Curazao; Dominica; República Dominicana; Ecuador; El Salvador; Guayana Francesa; Granada; Guadalupe; Guatemala; Guayana; Haití; Honduras; Isla de Pascua– Chile; Jamaica; Martinica; México; Montserrat; Nicaragua; Panamá; Paraguay; Perú; Puerto Rico; San Bartolomé; San Cristóbal y Nieves; Santa Lucía; San Martín; San Vicente y las Granadinas; San Martín; Surinam; Trinidad y Tobago; Islas Turcas y Caicos; Estados Unidos de América; Islas Vírgenes de los Estados Unidos; Venezuela (República Bolivariana de)	49
Región del Asia Sudoriental	Bangladesh; India; Indonesia; Maldivas; Myanmar; Sri Lanka; Tailandia	7
Región del Pacífico Occidental	Samoa Americana; Camboya; Islas Cook; Fiyi; Polinesia Francesa; República Democrática Popular Lao; Islas Marshall; Malasia; Micronesia (Estados Federados de); Nueva Caledonia; Palaos; Papúa Nueva Guinea; Filipinas; Samoa; Singapur; Islas Salomón; Tonga; Vanuatu; Viet Nam	19
Región Europea	Francia (departamento de Var)	1
Total		92

Modificado de: OMS, disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update-may-2024>.

Además, se reportan 60 países y territorios con riesgo latente de transmisión autóctona por vectores de ZIKV, ya que, aunque no se han documentado casos de infección por este virus, en ellos se encuentra presente su principal vector (Cuadro 2) (Figura 4) (OMS 2024; CDC 2024).

En la región de las Américas se notificaron un total de 55,813 casos de Zika para el año 2023. Desde la semana epidemiológica 1 hasta junio del 2024, la Organización Panamericana de la Salud (OPS), ha confirmado un total de 24,631 casos nuevos de Zika (OPS 2024).

En México, la Secretaría de Salud (SS) reporta 13,057 casos autóctonos confirmados de enfermedad por ZIKV desde 2015 hasta la semana epidemiológica 26 del 2024. Un total de 7,156 de estos casos fueron identificados en mujeres embarazadas (SS 2024).

En consideración a todos estos datos, se entiende que la circulación del virus es impredecible, por lo que se deben tomar medidas como el incremento de la vigilancia epidemiológica e investigación sobre esta enfermedad, ya que representa una amenaza a nivel mundial, en gran parte debido a la acelerada urbanización y los cambios en las condiciones climáticas en todo el mundo, que le confieren a este virus y su vector el potencial de amplificar su alcance e infectar a más personas (Masmejan y col., 2020).

Cuadro 2. Países y territorios con mosquitos vectores *A. aegypti*, pero sin casos conocidos de transmisión del virus Zika.

Oficina regional de la OMS	País / Territorio	Total
Región Africana	Benín; Botsuana; Chad; Comoras; Congo; República Democrática del Congo; Guinea Ecuatorial; Eritrea; Gambia; Ghana; Liberia; Madagascar; Malawi; Mauritania; Mauricio; Mayotte; Mozambique; Namibia; Níger; Reunión; Ruanda; Santo Tomé y Príncipe; Seychelles; Sierra Leona; Sudáfrica; Sudán del Sur; Togo; República Unida de Tanzania; Zambia; Zimbabue.	30
Región de las Américas	Uruguay	1
Región del Mediterráneo Oriental	Afganistán; Yibuti; Egipto; Omán; Pakistán; Arabia Saudita; Somalia; Sudán; Yemen	9
Región Europea	Chipre; Georgia; Região Autónoma da Madeira - Portugal; Federación Rusa; Turquía	5
Región del Asia Sudoriental	Bután; Nepal; Timor Oriental	3
Región del Pacífico Occidental	Australia; Brunei Darussalam; China; Isla de Navidad; Guam; Kiribati; Nauru; Niue; Islas Marianas del Norte (Mancomunidad de); Tokelau; Tuvalu; Wallis y Futuna	12
Total		60

Modificado de: OMS, disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update-may-2024>.

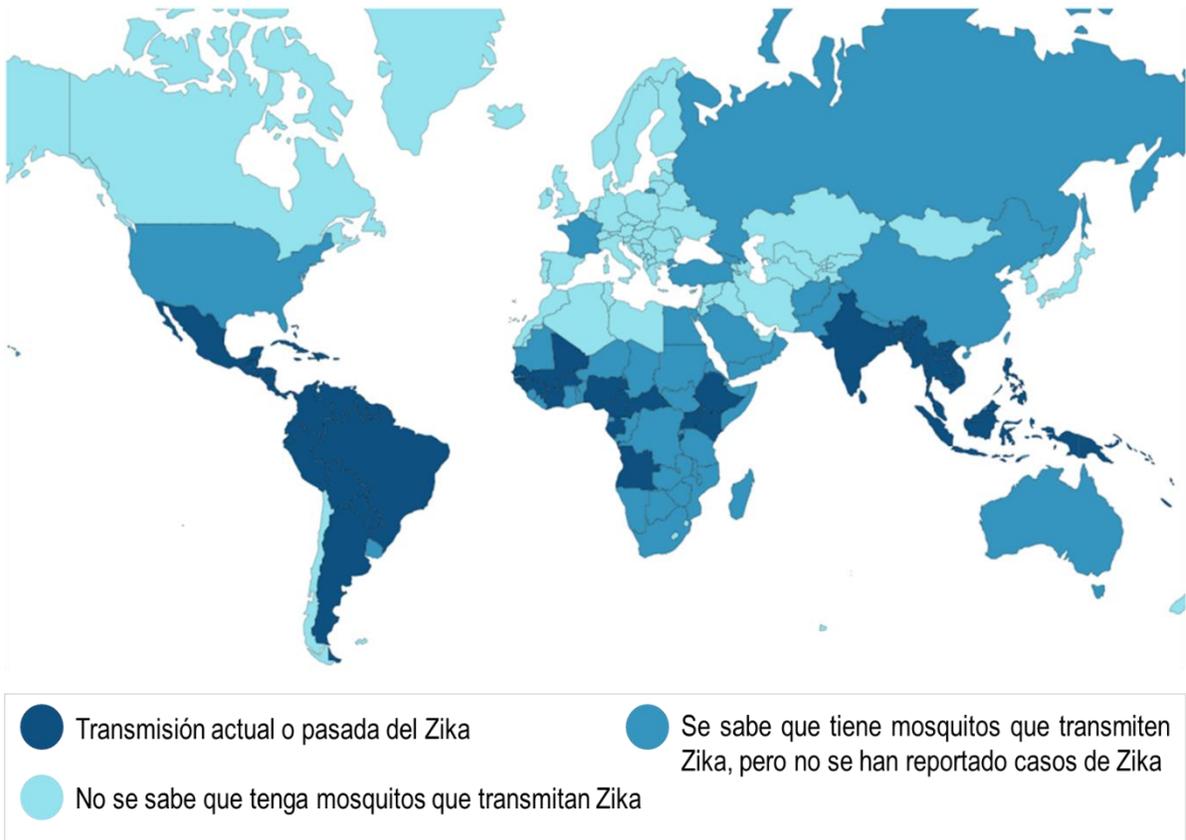


Figura 4. Distribución geográfica actual del Zika a nivel mundial. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) reporta los países con riesgo alto y bajo de transmisión de Zika. Modificado de: CDC 2024, disponible en: <https://www.cdc.gov/zika/geo/index.html>.

E. Diagnóstico

Debido a las manifestaciones clínicas inespecíficas de la infección por ZIKV, se precisa de diversas pruebas de laboratorio que permitan un diagnóstico definitivo, donde se incluyen ensayos moleculares y serológicos, además de las características clínicas de los pacientes (Rivadeneira-Espinar y col., 2019).

1. Ensayos moleculares

El RNA viral de ZIKV se puede detectar en múltiples fluidos corporales: sangre, orina, saliva, semen, leche materna, líquido conjuntival y líquido amniótico; y tejidos cerebrales y placentarios de fetos infectados de manera vertical (Noorbakhsh y col., 2019).

Durante la fase sintomática, el examen de elección para la detección de partículas de RNA viral, es la PCR de transcripción inversa (RT-PCR) del ZIKV, en muestras de sangre total o suero obtenidas durante los primeros días de la enfermedad; técnica con alta sensibilidad y especificidad que permite un diagnóstico temprano en comparación con los ensayos serológicos, que precisan de más tiempo para la generación de anticuerpos (Ciapponi y col., 2020). No obstante, la detección del RNA de ZIKV no es suficiente para concluir que estamos ante la presencia de virus infecciosos (Musso y col., 2019).

2. Ensayos serológicos

En su mayoría, los ensayos serológicos para la detección de anticuerpos (Ac) contra ZIKV se basan en la detección de los Ac pertenecientes a la clase IgM, en

muestras de suero o líquido cefalorraquídeo, detectándolos en un rango que va de 10 a 14 días después de la exposición o del inicio de los síntomas y se extiende hasta las 12 semanas posteriores; empleando para esto pruebas de neutralización, de inhibición de la hemaglutinación, ensayos de inmunofluorescencia y por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), entre otros (Musso y col., 2019 ; Ciapponi y col., 2020; Noorbakhsh y col., 2019).

Las pruebas serológicas tienen una ventana de diagnóstico más amplia en contraste con las pruebas moleculares. Sin embargo, presentan problemas de reactividad cruzada con otros flavivirus (Musso y col., 2019).

F. Prevención y tratamiento

1. Control del vector

La alta transmisión de arbovirus como ZIKV se debe principalmente a la abundancia y distribución del mosquito *A. aegypti*, por lo que una de las principales medidas de prevención es el control de este vector, valiéndose de un enfoque químico enfocado en la identificación y eliminación de criaderos y mosquitos adultos, o biológico con base en el uso de enemigos naturales (do Nascimento y col., 2022).

Las medidas de prevención se enfocan principalmente en las etapas juveniles para generar una reducción en el tamaño de la población de mosquitos vectores adultos, intervenciones que se logran comúnmente al dirigir en los hábitats acuáticos el uso de larvicidas tradicionales (ej. temephos y *Bacillus thuringiensis subesp. israelensis* (*Bti*)) que inducen la mortalidad en las etapas larvarias, causando efectos directos al ocasionar la muerte de las larvas e indirectos al influir

fenotípicamente en los mosquitos adultos que pudieron sobrevivir a la exposición con posibles implicaciones cruciales en la interacción mosquito-patógeno (Alomar y col., 2020).

Las estrategias más novedosas para el control de vectores incluyen al larvicida no tradicional llamado pyriproxyfen (PPF), que no mata las larvas, pero inhibe la conversión del mosquito a la etapa adulta, y bloquea la transmisión viral; de manera similar se aplica el uso de endosimbiontes genéticamente modificado y mosquitos modificados genéticamente para evitar que sus descendientes se conviertan en adultos (do Nascimento y col., 2022).

2. Vacunas y fármacos antivirales

Hasta la fecha no hay ninguna vacuna o fármaco específico y efectivo disponible para la infección por ZIKV (Jayachandran y col., 2021). Los tratamientos que se usan normalmente son solo del tipo paliativo empleado para aliviar los síntomas de la infección, no obstante, ya hay varias vacunas candidatas que están en ensayos clínicos y los investigadores que trabajan en desarrollos terapéuticos están empleando métodos dirigidos al ciclo de vida de los Flavivirus como uno de los objetivos terapéuticos para ZIKV (Jayachandran y col., 2021).

Naturalmente, se tiene a enzimas virales específicas como las moléculas diana de la mayoría de los medicamentos antivirales exitosos; además, más recientemente se ha desarrollado también la investigación en el campo de las terapias dirigidas al huésped, que actúan sobre proteínas del huésped y no del virus, como una estrategia antiviral de amplio espectro que tiene como objetivo afectar el ciclo de vida viral al

actuar sobre pasos cruciales de este (unión, entrada, fusión, formación del complejo de replicación, maduración viral y liberación), mostrando con frecuencia efectos antivirales por parte de un mismo compuesto contra múltiples virus (Guo y col., 2022; Farfan-Morales y col., 2021).

Cabe destacar que solo un pequeño número de candidatos que exhiben actividad antiviral contra ZIKV en modelos animales ha logrado avanzar a ensayos clínicos, por lo que aún existe una necesidad apremiante por desarrollar candidatos efectivos adicionales que sean aptos sobre todo para su uso en mujeres embarazadas y demás pacientes con complicaciones médicas (Guo y col., 2022).

G. Fuentes de tratamientos alternativos

Una solución alternativa para el tratamiento de las infecciones virales son los agentes terapéuticos de origen natural; las plantas han sido utilizadas con fines medicinales para luchar contra enfermedades desde la antigüedad (Huamán Novillo y Vasquéz Grandez, 2021). Se han extraído de plantas diversos compuestos como alcaloides, flavonoides, cumarinas, terpenoides, compuestos polifenólicos y demás agentes terapéuticos que exhiben una amplia gama de actividades biológicas (Kaur y col., 2020).

Además de las plantas, las especies marinas son una fuente importante de nuevos productos terapéuticos, ya que su hábitat abarca dos terceras partes de la tierra y por ello se han visto en la necesidad de desarrollar una amplia variedad de técnicas y productos químicos antiinfecciosos que les permitan defenderse de los microorganismos y virus con los que cohabitan (Rahman y col., 2022). Se ha

establecido que las algas y sus extractos son ricos en metabolitos con actividad farmacéutica y son consideradas fuentes potenciales de compuestos antivirales; se estima que el 9% de los compuestos biomédicos de origen marino son aislados a partir de algas, algunos imposibles de reproducir por síntesis química (Pagarete y col., 2021).

Entre estas, las microalgas son uno de los candidatos más interesantes para producir metabolitos bioactivos y productos biofarmacéuticos, incluyendo los antivirales; ya que cuentan con la capacidad de generar altos volúmenes de biomasa, son muy eficientes para generar compuestos de interés sin costos excesivos de energía, cuentan con costos de producción bajos, requieren de minerales simples para su crecimiento, no compiten por tierra agrícola para su siembra (como sería el caso de las plantas), y es posible el estimular la biosíntesis de compuestos específicos con la manipulación de las vías metabólicas a través del ajuste de las condiciones de cultivo, además de ser ecológicamente seguras y tener bajas concentraciones de toxinas (Khan y col., 2021; Chia y col., 2021; Rahman y col., 2022).

H. Microalgas

1. Generalidades

Una de las primeras formas de vida en la tierra son las microalgas, microorganismos fotosintéticos que convierten la energía solar y fuentes de carbono en compuestos orgánicos o biomasa (RIVERA y col., 2019).

Las microalgas están presentes en todo tipo de ecosistemas, tanto acuáticos como terrestres, en todas las condiciones de pH, concentración de sales o temperaturas

extremas, ya que exhiben una gran capacidad de adaptación (RIVERA y col., 2019). Se han identificado alrededor de 100,000 especies; sin embargo, sólo un tercio de estas se ha sometido a estudio y análisis (Sathasivam y col., 2019).

Las microalgas tienen un tamaño aproximado de 1 a 200 μm , son unicelulares, fotoautótrofas y las principales responsables de la producción a través de su proceso de fotosíntesis del oxígeno terrestre, siendo además esenciales para la mantención de la cadena trófica de la vida marina, ya que representan su eslabón inicial; en su mayoría son organismos eucariotas del reino Protista o Plantae, con excepción de las denominadas cianobacterias que son microalgas procariotas, carentes de un núcleo organizado, mitocondrias y cloroplastos, pertenecientes al reino Monera (Galarza, 2019).

Su reproducción se puede dar de tres formas: vegetativa por fisión binaria, asexual al formar esporas o sexual cuando existe intercambio genético (Galarza, 2019). Utilizan la luz solar de manera más eficiente en comparación con muchas plantas superiores, por lo que su tasa de reproducción y generación de biomasa es mucho mayor también, requiriendo para esto solo macronutrientes como nitrógeno y CO_2 , y micronutrientes minerales, además de la luz (Galarza, 2019).

Las microalgas se pueden clasificar con base en su género en la división: (1) Cyanophyta, conformado por cianobacterias, cuyos pigmentos característicos son la clorofila-a, así como ficobilinas, aloficocianina, ficocianina (azul) y ficoeritrina (rojo) que resultan en una variedad de colores, incluyendo el característico verdeazulado; (2) Chlorophyta, que contienen clorofila a y b al igual que las plantas, y el carotenoide luteína, por lo que son conocidas como algas verdes; (3) Bacillariophyta, conocidas

como diatomeas y consideradas protistas unicelulares eucarióticos, que poseen clorofila a, c1 y c2 y los pigmentos β - caroteno y fucoxantina que le dan la coloración marrón a las células; (4) Dinophyta, conocidos como dinoflagelados, que contienen clorofila a y c2 y varios carotenoides como peridinina y varias xantinas; (5) Charophyta, conocidas como algas verdes conjugadas que se encuentran fuertemente vinculadas con las Chlorophytas, que también contienen clorofila a y b; (6) Euglenophyta, conocidas como algas euglenoides que presentan clorofila a y b y carotenoides, siendo la acumulación de astaxantina lo que les da la coloración rojo brillante característica a las células; (7) Ochrophyta, con clorofilas a y c y los pigmentos carotenoides y xantofilas (fucoxantina), que le otorgan un color verde amarillento, dorado o marrón (Mercado Reyes y Álvarez Montero, 2022).

2. Composición bioquímica

Las microalgas presentan un alto contenido en proteínas, lípidos ricos en ácidos grasos insaturados y carbohidratos. Las proporciones de estos componentes presentan variaciones dependientes de la especie y también se ven diferenciados entre una misma especie a causa del cambio de las condiciones en que se encuentran: pH, salinidad, estrés, temperatura, intensidad de luz, privación de nutrientes, etc (Galarza, 2019).

De manera general, se estima que contienen alrededor de 20 a 57% de proteínas, 7 a 40% de lípidos y 4.1 a 32% de carbohidratos, esto en términos de peso seco y condiciones estándar de cultivo; su contenido proteico tiene una distribución equilibrada de los aminoácidos esenciales, entre un 70% y 90% de los lípidos totales

corresponden a fosfolípidos y los carbohidratos se pueden encontrar en forma de glucosa, fructosa, sacarosa, ramnosa, xylosa, manosa, almidón, glicógeno y celulosa (Encinas, 2023).

La versatilidad metabólica que les permite alterar su composición bioquímica y producción de biomasa en respuesta a las condiciones físico-químicas del cultivo las ha convertido en un objeto de interés comercial para la obtención de bioproductos por las industrias farmacéutica y alimenticia (Morales, 2019). Entre las especies más estudiadas y utilizadas para fines alimenticios en acuicultura gracias a su perfil bioquímico se encuentran *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans*, *C. muelleri*, *T. pseudonana*, *Skeletonema costatum*, *Rhodomonas spp.*, *Pyramimonas spp.*, *Navicula spp.*, *Nitzschia spp.*, *Cocconeis spp.*, *Amphora spp.*, *Nannochloropsis oculata*, *Dunaliella tertiolecta* y *Tetraselmis suecica*. *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* también se ha utilizado, aunque en menor medida (Encinas, 2023).

3. *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum es una microalga perteneciente al grupo de las diatomeas, reconocida por tener una alta tasa de crecimiento y reportar elevados porcentajes de lípidos y proteínas en su composición (Cuadro 3). Además, *P. tricornutum* también cuenta con una buena tolerancia a condiciones ambientales adversas y es empleada en cultivos a gran escala con relativa simplicidad. Sin embargo, poco es lo que se sabe en cuanto a su potencial como fuente de compuestos antivirales (Branco-Vieira y col., 2020; Encinas, 2023).

Cuadro 3. Caracterización 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). Modificado de: Branco-Vieira y col., (2020).

4. Compuestos bioactivos de las microalgas

Las microalgas son fuentes ricas en compuestos bioactivos como péptidos, proteínas, carbohidratos, terpenoides, ácidos grasos, flavonoides, compuestos fenólicos, vitaminas, porfirinas, entre otros; compuestos con múltiples aplicaciones potenciales para el desarrollo de la biomedicina y la industria biofarmacéutica, ya que estos reportan actividades farmacológicas de tipo antioxidante, neuroprotectora, citotóxica, anticancerígena, inmunomoduladora, antiprotoso, fungicida, bactericida y antiviral, por lo que es posible utilizarlas para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades de carácter autoinmune, tumoral e infeccioso que, además, al ser considerados GRAS (generalmente reconocidos como seguros), son viables para aplicaciones en salud que impliquen su consumo por humanos (Llopiz, 2016).

a. Potencial antiviral de péptidos e hidrolizados proteicos microalgales.

Debido a la complejidad de obtener una proteína en particular presente en la biomasa microalgal y poder evaluar su bioactividad sin que sea desnaturalizada mediante el proceso de extracción y aislamiento, algunos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos para la búsqueda de biofármacos en la generación de péptidos creados a partir de las proteínas extraídas de microalgas, mediante su sometimiento a un proceso de hidrólisis inducida con enzimas específicas, y determinar los efectos bioactivos de los péptidos resultantes considerando el hidrolizado proteico (HP) como un todo (Galarza, 2019). Estos péptidos tienen un tamaño aproximado de 2 a 20 residuos de aminoácidos por molécula, aunque pueden llegar a tener un tamaño ligeramente mayor, con un modo de acción diferente según su composición de aminoácidos; gracias a su reducido tamaño, menor a los 6 kDa, es que tienen un alto

potencial para desempeñar importantes actividades biológicas al atravesar más fácilmente la barrera intestinal y no desencadenar una respuesta inmune, contando además con una alta especificidad, baja toxicidad y poco riesgo de inducir resistencia, posicionándolos como candidatos a fármacos sumamente prometedores (Ratha y col., 2021; Sathya y col., 2021).

Una revisión sistemática realizada por Sathya y col., (2021) consolida a los péptidos derivados de microalgas como una fuente potencial de medicamentos de amplio espectro para el futuro, al presentar de manera conjunta los resultados de investigaciones, mostrando: (1) péptidos bioactivos con capacidad antioxidante aislados de microalgas pertenecientes a los géneros *Navicula* sp., *Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp., y *Espirulina* sp., generados a partir del tratamiento enzimático con papaína, pepsina o termolisina; (2) péptidos extraídos de las especies *C. vulgaris*, *C. pirenoidosa* y *S. platense* que muestran efectos citotóxicos en células cancerosas humanas; (3) producción de péptidos antihipertensivos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) por las microalgas, *C. vulgaris*, *C. ellipsiodea*, *N. incerta* y *S. platensis*; (4) péptidos antiateroscleróticos derivados de *Chlorella* sp., *Palmaria palmata* y *S. máxima*; (5) hidrolizados de proteínas de *C. vulgaris* que muestran actividad inmunomoduladora al promover el funcionamiento y proliferación de las células inmunitarias e inducir la liberación de citoquinas en estudios con ratones; y (6) efecto antimicrobiano/antibacteriano en péptidos derivados de *Spirulina* sp. a través de diversos estudios *in vitro* e *in vivo*.

IV. ANTECEDENTES

Diversas investigaciones han revelado el potencial terapéutico de extractos y compuestos derivados de microalgas, tales como ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos sulfatados, carotenoides, compuestos fenólicos, proteínas y péptidos. Estos últimos son de particular interés para el desarrollo de agentes terapéuticos antivirales debido a su alta especificidad y gran actividad, lo que les brinda una baja toxicidad y un menor desarrollo de efectos secundarios (Mahendran y col., 2021; Liu y col., 2021). En la actualidad, existe un medicamento de este tipo llamado Enfuvirtide (Fuzeon o T-20), el cual fue aprobado por la FDA y EMEA en 2003, que se encuentra indicado como tratamiento para la infección por VIH. Enfuvirtide es el liofilizado de un péptido sintético con actividad antiviral sumamente alta, con la capacidad de bajar la carga viral del VIH a niveles indetectables; hecho que genera una gran expectativa para el desarrollo de más péptidos como antivirales (Jiang y col., 1993; FDA 2003; EMEA 2003).

Se ha reportado inhibición de la actividad viral del virus de la influenza A, el virus del herpes simple y el virus de la inmunodeficiencia humana por parte de péptidos (Ratha y col., 2021; Sathya y col., 2021). Dos péptidos cíclicos presentes en los extractos metanolicos de una microalga del género *Microcystis* exhibieron una importante actividad antiviral contra el virus de la influenza A (IAV), reportando un 50 % de inhibición de la infección viral a una concentración de 20 µg/mL, sin mostrar efectos citotóxicos (Zainuddin y col., 2002, 2007).

Por otra parte, Affify y col., (2018) reportan altos porcentajes de actividad antiviral contra el virus Coxsackie B3 a una concentración de 100 ug/mL, para los hidrolizados

proteicos creados a partir de las proteínas de la microalga *Scenedesmus obliquus*. Obteniéndose, además un diferente porcentaje de actividad antiviral para los hidrolizados generados con diferentes enzimas (Afify y col., 2018). Estos resultados, sugieren que los hidrolizados proteicos son una excelente opción para el desarrollo de terapias antivirales, ya que, al estar conformados por un gran número de péptidos, maximizan la posibilidad de encontrar un efecto antiviral ejercido por uno o varios de estos péptidos, al evaluar en su conjunto el efecto de estos sobre pasos cruciales para el ciclo infectivo del virus, como la adhesión, integración, replicación o salida viral (Ratha, 2021). De manera similar, estudios *in silico*, reportan un alto potencial antiviral por parte de péptidos derivados de microalgas del género *Spirulina spp.* contra el virus SARS-CoV-2, siendo sumamente prometedores como inhibidores de la infección, ya que las estructuras predichas de los péptidos específicos seleccionados tienen la capacidad de unirse con la estructura de la proteína Spike (SP) del virus en cuestión (MubarakAli y col., 2021).

En cuanto a los mecanismos moleculares que les confieren esta actividad antiviral a los péptidos, podemos mencionar, por ejemplo, la capacidad para inhibir proteasas o polimerasas virales al unirse a estas enzimas e impedir la escisión proteica, el proceso de replicación y la maduración viral (Zainuddin y col., 2007; Jang y Park, 2016); y el bloqueo de la fusión del virus con las células objetivo mediante la unión del péptido con glicoproteínas de la superficie viral impidiendo su entrada a la célula (Jiang y col., 1993; MubarakAli y col., 2021).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El virus del Zika es un agente patógeno emergente que ha desencadenado brotes epidémicos importantes en varias regiones tropicales y subtropicales. La infección por ZIKV ha demostrado tener efectos negativos considerables en la salud, especialmente en mujeres embarazadas, donde se ha asociado con malformaciones congénitas serias, como la microcefalia en recién nacidos. A pesar de la creciente preocupación internacional y el significativo impacto en la salud pública, aún no existe un tratamiento antiviral específico aprobado para combatir el ZIKV.

La ausencia de tratamientos antivirales específicos plantea un problema crucial, ya que limita las opciones disponibles para gestionar y controlar los brotes del virus. Por lo tanto, es esencial desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para enfrentar esta amenaza emergente al desarrollar nuevos candidatos a fármacos que puedan mitigar el impacto del virus, mejorar los resultados clínicos y reducir la carga global asociada con la infección por ZIKV.

Las microalgas son ampliamente reconocidas como fuentes de compuestos biomédicos valiosos. Dentro de este grupo, *P. tricornutum* es una especie que, a pesar de haber sido extensamente estudiada, aún está poco explotada en este ámbito. Esta microalga se destaca por su alto contenido de proteínas de excelente calidad, lo que la convierte en una opción ideal para la producción de hidrolizados proteicos y, por ende, de posibles péptidos bioactivos.

Por lo tanto, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Los hidrolizados proteicos creados a partir de las proteínas de la microalga *P. tricornutum* son capaces de inhibir la infección causada por el virus del Zika?

VI. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de antivirales efectivos contra el virus del Zika es de suma importancia debido a la amenaza continua que representa esta enfermedad para la salud pública global. La gravedad de las complicaciones neurológicas asociadas a la infección por ZIKV destaca la necesidad urgente de desarrollar tratamientos eficaces que puedan mitigar el impacto del virus.

Las microalgas son una fuente prometedora de agentes terapéuticos, que se posicionan como una alternativa innovadora y ecológicamente sostenible, en comparación con las fuentes tradicionales de fármacos. Las proteínas de microalgas, que a menudo son subproductos desaprovechados de procesos industriales, representan una opción atractiva para el desarrollo de antivirales mediante la creación de hidrolizados proteicos. Este enfoque permite evaluar una amplia variedad de péptidos simultáneamente, lo que aumenta la posibilidad de encontrar un efecto antiviral potente mediante la sinergia entre los péptidos. Al aprovechar los mecanismos de acción únicos de los péptidos, se podrían crear tratamientos más efectivos y específicos. Además, este método podría conducir al desarrollo de antivirales de amplio espectro, capaces de atacar múltiples tipos de virus y mantener su eficacia frente a la mutación de cepas virales.

El desarrollo de un antiviral eficaz contra el virus del Zika podría tener un gran impacto en la salud pública, la economía y la investigación científica. Este antiviral podría reducir la gravedad y duración de la enfermedad, disminuir las complicaciones asociadas y ayudar a controlar brotes en áreas endémicas, previniendo la propagación

a nuevas regiones y reduciendo el riesgo de epidemias. Además, ofrecería una protección crucial para las poblaciones vulnerables, como las mujeres embarazadas.

Esta investigación busca contribuir a los esfuerzos para desarrollar antivirales contra ZIKV, con el objetivo de ofrecer opciones de tratamiento para las personas infectadas y mejorar la salud pública a nivel global.

VII.HIPÓTESIS

Los hidrolizados proteicos de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* presentan actividad antiviral contra el virus Zika.

VIII. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Evaluar la actividad antiviral de los hidrolizados proteicos de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* contra el virus Zika.

B. Objetivos específicos

- 1) Obtener hidrolizados proteicos a partir de la biomasa de la microalga *P. tricornutum*.
- 2) Evaluar la citotoxicidad de los hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* en células Huh-7.
- 3) Evaluar el efecto antiviral de la infección causada por ZIKV de los hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* en células Huh-7.

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Material biológico y cepa viral

La microalga *P. tricornutum* se obtuvo del cepario de microalgas del Laboratorio de Fisiología Molecular del Centro de Investigación Aplicada a la Salud Pública (CIASaP) de la Universidad Autónoma de Sinaloa; originalmente adquirida de la colección de cultivos del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE).

Las células derivadas de hepatocarcinoma humano Huh-7 se cultivaron a una densidad del 60 - 70% con medio DMEM suplementado con glutamina 2 mM, penicilina (5×10^4 U/mL)-estreptomicina (50 μ g /mL), suero fetal bovino (SFB) al 8% y 1 mL/L de anfotericina B (Fungizona) en multiplacas para cultivo celular con 37 °C y una atmósfera de CO₂ al 5% como condiciones para su crecimiento. Las células de riñón de mono verde Vero se cultivaron bajo las mismas condiciones con el medio Panserin Pro Vero.

La cepa del virus ZIKV empleada para los ensayos de infección fue amablemente donada por el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav). ZIKV se propagó por inoculación intracraneal en cerebros de ratones lactantes CD-1 (proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL)) de 2-3 días de nacidos; a los 4-5 días post-inoculación, los ratones fueron sacrificados, el virus se purificó a partir de los cerebros de las crías por medio de maceración, centrifugación y filtración a través de membrana de 0.22 μ M.

Los títulos virales fueron determinados mediante ensayo de Unidades Formadoras de Focos (UFF) en células Vero.

B. Estrategia experimental

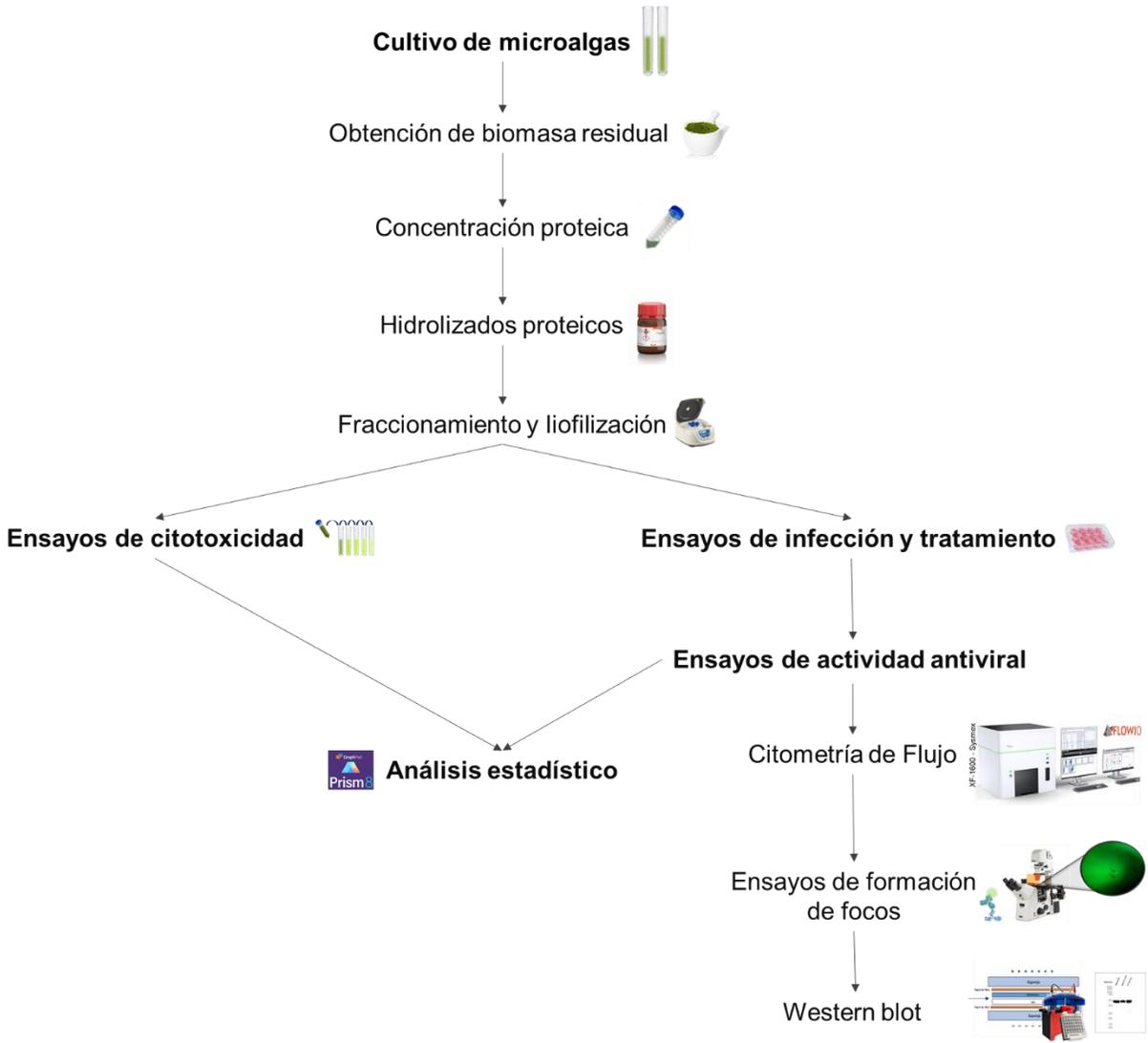


Figura 5. Diagrama de estrategia experimental.

C. Cultivo de microalgas

El cultivo de microalgas se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Guillard y Ryther (1962) empleando como base para el cultivo el medio F/2, compuesto por vitaminas, fosfatos, nitratos y metales traza; y la técnica de transferencias sucesivas propuesta por Norzagaray-Valenzuela y col., (2017) (Figura 6).

Las cepas fueron escaladas en su fase de crecimiento exponencial de un volumen inicial de 15 mL, a matraces Erlenmeyer de 50 mL, 1 L y 3 L; finalmente, se transfirieron a fotobiorreactores de 16 L, cada cultivo se estableció por duplicado, conteniendo cada uno de estos 1 mL del medio F/2 por cada litro de agua de mar. Todo el cultivo se mantuvo a una temperatura constante de 24 °C, empleando un equipo de refrigeración/calefacción. El cultivo se sometió a iluminación contante para acelerar el crecimiento celular, las células se encontraron expuestas a la misma cantidad de luz (6000-6500 luxes). La viabilidad y estabilidad de los cultivos fue verificada mediante el control del pH con la adición continua de burbujeo de CO₂ con un soplador (blower) de 2.5 hp de potencia, previamente filtrado con un cartucho de 1 µm facilitando el intercambio de gases y manteniendo en suspensión a las microalgas.

La cosecha de microalgas se realizó cuando el cultivo se encontraba en el máximo de la fase exponencial, detectado a través de las curvas de crecimiento, de acuerdo con Lopez-Elias y col., (2004).

D. Obtención de biomasa residual

La recuperación de la biomasa se llevó a cabo por medio del método de floculación, empleando Quitosano como floculante orgánico. Se añadió 0.5 mL de floculante por

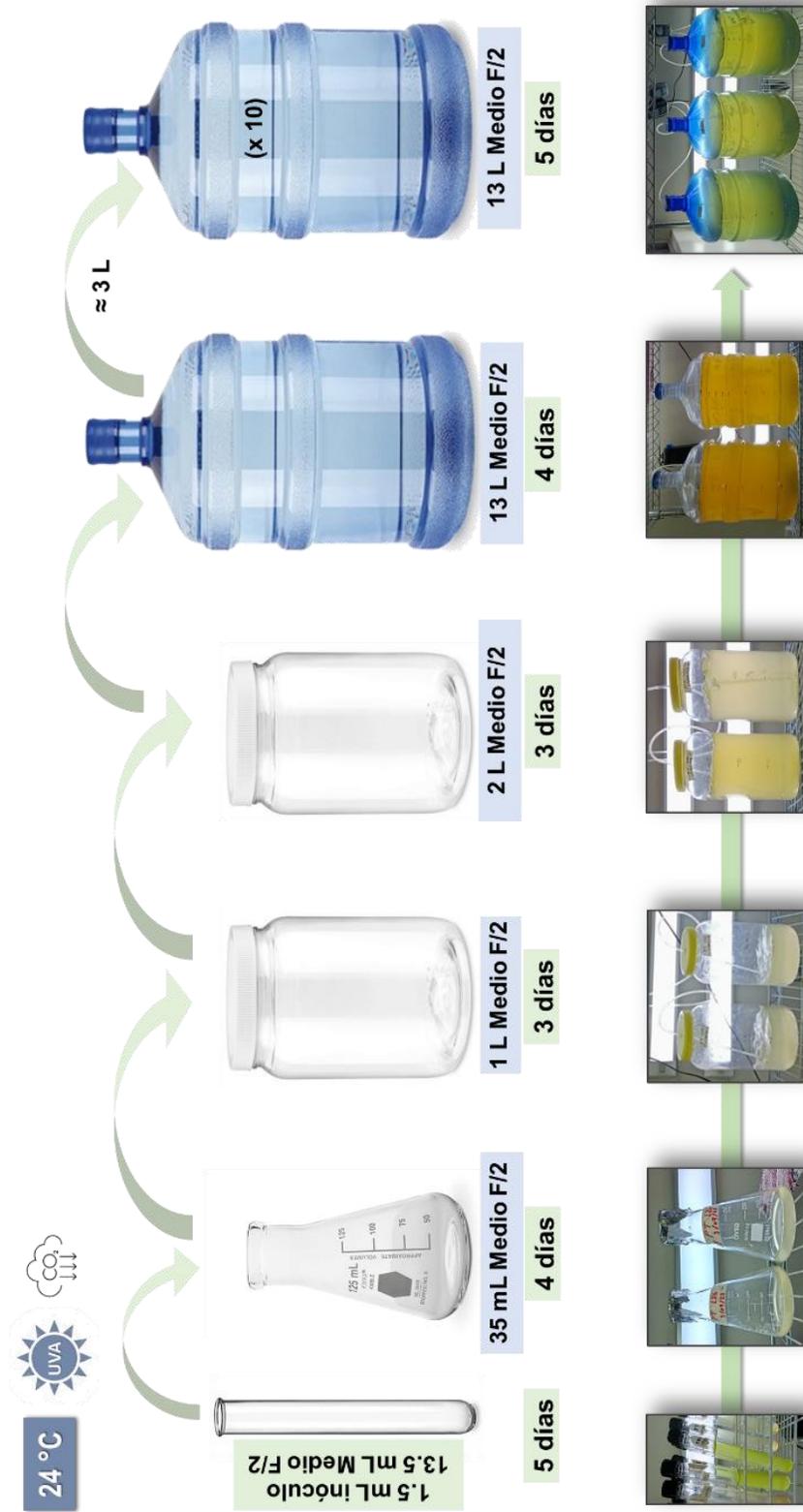


Figura 6. Cultivo de *P. tricornutum*.

cada litro de cultivo; el cultivo se mantuvo en reposo y se dejó actuar al floculante por 24 h, donde posterior a este tiempo se pudo observar la separación de la biomasa del medio de cultivo. El medio se retiró por procesos de decantación y centrifugado; la biomasa fue secada en horno a 40 °C por 24 h para remover la humedad remanente y almacenada a 4 °C hasta su uso posterior.

El proceso de extracción de aceite se llevó a cabo de acuerdo con la metodología de Bligh y Dyer (1959). A 50 gr de la biomasa recuperada se le agregó acetato de etilo como solvente en una relación 1:1 (biomasa - solvente). El matraz que contenía esté preparado fue protegido de la luz, colocado en hielo para evitar cambios bruscos de temperatura, y sometido a un proceso de sonicación por 1 h para potenciar la ruptura celular y extracción de aceites. Posteriormente, la mezcla se mantuvo en agitación continua a una velocidad constante durante 24 h a temperatura ambiente (23 – 25 °C).

La separación de la biomasa del solvente se realizó mediante centrifugación a 3,500 rpm por 20 min. Esta biomasa residual fue secada a 40 °C por 24 h; se le realizaron 5 lavados con agua destilada estéril, mediante un proceso de filtración al vacío con filtros Whatman #4, para eliminar restos de sal y solventes, aumentando así su pureza. Finalmente, la biomasa resultante de este proceso fue secada a 40 °C por 24 h, macerada con mortero de porcelana y almacenada a 4 °C hasta su uso posterior (Mussnug y col., 2010).

E. Concentración de la proteína microalgal

El procedimiento utilizado para obtener el concentrado se basó en el descrito por Safi y col., (2014), con modificaciones menores.

Se resuspendieron 20 gr de biomasa residual de microalgas en 250 ml de NaOH 2 M, esta mezcla fue puesta en agitación suave durante 2 h a temperatura constante de 40 °C y posteriormente sometida a centrifugación por 20 min a 4,000 rpm a 20 °C. La fracción sobrenadante se recuperó y su pH se ajustó a 3 con HCl 0,1 N para poder precipitar las proteínas hidrosolubles, esta mezcla fue nuevamente sometida a centrifugación y el pellet (componente proteico) fue recuperado con adición de una solución de NaOH a 0.01 M. Finalmente, la solución de proteínas fue neutralizada ajustando su pH a 7.

F. Generación de hidrolizados proteicos

Los hidrolizados proteicos (HP) se obtuvieron a partir de los concentrados proteicos de la biomasa residual de la microalga *P. tricornutum* según lo descrito por Humiski y Aluko (2007), con modificaciones (Figura 7). Se prepararon disoluciones acuosas de los concentrados proteicos. La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el kit BCA (*Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible*). La hidrólisis inició al agregar la enzima Alcalasa® al 4% (enzima/sustrato), la reacción se llevó a cabo por 60 min manteniendo pH y temperatura óptima para la actividad enzimática constante (pH 9, 50 °C). La hidrólisis enzimática fue detenida después de este tiempo, ajustando el pH de la solución a 4 y llevando a 95 °C en baño maría. Posteriormente, este preparado se centrifugó a 3,500 rpm por 30 min, y el sobrenadante colectado y almacenado a - 4 °C hasta su posterior uso.

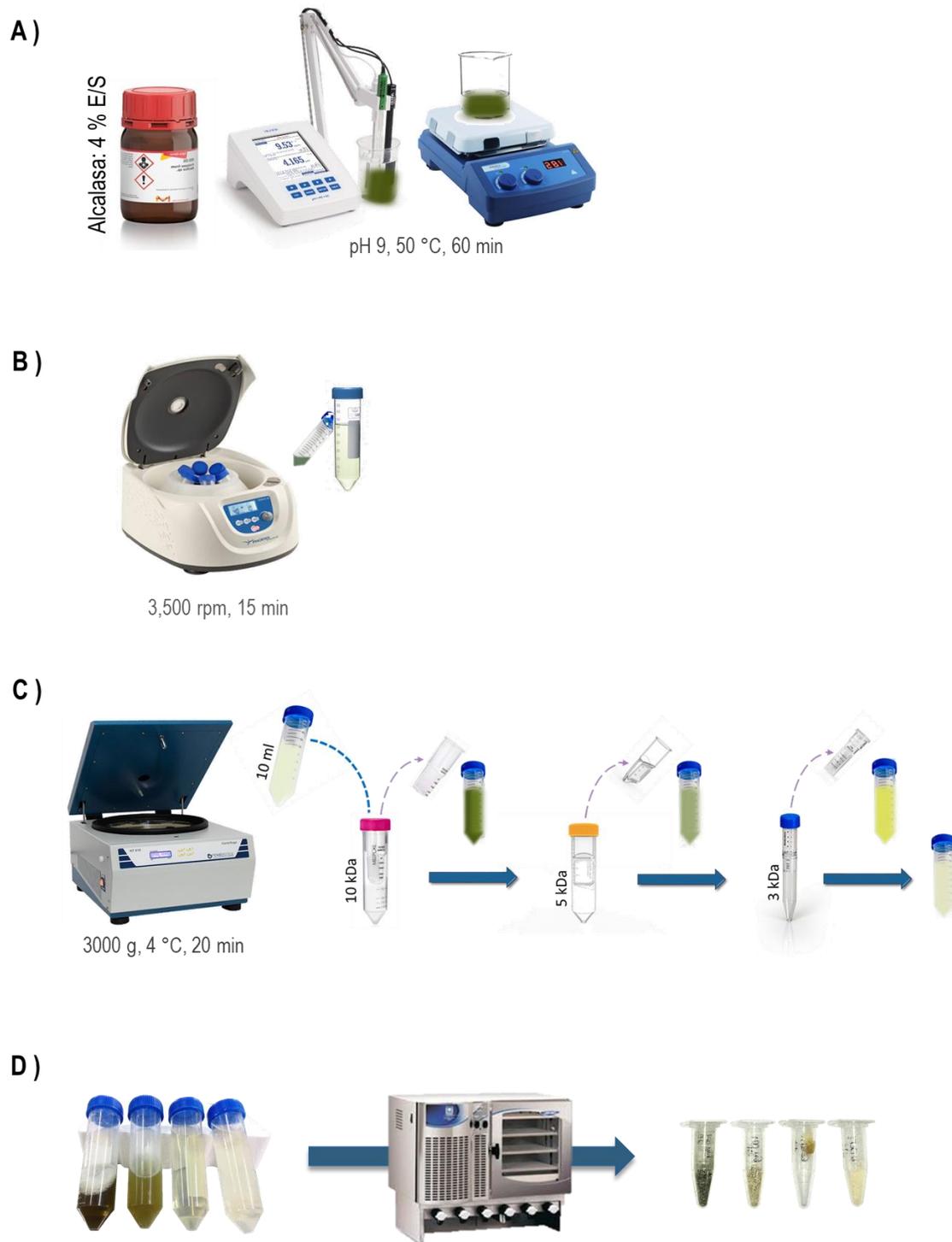


Figura 7. Proceso de obtención de hidrolizados proteicos fraccionados. A) Hidrolisis inducida. B) Recuperación de los HP. C) Fraccionamiento. D) Liofilización. Modificado de: Humiski y Aluko (2007) y Hou y col., (2019).

G. Fraccionamiento de hidrolizados proteicos

El hidrolizado proteico fue separado en varias fracciones según los diferentes tamaños de los péptidos resultantes. Estas fracciones se almacenaron a -4 °C y fueron liofilizadas para realizar los estudios posteriores, según la metodología propuesta por Hou y col., (2019) con modificaciones menores (Figura 7).

Para aislar fracciones peptídicas se aplicó un método basado en ultrafiltración centrífuga empleando tubos con dispositivos de filtros centrífugos selectivos para diferentes masas molares. Específicamente, los dispositivos de filtrado Amicon® Ultra-15 30 K, 10 K y 3 K con cortes de peso molecular (MWCO) de 30, 10 y 3 kDa, respectivamente; y los concentradores centrífugos Vivaspin® Turbo con corte de peso molecular de 5 kDa para obtener 4 fracciones peptídicas diferentes en términos de PM (10 - 30 kDa, 5 - 10 kDa, 3 - 5 kDa y < 3 kDa). Para este proceso, se partió del uso del tubo con filtro de 30 kDa, este fue cargado con 10 ml de la solución de hidrolizado, se centrifugó a 3000 g y 4 °C por 20 min, la fracción retenida resultante (fracción > 30 kDa) se descartó; la fracción que no fue retenida por el filtro se cargó en el tubo con filtro de 10 kDa, se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones y la fracción retenida (10 - 30 kDa) se resuspendió en agua destilada antes de recuperarlo para su posterior liofilización.

Este procedimiento se aplicó nuevamente al retenido y al filtrado, empleando los tubos restantes para obtener las tres fracciones peptídicas faltantes (5 - 10 kDa, 3 - 5 kDa y < 3 kDa). Después de dar por terminado el proceso de ultrafiltración todas las fracciones obtenidas se liofilizaron. Se empleó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para verificar el correcto

fraccionamiento y visualizar los péptidos contenidos en los HP. Se cargaron muestras por duplicado con una cantidad equivalente de proteína (20 µg) para todas las variantes. Se utilizó un marcador como referencial del peso molecular con un rango comprendido entre los 10 y 250 kDa.

Los geles se tiñeron con azul brillante Coomassie R-250 y fueron desteñidos de manera secuencial con dos soluciones diferentes de metanol y ácido acético (1: metanol 40%, ácido acético 10%, 2: metanol 7%, ácido acético 10%). Las imágenes de los geles se capturaron con un fotodocumentador (BioRAD Gel Doc XR) y se visualizaron con en el software ImageLab.

H. Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) con células Huh-7 cultivadas en placas de 96 pozos hasta una confluencia del 60-70%. Las monocapas celulares fueron tratadas por triplicado con concentraciones crecientes de cada una de las diferentes fracciones del hidrolizado proteico (0 µg/mL (vehículo: agua inyectable), 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 y 1000 µg/mL), e incubadas durante 48 h a 37°C y 5% CO₂.

Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio con el excedente de hidrolizados; se adicionó el reactivo MTT (0.5%) diluido en TBS (1X) y suplementado con medio DMEM (c/ SFB), posteriormente la placa de cultivo celular se incubó por un lapso de 3 h bajo las mismas condiciones. A continuación, se agregó 100 µL de DMSO a cada pozo. La placa se mantuvo en agitación constante por 15 min a temperatura

ambiente con el propósito de homogeneizar los cristales de Formazán formados durante el ensayo. Finalmente, los resultados fueron leídos en espectrofotómetro según la diferencia entre la absorbancia a 562 nm y 630 nm, que elimina el fondo. Para estimar la viabilidad celular, se normalizaron los valores obtenidos con las células tratadas con las concentraciones de los HP con los de las células que no recibieron tratamiento alguno. El 80 % se fijó como límite mínimo de viabilidad para ser considerado como no citotóxico.

I. Ensayos de infección y tratamiento

Las células Huh-7 fueron sembradas en placas de 12 pozos e infectadas con ZIKV a una multiplicidad de infección de 1 (MOI=1 UFF/mL) cuando alcanzaron una confluencia del 60 - 70%, se dio un tiempo de 2 h a 37 ° C para que se absorban las partículas virales. Las células fueron lavadas con medio HANKS' (1X), para retirar el exceso de inóculo viral. Posteriormente, se realizó el ensayo de inhibición, usando como vehículo, dH₂O estéril y como fármaco las diferentes fracciones del hidrolizado proteico en medio completo DMEM durante 48 h a 37 °C; las fracciones de los HP y las concentraciones empleadas se fijaron tomando en consideración los resultados de los ensayos de viabilidad celular de las diferentes fracciones del hidrolizado proteico y lo previamente reportado en la literatura. Se decidió evaluar la actividad antiviral de los HP con tamaños de 5 a 10 kDa y los menores de 3 kDa, a dos concentraciones cada uno: 150 µg/mL y 300 µg/mL.

J. Citometría de flujo

Las monocapas de células Huh-7 fueron despegadas con tripsina; la acción enzimática fue detenida con la adición de medio completo. Las células fueron recuperadas y transferidas a tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las células fueron concentradas en un pellet mediante un proceso de centrifugación a 600 rpm por 8 min a 4°C y posteriormente fijadas con 600 uL de paraformaldehído (PFA) frío al 4%. Las células fueron tratadas con 500 uL de solución permeabilizadora (saponina 0.2% y SFB 1%) y marcadas con el anticuerpo primario 4G2 (1:750) incubando toda la noche a 4 °C en agitación constante. Se realizaron lavados con PBS (1X) para eliminar el exceso de anticuerpo primario. El marcaje con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (1:750) se llevó a cabo su incubación durante 2 h a temperatura ambiente, con agitación constante y protección de la luz. Se realizaron lavados con PBS (1X) para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Las células fueron almacenadas hasta su uso posterior en 200 uL de PBS (1X) y protegidas de la luz. Finalmente, estas muestras fueron colocadas en tubos para citometría y se realizaron las mediciones correspondientes en el equipo Sysmex (*XF-1600™ Flow Cytometer; Sysmex Corporation, Japan*). Los datos obtenidos fueron analizados en el programa FlowJo versión 10.8.1.

K. Ensayos de formación de focos

Se utilizó el ensayo de formación de focos para determinar el título viral de las células infectadas y tratadas en contraste con las que no recibieron tratamiento. Para ello se emplearon células Vero en un formato de multiplaca de 96 pozos con una

confluencia del 60 – 70%. Por otro lado, se crearon diluciones seriadas en base 10 (volumen final de 150 μ L) utilizando 135 μ L de medio HANK's más 15 μ L de sobrenadante viral (recuperado del ensayo de infección y tratamiento). Se obtuvieron las diluciones -1 a -11 del sobrenadante recuperado de cada uno de los pozos del ensayo de infección y tratamiento. Posterior a esto, el medio de cultivo de las células Vero fue eliminado y se les adicionó 50 μ L de la dilución viral correspondiente (por duplicado) como medio de adsorción viral en los pozos, incubándose 2 h a 37°C. Posteriormente, se eliminó el exceso de inóculo viral y se añadieron 200 μ L por pozo de medio DMEM (c/SFB), incubándose por 48 h a condiciones estándar. Después de esta incubación se retiró el medio para lavar 1 vez con PBS (1X), se fijaron las células con paraformaldehído al 4% por 20 min y se realizaron más lavados con PBS (1X). Las células se permeabilizaron con una solución de Saponina al 0.2%, se marcaron con anticuerpo primario 4G2 durante toda la noche a 4 °C; al día siguiente, el marcaje con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 488 se llevó a cabo a temperatura ambiente por un lapso de 1 h. El número de unidades formadoras de focos (UFF) se determinó empleando microscopia de fluorescencia, a través de un promedio de las diluciones seriadas duplicadas, mediante la fórmula:

$$UFF/mL = \frac{\text{(Número de focos) (antilog dilución viral)}}{mL \text{ de diluyente}}$$

L. Western blot

Para realizar los ensayos de Western blot se partió de células Huh-7 infectadas con ZIKV (MOI: 1) y tratadas con una concentración de 150 µg/mL de los hidrolizados proteicos seleccionados (T1: HP < 3 kDa; T2: HP 5 – 10 kDa). A estas células se les realizó una extracción total de proteínas empleando el buffer de lisis RIPA en conjunto con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las células lisadas fueron despegadas de las placas con ayuda de un scraper, sus extractos fueron recuperados con micropipeta y transferidos a tubos de 0.6 mL; el componente proteico fue separado de los restos de membranas celulares mediante centrifugación a 10,000 g durante 10 min a 4 °C. Se utilizó el método de BCA (*Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible*) para llevar a cabo la cuantificación de las proteínas.

Para la electroforesis se crearon geles de poliacrilamida al 12 % (gel separador) y 5 % (gel concentrador), configurando la fuente de poder para suministrar 80 voltios por 20 min y después 110 voltios por aproximadamente 1 h.

Se utilizaron membranas de nitrocelulosa y una cámara de transferencia húmeda para llevar a cabo la transferencia de las proteínas del gel, a 100 voltios por 70 min a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau y las bandas cortadas con su marcador de peso correspondiente (NS3: 70 kDa; β actina: 46 kDa). Las membranas se lavaron 3 veces con Tritón X-100 al 0.02 %; se bloquearon con leche descremada al 10% durante 1 h y se les realizaron otros 3 lavados con Tritón X-100 al 0.02 % para eliminar remanentes de la solución de bloqueo. Para el marcaje con anticuerpos se empleó el anticuerpo primario GTX124253 anti NS3 (1: 5000) y como control el anticuerpo ACTBD11B7 anti β actina (1: 3000) diluidos en Tritón X-100

al 0.02 % e incubando toda la noche a 4 °C con agitación constante. Los anticuerpos secundarios empleados fueron un anti-conejo (para GTX124253; 1: 5000) y un anti-ratón (para ACTBD11B7; 1: 5000) acoplados a la encima peroxidasa de rábano picante diluidos en una solución de leche descremada al 5%; el marcaje con estos anticuerpos se dio durante 90 min, a temperatura ambiente y también con agitación constante. Finalmente, las membranas fueron lavadas 3 – 5 veces con Tritón X-100 al 0.02 % y los resultados medidos en equipo de WB software Image Studio empleando peróxido y luminol (1:1) como sustratos para reportar la señal quimioluminiscente por parte de la peroxidasa. Los resultados fueron analizados mediante el programa ImageJ y GraphPad Prism en su versión 8.

M. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por duplicado, con al menos dos repeticiones independientes. Los resultados se expresaron con el valor de la media \pm la desviación estándar (SD). Se utilizó la prueba ANOVA de una vía corregida para múltiples comparaciones con la prueba post-hoc de Dunnett. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico GraphPad Prism versión 8 tomando como significancia estadística valores de $p \leq 0.05$.

X. RESULTADOS

A. HIDROLIZADOS PROTEICOS

La obtención de los HP se realizó mediante la hidrólisis inducida de las proteínas obtenidas a partir de la biomasa de la microalga *P. tricornutum*. Después de fraccionar las muestras utilizando tubos de ultrafiltración con distintos cortes de peso molecular y de liofilizarlas, se obtuvieron cuatro fracciones de hidrolizados proteicos: 1) 10 - 30 kDa, 2) 5 – 10 kDa, 3) 3 – 5 kDa y 4) < 3 kDa.

Las fracciones de hidrolizados proteicos liofilizados se disolvieron fácilmente en agua inyectable. Tanto en los hidrolizados proteicos liofilizados como en los resuspendidos, se observaron diferencias notables entre las cuatro fracciones, visibles a simple vista. Estas diferencias incluyeron variaciones en color, desde tonos más claros hasta más oscuros, y en textura, que iba desde una apariencia más homogénea hasta una más heterogénea o granulosa (Figura 8). Estas características físicas podrían tener un impacto significativo en la eficacia de los hidrolizados proteicos para realizar una actividad antiviral. Por ejemplo, la textura y el color podrían estar relacionadas con la estructura y la solubilidad de las fracciones, lo que a su vez puede afectar su interacción con los objetivos virales y su capacidad para inhibir la replicación del virus.

El contenido proteico de los hidrolizados se cuantificó utilizando el método BCA, mientras que el tamaño de los péptidos se determinó mediante SDS-PAGE. En el gel de electroforesis se cargaron duplicados de muestras de cada fracción junto con un

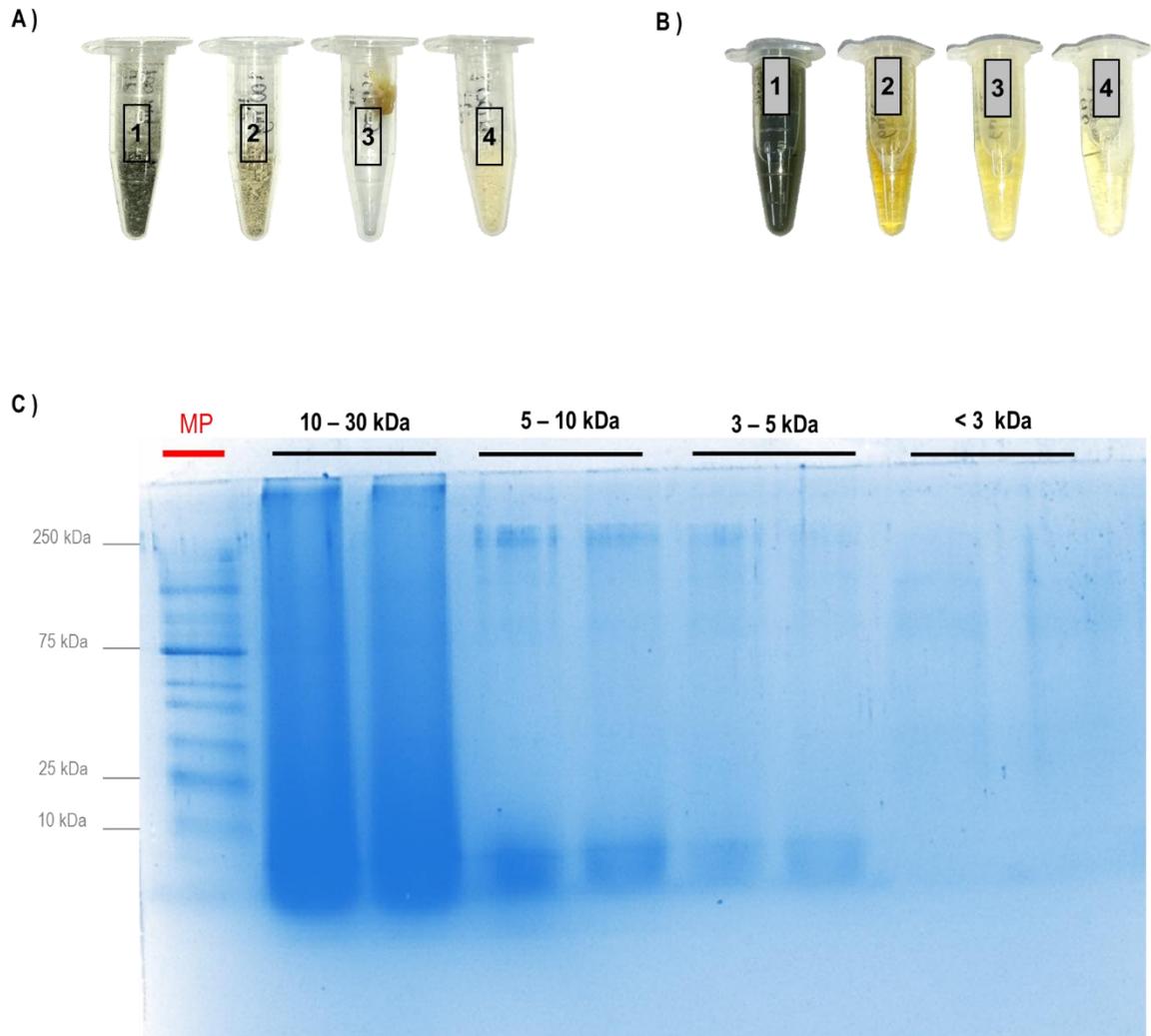


Figura 8. Hidrolizados proteicos de *P. tricornutum*. A) Hidrolizados proteicos fraccionados y liofilizados. B) Fracciones liofilizadas de los HP resuspendidas en agua inyectable y llevados a una concentración de 100 mg/mL. 1) 10 - 30 kDa, 2) 5 - 10 kDa, 3) 3 - 5 kDa y 4) < 3 kDa. C) SDS-PAGE. Carril 1: Marcador de peso molecular 10 - 250 kDa; Carril 2,3: duplicado de la fracción de 10 a 30 kDa; Carril 4,5: duplicado de la fracción de 5 a 10 kDa; Carril 6,7: duplicado de la fracción de 3 a 5 kDa; y Carril 8,9: duplicado de la fracción menor a los 3 kDa.

marcador de peso molecular para estimar el tamaño de los péptidos presentes en cada muestra (Figura 8). El peso molecular es una característica crucial a considerar, ya que puede provocar diferencias significativas en la capacidad antiviral de las distintas fracciones del hidrolizado proteico. Diferentes fracciones podrían interactuar de manera distinta con los virus, lo que influiría en su eficacia para inhibir o neutralizar la actividad viral.

Aunque la resolución de las bandas en el gel no fue óptima, la imagen revela claramente una variación en el patrón de bandeo entre las diferentes fracciones, así como una concentración desigual, evidenciada por el grosor de las bandas.

En la Figura 8 (panel C), se observa que las bandas correspondientes a las dos primeras fracciones (10 – 30 kDa y 5 – 10 kDa) son claramente visibles y presentan una alta intensidad dentro del rango de tamaño esperado. Estas bandas bien definidas sugieren que el proceso de fraccionamiento según el peso molecular ha sido eficaz y preciso. La alineación de estas bandas con los rangos de peso molecular determinados previamente por ultrafiltración valida que la separación de las fracciones ha sido realizada correctamente y que las fracciones han sido correctamente identificadas en términos de su peso molecular.

Por otro lado, las bandas correspondientes a las dos fracciones finales (3 – 5 kDa y < 3 kDa) son considerablemente más débiles y en algunos casos casi invisibles. Este hallazgo sugiere que la concentración de péptidos en estas fracciones es significativamente menor en comparación con las fracciones de mayor peso molecular. La debilidad de las bandas puede reflejar una menor cantidad de péptidos en estas

fracciones, lo que puede deberse a una menor cantidad de péptidos presentes o a su posible degradación durante el proceso de fraccionamiento.

Además, la falta de bandas en los rangos de tamaño distintos a los especificados para estas fracciones indica una alta especificidad en términos de tamaño y conformación peptídica. La presencia de bandas únicamente en los rangos de tamaño esperados sugiere que el fraccionamiento ha sido preciso y que las fracciones obtenidas están bien definidas.

B. VIABILIDAD CELULAR DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS

La toxicidad de las diferentes fracciones de los HP (< 3 kDa, 3 – 5 kDa, 5 – 10 kDa y 10 – 30 kDa) se evaluó mediante el ensayo de viabilidad celular por MTT. Para cada fracción, se emplearon concentraciones que abarcan un amplio rango, desde 5 µg/mL hasta 1000 µg/mL. El análisis de viabilidad celular reveló que todas las fracciones, en el rango de concentraciones evaluado, no presentaron citotoxicidad significativa. Específicamente, ninguna de las concentraciones aplicadas redujo el porcentaje de viabilidad celular por debajo del 80%.

La ausencia de efectos citotóxicos significativos en todas las fracciones y concentraciones evaluadas sugiere que el hidrolizado proteico de *P. tricornutum* tiene una alta seguridad para su uso en células Huh-7. Este hallazgo indica que, dentro del rango de concentraciones probado (5–1000 µg/mL), el hidrolizado proteico no ejerce un impacto adverso en la viabilidad celular, destacando su potencial para aplicaciones experimentales y terapéuticas en este tipo de células.

Dado que no se observaron efectos citotóxicos relevantes, se puede considerar la evaluación de tratamientos con concentraciones de hasta 1 mg/mL de cualquiera de las fracciones del hidrolizado proteico. Esta conclusión permite explorar más a fondo el potencial de las fracciones del hidrolizado proteico como agentes terapéuticos, sin el riesgo significativo de toxicidad para las células Huh-7. La Figura 9 proporciona una representación visual de los resultados, mostrando la viabilidad celular en función de las diferentes concentraciones y fracciones.

C. EFECTO DE LOS HP SOBRE EL PORCENTAJE DE INFECCIÓN POR ZIKV EN CÉLULAS Huh-7

Se seleccionaron dos fracciones de hidrolizados proteicos con el objetivo de delimitar el estudio. De las cuatro fracciones disponibles, se eligieron aquellas que mostraron el mayor potencial para ejercer bioactividad y que podrían ser escaladas para su uso como agentes terapéuticos. La selección se basó en un análisis de sus características inmunológicas, que incluyen su tamaño molecular, y similitud con datos reportados en la literatura. Esta elección estratégica permite concentrar los esfuerzos de investigación en las fracciones con mayor potencial para aplicaciones prácticas. En consecuencia, las fracciones seleccionadas para continuar con la investigación fueron las de 5 - 10 kDa y < 3 kDa.

El efecto antiviral de los HP de *P. tricornutum* sobre la infección por ZIKV se evaluó utilizando dos concentraciones: 150 µg/mL y 300 µg/mL. Estas concentraciones fueron

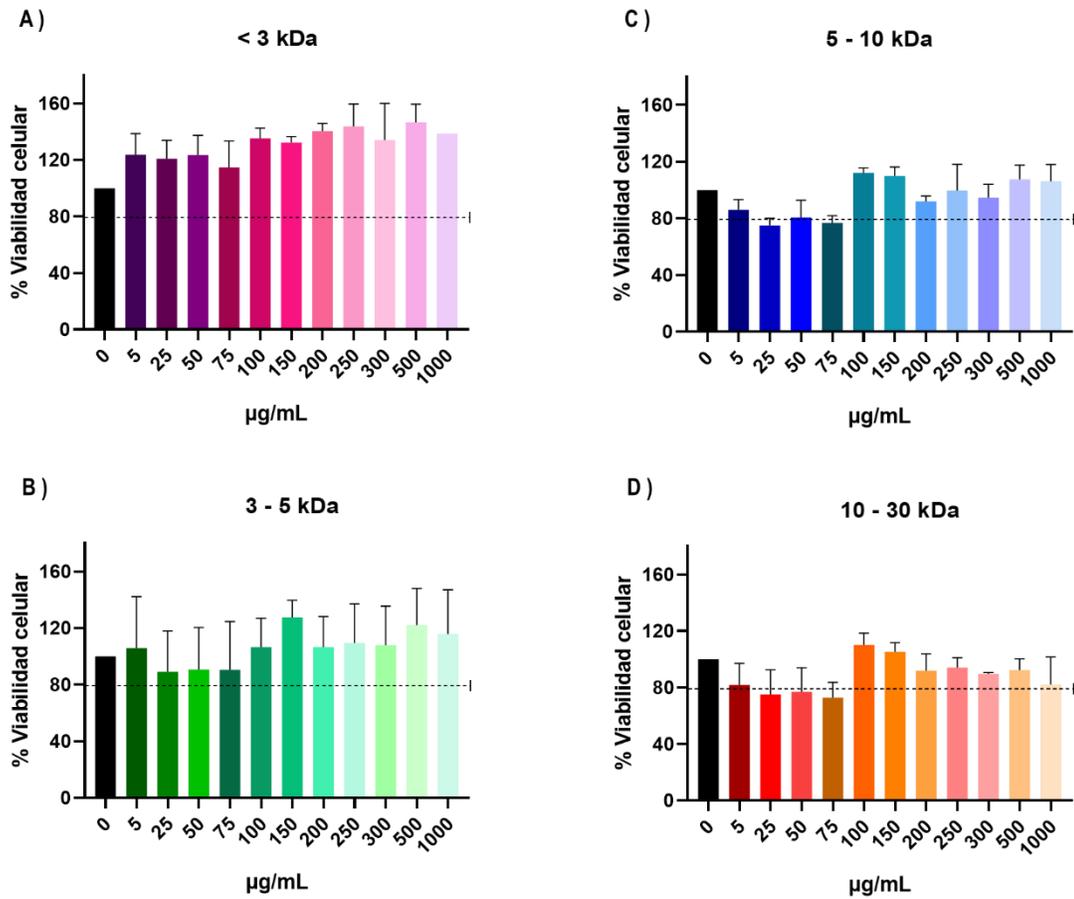


Figura 9. Efecto de los hidrolizados proteicos a diferentes concentraciones sobre la viabilidad celular en la línea Huh-7. La citotoxicidad inducida por las diferentes fracciones peptídicas, separadas según su peso molecular, se evaluó en un rango de concentración de 0 a 1000 µg/mL. A) < 3 kDa, B) 3 - 5 kDa, C) 5 - 10 kDa y D) 10 - 30 kDa. La viabilidad celular se reporta como porcentaje del control no tratado, indicando la ausencia de citotoxicidad significativa. Los datos corresponden a tres experimentos independientes y se expresan como media \pm la desviación estándar de la media (SD).

seleccionadas en función de la toxicidad de los HP en células Huh-7 y en congruencia con lo reportado en la literatura para estudios similares a este (Afify y col., 2018).

Las células Huh-7 infectadas, fueron tratadas con las fracciones peptídicas seleccionadas (< 3 kDa, 5 - 10 kDa) a las dos concentraciones elegidas (150 µg/mL, 300 µg/mL) durante un lapso de 48 h, y posteriormente se cuantificó el porcentaje de células infectadas. El porcentaje de infección se analizó mediante citometría de flujo. En la Figura 10 se presentan gráficos *dotplot* que ilustran la distribución celular de las células infectadas con ZIKV y tratadas con las fracciones del HP, en comparación con las células infectadas no tratadas. Los gráficos muestran una elevada densidad de células positivas para la glicoproteína E del ZIKV, evidenciada mediante Inmunofluorescencia. Esta información se obtuvo utilizando el anticuerpo primario 4G2, específico para la proteína viral, y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor™ 488. Además, los histogramas correspondientes destacan las diferencias en la distribución de células Alexa 488 positivas entre los distintos grupos experimentales: control antigénico celular (sin inoculación viral), control de infección y tratamientos con HP. En los histogramas, la altura del pico indica el conteo total de células en cada condición experimental, mientras que el desplazamiento del pico hacia la derecha, asociado con una mayor intensidad de fluorescencia, refleja el grado de infección.

El análisis de los datos recopilados, tanto de los replicados técnicos como de las repeticiones independientes de este experimento, revela que no existe una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de infección por ZIKV entre las células infectadas y tratadas, en comparación con aquellas que sirvieron como control de

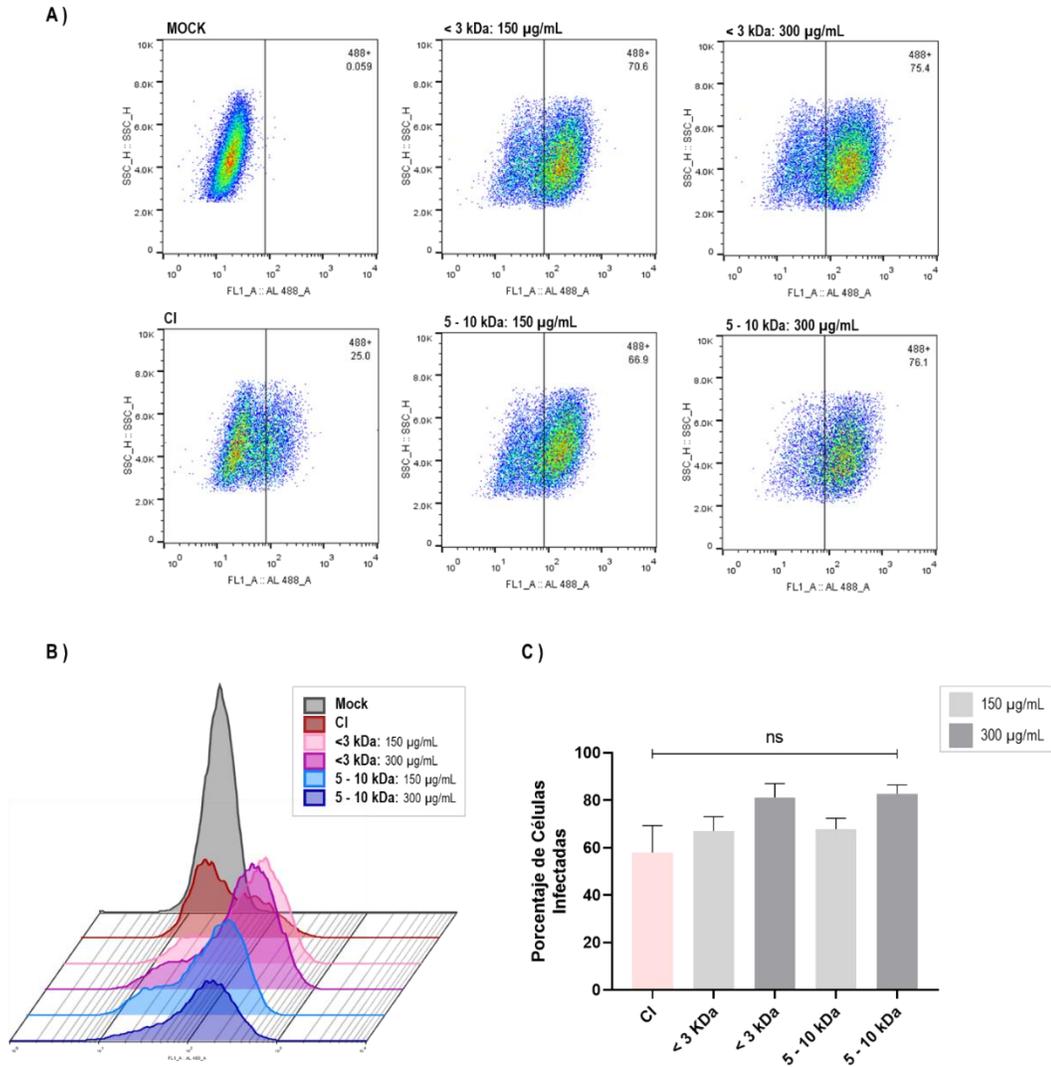


Figura 10. Actividad antiviral de los hidrolizados proteicos contra ZIKV en células Huh-7. A) Imágenes representativas de los resultados de los ensayos de citometría de flujo donde se muestra el comportamiento de las células con base al marcaje con el fluoróforo Alexa Fluor 488, incluyéndose como muestras células Huh-7 sin infección y sin tratamiento (Mock), con infección y sin tratamiento (Control de Infección, CI), y aquellas tratadas con las fracciones de los hidrolizados proteicos (< 3 kDa, 5 - 10 kDa) a dos concentraciones (150 µg/mL, 300 µg/mL). B) Histogramas representativos que ilustran la distribución de las frecuencias de infección de las células Huh-7. C) Porcentaje de células infectadas resultantes de los ensayos de tratamiento con los HP, donde no se observa una diferencia significativa entre estos vs el CI ($p \leq 0.05$). Los datos corresponden a tres experimentos independientes y se expresan como media \pm el error estándar de la media (SEM).

infección sin tratamiento. Este hallazgo se observó de manera consistente en todos los tratamientos con ambas fracciones de hidrolizados proteicos (Figura 10). En particular, las fracciones menores a 3 kDa y entre 5 - 10 kDa de *P. tricornutum* no lograron reducir el porcentaje de infección celular por ZIKV en células Huh-7 a las concentraciones evaluadas de 150 µg/mL y 300 µg/mL.

D. EFECTO DE LOS HP SOBRE EL RENDIMIENTO VIRAL DE ZIKV

Para confirmar los resultados obtenidos en el ensayo de actividad antiviral mediante citometría de flujo, se decidió implementar una técnica más sensible que permitiera obtener información adicional sobre la progenie viral post-tratamiento. El análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de los ensayos de formación de focos revela que los tratamientos con hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* no reducen la producción de partículas virales del ZIKV en células Huh-7. Esto se evidencia por la ausencia de disminución en la carga viral de los sobrenadantes recuperados de los ensayos de infección y tratamiento con los HP, en comparación con el control de infección, expresada en Unidades Formadoras de Focos (UFF/mL) (Figura 11).

E. EFECTO DE LOS HP SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA VIRAL NS3

Se decidió evaluar la síntesis de proteínas virales, cuantificando los niveles de una de estas proteínas mediante el ensayo de Western blot, con el fin de determinar si los tratamientos tuvieron algún impacto en la expresión de proteínas virales. El estudio se

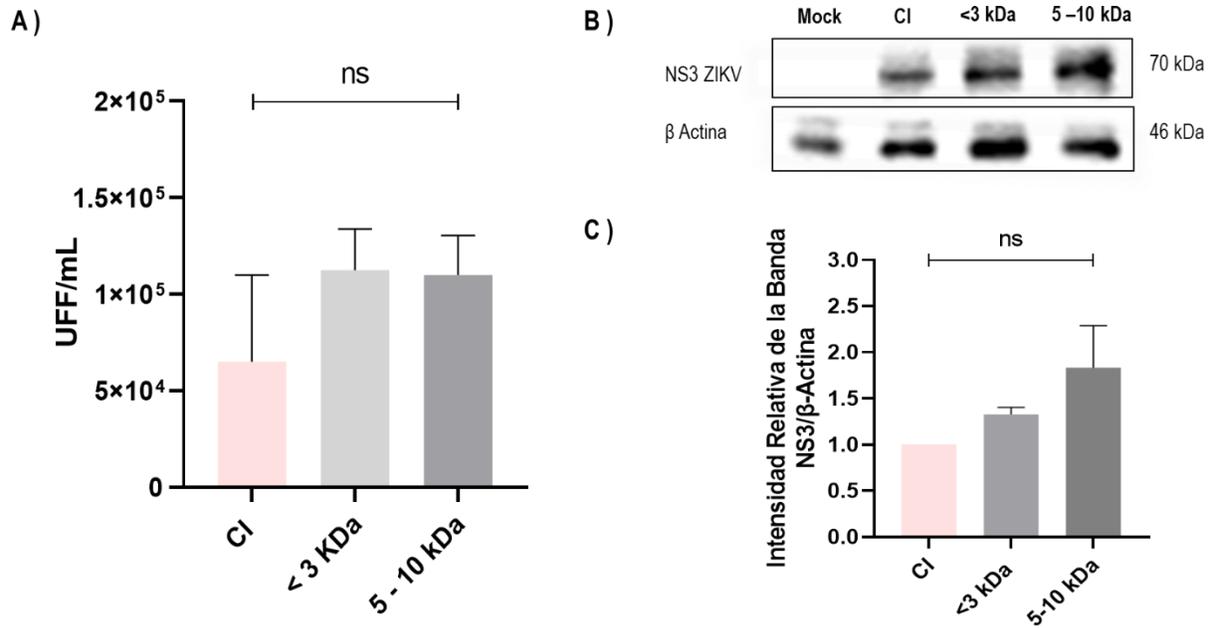


Figura 11. Efecto de los hidrolizados proteicos frente al rendimiento viral de ZIKV. A) Títulos virales de los sobrenadantes recolectados postratamiento con HP (<3 kDa, 5 - 10 kDa) a la concentración de 150 μ g/mL en células Huh-7 previamente infectadas con ZIKV (MOI: 1). Los resultados se presentan como UFF/mL vs el CI. El gráfico representa las medias \pm SEM de 2 experimentos independientes realizados por duplicado ($p \leq 0.05$). B) Proteína NS3-ZIKV en células Huh-7 post-tratamiento. C) Análisis densitométrico de la proteína NS3 viral en función de la intensidad relativa de la banda vs β -Actina. Los resultados se reportan como medias \pm DS de 2 experimentos independientes realizados por duplicado ($p \leq 0.05$).

centró en la proteína viral multifuncional NS3, que posee dominios de proteasa y helicasa, esenciales para la replicación viral.

Para evaluar los niveles de la proteína NS3, se prepararon lisados de células infectadas con ZIKV, infectadas y no tratadas y tratadas con los HP durante 48 h. Las proteínas recuperadas del lisado se sometieron a ensayos de Western blot usando anticuerpos anti-NS3 y anti- β actina como control. Los niveles de expresión de proteína NS3 se determinaron mediante densitometría. El análisis de los datos indica que los tratamientos con los hidrolizados proteicos de *P. tricornutum* no reducen los niveles de expresión de la proteína NS3 del ZIKV en células Huh-7, ya que no se reporta diferencia estadística para la intensidad relativa de la banda entre los tratamientos y el control de infección (Figura 11).

XI. DISCUSIÓN

El virus del Zika es un virus emergente que ha captado recientemente la atención mundial debido a su rápida expansión geográfica y las potenciales complicaciones que plantea para la salud pública a nivel mundial. La enfermedad Zika, en una primera instancia considerada leve y autolimitada, ha revelado una capacidad sorprendente para causar complicaciones neurológicas graves, observables en adultos, niños e incluso recién nacidos que fueron expuestos a esta infección durante su gestación (Gómez-Velasco y col., 2019; Bloom y Cadarette, 2019).

A pesar de que los informes de casos de Zika han disminuido desde su punto cúlmine durante el brote en Brasil (2015 - 2017), diversos factores en su conjunto, como la migración del vector, el cambio climático, las posibles mutaciones en el virus, el crecimiento de la población y los constantes viajes humanos, generan una alarma constante acerca del posible surgimiento y expansión de este virus, posicionando a esta enfermedad viral como una amenaza importante a nivel internacional (Masmajan y col., 2020; Guanche, 2022). En particular, debido a que, hasta el momento, el sector sanitario en todo el mundo no dispone de una terapia adecuada ni un medicamento específico, seguro y efectivo para tratar las infecciones causadas por este virus, y se ha observado solo un impacto beneficioso reducido de sus implementaciones (Jayachandran y col., 2021; do Nascimento y col., 2022).

De los candidatos a fármacos que presentan actividad inhibidora del ZIKV, tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo* con animales, pocos son siquiera los que han logrado avanzar a ensayos clínicos (Guo y col., 2022). Por lo tanto, es fundamental

investigar y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para combatir las infecciones causadas por este patógeno. Dado que las mujeres embarazadas y pacientes con otras complicaciones médicas constituyen la principal población objetivo para las intervenciones terapéuticas contra el ZIKV, el desarrollo de compuestos terapéuticos novedosos, incluidos aquellos extraídos de fuentes naturales, ofrecen alternativas prometedoras para el tratamiento de esta infección.

Recientemente, las microalgas han emergido como una fuente prometedora de compuestos bioactivos con un alto potencial para su desarrollo como antivirales (Llopiz, 2016). Los hidrolizados de proteínas de microalgas representan una opción para la producción de péptidos bioactivos a través de su hidrólisis enzimática. La caracterización de los péptidos liberados por hidrólisis revela que mantienen su valor nutricional y que, al menos algunos de ellos, actúan como compuestos biológicamente activos (Möller y col., 2008). En consecuencia, esta investigación se centró en la evaluación de la actividad antiviral de hidrolizados proteicos creados a partir de las proteínas de la microalga *P. tricornutum* contra ZIKV, contribuyendo así al desarrollo de investigación en pro de la búsqueda de terapias antivirales efectivas que den respuesta a la problemática que plantea el virus del Zika.

Los resultados obtenidos del presente estudio indican que los hidrolizados proteicos de *P. tricornutum*, con tamaños de 5 a 10 kDa y aquellos menores a los 3 kDa, no presentan actividad antiviral contra el virus del Zika. Estos datos difieren notablemente de la literatura, donde diversos estudios han reportado actividad antiviral por parte de péptidos de varios tamaños, que en su mayoría se engloban en un rango de 1.2 kDa a 9.6 kDa (Matanic y Castilla, 2004; Panya y col., 2019; Camargo y col.,

2008; Wong y Ng, 2005; Zhan S y col., 2019). Los péptidos tienen la capacidad de bloquear la infección al actuar sobre el virus o el huésped. En general, los péptidos antivirales ejercen su efecto al inhibir directamente al virus, aunque los sitios de inhibición y los mecanismos de acción pueden diferir a lo largo del ciclo de replicación viral. La capacidad de estos péptidos para inhibir la replicación viral y la propagación de infecciones puede deberse a varios mecanismos, tales como: 1) inhibición de la entrada del virus a la célula objetivo mediante la interacción del péptido con receptores de la superficie viral o celular; 2) interferencia con la fusión entre el virus y la membrana celular, crucial para la liberación del material genético viral en la célula huésped; 3) inhibición de la replicación del genoma viral y; 4) modulación de la respuesta inmune que confiere una respuesta antiviral aumentada por parte del sistema inmune del huésped (Rider y col., 2011).

Los péptidos se presentan como una categoría única de compuestos farmacéuticos que se encuentran en un rango intermedio entre las moléculas pequeñas y las proteínas en cuanto a tamaño, aunque difieren bioquímica y terapéuticamente tanto de las moléculas pequeñas como de las proteínas, y tienen la capacidad de imitar de manera bastante precisa las vías biológicas naturales (Lau y Dunn, 2018). Se han aprobado terapias antivirales con péptidos para tratar el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la influenza y los virus de la hepatitis B y C. Enfuvirtide es un péptido de 36 aminoácidos (4.5 kDa) que actúa sobre el dominio de la proteína de la envoltura del VIH, gp41 (Teissier y col., 2010). Boceprevir y Telaprevir, péptidos sintéticos diseñados para combatir el virus de la hepatitis C (VHC) actúan como inhibidores de la proteasa NS3/4 e interfieren con la replicación viral

(Divyashree y col., 2020). Otros péptidos antivirales candidatos que aún se encuentran en fases de ensayos clínicos y preclínicos son Flufirvitide (16 aa, 1.9 kDa) para el virus de la influenza (Skalickova y col., 2015), Sifuvirtide (36 aa, 4.7 kDa) para el VIH-1 (Yu y col., 2018), y Thymosin α -1 (28 aa, 3.1 kDa) para el virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC) (Jenssen, 2009).

Las propiedades fisicoquímicas de los péptidos, como su tamaño, carga, hidrofobicidad, anfipaticidad y solubilidad, son cruciales para sus propiedades antivirales. Aunque no hay un consenso sobre las características que debe tener un péptido para ser un agente bioactivo, un análisis comparativo de estas moléculas revela que la mayoría de estos cuentan con un alto contenido de residuos de cisteína y/o glicina, donde los puentes disulfuro que se pueden formar entre los residuos les confieren un aumento en su estabilidad; de igual forma, la mayoría contienen aminoácidos cargados de manera catiónica, siendo hidrofóbicos; y su longitud varía entre 12 y 55 residuos (Salas y col., 2015). En particular, los péptidos antivirales de origen natural son en mayor parte estructuras catiónicas, anfipáticas (hélice α , lámina β con forma de horquilla β , lámina β o estructuras mixtas de hélice α /lámina β) con una masa molecular inferior a 25 - 30 kDa (Bulet y col., 2004). Es probable que los péptidos más cortos evaluados, que se encuentran en la fracción de menos de 3 kDa, tengan un bajo porcentaje de residuos de cisteína y/o glicina. Esto podría limitar su capacidad para adoptar una estructura secundaria adecuada y alcanzar la estabilidad necesaria para una acción antiviral efectiva. No obstante, se requerirían experimentos adicionales para confirmar esta teoría.

Se ha informado que una familia de péptidos pequeños (de 28 a 37 aminoácidos), de naturaleza catiónica y anfipática, derivados de diversas fuentes vegetales y conocidos como ciclótidos, exhibe actividad antiviral contra el VIH, el virus de la influenza y el virus del dengue, todos ellos virus envueltos. Estos péptidos tienen la capacidad de unirse a objetivos virales o celulares, interfiriendo con la entrada del virus en las células huésped (Gao y col., 2010; Weidmann y Craik, 2016). Las investigaciones realizadas por Badani y col., (2014) y Wang y col., (2017) demuestran que la hidrofobicidad de los péptidos es una propiedad esencial necesaria para tener la capacidad de atacar a los virus envueltos. Es posible que los péptidos en las fracciones evaluadas no hayan cumplido con este requisito aparentemente esencial, lo que podría haberles impedido tener un efecto antiviral contra el ZIKV, un virus envuelto. Alternativamente, dado que se está considerando un conjunto amplio de péptidos (HP), es posible que la concentración de algún péptido bioactivo dentro de este conjunto haya sido insuficiente para manifestar un efecto biológico observable.

Los estudios sobre péptidos bioactivos indican que sus propiedades funcionales y beneficios para la salud están estrechamente relacionados con la secuencia de aminoácidos, el peso molecular, la conformación y sus características superficiales (Görgüç y col., 2020). Los péptidos biológicamente activos pueden ser compuestos naturales de los alimentos y diversos organismos, o ser parte de la proteína siendo inactivos en la molécula precursora pero activos después de su liberación como molécula independiente que adopta una forma distinta y/o su acoplamiento con otras moléculas (Jakubczyk y col., 2020).

Según lo reportado por Afify y col., (2018), la actividad antiviral de los hidrolizados proteicos varía entre aquellos creados con diferentes enzimas, independientemente de que esos hidrolizados partan de un mismo conjunto de proteínas, por consiguiente, es factible sugerir que *P. tricornutum* sigue siendo una excelente fuente para la obtención de proteínas debido a su alto contenido y buen balance de aminoácidos en su composición, muy a pesar del hecho de que el enfoque aplicado en este estudio utilizando Alcalasa® como enzima hidrolítica no haya reportado los resultados esperados. De igual forma, cabe mencionar que del fraccionamiento de los HP de las proteínas extraídas de *P. tricornutum* se obtuvieron cuatro fracciones peptídicas que contenían péptidos dentro de diversos rangos de pesos moleculares (< 3 kDa, 3 - 5 kDa, 5 - 10 kDa y 10 - 30 kDa); por varias razones se decidió probar solo dos de estas (< 3 kDa, 5 - 10 kDa), no obstante, las dos fracciones restantes (3 - 5 kDa, 10 - 30 kDa) también podrían ser buenas candidatas para su evaluación antiviral.

Nuestros resultados demuestran que los hidrolizados proteicos de *P. tricornutum*, en sus cuatro fracciones, no presentan características citotóxicas para células Huh-7 en un amplio rango de concentraciones. Este hecho respalda el uso seguro de estos HP como potenciales agentes terapéuticos contra otros virus y también para la búsqueda de otras bioactividades, empleando concentraciones de hasta 1 mg/mL.

En los inicios de este estudio no había investigación que aportara indicios de actividad antiviral por parte de algún extracto o compuesto en particular procedente de una microalga contra ZIKV, por lo que la creación de hidrolizados proteicos a partir de las proteínas de *P. tricornutum* nos pareció una idea prometedora para evaluar un posible efecto antiviral. Sin embargo, según lo reportado recientemente por Cirne-

Santos y col., (2024) se sabe que el extracto de la microalga *Arthrospira máxima* tiene la capacidad de prevenir y curar la infección por el virus Zika *in vitro*. Tomando esto en consideración, en suma, con nuestros resultados podemos decir que las microalgas son una fuente potencial de agentes antivirales, donde los HP figuran como buenos candidatos, pero el estudio de su potencial antiviral no se limita a estos ya que son ricas en compuestos que de manera natural pueden fungir también como potentes antivirales. De igual forma, este estudio no descarta la posibilidad de que las fracciones evaluadas contra ZIKV tengan un efecto antiviral contra otras entidades patógenas o una respuesta inmunitaria potenciada del huésped contra la infección por ZIKV. Estos no fueron objetivos evaluados durante el estudio, pero podrían ser temas interesantes para su investigación y desarrollo posterior.

XII.CONCLUSIONES

Los HP de la microalga *P. triornutum* creados con la enzima Alcalasa®, con tamaños de 10 a 5 kDa y aquellos menores a los 3 kDa, no presentan actividad antiviral contra el virus del Zika en células Huh-7 a las 48 h de tratamiento. Estos resultados fueron validados mediante experimentación con tres técnicas distintas: citometría de flujo, ensayos de formación de focos y Western blot. El análisis estadístico de los datos revela que el tratamiento con los HP no reduce el porcentaje de infección, la producción de partículas virales ni los niveles de expresión de la proteína NS3 del ZIKV.

Estos resultados en conjunto indican que los HP evaluados no son agentes antivirales eficaces para tratar la infección por ZIKV *in vitro*. No obstante, siguen siendo candidatos prometedores para la evaluación como antivirales contra otros patógenos o para explorar sus posibles bioactividades en diferentes contextos.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Afify AEMM, El Baroty GS, El Baz FK, Abd El Baky HH, Murad SA. *Scenedesmus obliquus*: antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. *J Genet Eng Biotechnol*. 2018;16(2):399-408.
- Alomar AA, Eastmond BH, Alto BW. The effects of exposure to pyriproxyfen and predation on Zika virus infection and transmission in *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2020;14(11):e0008846.
- Badani H, Garry RF, Wimley WC. Inhibidores de la entrada de péptidos en virus con envoltura: la importancia de la hidrofobicidad interfacial. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2014;1838:2180-97.
- Bermúdez MZ, Chacón LMM, Gonzalez JG, Rizo CM, Hernández TM, Vidal MD. Características del desarrollo psicomotor de niños con síndrome congénito por Zika. *Revista Cubana de Tecnología de la Salud*. 2021;12(2):3-13.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 1959;37(8):911-7.
- Bloom DE, Cadarette D. Infectious disease threats in the twenty-first century: strengthening the global response. *Frontiers in immunology*. 2019;10:549.
- Branco-Vieira M, San Martin S, Agurto C, Freitas MA, Martins AA, Mata TM, Caetano NS. Biotechnological potential of *Phaeodactylum tricornutum* for biorefinery processes. *Fuel*. 2020;268:117357.
- Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*. 2004;198(1):169-84.
- Camargo Filho I, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Actividad antiviral y modo de acción de un péptido aislado de *Sorghum bicolor*. *Fitomedicina*. 2008;15(3):202-8.
- Cardenas VM, Perez JM, Besares KC, Lara IFM, Arias SM, Izaba BS, et al. Características clínicas y epidemiológicas de casos probables de síndrome congénito por Zika y los

- niveles de anticuerpos anti-dengue, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. *Población y Salud en Mesoamérica*. 2022;20(1):2.
- Centers for Disease Control and Prevention. Zika virus: geography. Available from: <https://www.cdc.gov/zika/geo/index.html>. Accessed 2024 Aug 8.
- Chen LH, Wilson ME. Zika circulation, congenital syndrome, and current guidelines: making sense of it all for the traveller. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2019;32(5):381-9.
- Chia WY, Kok H, Chew KW, Low SS, Show PL. Can algae contribute to the war with Covid-19? *Bioengineered*. 2021;12(1):1226-37.
- Chouin-Carneiro T, David MR, de Bruycker Nogueira F, Dos Santos FB, Lourenco-de-Oliveira R. Zika virus transmission by Brazilian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* is virus dose and temperature-dependent. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2020;14(9):e0008527.
- Ciapponi A, Matthews S, Cafferata ML, Comandé D, Gibbons L, Núñez-González S, et al. Laboratory tests for diagnosis of congenital Zika virus in fetuses and neonates. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2020(7).
- Cirne-Santos CC, Barros CS, da Silva ACR, Kurpan D, Oliveira WDSC, Vasconcellos BM, et al. *Arthrospira maxima* extract prevents and cures Zika virus infection: *in vitro* analysis with VERO cells. *Algal Res*. 2024;79:103479.
- del Carpio Orantes L, Rangel FJ, García-Méndez S. Incidencia de síndrome de Guillain-Barré durante la oleada de zika del 2016 en un hospital de segundo nivel. *Neurología*. 2020;35(3):160-4.
- Del Carpio-Orantes L, Peniche-Moguel KG, Sánchez-Díaz JS, del Rosario Pola-Ramírez M, Perfecto-Arroyo MA, Solís-Sánchez I, et al. Guillain-Barré syndrome during the Zika outbreak in Veracruz, Mexico, in 2016-2017. *Medicina Interna de México*. 2020;36(1):33-9.
- Divyashree M, Mani MK, Reddy D, Kumavath R, Ghosh P, Azevedo V, Barh D. Clinical applications of antimicrobial peptides (AMPs): where do we stand now? *Protein Pept Lett*. 2020;27(2):120-34.

- do Nascimento RM, Campolina TB, Chaves BA, Delgado JLF, Godoy RSM, Pimenta PFP, et al. The influence of culture-dependent native microbiota in Zika virus infection in *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*. 2022;15(1):57.
- Elshahawi H, Syed Hassan S, Balasubramaniam V. Importance of Zika virus NS5 protein for viral replication. *Pathogens*. 2019;8(4):169.
- Encinas YAA. Composición bioquímica de las diatomeas *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* en cultivo estático y semicontinuo. 2023.
- Estévez-Herrera J, Pérez-Yanes S, Cabrera-Rodríguez R, Márquez-Arce D, Trujillo-González R, Machado J-D, et al. Zika virus pathogenesis: a battle for immune evasion. *Vaccines*. 2021;9(3):294
- European Medicines Agency. Fuzeon: EPAR - Product information. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/fuzeon#authorisation-details>. Accessed 2024 Jul 11.
- Farfan-Morales CN, Cordero-Rivera CD, Osuna-Ramos JF, Monroy-Muñoz IE, De Jesús-González LA, Muñoz-Medina JE, et al. The antiviral effect of metformin on zika and dengue virus infection. *Scientific Reports*. 2021;11(1):8743.
- Farrar JJ. Stopping the gaps in epidemic preparedness. *New England Journal of Medicine*. 2019;380(19):1788-9.
- Galarza VO. Carbohidratos y proteínas en microalgas: potenciales alimentos funcionales. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2019;22.
- Gao Y, Cui T, Lam Y. Synthesis and disulfide bond connectivity–activity studies of a kalata B1-inspired cyclopeptide against dengue NS2B–NS3 protease. *Bioorg Med Chem*. 2010;18(3):1331-6.
- Gestuveo RJ, Royle J, Donald CL, Lamont DJ, Hutchinson EC, Merits A, et al. Analysis of Zika virus capsid-Aedes aegypti mosquito interactome reveals pro-viral host factors critical for establishing infection. *Nature Communications*. 2021;12(1):2766.
- Giraldo MI, Gonzalez-Orozco M, Rajsbaum R. Pathogenesis of Zika Virus Infection. Annual Review of Pathology: *Mechanisms of Disease*. 2023;18:181-203.

- Gobierno de México. Casos confirmados de infección por virus Zika 2024. Available from: <https://www.gob.mx/salud/documentos/casos-confirmados-de-infeccion-por-virus-zika-2024>. Accessed 2024 Aug 8.
- Gomes JA, Wachholz GE, Boquett JA, Vianna FS, Schuler-Faccini L, Fraga LR. Molecular Mechanisms of ZIKV-Induced Teratogenesis: A Systematic Review of Studies in Animal Models. *Molecular Neurobiology*. 2023;60(1):68-83.
- Gómez-Velasco A, León-Cortés JL, Gordillo-Marroquín C, Sánchez-Pérez HJ, Alocilja EC, Muñoz-Jiménez SG, et al. Uso de nanopartículas magnéticas y un biosensor para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades infecciosas emergentes, re-emergentes y tropicales desatendidas. *Revista Enfermedades Emergentes*. 2019;18(1):23-31.
- González Ayala SE, Cecchini DM, Forestieri OÁ, Uranga A. Infecciones de transmisión pre y perinatal. 2022.
- Görgüç A, Gençdağ E, Yılmaz FM. Bioactive peptides derived from plant origin by-products: biological activities and techno-functional utilizations in food developments—a review. *Food Res Int*. 2020;136:109504.
- Guanche HG. Zika: La enfermedad y su prevención: RUTH; 2022.
- Guillard RR, Ryther JH. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian journal of microbiology*. 1962;8(2):229-39.
- Guo J, Ma X, Xu X, Guo Y, Li B, Wang M, et al. Zika virus infection and development of drug therapeutics. *Applied Microbiology*. 2022;2(4):782-99.
- Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Schatz F, Lockwood CJ. Vertical Zika Virus Transmission at the Maternal-Fetal Interface. *Frontiers in Virology*. 2022;2:801778.
- Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *J Virol*. 2015;89(17):8880-8896.
- Hastings AK, Uraki R, Gaitsch H, Dhaliwal K, Stanley S, Sproch H, et al. *Aedes aegypti* NeSt1 protein enhances Zika virus pathogenesis by activating neutrophils. *Journal of Virology*. 2019;93(13):e00395-19.

- Hou C, Wu L, Wang Z, Sagner E, Zhang D. Purification and identification of antioxidant alcalase-derived peptides from sheep plasma proteins. *Antioxidants*. 2019;8(12):592.
- Huamán Novillo ME, Vasquez Grandez C. Nivel de conocimiento de plantas medicinales antivirales en la pandemia Covid-19 en el mercado Productores. distrito de Santa Anita, Lima. 2021. 2021.
- Humiski L, Aluko R. Physicochemical and bitterness properties of enzymatic pea protein hydrolysates. *Journal of Food Science*. 2007;72(8):S605-S11.
- Jakubczyk A, Karaś M, Rybczyńska-Tkaczyk K, Zielińska E, Zieliński D. Tendencias actuales de péptidos bioactivos: nuevas fuentes y efectos terapéuticos. *Alimentos*. 29 de junio de 2020;9(7):846.
- Jang IS, Park SJ. A *Spirulina maxima*-derived peptide inhibits HIV-1 infection in a human T cell line MT4. *Fish Aquat Sci*. 2016;19:1-5.
- Jayachandran B, Chanda K, Balamurali MM. Overview of pathogenesis, diagnostics, and therapeutics of infectious diseases: Dengue and zika. *ACS omega*. 2021;6(35):22487-96.
- Jenssen H. Therapeutic approaches using host defense peptides to combat herpesvirus infections. *Viruses*. 2009;1(3):939-64.
- Jiang SB, Lin K, Strick N, Neurath AR. Inhibition of HIV-1 infection by a fusion domain binding peptide from the HIV-1 envelope glycoprotein GP41. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;195(2):533-538.
- Jimenez A, Shaz BH, Kessler D, Bloch EM. How do we manage blood donors and recipients after a positive Zika screening result? *Transfusion*. 2017;57(9):2077-83.
- Kaur R, Sharma P, Gupta GK, Ntie-Kang F, Kumar D. Structure-activity-relationship and mechanistic insights for anti-HIV natural products. *Molecules*. 2020;25(9):2070.
- Khaiboullina SF, Ribeiro FM, Uppal T, Martynova EV, Rizvanov AA, Verma SC. Zika virus transmission through blood tissue barriers. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:1465.
- Khan MT, Ali A, Wang Q, Irfan M, Khan A, Zeb MT, et al. Marine natural compounds as potents inhibitors against the main protease of SARS-CoV-2—a molecular dynamic study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2021;39(10):3627-37.

- Labadie T, Batéjat C, Manuguerra J-C. Historical discoveries on viruses in the environment and their impact on public health. *Intervirology*. 2020;63(1-6):17-32.
- Lascano AVB, Espinoza-Bravo CA, Castillo-Avendaño JL, Estrella-Campuzano SA. Características clínicas y pronóstico del síndrome de Guillain-Barré. *Polo del Conocimiento*. 2021;6(11):1708-19.
- Lau JL, Dunn MK. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem*. 2018;26(10):2700-7.
- Leandro AS, de Castro WAC, Lopes RD, Delai RM, Villela DA, De-Freitas RM. Citywide integrated *Aedes aegypti* mosquito surveillance as early warning system for arbovirus transmission, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2022;28(4):707.
- Liu J, Obaidi I, Nagar S, Scalabrino G, Sheridan H. The antiviral potential of algal-derived macromolecules. *Curr Res Biotechnol*. 2021;3:120-134.
- Llopiz A. Active compounds from cyanobacteria and microalgae: properties and potential applications in biomedicine. 2016.
- López-Elías J, Voltolina D, Nieves-Soto M, Figueroa-Ortiz L. Producción y composición de microalgas en laboratorios comerciales del noroeste de México. *Avances en Nutrición Acuícola*. 2004.
- Losa J, editor. *Enfermedades infecciosas emergentes: una realidad asistencial*. Anales del Sistema Sanitario de Navarra; 2021. SciELO España.
- Mahendran MS, Djearmane S, Wong LS, Kasivelu G, Dhanapal ACTA. Antiviral properties of microalgae and cyanobacteria. *J Appl Phycol*. 2021;33(1):115-126.
- Masmejan S, Musso D, Vouga M, Pomar L, Dashraath P, Stojanov M, et al. Zika virus. *Pathogens*. 2020;9(11):898.
- Matanic VCA, Castilla V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;23(4):382-9.
- Mercado Reyes I, Álvarez Montero X. Catálogo de microalgas y cianobacterias. *Environmental Science and Technology*. 2022;44(18):1995-2037.

- Miner JJ, Diamond MS. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell host & microbe*. 2017;21(2):134-42.
- Möller NP, Scholz-Ahrens KE, Roos N, Schrezenmeir J. Péptidos y proteínas bioactivos de los alimentos: indicación de efectos sobre la salud. *Revista europea de nutrición*. Junio de 2008;47(4):171-82.
- Morales ÓP. Actualización en el síndrome de Guillain-Barré. *Revista Médica Sinergia*. 2019;4(11):e290-e.
- Moreira J, Peixoto TM, Siqueira AMd, Lamas CC. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017;23(5):296-305.
- MubarakAli D, MohamedSaalis J, Sathya R, Irfan N, Kim J-W. An evidence of microalgal peptides to target spike protein of COVID-19: *In silico* approach. *Microbial Pathogenesis*. 2021;160:105189.
- Mussnug JH, Klassen V, Schlüter A, Kruse O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of biotechnology*. 2010;150(1):51-6.
- Musso D, Ko AI, Baud D. Zika virus infection—after the pandemic. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(15):1444-57.
- Noorbakhsh F, Abdolmohammadi K, Fatahi Y, Dalili H, Rasoolinejad M, Rezaei F, et al. Zika virus infection, basic and clinical aspects: a review article. *Iranian J Public Health*. 2019;48(1):20.
- Norzagaray-Valenzuela CD, Valdez-Ortiz A, Shelton LM, Jiménez-Edeza M, Rivera-López J, Valdez-Flores MA, et al. Residual biomasses and protein hydrolysates of three green microalgae species exhibit antioxidant and anti-aging activity. *Journal of Applied Phycology*. 2017;29(1):189-98.
- Pagarete A, Ramos AS, Puntervoll P, Allen MJ, Verdelho V. Antiviral potential of algal metabolites—a comprehensive review. *Marine Drugs*. 2021;19(2):94.
- Pan American Health Organization. Indicadores Zika. Available from: <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-zika.html>. Accessed 2024 Aug 8.

- Panya A, Yongpitakwattana P, Budchart P, Sawasdee N, Krobthong S, Paemanee A, et al. Novel bioactive peptides demonstrating anti-dengue virus activity isolated from the Asian medicinal plant *Acacia catechu*. *Chem Biol Drug Des*. 2019;93(2):100-9.
- Patiño O, Muñoz N, Pinzón H, Reyes M, Moneriz C. Microcefalia por Zika un problema latente: Reporte de Caso y Aspectos Moleculares. *Infectio*. 2020;24(1):50-3.
- Pielnaa P, Al-Saadawe M, Saro A, Dama MF, Zhou M, Huang Y, et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology*. 2020;543:34-42.
- Rahman MM, Islam MR, Shohag S, Hossain ME, Shah M, Shuvo SK, et al. Multifaceted role of natural sources for COVID-19 pandemic as marine drugs. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022;29(31):46527-50.
- Ratha SK, Renuka N, Rawat I, Bux F. Prospective options of algae-derived nutraceuticals as supplements to combat COVID-19 and human coronavirus diseases. *Nutrition*. 2021;83:111089.
- Requena T, Velasco M. Microbioma humano en la salud y la enfermedad. *Revista Clínica Española*. 2021;221(4):233-40.
- Rider TH, Zook CE, Boettcher TL, Wick ST, Pancoast JS, Zusman BD. Broad-spectrum antiviral therapeutics. *PLoS One*. 2011;6(7)
- Rincón Silva NG, Acevedo Castro DA. General Analysis of the Epidemiological Outbreak Caused by the Zika and Chikungunya Viruses in Colombia. *Revista Med*. 2019;27(2):47-62.
- Rivadeneira-Espinar PG, Venegas-Esquivel GA, Díaz-Espinoza CM, Pérez-Robles VM, González-Fernández MI, Sesma-Medrano E. Zika como causa de aborto espontáneo en zonas endémicas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. 2019;76(4):193-7.
- RIVERA JS, DUQUE KB, JOJOA DMG, ALDANA AÁ. Microalgas y Cianobacterias: ¿ qué son? ¿ dónde encontrarles? ¿ cómo cultivarles? *Microciencia*. 2019;8:107-17.
- Safi C, Ursu AV, Laroche C, Zebib B, Merah O, Pontalier PY, Vaca-Garcia C. Extracción acuosa de proteínas de microalgas: efecto de diferentes métodos de disrupción celular. *Algal Res*. 2014;3:61-65.

- Salas CE, Badillo-Corona JA, Ramírez-Sotelo G, Oliver-Salvador C. Biologically active and antimicrobial peptides from plants. *Biomed Res Int*. 2015;2015:102129.
- Sathasivam R, Radhakrishnan R, Hashem A, Abd_Allah EF. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi journal of biological sciences*. 2019;26(4):709-22.
- Sathya R, MubarakAli D, MohamedSaalis J, Kim JW. A systemic review on microalgal peptides: bioprocess and sustainable applications. *Sustainability*. 2021;13(6):3262.
- Sharma A, Lal SK. Zika virus: transmission, detection, control, and prevention. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:110.
- Sharma V, Sharma M, Dhull D, Sharma Y, Kaushik S, Kaushik S. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. *Canadian Journal of Microbiology*. 2020;66(2):87-98.
- Silva MA, Palacios E, Castillo GA, Monsalve JA, Castaño LFL. Secuelas neurológicas del síndrome de Guillain-Barré en pacientes adultos. *Revista repertorio de medicina y cirugía*. 2020;29(3):185-91.
- Skalickova S, Heger Z, Krejцова L, Pekarik V, Bastl K, Janda J, et al. Perspectives on the use of antiviral peptides against influenza virus. *Viruses*. 2015;7(10):5428-42.
- Teissier E, Penin F, Pécheur EI. Targeting cell entry of enveloped viruses as an antiviral strategy. *Molecules*. 2010;16(1):221-50.
- U.S. Food and Drug Administration. Fuzeon (enfuvirtide) summary review. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/021481_fuzeon_review.cfm. Accessed 2024 Aug 8.
- Viennet E, Frentiu FD, Williams CR, Mincham G, Jansen CC, Montgomery BL, et al. Estimation of mosquito-borne and sexual transmission of Zika virus in Australia: Risks to blood transfusion safety. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2020;14(7):e0008438.
- Wang CK, Shih LY, Chang KY. Large-scale analysis of antimicrobial activities in relation to amphipathicity and charge reveals novel characterization of antimicrobial peptides. *Molecules*. 2017;22(11):2037.
- Weidmann J, Craik DJ. Discovery, structure, function and applications of cyclotides: circular plant proteins. *J Exp Bot*. 2016;67(16):4801-12.

- Wolford RW, Schaefer TJ. Zika Virus. 2017.
- Wong JH, Ng TB. Sesquin, a potent antimicrobial peptide resembling defensins from ground beans with inhibitory activities towards tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides*. 2005;26(7):1120-6.
- World Health Organization. Zika epidemiology update: May 2024 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2024 [cited 2024 Aug 8]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update-may-2024>
- Yu D, Ding X, Liu Z, Wu X, Zhu Y, Wei H, et al. Molecular mechanism of HIV-1 resistance to sifuvirtide, a fusion inhibitor approved in clinical trials. *J Biol Chem*. 2018;293(33):12703-18.
- Zainuddin E, Mundt S, Wegner U, Mentel R. Cyanobacteria a potential source of antiviral substances against influenza virus. *Medical microbiology and immunology*. 2002;191:181-2.
- Zainuddin EN, Mentel R, Wray V, Jansen R, Nimtz M, Lalk M, et al. Cyclic depsipeptides, ichthyopeptins A and B, from *Microcystis ichthyoblabe*. *Journal of Natural Products*. 2007;70(7):1084-8.
- Zhan S, Aweya JJ, Wang F, Yao D, Zhong M, Chen J, et al. *Litopenaeus vannamei* attenuates white spot syndrome virus replication by antiviral peptides derived from hemocyanin. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019;91:50-61.

XIV. SIGLAS Y ABREVIACIONES

Ac: Anticuerpo.

Ahp: Residuo 3-amino-6-hidroxi-2-piperidona.

AMP: Adenosín monofosfato.

Bti: *Bacillus thuringiensis* subesp. *Israelensis*.

°C: Grados Celsius o Centígrados.

CICESE: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

CMC: Medio Carboxi Metil Celulosa.

CO₂: Dióxido de carbono.

CVB3: Coxsackievirus B3.

DBO: Demanda Bioquímica de Oxígeno.

DQO: Demanda Química de Oxígeno.

DMEN: Medio Eagle Modificado de Dulbecco.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico.

E/S: Relación Enzima/Sustrato.

ECA: Enzima Convertidora de la Angiotensina.

ELISA: Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima.

FDA: Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU.

FHCC: Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.

FVR: Fiebre del Valle del Rift.

g: Fuerzas g.

gr: Gramo (s).

GRAS: Generalmente Reconocido como Seguro.

h: Hora (s).

HANKS: Solución salina equilibrada de Hanks.

HCl: Ácido Clorhídrico.

HP: Hidrolizados proteicos.

Huh7: Células de Carcinoma hepatocelular humano.

IAV: Virus de la influenza A.

IFN-I: Interferones tipo I.

IRF3: Factor regulador de interferón 3.

IRF7: Factor regulador de interferón 7.

ISG: Genes estimulados por IFN.

kDa: Kilodalton.

L: Litro (s).

MDCK: Células de riñón canino Madin Darby.

MERS-CoV: Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio.

MOI: Multiplicidad de infección.

min: Minuto (s).

mL: Mililitro.

mL/L: Mililitros por litro.

mM: Milimolar.

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

NaOH: Hidróxido de sodio.

Nm: Nanómetro.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

ORF: Marco de Lectura Abierto.

P: Significancia estadística.

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PBS: Solución Salina Amortiguada por Fosfatos.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

pH: Potencial de Hidrógeno.

PHEIC: Emergencia de Salud Pública de Preocupación Internacional.

PPF: Pyriproxyfen.

PRNT: Prueba de neutralización por reducción de placa.

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones.

qRT-PCR: PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real.

RNA: Ácido Ribonucleico.

RNAi: RNA de interferencia.

rpm: Revoluciones por minuto.

RT-PCR: PCR de transcripción inversa.

RV: Rotavirus.

SARS: Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo.

SARS-CoV-2: Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo.

SCZ: Síndrome Congénito por Zika.

SD: Desviación Estándar.

SE: Semana Epidemiológica.

SFB: Suero Fetal Bovino.

SGB: Síndrome de Guillain-Barré.

SP: Proteína espiga.

SS: Secretaría de Salud.

TLR: Receptores tipo Toll.

U/mL: Unidades por mililitro.

UPEAL: Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio.

VHSV: Virus de la septicemia hemorrágica.

VPPA: Virus de la peste porcina africana.

ZIKV: Virus Zika.

$\mu\text{g/mL}$: Microgramos por mililitro.

μL : Microlitros.

μm : Micrómetro.

μM : Micromol (es).

XV. ANEXOS



Av. Instituto Politécnico Nacional 2508
Col. San Pedro Zacatenco
México, Ciudad de México, 07360
Tel. (55) 5747 3800 Ext. 5670
Fax. (55) 5747 3777

Departamento de
Infectómica y

Patogénesis Molecular

Ciudad de México a 10 de Noviembre de 2023

DRA. CARLA ERNESTINA ANGULO ROJO
COORDINADORA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SINALOA
PRESENTE. -

En mi calidad de Jefa del Dpto. de Infectómica y Patogénesis Molecular de Cinvestav Zacatenco, de manera atenta y respetuosa me dirijo a usted para informar que la **Lic. Cabanillas Salcido Sandy Lucero**, estudiante de la Maestría en Ciencias en Biomedicina molecular fue aceptada para realizar una estancia científica en las instalaciones del Dpto. de Infectómica y Patogénesis Molecular de Cinvestav Zacatenco con una duración de 2 meses que abarca el periodo del 15 de enero del 2024 al 15 de marzo del 2024 del año 2024.

Debido a lo anterior y en consideración a su brillante desempeño académico, me permito otorgar aval institucional a la solicitud de esta ESTANCIA.

Agradeciendo todo el apoyo que le brinden a la formación de la Alumna **CABANILLAS SALCIDO SANDY LUCERO** y su contribución en la mejora de la excelencia académica y científica del Dpto. de Infectómica y Patogénesis Molecular, quedo de usted para cualquier asunto relacionado, reciba cordiales saludos.

ATENTAMENTE

DRA. ROSA MARÍA DEL ANGEL NUÑEZ Y CÁCERES
JEFA DEL DPTO. DE INFECTOMICA Y PATOGENESIS MOLECULAR
CINVESTAV ZACATENCO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN