

# Bionatura

Microalgae: An outstanding tool in nanotechnology

Ficocianobilina

Péptidos que atraviesan la membrana celular  
como potenciales transportadores de fármacos

Reparación de la lesión medular

Tratamiento glioma maligno

*Plectranthus amboinicus* in common cold

Biología en Colombia





# Pregrados

Alma Mater del Oriente Antioqueño



## Ciencias Agropecuarias

### › Tecnología Agropecuaria

SNIES 1850 Registro Calificado  
Res. 8684 del 10-07-2014 M.E.N.  
113 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

### › Agronomía

SNIES 4443 Registro Calificado  
Res. 12935 del 10-10-2012 M.E.N.  
**Acreditación de Alta Calidad**  
Res. 0748 del 06-09-2012 M.E.N.  
Modificación al Programa  
Res. 17754 del 22-10-2014 M.E.N.  
157 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

### › Zootecnia

SNIES 53037 Registro Calificado  
Res. 14466 del 04-09-2014 M.E.N.  
156 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

## Ciencias de la Educación

### › Licenciatura en Filosofía y Educación Religiosa

SNIES 15235 Registro Calificado  
Res. 5742 del 13-07-2011 M.E.N.  
167 créditos / A distancia / Rgro. Ant.

### › Licenciatura en Matemáticas

SNIES 15229 Registro Calificado  
Res. 6677 del 12-08-2011 M.E.N.  
164 créditos / A distancia / Rgro. Ant.

### › Licenciatura en Educación Física, Recreación y Deportes

SNIES 15233 Registro Calificado  
Res. 6136 del 29-07-2011 M.E.N.  
164 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

### › Licenciatura en Lenguas Extranjeras

SNIES 91003 Registro Calificado  
Res. 12954 del 31-12-2010 M.E.N.  
154 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

### › Licenciatura en Educación para la Primera Infancia

SNIES 105359 Registro Calificado  
Res. 2848 del 16-02-2016 M.E.N.  
164 créditos / Presencial / Rionegro Ant.

### › Licenciatura en Ciencias Naturales

SNIES 105898 Registro Calificado  
Res. 19869 del 18-10-2016 M.E.N.  
164 créditos / Rgro. Ant.

## Ciencias Económicas y Administrativas

### › Tecnología en Operaciones Financieras

SNIES 104841 Registro Calificado  
Res. 12903 del 21-08-2015 M.E.N.  
95 créditos / A distancia  
tradicional Rgro. Ant.

### › Contaduría Pública

SNIES 13018 Registro Calificado  
Res. 16741 del 20-12-2012 M.E.N.  
**Acreditación de Alta Calidad**  
Res. 15253 del 23-11-2012 M.E.N.  
165 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

### › Comercio Exterior

SNIES 1854 Registro Calificado  
Res. 7020 del 31-01-2013 M.E.N.  
**Acreditación de Alta Calidad**  
Res. 16718 del 20-12-2012 M.E.N.  
170 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

### › Administración de Empresas

SNIES 55096 Registro Calificado  
Res. 10521 del 23-12-2009 M.E.N.  
162 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

## Ingenierías

### › Técnico Profesional en Programación Web

SNIES 103704 Registro Calificado  
Res. 14454 del 04-09-2014 M.E.N.  
62 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

### › Ingeniería Ambiental

SNIES 4361 Registro Calificado  
Res. 2703 del 16-04-2010 M.E.N.  
**Acreditación de Alta Calidad**  
Res. 10749 del 06-09-2012 M.E.N.  
173 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

### › Ingeniería de Sistemas

SNIES 1855 Registro Calificado  
Res. 12325 del 29-12-2011 M.E.N.  
163 créditos / Presencial Rgro. Ant.

### › Ingeniería Electrónica

SNIES 20271 Registro Calificado  
Res. 9193 del 22-10-2010 M.E.N.  
178 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

### › Ingeniería Industrial

SNIES 1856 Registro Calificado  
Res. 11318 del 06-12-2011 M.E.N.  
160 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

## Ciencias de la Salud

### › Enfermería

SNIES 91027 Registro Calificado  
Res. 721 del 08-02-2011 M.E.N.  
166 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

### › Nutrición y Dietética

SNIES 104601 Res. 07823  
del 01-06-2015 M.E.N.  
166 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

### › Gerontología

SNIES 1853 Registro Calificado  
Res. 14839 del 22-10-2013 M.E.N.  
138 créditos / A distancia con  
apoyo virtual / Rgro. Ant.

## Ciencias Sociales

### › Psicología

SNIES 8562 Registro Calificado  
Res. 9902 del 31-07-2013 M.E.N.  
**Acreditación de Alta Calidad**  
Res. 8642 del 09-07-2013 M.E.N.  
175 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

### › Comunicación Social

SNIES 53045 Registro Calificado  
Res. 14892 del 11-09-2014 M.E.N.  
146 créditos / Presencial / Rgro. Ant.

## Derecho

### › Derecho

SNIES 53539 Registro Calificado  
Res. 10542 del 14-07-2015 M.E.N.  
166 créditos Presencial / Rgro. Ant.

## Teología y Humanidades

### › Teología

(Virtual) SNIES 102489  
Res. 4979 de 02-05-2013 M.E.N.  
130 créditos / Presencial  
Rgro. Ant.

### › Teología

SNIES 103450 Registro Calificado  
Res. 10638 del 09-07-2014 M.E.N.  
130 créditos académicos  
A distancia Rgro. Ant.

## IFT y DH MIES

Resolución No. S201500294628

### › Técnico Laboral Liniero Redes de Energía Eléctrica

Resolución No. S201500294925

Más información sobre los programas ofertados en



Sector 3, Carrera 46 No. 40B - 50  
PBX: + (57)(4) 569 90 90 - Rionegro - Antioquia  
NIT. 890984746-7

www.uco.edu.co universidad.catolicadeoriente @uconiano







## Instrucciones para los Autores

Los Trabajos serán Inéditos: Una vez aprobados, no podrán someterse a la consideración de otra revista, con vistas a una publicación múltiple, sin la debida autorización del Comité Editorial de la Revista. La extensión máxima será 8 cuartillas para los trabajos originales, 12 las revisiones y 4 las comunicaciones breves e informes de casos, incluidas las tablas y figuras. Los artículos se presentarán impresos (dos ejemplares). Todas las páginas se numerarán con arábigos y consecutivamente a partir de la primera. Estos deben acompañarse de una versión digital (correo electrónico o CD) en lenguaje Microsoft Word, sin sangrías, tabuladores o cualquier otro atributo de diseño (títulos centrados, justificaciones, espacios entre párrafos, etc.). Siempre se ha de adjuntar la carta del consejo científico que avala la publicación y una declaración jurada de los autores. Referencias Bibliográficas. Se numerarán según el orden de mención en el texto y deberán identificarse mediante arábigos en forma exponencial. Los trabajos originales no sobrepasarán las 20 citas; las revisiones, de 25 a 50 y las comunicaciones breves e informes de casos. En las Referencias en caso de que las publicaciones revisadas estén online se debe proveer un enlace consistente para su localización en Internet. Actualmente, no todos los documentos tienen DOI, pero si lo tienen se debe incluir como parte de la referencias. Si no tuviese DOI, incluir la URL.

Tablas, modelos y anexos: Se presentarán en hojas aparte (no se intercalarán en el artículo) y en forma vertical numeradas consecutivamente y mencionadas en el texto. Las tablas se ajustarán al formato de la publicación se podrán modificar si presentan dificultades técnicas.

**Figuras:** Las fotografías, gráficos, dibujos, esquemas, mapas, salidas de computadora, otras representaciones gráficas y fór-

mulas no lineales, se denominarán figuras y tendrán numeración arábiga consecutiva. Se presentarán impresas en el artículo en páginas independientes y en formato digital con una resolución de 300 dpi. Todas se mencionarán en el texto. Los pies de figuras se colocarán en página aparte. El total de las figuras y tablas ascenderá a 5 para los trabajos originales y de revisión y 3 para las comunicaciones breves e informes de casos.

**Abreviaturas y siglas:** Las precederá su nombre completo la primera vez que aparezcan en el texto. No figurarán en títulos ni resúmenes. Se emplearán las de uso internacional.

**Sistema Internacional de Unidades (SI):** Todos los resultados de laboratorio clínico se informarán en unidades del SI o permitidas por este. Si se desea añadir las unidades tradicionales, se escribirán entre paréntesis. Ejemplo: glicemia: 5,55 mmol/L (100 mg/100 mL).

Para facilitar la elaboración de los originales, se orienta a los autores consultar los requisitos uniformes antes señalados disponibles en: [http://www.fisterra.com/recursos\\_web/mbelvancover.htm#ilustraciones%20\(figura\)](http://www.fisterra.com/recursos_web/mbelvancover.htm#ilustraciones%20(figura))

Los trabajos que no se ajusten a estas instrucciones, se devolverán a los autores. Los aceptados se procesarán según las normas establecidas por el Comité Editorial. El arbitraje se realizará por pares y a doble ciego en un período no mayor de 60 días. Los autores podrán disponer de no más de 45 días para enviar el artículo con correcciones, se aceptan hasta tres reenvíos. El Consejo de Redacción se reserva el derecho de introducir modificaciones de estilo y/o acotar los textos que lo precisen, comprometiéndose a respetar el contenido original. El Comité Editorial de la Revista se reserva todos los derechos sobre los trabajos originales publicados en esta.

- La **Revista Bionatura** es un medio especializado, interinstitucional e interdisciplinario, para la divulgación de desarrollos científicos y técnicos, innovaciones tecnológicas, y en general, los diversos tópicos relativos a los sectores involucrados en la biotecnología, tanto en Ecuador como en el exterior; así mismo, la revista se constituye en un mecanismo eficaz de comunicación entre los diferentes profesionales de la biotecnología.
- Es una publicación sin ánimo de lucro. Los ingresos obtenidos por publicidad o servicios prestados serán destinados para su funcionamiento y desarrollo de su calidad de edición. (<http://revistabionatura.com/media-kit.html>)
- Es una revista trimestral, especializada en temas concernientes al desarrollo teórico, aplicado y de mercado en la biotecnología.
- Publica artículos originales de investigación y otros tipos de artículos científicos a consideración de su consejo editorial, previo proceso de evaluación por pares (peer review) sin tener en cuenta el país de origen.
- Los idiomas de publicación son el Español e Inglés.
- Los autores mantienen sus derechos sobre los artículos sin restricciones y opera bajo la política de Acceso Abierto a la Información, bajo la licencia de Creative Commons 4.0 CC BY-NC-SA (Reconocimiento-No Comercial-Compartir igual).

Esta revista utiliza **Open Journal Systems**, que es un gestor de revistas de acceso abierto y un software desarrollado, financiado y distribuido de forma gratuita por el proyecto Public Knowledge Project sujeto a la Licencia General Pública de GNU.

Nuestros contactos deben ser dirigidos a:  
Revista Bionatura: [editor@revistabionatura.com](mailto:editor@revistabionatura.com)  
ISSN: 1390-9347 (Versión impresa)  
Formato: 21 x 29,7 cm  
Número de ejemplares: 1000  
ISSN: 1390-9355 (Versión electrónica)  
Sitio web: <http://www.revistabionatura.com>

Publicación periódica trimestral  
Esta revista utiliza el sistema peer review para la evaluación de los manuscritos enviados.  
Instrucciones a los autores en:  
<http://revistabionatura.com/instrucciones.html>

## EDITORIAL

- Una visión global de la Biotecnología en Colombia** 165  
*An overview of Biotechnology in Colombia*  
 Dagoberto Castro – Restrepo

## CARTA AL EDITOR / LETTER TO THE EDITOR

- Reparación de la lesión medular mediante trasplante de células aldainoglia e inhibición de la actividad RhoGTPasa** 167  
*Repair of spinal cord injury by aldainoglia cell transplantation and inhibition of RhoGTPase activity*  
 Ernesto Doncel-Perrez

## INVESTIGACIÓN / RESEARCH

- Nimotuzumab en el tratamiento de pacientes con glioma maligno. Comparación entre estudios pre-registro y pos-aprobación.** 171  
*Nimotuzumab for the treatment of patients with malignant glioma. Comparison between pre-registration and post-approved studies.*  
 Mabel Alvarez, Giselle Saurez, Carmen Viada, Patricia Luaces, Aliuska Frías, Yuliannis Santiesteban, Lazara Garcia, Yanela Santiesteban, Amparo Macias, Tania Crombet

- Eficacia de las tabletas de Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng (Orégano francés) en pacientes con catarro común: estudio aleatorizado, a doble ciego, controlado con placebo.** 177  
*Efficacy of Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng (French oregano) tablets in patients with common cold: a randomized, double-blind, placebo-controlled study.*  
 Yolanda A Rodríguez-Cámbara, Daise Jiménez-Rodríguez, Jorge E Rodríguez-Chañfrau, Midalis Gracial-Serrano, Tatiana Festary-Casanova, Mabel C Luaces-Argüelles, Joaquina Gómez-Peire, Ángela D Tuero-Iglesias, Idrian García-García

- HLA-DRB1\*1101 allele confer protection for Multiple Sclerosis disease in Cuban population.** 183  
*Alelo HLA –DRB1\*11:01 asociado con la Esclerosis Múltiple en población cubana confiere protección.*  
 Fernández-de-Cossío ME, Cintado A, Nazabal MI, Hanlet C, Díaz T, Villarreal A, Ale M, Grass D, Cervantes-Llanos M, Pavon-Fuentes N, Benitez JV, Cabrera-Gomez JA, Diaz de la Fe A, Pentón-Rol G

- Quantification of polysaccharide Vi in the typhoid vaccine VaxTyVi™ by sandwich ELISA using a monoclonal antibody.** 190  
*Cuantificación del polisacárido Vi en la vacuna contra la fiebre tifoidea VaxTyVi™ mediante ELISA en sandwich utilizando un anticuerpo monoclonal.*  
 Elizabeth González Aznar, Fátima Reyes, Nevis Amin Blanco, Oscar Otero Alfaro, Maribel Cuello Pérez, Fidel Ramírez Bencomo and Reinaldo Acevedo Groguez

## REVISIÓN / REVIEW

- Microalgae: An outstanding tool in nanotechnology.** 196  
*Microalgas: Una excelente herramienta en nanotecnología.*  
 Si Amar Dahoumane, Mourad Mechouet, Francisco J. Alvarez, Spiros N. Agathos, Clayton Jeffryes

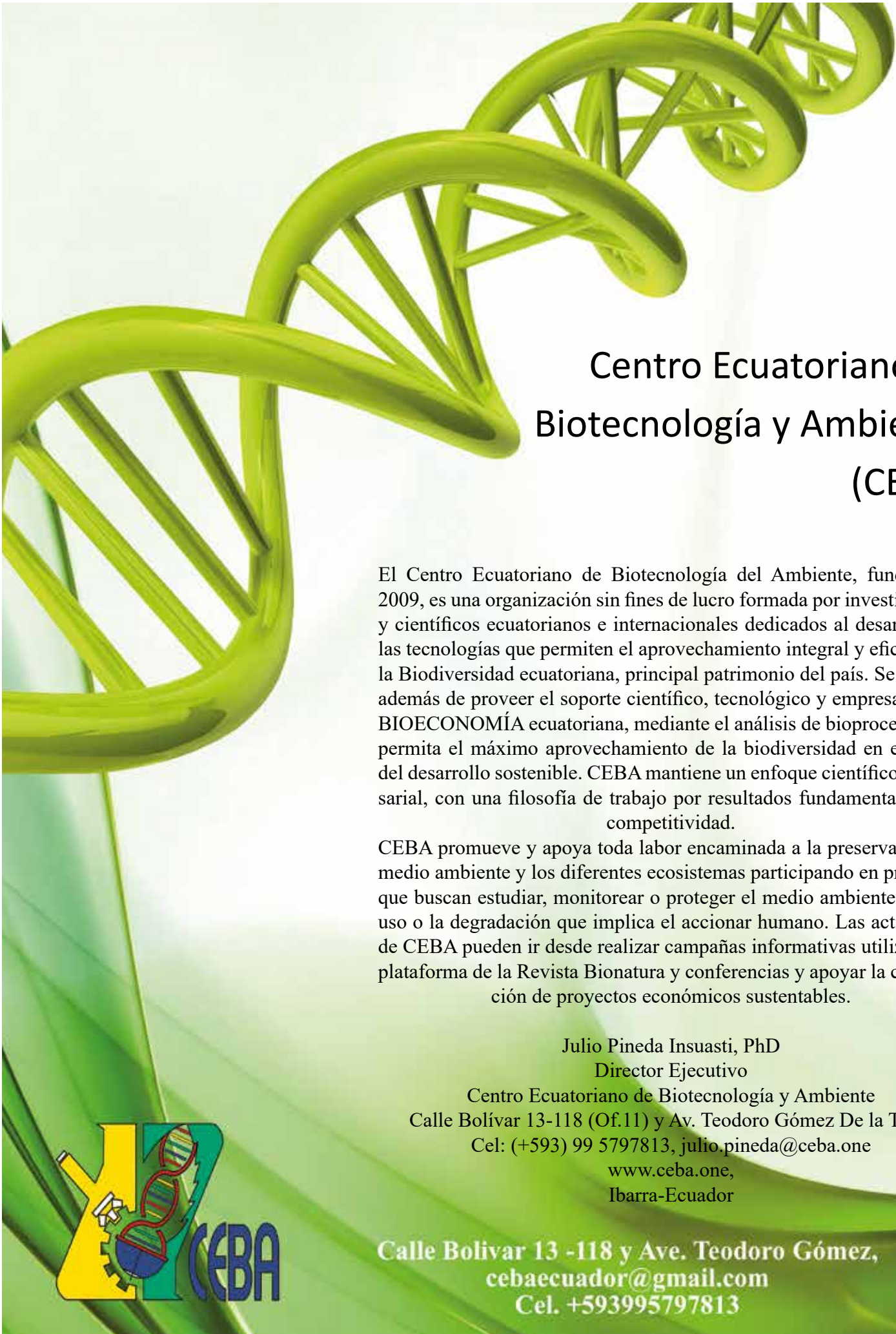
- Purificación y caracterización de la ficocianobilina.** 202  
*Purification and characterization of phycocyanobilin.*  
 Alexey Llopiz, a, Ariadna Milián, Gabriela Díaz Domínguez

- Péptidos que atraviesan la membrana celular como potenciales transportadores de fármacos.** 208  
*Cell Penetrating Peptides as potential drug carriers.*  
 Ximena Carolina Pulido, Miriam Royo, Fernando Albericio y Hortensia Rodríguez

## NOTICIAS Y OPINIONES / NEWS AND VIEWS

- Guardian de las alturas andinas. Estado de conservación actual del condor andino (Vultur Gryphus).** 217  
*Guardian of the Andean heights. Conservation status of the Andean condor (Vulture Gryphus).*  
 Jorge Simón Tanquero





## Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA)

El Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente, fundado en 2009, es una organización sin fines de lucro formada por investigadores y científicos ecuatorianos e internacionales dedicados al desarrollo de las tecnologías que permiten el aprovechamiento integral y eficiente de la Biodiversidad ecuatoriana, principal patrimonio del país. Se encarga además de proveer el soporte científico, tecnológico y empresarial a la BIOECONOMÍA ecuatoriana, mediante el análisis de bioprocesos, que permita el máximo aprovechamiento de la biodiversidad en el marco del desarrollo sostenible. CEBA mantiene un enfoque científico-empresarial, con una filosofía de trabajo por resultados fundamentada en la competitividad.

CEBA promueve y apoya toda labor encaminada a la preservación del medio ambiente y los diferentes ecosistemas participando en proyectos que buscan estudiar, monitorear o proteger el medio ambiente del mal uso o la degradación que implica el accionar humano. Las actividades de CEBA pueden ir desde realizar campañas informativas utilizando la plataforma de la Revista Bionatura y conferencias y apoyar la consecución de proyectos económicos sustentables.

Julio Pineda Insuasti, PhD

Director Ejecutivo

Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente  
Calle Bolívar 13-118 (Of.11) y Av. Teodoro Gómez De la Torre

Cel: (+593) 99 5797813, julio.pineda@ceba.one

www.ceba.one,

Ibarra-Ecuador



Calle Bolívar 13 -118 y Ave. Teodoro Gómez,  
cebaecuador@gmail.com  
Cel. +593995797813

EDITORIAL

## Una visión global de la Biotecnología en Colombia.

### An overview of Biotechnology in Colombia.

Dagoberto Castro – Restrepo

DOI. 10.21931/RB/2016.01.04.1

La estratégica localización geográfica de Colombia le ha permitido contar con la segunda mayor biodiversidad y además ser uno de los 12 países megadiversos en el mundo; sin embargo, como se menciona en el V informe de Biodiversidad en Colombia es igualmente complejo y frágil aún falta tomar mayor conciencia sobre la importancia de la biodiversidad y los servicios económicos como parte del desarrollo sostenible. <sup>1</sup> En tal sentido, la biotecnología se presenta como una oportunidad para afrontar este reto, para lo cual existen esfuerzos Nacionales liderados por el Departamento administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia – COLCIENCIAS- como son el Programa Nacional de Biotecnología con sus líneas de fortalecimiento de la industria biotecnológica, desarrollo y producción de biocombustibles y el conocimiento, protección y aprovechamiento sostenible de la biodiversidad. <sup>2</sup>

Respecto a la formación del talento humano en Biotecnología, en Colombia se tienen dos programas de pregrado, ocho especializaciones, once maestrías y tres programas de doctorado, que considerando las oportunidades para el país son todavía deficitarios. En este mismo sentido, se registran 114 grupos de investigación reconocidos por Colciencias en temas agropecuarios, salud, farmacia, ambiental e industrial.

Como oportunidad para el fortalecimiento de la biotecnología del país, el Estado Colombiano ha identificado sectores que ha denominado de clase mundial, entre los que se destacan la Chocolatería y confitería, carne bovina, hortofrutícola, acuícola, lácteo, palma, aceites, grasas y sus biocombustibles así como los productos para cosmética y aseo; <sup>3</sup> por lo tanto, para que estos sectores sean competitivos se debe tener la convergencia del estado, las empresas privadas, las Universidades y Centros de desarrollo tecnológico

Recientemente COLCIENCIAS ha promovido el “Proyecto Colombia BIO” cuyo principal objetivo es propiciar condiciones para conocer, valorar, conservar y aprovechar sosteniblemente la biodiversidad del país, contribuyendo a un desarrollo sostenible y socialmente inclusivo, cuyos componentes tienen como meta articular una gran cadena de valor de la biodiversidad y crear condiciones para ser competitivos. <sup>4</sup>

Por lo tanto, teniendo como referencia la riqueza en recursos de la biodiversidad, la oferta de formación académica, el talento humano a través de los grupos de investigación, es una fortaleza que debe ser capitalizada en forma articulada con el estado como ente gestor y la empresa privada como inversionista, teniendo en cuenta que el país cuenta con 157 compañías biotecnológicas con aplicaciones en los sectores de cosméticos, medicina, industria, agropecuario, alimentos, ambiente y energía. En este sentido, para generar cooperación equitativa y de confianza las Universidades tenemos la tarea de establecer nuestros propios modelos de negocios, de gestión y de operación en el marco de la propiedad intelectual, en un ámbito de Ética y Responsabilidad Social Universitaria.

En este sentido, la Universidad Católica de Oriente la Unidad de Biotecnología Vegetal ha contribuido al desarrollo de la biotecnología en el país por más de 20 años, con procesos de reproducción clonal masiva de musáceas como bananos del grupo “Cavendish”

donde se han producido más de 10 millones de plantas con destino a mercados nacionales e internacionales. En especies forestales se han realizado investigaciones para la revigorización, reproducción clonal y el uso de marcadores moleculares para la selección y propagación de teca, abarco, eucaliptos y pinos. Así mismo en frutales se han establecido protocolos para la micropropagación de ecotipos de mora de castilla, agraz (mortiño), piña y el desarrollo de patrones tolerantes a estrés biótico y abiótico en especies de tomate de árbol, lulo y aguacate. En el cultivo de la papa se han desarrollado métodos moleculares para la detección de virus, viroides y producción de microtubérculos in vitro.

En los últimos años se han desarrollado investigaciones en alianza con el sector farmacéutico para la producción de metabolitos secundarios como polifenoles en mortino (*Vaccinium meridionale*), fitosteroles en ñame, zanahoria y yacón; y eritadenina a partir del hongo shiitake (*Lentinula edodes*); así como un proyecto de investigación en Amaryllidaceas, en cooperación con 11 países, para la búsqueda de principios activos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas.



Mini jardín clonal hidropónico para la propagación masiva de plantas de abarco, teca y eucaliptos reproducidas in vitro.

### Referencias bibliográficas

1. <http://www.co.undp.org/content/dam/colombia/docs/MedioAmbiente/undp-co-informebiodiversidad-2014.pdf>.
2. [http://legadoweb.colciencias.gov.co/programa\\_estrategia/programa-nacional-de-biotecnolog-0](http://legadoweb.colciencias.gov.co/programa_estrategia/programa-nacional-de-biotecnolog-0)
3. <https://www.ptp.com.co/portal/default.aspx>. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology* 2012;13: 607-615
4. <http://www.colciencias.gov.co/content/colombia-bio>.

**Dr. Dagoberto Castro – Restrepo. PhD**  
Líder Grupo de investigación Unidad de Biotecnología.  
Universidad Católica de Oriente  
Autor de correspondencia: [investigacion.dir@uco.edu.co](mailto:investigacion.dir@uco.edu.co)



# Biología para la producción y la vida



Técnicas Agrícolas | Cultivo de Tejidos | Bioproductos  
Fitopatología/Microbiología | Biología Molecular | Biorremediación





CARTA AL EDITOR / LETTER TO THE EDITOR

## Reparación de la lesión medular mediante trasplante de células aldainoglia e inhibición de la actividad RhoGTPasa

### Repair of spinal cord injury by aldainoglia cell transplantation and inhibition of RhoGTPase activity

Ernesto Doncel-Pérez<sup>1</sup>

DOI. 10.21931/RB/2016.01.04.2

#### RESUMEN

Una posible terapia para la reparación de una Lesión de la Médula Espinal (LME) está en la modulación eficaz de elementos moleculares y celulares implicados en el proceso de cicatrización glial. Las células de aldainoglia son precursores de células neurales con una alta capacidad para diferenciarse en neuronas, promueven el crecimiento, la envoltura y mielinización axonal de las neuronas residentes. Estas importantes características de la aldainoglia se pueden combinar con la inhibición específica de la actividad RhoGTPasa en astroglia y microglia que causan la reducción de la proliferación glial, la retracción de células astrogliales y la producción de mielina por los oligodendrocitos. Anteriormente hemos utilizado modelos de lesión experimental del sistema nervioso central, como la contusión de la médula espinal en ratas y el *ictus* lacunar estriatal en ratones; así observamos que la administración de glicolípidio inhibidor para RhoGTPase o de células aldainoglia, respectivamente, produjo un aumento significativo de la recuperación funcional en los animales tratados. La estrategia de una terapia combinada con propiedades neuro-regenerativas es muy propicia en el tratamiento de LME por la potenciación funcional de neuronas y oligodendrocitos, que redundaría en la recuperación del ritmo locomotor. Aquí proponemos que el tratamiento de la lesión de la médula espinal con aldainoglia proveniente de neuroesferas, junto a la administración local de un inhibidor de RhoGTPasas tendría un efecto aditivo que facilitaría la recuperación después de la LME.

Palabras Clave: Aldainoglia, astrocito, cicatriz glial, CSPGs, médula espinal, mielinización, neurona, RhoGTPasa.

#### ABSTRACT

A possible therapy for repairing a spinal cord injury (SCI) is the effective modulation of cellular and molecular elements involved in the process of glial scarring. The aldainoglia cells are neural precursor cells with a high capacity to differentiate into neurons and promote growth, ensheathment and axonal myelination of resident neurons. These important features of the aldainoglia can be combined with the specific inhibition of RhoGTPase activity in astroglia and microglia that produces a reduction in glial proliferation, retraction of astroglial cells and production of myelin by oligodendrocytes. We have been working in experimental models of CNS injury, such as spinal cord contusion in rats and striatal lacunar infarction in mice; and we observed that administration of glycolipid inhibitor for RhoGTPase or aldainoglia cells, respectively, produced a significant increase in the functional recovery in treated animals. A therapy that combines both treatments with neuro-regenerative properties is quite desired in the treatment of SCI because a functional potentiation of neurons and oligodendrocytes, would result in a better recovery of locomotor rhythm. Here we propose that the treatment of spinal cord injuries with aldainoglia obtained from neurospheres, plus the local administration of an inhibitor of RhoGTPases have an additive effect that could be facilitate recovery after SCI.

Keywords: Aldainoglia, astrocyte, CSPGs, glial scar, myelination, neuron, spinal cord, RhoGTPase.

#### Introduction

Después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, el trauma accidental es la causa principal de muerte en niños y adultos jóvenes en los países desarrollados. Las lesiones del Sistema Nervioso Central (SNC) causan incapacidad laboral, suelen conducir a una dependencia crónica y con frecuencia se producen en individuos menores de 45 años. La recuperación de una lesión en el cerebro o médula espinal depende de la zona dañada y la extensión de la lesión, sin embargo; las terapias disponibles en la actualidad se limitan a proporcionar alivio a los síntomas y realizar rehabilitación.

Tras una Lesión en la Médula Espinal (LME), se producen una serie de acontecimientos celulares y moleculares muy dinámicos en la zona afectada. Los macrófagos provenientes de la sangre eliminan el *debris* celular, comienza el proceso de muerte neuronal secundaria, células precursoras neurales migran cerca de la zona dañada, también proliferan y se diferencian astrocitos que agrandan sus procesos fibrosos, formando una barrera glial entre la zona lesionada y el SNC no lesionado. Los fibroblastos del tejido conectivo adyacente se dividen y se superponen sobre los astrocitos

<sup>1</sup> Grupo de Química Neuro-Regenerativa, Hospital Nacional de Paraplégicos, Servicio de Salud de Castilla La Mancha (SESCAM), Finca La Paredada s/n, 45071 Toledo, España. aculty of Medicine, McGill University, Montréal, Québec, H3G 1Y6, Canada.

Correspondence: ernestod@sescam.jccm.es



fibrosos, depositando colágeno, esto completa la formación de una frontera que le separa del SNC llamada cicatriz glial. Las células de esta cicatriz son principalmente astrocitos reactivos, microglía reactiva, pericitos y fibroblastos que junto a la matriz extracelular, conforman un ambiente hostil para el crecimiento axonal. Los astrocitos y la microglía son poblaciones de células del SNC altamente reactivas y tienen un papel fundamental en la formación de la cicatriz glial que está ampliamente documentado.<sup>12</sup>

La respuesta de astrocitos a una lesión del SNC también se caracteriza por la producción de proteoglicanos tipo condroitin sulfato (*Chondroitin Sulphate Proteoglycans*, CSPGs), que presentan una potente barrera para la regeneración de axones. La acción inhibitoria de CSPG se ha atribuido a la abundancia de las cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) cargados negativamente que decoran el núcleo proteico y constituyen un sustrato pobre que repele electrostáticamente los conos de crecimiento axonal. La *protein tyrosine phosphatase sigma*, PTPsigma, el *Leukocyte common antigen related phosphatase*, LAR; así como el *receptor de Nogo* (NgR) han sido identificados como receptores neuronales que funcionalmente interactúan con los CSPGs y median la inhibición del crecimiento neuronal dependiente de CSPG. La *chondroitinase ABC* (chABC) es una enzima bacteriana que digiere las cadenas de GAG. La chABC suprime, *in vitro*, la inhibición de crecimiento de neuritas dependiente de CSPG; así como mejora el crecimiento de neuritas y la recuperación funcional después de LME. Por lo tanto, el “*targeting*” farmacológico de receptores para CSPGs es una estrategia que ha mostrado algún potencial para disminuir el secuestro de los conos de crecimiento neuronales dependiente de CSPG. Si bien estos estudios han identificado como posibles objetivos los receptores de CSPG, el trabajo futuro se inclina hacia el desarrollo de pequeñas moléculas inhibitorias que alcancen una mejor penetración y distribución en el SNC y se consiga llegar de manera más temprana y eficaz a la lesión.<sup>3</sup> En este sentido, hemos trabajado en el desarrollo de glucósidos inhibitorios que consigan una inhibición específica y temporal de la astrogliosis. Esto, a su vez, permitiría una reducción significativa de la producción de CSPGs, promovería el crecimiento axonal y la recuperación funcional de las neuronas y células gliales.<sup>14</sup>

Los derivados de la mielina del SNC constituyen una barrera para la regeneración de axones en los sitios de lesión. Los inhibidores asociados a la mielina (*myelin-associated inhibitors*, MAIs), incluyendo Nogo, la glicoproteína asociada a la mielina (*myelin-associated glycoprotein*, MAG) y la glicoproteína de mielina de los oligodendrocitos (*oligodendrocyte myelin glycoprotein*, OMgp) colapsan los conos de crecimiento axonal e inhiben el crecimiento de neuronas. El “*targeting*” de estos factores inhibitorios externos ha producido alguna mejora en la plasticidad axonal y la recuperación funcional después de lesión del SNC. Adicionalmente, la estimulación del potencial de crecimiento intrínseco mediante silenciamiento de reguladores negativos del crecimiento de genes en neuronas, incluyendo la *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) y el *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3), puede inducir de manera importante la regeneración axonal a larga distancia, después de una lesión del SNC.<sup>5</sup> También, el trasplante de células precursoras neurales en roedores con la médula espinal seccionada resulta en un crecimiento significativo a larga distancia de las células trasplantadas.<sup>6</sup> Estos estudios indican que una estimulación del crecimiento neuronal intrínseco es capaz de superar la naturaleza inhibitoria de la lesión en el SNC.

Una pequeña GTPasa, RhoA, que participa en la regulación de la actina; así como su efectora cadena abajo la Rho-quinasa (ROCK), se han estudiado de forma exhaustiva como mediadores de la inhibición del exo-crecimiento neurítico en el SNC. Se ha demostrado que MAIs aumentan los niveles de RhoA activa, unida a GTP. La inhibición de ROCK, estimula el exo-crecimiento de

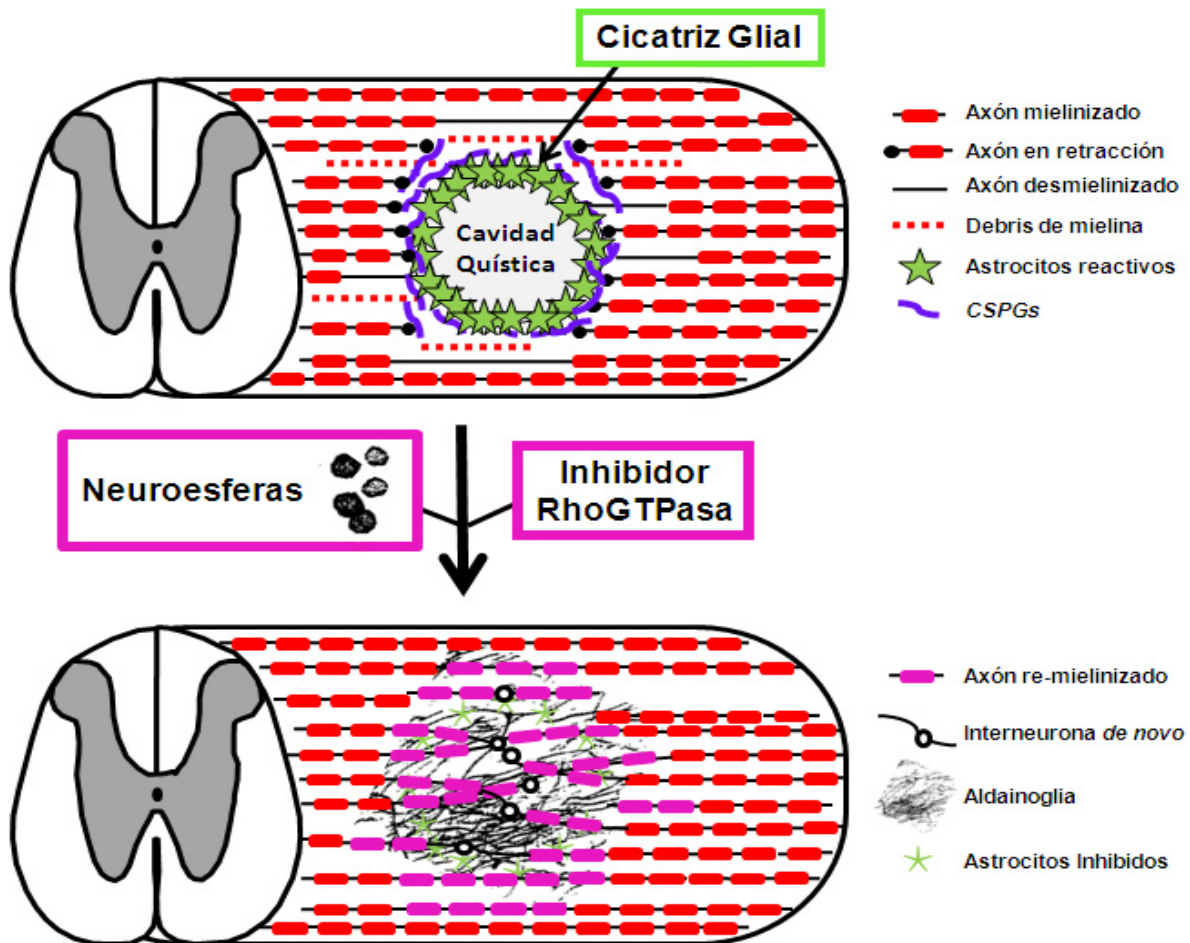
neuritas sobre la mielina; así también la infusión de inhibidores ROCK en la médula espinal lesionada de la rata (Ej: pequeñas moléculas como Y-27632 o fasudilo), mejora la recuperación de su sistema locomotor.<sup>7</sup> RhoA se puede inhibir específicamente con la exoenzima C3 transferasa (C3) de *Clostridium botulinum*, la cual ribosila el ADP e inactiva RhoA. El tratamiento de los animales con C3 mejora la recuperación locomotora en los modelos de LME por contusión y hemisección dorsal.<sup>8</sup> Los resultados positivos con C3 se han trasladado a fase I / II de ensayos clínicos con Cethrin (BA-210), una forma de C3 que es permeable a las células. Durante la cirugía de la médula espinal y usando fibrina como agente sellador, BA-210 se libera a nivel local sobre la duramadre.<sup>9</sup>

Células precursoras neurales (*neural stem cells*, NSCs) trasplantadas tienen una elevada capacidad para sobrevivir e integrarse funcionalmente en la médula espinal lesionada de roedores. Lo anterior nos sugiere que la naturaleza inhibitoria del SNC lesionado puede ser superada por neuronas con un crecimiento vigoroso. Se ha demostrado que las NSC trasplantadas en una médula espinal seccionada extienden largos axones a través de la materia gris y blanca, estableciendo un puente electrofisiológico a través de la lesión.<sup>6</sup> Las NSC injertadas tuvieron la capacidad de integrarse en la médula espinal de su huésped; no obstante, en la mitad de los animales se observó la presencia de colonias ectópicas de células del donante a lo largo de la médula espinal y el tronco cerebral.<sup>10</sup> Esto nos indica la precaución que debe mantenerse en el desarrollo de terapias con NSC, ya que estas células implantadas pueden generar tumores y/o conexiones sinápticas exuberantes que podrían dar lugar a efectos secundarios desfavorables ya sea conductuales o sensoriales, incluyendo el dolor neuropático. En general, en los trabajos revisados queda probado que las neuronas provenientes de NSCs poseen alta potencialidad de crecimiento; siendo capaces de crecer y diferenciarse extensamente en el CNS lesionado, a pesar de la presencia de factores inhibitorios.

Un enfoque novedoso en la terapia para LME es la modulación de procesos celulares y moleculares implicados en la cicatrización glial. Este enfoque se sustenta en dos elementos fundamentales: i) apoyar, preservar y promover el crecimiento axonal de neuronas residentes o “*de novo*” y ii) la inhibición de la activación glial y por consecuencia la inhibición de la cicatriz glial (Figura 1).

En cuanto al primer elemento hemos trabajado en la obtención de aldainoglia, células gliales que promueven el crecimiento axonal y se pueden encontrar en diferentes nichos del SNC como el bulbo olfativo, hipotálamo, hipófisis o glándula pineal. Estas células comparten con las células de Schwann (*Schwann cells*, SCs) del sistema nervioso periférico la capacidad de sobrevivir y proliferar en cultivo, promover el crecimiento de neuritas, así como la envoltura y mielinización de axones. Las células que corresponden respectivamente a las zonas del SNC mencionadas son: células de glía de envoltura olfativa (*Olfactory ensheathing cells*, OECs), tanicitos, pituiticos y células pineales intersticiales. Estas se pueden identificar en cultivo por expresión concomitante de un conjunto de marcadores inmunológicos, tales como la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), la vimentina, el receptor p75 para NGF, y el receptor de estrógeno tipo  $\alpha$ , lo que muestra que poseen propiedades de SCs y astrocitos.<sup>11</sup> Los trasplantes de células aldainoglia tienen un considerable potencial para el tratamiento de las lesiones del SNC. Estas NSCs multipotentes se pueden aislar de las mencionadas regiones del SNC de mamíferos en diferentes etapas de desarrollo y cultivarse como neuroesferas en suspensión. Después de las señales apropiadas, las células de neuroesferas pueden diferenciarse *in vitro* a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, aunque su comportamiento después de trasplantadas es variable. Las neuroesferas de roedores cuando se trasplantan se diferencian predominantemente a células gliales, mientras que los trasplantes de neuroesferas del





**Figura 1.** Modelo para la reparación de la lesión medular mediante tratamiento con aldainoglia derivada de neuroesferas e inhibición de la actividad RhoGTPasa. Después de una lesión medular, los astrocitos proliferan cerca de la zona dañada, se agrandan sus procesos fibrosos, producen CSPGs y forman una cicatriz glial con una cavidad quística en la médula espinal. Se interrumpe los tractos de neuronas y provoca la retracción axonal de las neuronas lesionadas. Los restos de mielina del SNC provenientes de los axones dañados generan MAIs, MAG y OMgp, que inhiben el crecimiento axonal e inducen la muerte neuronal (Panel A). La administración de un inhibidor de RhoGTPasa reduce el tamaño de los astrocitos reactivos e inhibe su producción de CSPGs. La inyección de células precursoras neurales (neuroesferas) induce su diferenciación a aldainoglia, que promueve el crecimiento axonal, la re-mielinización y la re-conexión de las vías nerviosas por interneuronas generadas *de novo* a partir de los precursores neuronales trasplantados o residentes (Panel B).

cerebro anterior de embriones humanos dieron lugar a una proporción significativa de neuronas. Nuestro grupo ha reportado que neuroesferas mesencefálicas de roedores se diferencian, *in vitro*, predominantemente a células con propiedades similares a aldainoglia, cuando se expone al medio condicionado por OECs (OEC-CM). Este medio contiene una mezcla de neurotrofinas (NGF, BDNF) y neurregulinas, que instruye a las neuroesferas hacia células progenitoras neurales con fenotipo de aldainoglia. Es por esto que OEC-CM causa que las células de neuroesferas se diferencien a células con fenotipo de glia periférica, a juzgar por su expresión de ARNm y los marcadores de proteínas (GFAP, vimentina, nestina, y proteínas S100). En ensayos de co-cultivo de aldainoglia marcada con GFP, con ganglios de la raíz dorsal (*dorsal root ganglia*, DRG), se observó migración de aldainoglia-GFP hacia estos ganglios, invadiéndolos e interaccionando con las neuronas DRG. La interacción directa aldainoglia-neurona fue necesaria y suficiente para promover la envoltura, mielinización y exo-crecimiento neurítico.<sup>12</sup> La posibilidad de diferenciar las células neuroesferas a aldainoglia podría satisfacer el déficit de células neurales necesarias en trasplantes para reparar grandes lesiones del SNC.

Para conseguir el segundo elemento en este enfoque de terapia SCI conseguimos inhibir de manera específica las células gliales no deseadas (astrocitos y microglia), evitando al mismo tiempo no afectar a otros tipos de células neurales, es decir, las neuronas y oligodendrocitos. En los últimos años, tomando como base la estruc-

tura química de un inhibidor natural de astroblastos y de la división de astrocitos (neurostatin), hemos estudiado los glucósidos inhibidores de la división de glioma.<sup>13</sup> Entre los compuestos ensayados, los glicolípidos sulfatados presentaron la más alta actividad inhibidora de la división de glioma humano y de rata.<sup>4</sup> Resulto interesante observar mediante el uso de la tecnología de *microarrays* de ADN que el gen ARHGDIa fue reprimido de forma significativa. El producto de este gen es el inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina tipo alfa para Rho (RhoGDI $\alpha$ ), un regulador de RhoGTPasas.<sup>14</sup> Hemos demostrado recientemente que nuestro sulfoglicolípido afecta a células gliales mediante la interacción con la proteína RhoGDI $\alpha$ , provocando un aumento en la expresión de genes TrkB en las células neurales, la producción de mielina por oligodendrocitos y la promoción del crecimiento axonal de neuronas DRG. Las células astrogliales cambian su morfología y esto es transducido principalmente por la vía de señalización BDNF / TrkB / RhoGDI $\alpha$ , que también es operativo en microglia. La isoforma TrkT1 corresponde a la forma TrkB truncada del receptor con un corto dominio citoplásmico de 11 residuos de aminoácidos en el C-terminal. Este dominio interactúa con RhoGDI $\alpha$  e induce la afluencia de Ca<sup>2+</sup> y cambios morfológicos en las células de la glia. La inhibición de la vía de BDNF / TrkB / RhoGDI $\alpha$  en astrocitos y células microgliales, por secuestro de RhoGDI $\alpha$ , fue propuesto como una nueva diana para el tratamiento de LME.<sup>1</sup>

Las NSC injertadas podrían integrarse en la médula espinal



y el cerebro del huésped, pero también estas células implantadas pueden dar lugar a tumores y dolor neuropático, según hemos mencionado anteriormente. Una combinación de células precursoras neurales y nuestro glucósido antiproliferativo podría salvar este obstáculo (Figura 1). Las propiedades antiproliferativas de estos compuestos disminuyen el riesgo de crecimiento de tumores y facilita el movimiento de las NSCs trasplantadas en un entorno de laxitud astrogliar proporcionada por la actividad inhibitoria del glucósido.

La promoción del crecimiento axonal por la aldainoglia y la inhibición de la actividad RhoGTPase en células de la glia residente ocurren simultáneamente. Hemos observado que la presencia de sulfoglicolipido potencia el exo-crecimiento del axón en neuronas DRG, y las células aldainoglia no se vieron afectadas por el glucósido.<sup>1</sup> Esto indica que la inhibición de la actividad era debido al efecto antiproliferativo del glucósido y no influyó a otras funciones en la aldainoglia. El reclutamiento de astrocitos después de la lesión recae en la proliferación astrogliar; así el número de astrocitos reclutados a un sitio de la lesión del SNC se reduce significativamente en ratones deficientes para RhoGTPase.<sup>14</sup> En otros escenarios se ha reportado que una alta actividad RhoGTPase en las células madre hematopoyéticas (HSC) de adultos esta causalmente vinculada al envejecimiento de HSC y correlaciona con una pérdida de la polaridad en las HSCs en la edad adulta; mientras que la inhibición farmacológica de la actividad de la RhoGTPasa Cdc42 rejuveneció funcionalmente a HSCs adultas, aumento la proporción de células polarizadas en la población de HSC adultas y restaura el nivel y la distribución espacial de la acetilación de histonas a un estado similar al observado en HSCs juveniles.<sup>15</sup>

Las células de aldainoglia son precursores de células neurales con capacidad de diferenciarse a neuronas, promover la envoltura, mielinización y crecimiento axonal. La inhibición selectiva de la actividad RhoGTPase en astroglia y microglia por sulfoglicolipido específico reduce su proliferación celular, induce la retracción de los procesos de células gliales y aumenta de la producción de mielina por oligodendrocitos.<sup>1, 12, 16</sup> Estas son propiedades fundamentales en la terapia de LME donde la potenciación funcional de neuronas y oligodendrocitos resultará en una mejor recuperación del ritmo locomotor. Hemos reportado que ratas con una contusión moderada de la médula espinal, tratadas con inyección espinal de sulfoglicolipido, mostraron una recuperación funcional significativa.<sup>1</sup> Adicionalmente observamos en un modelo en ratón con ictus lacunar estriatal, que nuevas neuronas derivadas de aldainoglia se integraron en los circuitos del SNC del huésped y se lograron establecer contactos sinápticos.<sup>16</sup> Estos datos apoyan el uso de la aldainoglia y los inhibidores de la actividad RhoGTPasa como herramientas útiles para la terapia en el trauma del SNC, particularmente en el tratamiento de LME.

## References

- García-Alvarez, I., et al., Inhibition of glial proliferation, promotion of axonal growth and myelin production by synthetic glycolipid: A new approach for spinal cord injury treatment. *Restor Neurol Neurosci*, 2015. 33(6): p. 895-910.
- Bovolenta, P., F. Wandosell, and M. Nieto-Sampedro, Neurite outgrowth over resting and reactive astrocytes. *Restor Neurol Neurosci*, 1991. 2(4): p. 221-8. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005;436(7051):725-30.
- Kaplan, A., S. Ong Tone, and A.E. Fournier, Extrinsic and intrinsic regulation of axon regeneration at a crossroads. *Front Mol Neurosci*, 2015. 8: p. 27.
- Doncel-Perez, E., et al., Synthetic glycolipids for glioma growth inhibition developed from neurostatin and NF115 compound. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013. 23(2): p. 435-9. Caldwell ME, DeNicola GM, Martins CP, Jacobetz MA, Maitra A, Hruban RH, et al. Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene*. 2012;31(12):1599-608.
- Sun, F., et al., Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3. *Nature*, 2011. 480(7377): p. 372-5.
- Lu, P., et al., Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell*, 2012. 150(6): p. 1264-73. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005;436(7051):720-4.
- Sung, J.K., et al., A possible role of RhoA/Rho-kinase in experimental spinal cord injury in rat. *Brain Res*, 2003. 959(1): p. 29-38.
- Boato, F., et al., C3 peptide enhances recovery from spinal cord injury by improved regenerative growth of descending fiber tracts. *J Cell Sci*, 2010. 123(Pt 10): p. 1652-62.
- Lord-Fontaine, S., et al., Local inhibition of Rho signaling by cell-permeable recombinant protein BA-210 prevents secondary damage and promotes functional recovery following acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 2008. 25(11): p. 1309-22.
- Steward, O., K.G. Sharp, and K. Matsudaira Yee, Long-distance migration and colonization of transplanted neural stem cells. *Cell*, 2014. 156(3): p. 385-7.
- Gudino-Cabrera, G. and M. Nieto-Sampedro, Schwann-like macroglia in adult rat brain. *Glia*, 2000. 30(1): p. 49-63.
- Doncel-Perez, E., S. Caballero-Chacon, and M. Nieto-Sampedro, Neurosphere cell differentiation to aldainoglia promoted by olfactory ensheathing cell conditioned medium. *Glia*, 2009. 57(13): p. 1393-409. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44-57.
- Nieto-Sampedro, M., E. Doncel-Perez, and A. Fernandez-Mayoralas, Natural, synthetic and semisynthetic glycolipid inhibitors of glioma growth. *Expert Opin Ther Pat*, 2004. 14(4): p. 487-97. Gotea V, Ovcharenko I. DiRE: identifying distant regulatory elements of co-expressed genes. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Web Server issue):W133-9.
- Robel, S., et al., Genetic deletion of cdc42 reveals a crucial role for astrocyte recruitment to the injury site in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 2011. 31(35): p. 12471-82.
- Florian, M.C., et al., Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell*, 2012. 10(5): p. 520-30.
- Muneton-Gomez, V.C., et al., Neural differentiation of transplanted neural stem cells in a rat model of striatal lacunar infarction: light and electron microscopic observations. *Front Cell Neurosci*, 2012. 6: p. 30.

**Recibido:** 7 de septiembre de 2016.

**Aprobado:** 15 de noviembre de 2016.



INVESTIGACIÓN / RESEARCH

## Nimotuzumab en el tratamiento de pacientes con glioma maligno. Comparación entre estudios pre-registro y pos-aprobación

### Nimotuzumab for the treatment of patients with malignant glioma. Comparison between pre-registration and post-approved studies

Mabel Alvarez\*, Giselle Saurez\*, Carmen Viada, Patricia Luaces, Aliuska Frías, Yuliannis Santiesteban, Lazara Garcia, Yanela Santiesteban, Amparo Macías, Tania Crombet

DOI. 10.21931/RB/2016.01.04.3

#### RESUMEN

Nimotuzumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico aprobado para el tratamiento de Gliomas malignos de alto grado en combinación con radioterapia. Los estudios pre y pos –registro han demostrado resultados de seguridad y eficacia equivalentes; no obstante, la magnitud de dichas semejanzas se desconoce. El presente trabajo compara la supervivencia y el perfil de seguridad de los estudios pre y pos- aprobación. Se diseñó una base de datos integrada, correspondiente a cuatro estudios clínicos, que incluyó 262 pacientes adultos con glioma de alto grado de malignidad de nuevo diagnóstico, expuestos a nimotuzumab (61 pacientes de estudios pre-registro y 201 de estudios pos-aprobación). Las medianas de supervivencia para pacientes con Glioblastoma fueron 14.2 y 11.9 meses; mientras que para Astrocitoma anaplásico fueron 43.9 y 21.4 respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas. Nimotuzumab fue seguro en ambas poblaciones estudiadas, con una baja frecuencia de eventos relacionados. La aparición de reacciones dermatológicas fue mínima y de grado ligero. Nimotuzumab combinado con radioterapia en pacientes con tumores gliales de alto grado de malignidad confirma su eficacia clínica en términos de supervivencia, tanto en los estudios pre-registro como en condiciones reales. El perfil de seguridad de nimotuzumab es consistente para ambas poblaciones estudiadas. Este tratamiento multimodal puede ser recomendado en pacientes con gliomas malignos de alto grado.

Palabras claves: Estudios clínicos controlados, estudios pos aprobación, terapias dirigidas, nimotuzumab, gliomas de alto grado de malignidad.

#### ABSTRACT

Nimotuzumab is a monoclonal antibody targeted against the epidermal growth factor receptor approved for the High-Grade Gliomas in combination with radiotherapy. Those studies pre and post-marketing have shown results of safety and efficacy equivalent; but the magnitude of such similarities is unknown. This paper compares the survival and the safety profile from pre and post-approval studies. We designed a database, corresponding to four clinical trials, which involved 262 adult patients with high-grade glioma, exposed to nimotuzumab (61 patients from pre-registration and 201 from post-approval studies). The median survivals for patients with Glioblastoma were 14.2 and 11.9 months; while for Anaplastic astrocytoma were 43.9 and 21.4 respectively, without differences statistically significant. Nimotuzumab was safe in both populations studied, with a low frequency of events. The appearance of dermatological reactions was negligible and mild. Nimotuzumab combined with radiotherapy in patients with High grade glioma tumors confirms clinical efficacy in terms of survival, in real conditions as pre-registration studies. The safety profile for both populations studied of nimotuzumab is consistent. This multimodal treatment can be recommended in patients with High-grade malignant gliomas.

Key words: Controlled clinical studies, postmarketing studies, target therapies, nimotuzumab, and High- grade glioma.

#### Introducción

El glioma maligno es el tumor cerebral primario más común en los adultos. Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud, los gliomas de alto grado de malignidad, definidos como Astrocitoma Anaplásico (AA), grado III y Glioblastoma Multiforme (GBM), grado IV representan entre un 45 y 60 % de todos los tumores cerebrales y son los que exhiben mayor agresividad.<sup>1</sup>

Los gliomas de alto grado de malignidad tienen una elevada morbilidad y mortalidad entre todas las malignidades; incluso con un óptimo tratamiento de cirugía, radioterapia (RTP) y quimioterapia (QT), la supervivencia esperada no sobrepasa los dos años al diagnóstico, principalmente cuando se asocian a factores de mal pronóstico, como el subtipo histológico, la edad avanzada (mayores de 50 años) y la capacidad funcional, según índice de Karnofsky (KPS) menor de 70 % entre otros.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Immunology. Institute of Hematology and Immunology. Havana, Cuba.

<sup>2</sup> Immunodiagnosics and Genomics Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba.

<sup>3</sup> Department of Mental Health, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, USA

<sup>4</sup> Neuroscience Center. Havana, Cuba. **Correspondence:** José Armando Galván Cabrera, MD, PhD. Institute of Hematology and Immunology. Ave 100 y Perla, Altahabana, Boyeros, Havana, Cuba. CP-10800. Tel:(537) 6438268, 6438695. Fax: (537) 6442334. E-mail: jagalvancabrera@gmail.com jagalvan@infomed.sld.cu



Estos últimos factores dependientes del paciente se asocian comúnmente a los que se enfrentan la comunidad médica en la práctica y son generalmente, criterios de exclusión de los estudios clínicos controlados, de alto rigor estadístico, pero con esas limitaciones en su validez externa, por no ser representativos de la población real.

Aunque los ensayos controlados son el prototipo de la investigación clínica para evidenciar la seguridad y la eficacia de un fármaco, los estudios clínicos pos-aprobación (EPA), de no intervención, complementan y amplían la información sobre el

dioterapia, quimio-radioterapia o monoterapia (Tabla 1).

Se realizó un análisis de los datos demográficos según edad y sexo y de las características de la enfermedad como KPS, subtipo histológico y tratamiento recibido.

Se compararon los tiempos de supervivencia de los estudios agrupados en ensayos pre-registro y estudios pos-aprobación, según subtipo histológico GBM y AA; seleccionando aquellos pacientes expuestos al tratamiento de nimotuzumab en combinación con radioterapia o quimio- radioterapia. Se estimó como

**Table 1.** Estudios clínicos de evaluación de nimotuzumab en pacientes adultos con glioma de alto grado de malignidad de nuevo diagnóstico

Código del estudio	Pacientes N: 262	Tratamiento recibido
<b>Estudios pre- registro (n:61)</b>		
EC053 <sup>8</sup>	29	Nimo + RTP
IICRD EC0069* <sup>9</sup>	32	
<b>Estudios pos aprobación (n:201)</b>		
Estudio clínico observacional <sup>11</sup>	70	Nimo + RTP Nimo + QRT
IICRD EC114 <sup>12</sup>	131	Nimo (monoterapia)

**Leyenda:** \*Solo pacientes tratados con nimotuzumab; Nimo + QRT: Nimotuzumab+ quimio-radioterapia; Nimo+ RTP: Nimotuzumab+ radioterapia.

perfil de seguridad y la eficacia en la práctica habitual del nuevo fármaco, además contribuyen a la mejor comprensión de su beneficio clínico.<sup>2</sup>

En el caso de las terapias dirigidas a blancos tumorales han tenido un ritmo acelerado de aprobación sanitaria en los últimos 30 años; lo cual ha promovido su rápida introducción en la práctica médica. Dentro de los más representativos, se encuentran: Trastuzumab para cáncer mamario que sobre expresa el oncogén cERB-2 positivo, Rituximab para Linfoma no Hodgkin con expresión de linfocitos CD 20 positivo, Cetuximab par cáncer colo-rectal con expresión de KRAS genotipo salvaje, Imatinib para la leucemia mieloide crónica con alteraciones del gen BCR-ABL y para adenocarcinoma de pulmón con mutaciones de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, siglas en inglés) el erlotinib y gefitinib.<sup>3</sup>

Nimotuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce el receptor del EGFR, con una afinidad intermedia (10-9M)<sup>4</sup>, capaz de bloquear al EGFR en su dominio extracelular e inhibir la proliferación celular tumoral; además promueve la apoptosis, limita la neo-angiogénesis tumoral<sup>5</sup> y tiene acción radiosensibilizante.<sup>6</sup>

Actualmente nimotuzumab está aprobado para el tratamiento de tumores avanzados escamosos de cabeza y cuello, adenocarcinoma de esófago y páncreas y tumores gliales malignos en adultos y niños.<sup>7</sup>

Particularmente en la indicación de glioma maligno en adulto existen resultados de estudios controlados pre-registro<sup>8-10</sup> y estudios pos-registro<sup>11,12</sup> que demuestran un perfil de seguridad y resultados de eficacia en términos de supervivencia comparables. No obstante, se desconoce en qué magnitud son reproducibles los resultados de los estudios conjuntos en condiciones controladas en relación con los de la práctica médica.

El presente trabajo analiza el perfil de seguridad y eficacia en términos supervivencia entre los estudios pre-registro y pos-aprobación.

## Materiales y Métodos

Se concibió una base de datos integrada de pacientes adultos con glioma de alto grado de malignidad de nuevo diagnóstico, que participaron de cuatro estudios clínicos terminados (2 estudios pre- registro y 2 estudios pos- autorización). Todos ellos expuestos a nimotuzumab en esquemas de combinación con ra-

dioterapia desde la fecha de inclusión en el estudio hasta la fecha de muerte o de últimas noticias.

Para evaluar la seguridad se seleccionaron todos los pacientes que al menos recibieron una dosis de nimotuzumab. Se analizaron las proporciones de eventos reportados según clasificación de la CTCAE versión 3<sup>13</sup> y se compararon las frecuencias de esos eventos adversos según intensidad, gravedad y relación causal con nimotuzumab entre los estudios pre registro y EPA.

Se aplicaron estadísticas descriptivas de proporción en porcentajes y rangos con un índice de confianza del 95 %, prueba Chi-cuadrado de Pearson y la prueba exacta de Fisher. Para el análisis de supervivencia se usaron las curvas de Kaplan Meier y test de Log Rank, procesados en el paquete estadístico SPSS, versión 19.0 para Windows.<sup>14</sup>

## Resultados y Discusión

El presente trabajo comprueba la validez externa entre los estudios clínicos pre y pos-aprobación según las características demográficas y clínicas (Tabla 2). Existe correspondencia entre las variables demográficas edad y sexo, lo que es coherente con el comportamiento epidemiológico de esta enfermedad, más frecuente en mayores de 50 años y en hombres que en mujeres.<sup>1</sup>

En cuanto a la capacidad funcional existe un comportamiento semejante entre los estudios pre y pos aprobación, sin embargo, en los EPA existe un mayor rango de esta condición, dado por la flexibilidad de los criterios de inclusión, menos estrictos que los estudios controlados, pero más parecidos a la población real. Además, pudieran estar asociados a morbilidades propias de la enfermedad de base, de la cirugía previa incluso a enfermedades cardiovasculares y metabólicas.<sup>2,11,12</sup>

En referencia a la histología la población de pacientes con Glioblastoma multiforme en los EPA fue mayoritariamente significativa en contraste con la de los estudios pre registro de igual diagnóstico. Esto es de esperar dado que en una población real el GBM es más frecuente que el AA.<sup>1</sup>



**Table 2.** Características demográficas y clínicas entre los estudios pre-registro y pos-registro

Variables		Estudios pre-registro (n=61/100%)	Estudios pos-aprobación (n=201/100%)	Total (N=262/100%)	P
Edad (años)	Mayores o Igual 50	25 (41.0)	107 (53.2)	132 (50.4)	0.10
	Menor de 50	36 (59.0)	94 (46.8)	130 (49.6)	
	Rango	20-76	17-82	17-82	
Sexo	Masculino	34 (55.7)	117 (58.2)	151 (57.6)	0.76
	Femenino	27 (44.3)	84 (41.8)	111 (42.4)	
KPS (%)	Mayor o Igual 70%	58 (95.1)	189 (94.0)	247 (94.3)	1.00
	Menor 70%	3 (4.9)	12 (6.0)	15 (5.7)	
	Rango	60-100	40-100	40-100	
Tipo histológico	GBM	30 (49.2)	141 (70.1)	171 (65.3)	0.001
	AA	30 (49.2)	48 (23.9)	78 (29.8)	
	OAA	1 (1.6)	12 (6.0)	13 (5.0)	
Tratamiento	Nimo + RTP	61 (100)	163 (81.1)	224 (85.5)	0.001
	Nimo+ RTP+QTP	0 (0)	9 (4.5)	9 (3.4)	
	Monoterapia	0 (0)	29 (14.4)	29 (11.1)	

QRT: Nimotuzumab+ Quimio-radioterapia; Nimo+ RTP: Nimotuzumab+ Radioterapia. OAA: Oligoastrocitoma anaplásico.

Por otro lado, en relación con los tratamientos recibidos, la mayoría de los pacientes se expusieron a la combinación del nimotuzumab y radioterapia; sin embargo, en la práctica (EPA) aunque en una frecuencia menor, se identificaron otras modalidades terapéuticas como la combinación con quimio-radioterapia y como simple terapia.

Ciertamente la quimioradioterapia basada en temozolamida es el estándar internacional para los gliomas malignos de alto grado,<sup>15</sup> pero no es la generalidad en nuestro medio por restricciones internacionales para acceder a la temozolamida.<sup>11, 12</sup> La combinación de nimotuzumab y quimio-radioterapia se ha evaluado en estudios controlados, pero no tenemos estudios pos autorización para compararlos,<sup>10</sup> pero no tenemos estudios pos autorización para compararlos en nuestro medio. Los pacientes que recibieron nimotuzumab como simple terapia, suceden como consecuencia de asuntos organizativos de la práctica habitual, tales como distanciamiento del local de la radioterapia y del desti-

nado para recibir nimotuzumab, el tiempo de espera para recibir radioterapia, entre otras.<sup>11, 12</sup> Toda vez identificada esta desviación se propusieron estrategias administrativas para minimizarla.

### Análisis de la supervivencia

La mediana de supervivencia global para los pacientes expuestos a nimotuzumab y radioterapia con diagnóstico de GBM fue de 12.3 meses, mientras que para los diagnosticados con AA fue de 37 meses. No se observaron diferencias significativas entre los estudios pre y pos registro en ninguno de los grupos histológicos, a pesar de que las medianas en los EPA fueron inferiores entre 2 y 22 meses para GBM y AA respectivamente (Tabla 3).

Si bien para GBM esta diferencia en la supervivencia fue pequeña, el resultado para AA es paradójico. Probablemente esta discrepancia se explique porque aun siendo el grado histológico el de mayor relevancia pronóstica, otros factores de naturaleza

**Table 3.** Análisis de la Supervivencia entre estudios pre-registro y pos-registro

Histología	Estudios pre-registro	Estudios pos-aprobación	Global	p (Log-Rank)
GBM	30	122	152	0.19
Vivos/Fallecidos	7/23	32/90	39/113	
Mediana de SV (meses)	14.2 (8.0-20.5)	11.9 (9.5-14.2)	12.3 (10.6-14.1)	
AA	30	43	73	0.20
Vivos/Fallecidos	12/18	20/23	32/41	
Mediana de SV (meses)	43.9 *	21.4*	37.0 (14.5-59.5)	

Leyenda: AA: Astrocitoma Anaplásico; GBM Glioblastoma multiforme; SV supervivencia.  
 \* No se estima el IC 95%.

Figura1: Supervivencia en pacientes con Glioblastoma multiforme tratados con nimotuzumab en estudios pre y pos aprobación

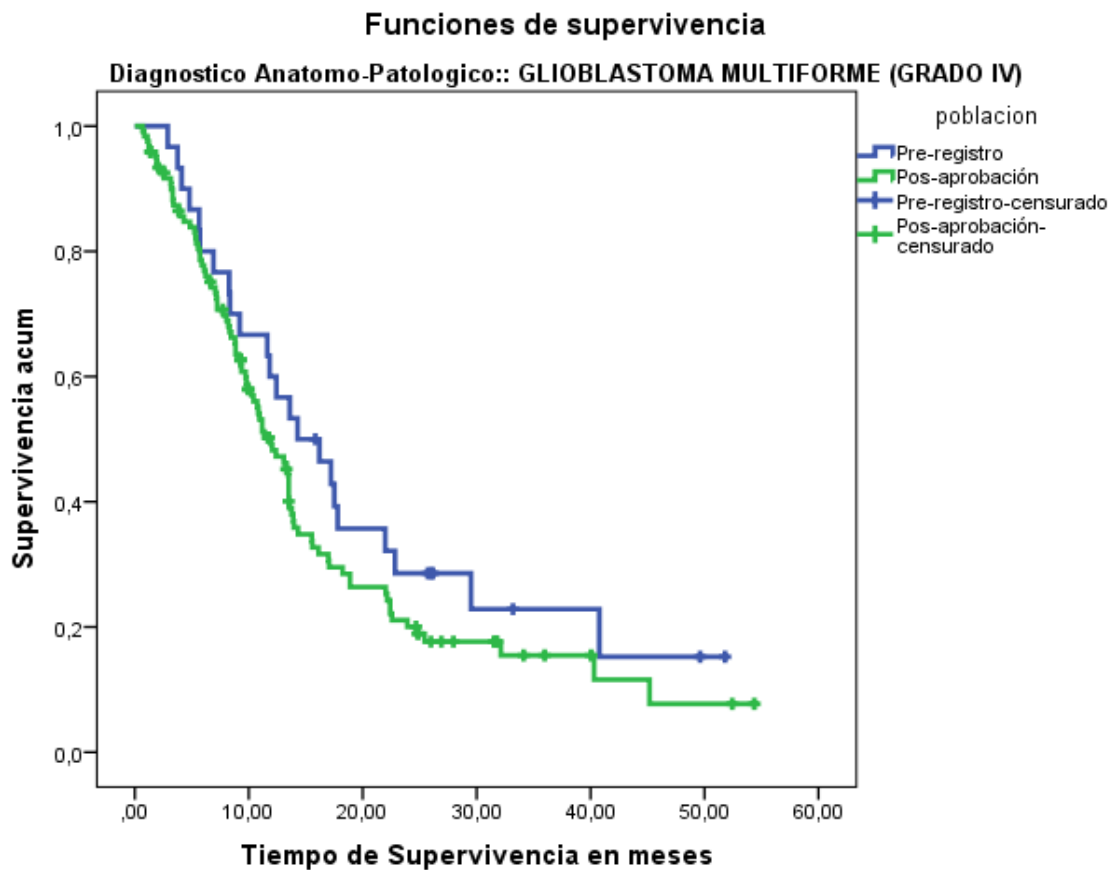
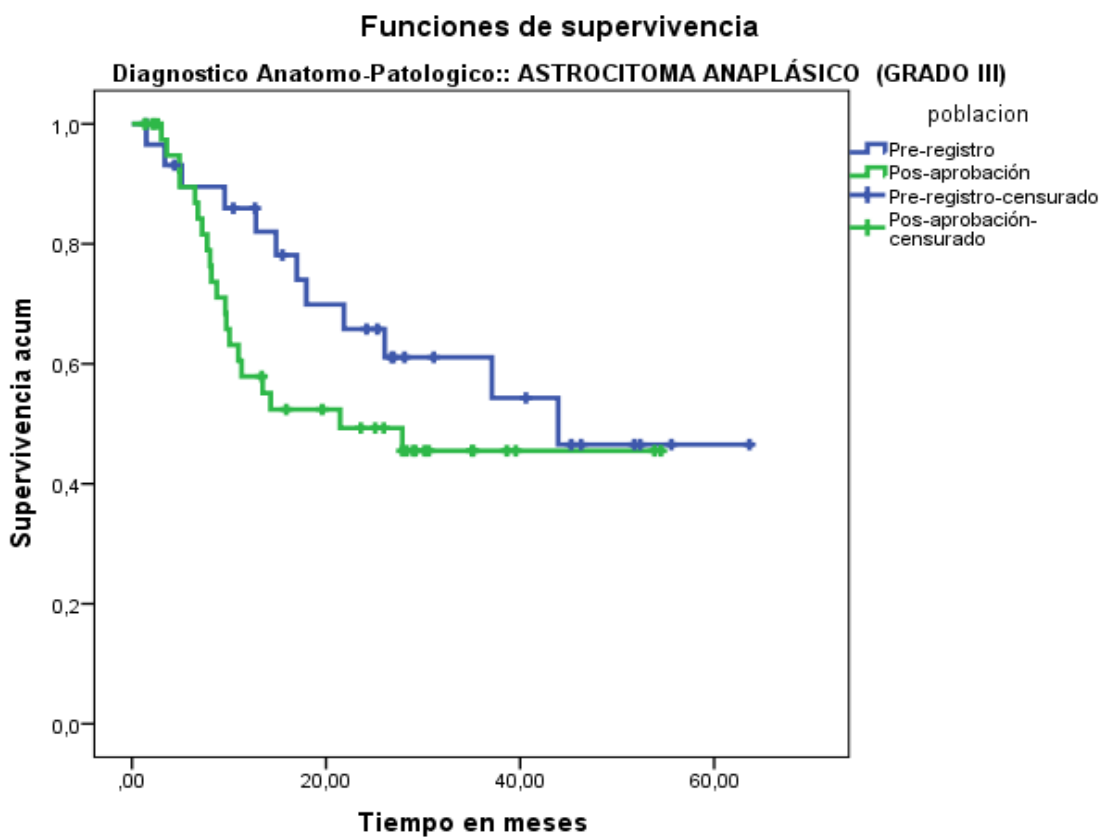


Figura 2: Supervivencia en pacientes con Astrocitoma anaplásico tratados con nimotuzumab en estudios pre y pos aprobación





genética tumoral, propias del paciente como la edad, el KPS, morbilidades asociadas y del tratamiento recibido como la resección tumoral, la radioterapia, la quimioterapia y sobre el cumplimiento del tratamiento planificado influyen también en la supervivencia.<sup>1,2</sup> Esos factores no se analizaron en este trabajo y constituyen una limitante del mismo.

### Análisis de seguridad

Nimotuzumab fue seguro y bien tolerado en ambas poblaciones estudiadas (Tabla 4). De la misma manera los eventos relacionados se mantuvieron en una baja frecuencia a pesar de que en los EPA más de la mitad de los pacientes presentó algún evento adverso. En cuanto a la intensidad de los eventos adversos predominaron los ligeros, pero este hallazgo no influyó en la relación causal con nimotuzumab en los diferentes tipos de estudios. Es de señalar que solo en los EPA se identificaron eventos graves relacionados, pero una vez más, en mínima proporción, todos recuperados.<sup>12</sup>

Estos hallazgos son coherentes con lo que puede esperarse

el perfil de seguridad del nimotuzumab, en contraste con otros monoclonales dirigidos al mismo blanco tumoral del EGFR16 y por consiguiente, una ventaja para el manejo de un fármaco, que garantiza una mejor adherencia al tratamiento.

Estudios publicados previamente revelan que esta diferencia se debe a que nimotuzumab posee una afinidad intermedia, más sensible a unirse a aquellas células de mayor densidad de EGFR, como las células tumorales, que en las células con expresión de EGFR normal como se caracterizan los tejidos epiteliales no tumorales.<sup>17</sup>

### Conclusiones

La combinación de radioterapia y nimotuzumab confirma su eficacia clínica en términos de supervivencia para pacientes con tumores gliales de alto grado de malignidad, tanto en los estudios pre-registro como en condiciones reales. El perfil de seguridad de nimotuzumab es consistente para ambas poblaciones estudiadas.

Nimotuzumab puede ser recomendado como parte del tratamiento multimodal en gliomas de alto grado de malignidad.

Para optimizar su beneficio clínico será necesario profundi-

**Table 4.** Eventos adversos en pacientes expuestos a nimotuzumab.

Variables	Estudios pre-registro (n=61)	Estudios pos-aprobación (n=201)	Total (N=262)	p
Ptes con EA	35 (35%)	124 (61.7%)	159 (60.7%)	0.0984
No. de EA	412	800	1212	0.0500
Relacionados con nimotuzumab <sup>a</sup>	55 (13.3)	93 (11.6)	148 (12.2)	
<b>Intensidad del EA <sup>b</sup></b>				
Ligero	265 (64.3)	398 (49.8)	663 (54.7)	0.0000
Moderado	110 (26.7)	267 (33.4)	377 (31.1)	
Severo	28 (6.8)	93 (11.6)	121 (9.9)	
Muy severo	9 (2.2)	42 (5.2)	51(4.2)	
No. de EAG (%) <sup>c</sup>	28 (6.7)	51 (6.4)	79 (6.5)	0.1663
EAG relacionados <sup>d</sup>	0 (0%)	4 (7.8%)	4 (5.0%)	

Leyenda: <sup>a</sup> Porcentaje de eventos adversos relacionados sobre todos los eventos adversos; <sup>b</sup> Porcentaje de eventos adversos según intensidad sobre todos los eventos adversos; <sup>c</sup> Porcentaje de eventos adversos graves sobre todos los eventos adversos; <sup>d</sup> Porcentaje de eventos adversos graves relacionados sobre todos los eventos adversos graves.

en una mayor cantidad de pacientes expuestos a un fármaco y en condiciones de la práctica médica como sucede en los EPA.<sup>2</sup> Interesantemente los eventos adversos relacionados y graves relacionados en la población real (EPA) fueron eventos previamente descritos para el fármaco en estudios bajo condiciones controladas.<sup>7-9</sup> La cefalea, la fiebre y las alteraciones de las enzimas hepáticas fueron los eventos más comunes tanto en los estudios pre-registro <sup>8,9</sup> como en los EPA.<sup>11,12</sup>

En cuanto a la aparición de eventos dermatológicos del tipo rash o eritema cutáneo solo se notificaron en los estudios EPA, pero en escasa frecuencia<sup>11,12</sup>; lo que persiste como distintivo en

zar en la caracterización del paciente más allá de su clasificación histológica, que incluye el análisis y la validación de marcadores biológicos predictores de respuesta a esta terapia dirigida.

### Referencias bibliográficas

- Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. The epidemiology of glioma in adults: A "state of the science" review. *Neuro Oncol.* 2014;16:896-913
- Suvarna V. Phase iv of drug development. *Perspectives in clinical*

Códigos de referencia de los ensayos clínicos analizados en este manuscrito. Registro Público Cubano de Ensayos Clínicos (RPCEC). De los 4 estudios, 2 están publicados en el RPCEC, que cuenta como registro primario de la Organización Mundial de la Salud.

Estudio Clínico	Código del registro público	Referencia
II CRD - C053	No tiene código	
IIC RD - C069	RPCEC00000012	<a href="http://registroclinico.sld.cu/ensayos/RPCEC00000012-Sp">http://registroclinico.sld.cu/ensayos/RPCEC00000012-Sp</a>
Estudio clínico observacional	No tiene código	
IICRD EC114	RPCEC00000087	<a href="http://registroclinico.sld.cu/ensayos/RPCEC00000087-Sp">http://registroclinico.sld.cu/ensayos/RPCEC00000087-Sp</a>

RPCEC00000012. <http://registroclinico.sld.cu/ensayos/RPCEC00000012-Sp>

RPCEC00000087. <http://registroclinico.sld.cu/ensayos/RPCEC00000087-Sp>

- research. 2010;1:57-60
- Gerber DE. Targeted therapies: A new generation of cancer treatments. *Am Fam Physician*. 2008;77:311-319
  - Díaz Miqueli A, Blanco R, García B, Badía T, Batista AE, Alonso R, et al. Biological activity in vitro of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies with different affinities. *Hybridoma (Larchmt)*. 2007;26:423-431
  - Crombet-Ramos T, Rak J, Pérez R, Vilorio-Petit A. Antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic activity of h-r3: A humanized anti-egfr antibody. *Int J Cancer*. 2002;101:567-575
  - Díaz-Miqueli A, Martínez GS. Nimotuzumab as a radiosensitizing agent in the treatment of high grade glioma: Challenges and opportunities. *Onco Targets Ther*. 2013;6:931-942
  - Centro para el Control Estatal de Medicamentos EyDMC. Resumen de las características del producto 2015:6
  - Ramos TC, Figueredo J, Catalá M, González S, Selva JC, Cruz TM, et al. Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (egfr) antibody h-r3: Report from a phase i/ii trial. *Cancer Biol Ther*. 2006;5:375-379
  - Solomon MT, Selva JC, Figueredo J, Vaquer J, Toledo C, Quintanal N, et al. Radiotherapy plus nimotuzumab or placebo in the treatment of high grade glioma patients: Results from a randomized, double blind trial. *BMC Cancer*. 2013;13:299
  - Westphal M, Heese O, Steinbach JP, Schnell O, Schackert G, Mehdorn M, et al. A randomised, open label phase iii trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *Eur J Cancer*. 2015;51:522-532
  - Martínez GS, Camaño SNS, Sierra PP, Iglesias B, Castillo CTJ, Cardona MTS, et al. Seguridad y efectividad del nimotuzumab en los pacientes con tumores gliales malignos. *Revista Cubana de Neurología y Neurocirugía*. 2015;5:123-132
  - Saurez G, Salva S, Uranga R, Piedra P, Anoceto JA, Iglesias B, et al. Safety and effectiveness of nimotuzumab in high grade glioma patients. Phase iv study results *International Journal Of Current Medical And Pharmaceutical Research*. 2016;2:657-664
  - Trotti A, Colevas AD, Setser A, Rusch V, Jaques D, Budach V, et al. Ctae v3.0: Development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol*. 2003;13:176-181
  - Arbuckle JL. *Ibm spss amos 19 user's guide*. Crawfordville, FL: Amos Development Corporation. 2010;635
  - Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn JC, Pentheroudakis G. High-grade glioma: Esmo clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25 Suppl 3:iii93-101
  - Ocvirk J, Heeger S, McCloud P, Hofheinz RD. A review of the treatment options for skin rash induced by egfr-targeted therapies: Evidence from randomized clinical trials and a meta-analysis. *Radiol Oncol*. 2013;47:166-175
  - Pérez R, Moreno E, Garrido G, Crombet T. Egfr-targeting as a biological therapy: Understanding nimotuzumab's clinical effects. *Cancers Journal* 2011; 3:2014-2031

**Recibido:** 28 septiembre 2016 de 2016.

**Aprobado:** 20 de noviembre de 2016.



INVESTIGACIÓN / RESEARCH

## Efficacy of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (French oregano) tablets in patients with common cold: a randomized, double-blind, placebo-controlled study

Eficacia de las tabletas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Orégano francés) en pacientes con catarro común: estudio aleatorizado, a doble ciego, controlado con placebo

Yolanda A Rodríguez-Cámara<sup>1</sup>, Daise Jiménez-Rodríguez<sup>2</sup>, Jorge E Rodríguez-Chanfrau<sup>2</sup>, Midalis Gracial-Serrano<sup>1</sup>, Tatiana Festary-Casanovas<sup>2</sup>, Mabel C Luaces-Argüelles<sup>1</sup>, Joaquina Gómez-Peire<sup>1</sup>, Ángela D Tuero-Iglesias<sup>3</sup>, Idrian García-García<sup>2</sup>

DOI. 10.21931/RB/2016.01.04.4

### ABSTRACT

Medicinal plants with healing properties could be used to improve medical attendance. Common cold is a very high frequent disease but their treatment is not always available and adequate. Particularly, French oregano had demonstrated expectorant and antitussive properties at non-clinical level. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial was carried out to evaluate if French oregano tablets could quickly suppress common cold symptoms in patients with upper respiratory tract infections, being superior to symptomatic treatment. Patients received placebo or oregano (300 or 600 mg), daily, during 15 days, combined to abundant liquid and antipyretics on the presence of fever or malaise. Each group was formed by 30 patients. The frequency and intensity of cough and the amount of expectoration were assessed weekly. After first week of treatment, cough frequency was significantly lower in those patients treated with 600 mg comparing other groups ( $p = 0.003$ ). Cough disappeared in 20 patients from the highest dose group. At that time, this group had best results concerning reduction in cough intensity ( $p = 0.046$ ) and increase in the amount of expectoration ( $p = 0.041$ ). None patient treated with 600 mg had severe cough after seventh day when a profuse expectoration arose. Therefore, the highest percentage of patients with successful overall response was recorded in this group. Adverse events were mild and mostly attributed to typical disease reactions. French oregano tablets produced a rapid, dependent-dose outcome in patients with common cold, superior to conventional treatment, being also well-tolerated. Cuban Public Registry of Clinical Trials RPCEC00000124.

**Keywords:** Common cold, upper respiratory tract infections, cough, expectoration, French oregano tablets, placebo.

### RESUMEN

Las plantas medicinales con propiedades curativas pueden ser útiles en la asistencia médica. El catarro común es una enfermedad muy frecuente, pero su tratamiento no siempre está disponible ni es adecuado. Particularmente, el Orégano francés ha demostrado propiedades expectorantes y antitusivas a nivel no clínico. Se llevó a cabo un ensayo clínico aleatorizado, a doble ciego, controlado con placebo para evaluar si la administración de tabletas de Orégano francés tiene un efecto superior al tratamiento sintomático por la reducción rápida de síntomas del catarro común en pacientes con infecciones del tracto respiratorio superior. Los pacientes recibieron placebo u orégano (300 o 600 mg), diariamente, durante 15 días, combinado a líquidos abundantes y antipiréticos ante la presencia de fiebre o malestar general. Cada grupo estuvo formado por 30 pacientes. La frecuencia y la intensidad de la tos y la cantidad de expectoración se evaluaron semanalmente. Después de la primera semana de tratamiento, la frecuencia de la tos fue significativamente menor en los pacientes tratados con 600 mg en comparación con los otros grupos ( $p = 0,003$ ). La tos desapareció en 20 pacientes del grupo de dosis mayor. Al mismo tiempo, este grupo tuvo los mejores resultados en cuanto a reducción de la intensidad de la tos ( $p = 0,046$ ) y aumento de la cantidad de expectoración ( $p = 0,041$ ). Ningún paciente tratado con 600 mg presentó tos severa después del séptimo día, momento que sobrevino una expectoración profusa. Por esto, el mayor porcentaje de pacientes con respuesta general satisfactoria se registró en este grupo. Los eventos adversos fueron leves y en su mayoría atribuidos a las reacciones típicas de la enfermedad. Las tabletas de Orégano francés produjeron una respuesta rápida, dependiente de la dosis, en pacientes con catarro común, superior al tratamiento convencional, siendo además bien toleradas. Registro Público Cubano de Ensayos Clínicos RPCEC00000124.

**Palabras clave:** Catarro común, infecciones del tracto respiratorio superior, tos, expectoración, tabletas de Orégano francés, placebo.

<sup>1</sup> Natural and Traditional Medicine Service, Clinical-Surgical Hospital "Dr. Luis Díaz Soto", Havana, Cuba

<sup>2</sup> Clinical Trials Group, Research Direction, Center for Drug Research and Development, Havana, Cuba

<sup>3</sup> Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba

**Correspondence:** Idrian García-García. Center for Drug Research and Development (CIDEM), Ave. 26 and Puentes Grandes, #1605, Nuevo Vedado, Havana, Cuba, Telephone: (53)-7-8811844 ext 144, Fax: (53)-7-8335556. E-mail: idrian.garcia@cidem.cu

## Introduction

Common cold accounts for half of all acute diseases.<sup>1</sup> Their incidence has significant geographical and seasonal variations. In winter 6-8 cases per 1000 people per day appear, whereas in summer the daily incidence is reduced until 2-3 cases per 1000. As average every people present 2-5 colds per year, increased to 6-8 in young children.<sup>2</sup>

Common cold is a syndrome described as an acute and mild inflammation of the mucous membranes of the upper respiratory tract (especially nose and sinuses). It is characterized by sneezing, runny nose and nasal congestion. Its evolution is about two weeks and rarely is complicated by severe infections, although at present cases up to 30 days of evolution is reported. A red and dripping nose is often characteristic of common cold, but sometimes a mucous nasal discharge, along a protein transudate, could appear conferring the nasal mucosa a crystalline appearance. The yellowish and greenish staining of secretions are due the increased presence of neutrophils, but these are not indicative of bacterial superinfection, since that color should not be a reason to start antibiotic therapy. Another significant respiratory symptom is

## Methods

An exploratory, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study was carried out at the "Dr. Luis Díaz Soto" Hospital, Natural and Traditional Medicine Service, Havana, Cuba. The protocol was approved by the Ethics Committee of this institution and by the Cuban Regulatory Authority, the State Center for the Control of Drugs, Equipment & Medical Devices (CECMED, reference number: 1486/05.032.09.N). The trial was in compliance with the Helsinki Declaration and its amendments. All patients prior to study enrollment provided their voluntary written informed consent.

## Patients

The study population was constituted by Cuban patients, both sexes, more than 18 years-old, that attend to the clinical site suffering upper respiratory tract infections. The presence of less than 14 days of evolution cough was mandatory accompanied or not of a non-fetid mucous expectoration. Initially, cough can be dry and mild but after 3 or 4 days the patient can expectorate white sputum that can change later to white-yellow or lightly



Fig. 1. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (French oregano)

cough, initially dry and angry and then may become wet with expectoration. General manifestations also include malaise, anorexia, fever, chills, headache, sore and dry throat, muscle and eye affectations and rhinitis.<sup>2</sup>

Although a number of medications have been shown to have some effect, either on the number or on the severity of common colds, no single agent is considerably effective.<sup>3,4</sup> The development of natural alternative medical products to improve patient care is well-known. These medicines are widespread used because of its low cost, easy obtain and low rate of adverse reactions. The use of medicinal plants to relieve symptoms of the common cold in acute respiratory diseases is a practice since ancient times. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (French oregano) has a recognized ethno-medical use to treat common cold.<sup>5</sup> The Center for Drug Research and Development (CIDEM, in Spanish), Havana, developed a solid dosage form from the dry extract of French oregano. This natural product exhibited excellent pharmacological and toxicological results in experimentation animals.<sup>6-8</sup> The present placebo-controlled clinical trial had the aim to evaluate if therapeutic effects of French oregano tablets are similar or better than those from symptomatic treatment in patients with common cold.

green, together with a cough enhancement. The diagnosis could also include symptoms such as: nasal congestion, painful or reddened throat, fever and respiratory rate < 20/min. Exclusion criteria were: pregnancy or nursing, history or presence at entry of chronic respiratory diseases, lung cancer, antecedents of regular ingestion of steroids and antipsychotics, ingestion of antibiotics or bronchodilators one month before symptoms, cough induced by angiotensin-converting enzyme inhibitors or strange bodies, purulent, serous or bloody sputum, presence of wet stertors at physical examination of the respiratory tract, leukocytes count outside normal range, uncompensated chronic diseases at entry, psychiatric dysfunction and positive HIV test. Patients could withdraw the trial voluntarily, due to disease worsening, occurrence of severe adverse reactions, allergic reaction to studied drug, by appearance of any exclusion criteria or by medical team decision if appropriate.

## Treatment

French oregano tablets of pharmaceutical quality were produced using a technology developed by CIDEM, Havana. The stabilized formulation contains 100 mg of a dry extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng leaves. Each tablet also



contains as inactive ingredients lactose, cornstarch, polyvinylpyrrolidone K-25, talc for tablets, magnesium stearate and class C 96% ethylic alcohol.

Three groups of treatment were created using a computer-generated random number list. One group received French oregano (orally) at a daily dose of 300 mg, divided into three administrations of 100 mg each, during 15 days. The second group received a daily dose of 600 mg, divided into three administrations of 200 mg each. The third group received placebo with the same schedule of treatment. French oregano doses were chosen based on the whole pharmacological data (see Discussion section) also considering that there were no previous findings in humans. All the treatments were administered under outpatient conditions.

To keep masking for the three groups, the same number of tablets was administered. Therefore, for each 100-mg administration one tablet of French oregano and one placebo tablet were used; to give 200 mg two 100 mg tablets were used and for placebo group two placebo tablets were given to these patients. French oregano and placebo tablets looked similar with the same composition regarding excipients.

Random lists were kept at the sponsor's product-preparation department, where flasks containing tablets were labeled. This group was independent from the monitors, investigators or other trial participants. All clinical and laboratory evaluations were done blindly regarding the patient's group allocation. The code was opened only in case of serious adverse events, deaths or at the end of the study, after database closure.

All the patients received the symptomatic treatment established for such cases. This treatment comprised abundant liquid and dipyrone or acetaminophen on the presence of fever or malaise. Other interventions could be only indicated for the management of adverse events, after medical consent. None of them could affect the results because interactions neither direct effects on the tested variables.

## Evaluation

The presence of typical symptoms of common cold, cough and expectoration, was the main clinical outcome in this trial. For cough, frequency and intensity were evaluated, while amount of expectoration was also compared between groups. Measurement of symptoms and physical examination (including vital signs) in the patients were carried out at entry, seven days and at the end of treatment (15 days).

The methods used to assess cough and expectoration were designed by experts in the field (Internal Medicine, Pneumology) being approved by the ethics committee and scientific council of the clinical site. An adaptation of the Modified Borg Scale was applied.<sup>9</sup> Its use is similar to the visual analogue scale, but helping the patient through some key phrases at certain points of the scales. These are categorical scales where each phrase that describes cough and expectoration is assigned by a score. Patients are requested to assign a number from 0 (no cough, no expectoration) to the maximum number of events, according to the phrase that best describes the current state thereof.

To evaluate cough frequency within 24 hours was employed the following score: (0): no cough; (1): 1-4 times; (2): 5-10 times; (3): 11-15 times; (4): > 15 times. Cough intensity during the same period was considered as (mild): < 5 coughing, with expectoration; (moderate): 5-10 coughing, with nausea, vomiting, headache, chest pain and tachycardia and (severe): > 10 coughing that could or not prevent patient's vital activities such as eating and sleeping. On the other hand, amount of expectoration was classified as null expectoration (no events / 24h), mild expectoration (1-5 times / 24h) and profuse expectoration (> 5 times / 24h).

Additionally, treatments were classified as successful, proper or unsatisfactory at the 7th and 15th days of treatment. Patients with successful response were those with a 90% both cough re-

duction and expectoration increase. A proper response occurred when cough decrease and expectoration increase were between 70 and 90%. Patients that no changed their clinical condition, presented signs of acute respiratory infection or increased disease symptoms had unsatisfactory response.

Safety and tolerability were monitored during the study through registration of adverse events. Events were severe if produce patient's death, threatens patient's life, requires or prolongs hospitalization or produce a significant or persistent disability. The medical terminology for adverse events and their intensity classification (in 5 grades) was applied according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events.<sup>10</sup> The causal relationship was classified as remote (doubtful), possible, probable or very probable (definitive).<sup>11</sup>

Blood samples were taken for routine hematological and biochemical determinations before and after treatment. Hematological counts (hemoglobin, hematocrit, leukocytes) and blood chemistry (glycemia, cholesterol, creatinine, alkaline phosphatase, total bilirubin and triglycerides) were done according to usual clinical laboratory procedures, using advanced automated analyzers (Elimat, Hitachi, Tokyo, Japan; Inlab 158, CPM, Milan, Italy).

## Statistics

Sample size was calculated using the equation  $n = [(Z\alpha + Z\beta) \sigma/\delta]^2$  assuming 0.05 and 0.85 for type I and II errors. The "2N" Program was used for this purpose.<sup>12</sup> A 10% excess was considered to compensate withdrawals. This yielded a value of 90 patients (30 per group) for this trial.

Data were double entered and validated and then imported into SPSS for Windows (version 15.0, IBM Analytics 2006, Armonk, North Castle, NY, USA) for further analysis. Categorical variables were given as absolute values and percentages. Continuous variables were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and minimum and maximum values (range). With these variables, analyses of normality (Shapiro Wilk's test) and homogeneity of variance (Levene's test) were carried out. Groups were compared for the primary endpoints at the beginning and at the 7th and 15th days of treatment using contingency table chi-square test with the aim to establish dependency relationships between evaluated symptoms (frequency and intensity of cough, amount of expectoration) and treatment received. Vital signs and clinical laboratory data were treated using paired analysis. Significance level chosen was 0.05.

## RESULTS

One-hundred patients were recruited from March 2011 to July 2012 to select finally those 90 patients that were randomly distributed to each group (30 per each one). The other ten patients did not fulfill with the selection criteria. All the patients completed the 15 days of treatment.

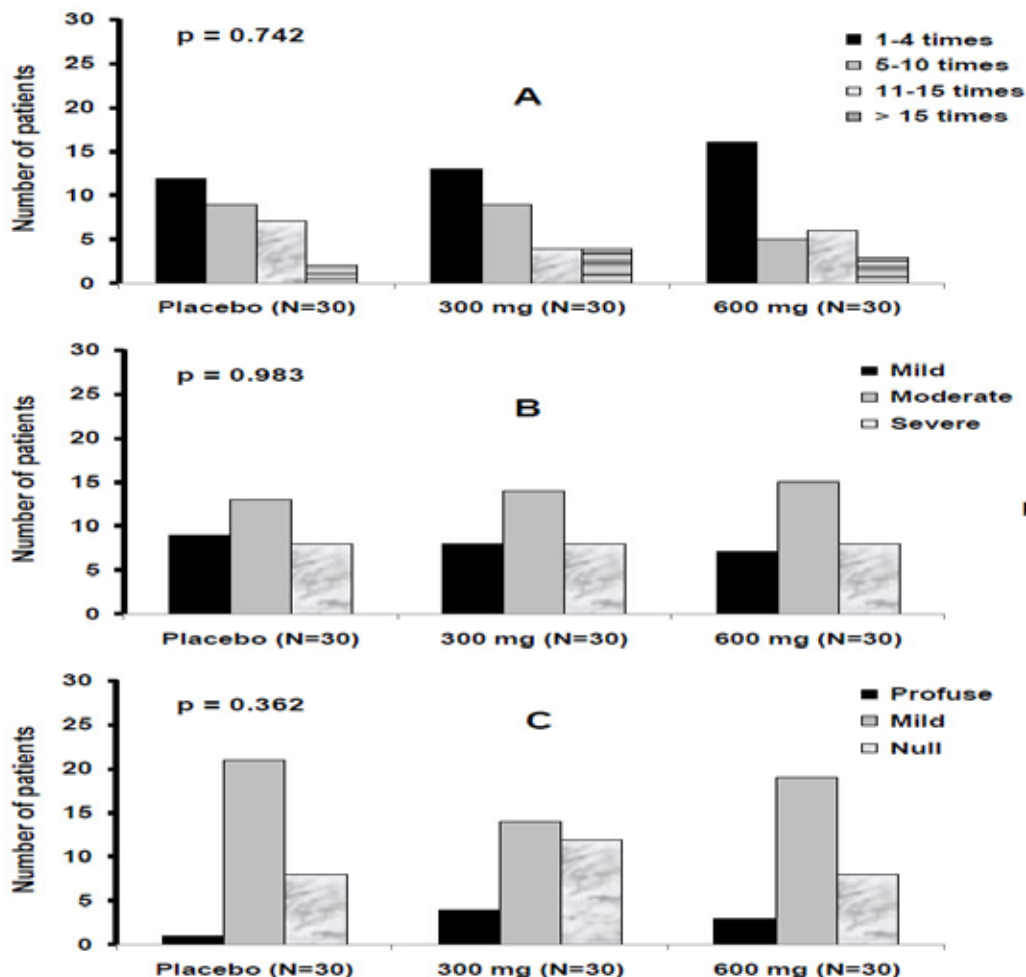
Demographic and baseline characteristics at entry of the included patients are shown in Table 1. Groups were similar regarding each characteristic. Globally, 70% of patients were women with a mean age around 50 years (range: 19-84 yrs). Non-white skin color prevailed (60%). They weighed 40 to 105 Kg and were 148 to 198 cm tall. Patients ranged 2 -10 days suffering cough (mean: 6 days) into each group. History of allergy was something inferior to half of patients whereas risk exposure (mostly dust) was not very frequent. Regarding habit toxics, consumption of coffee was common (>75% of patients) and patients included in French oregano groups were slightly more smokers.

Before treatment groups were also similar regarding cough and expectoration as observed in Figure 1. No differences were detected for the frequency and intensity of cough neither amount of expectoration; therefore, the hypostasis of a dependency be-

**Table 1. Demographic and baseline characteristics of the patients involved in the clinical trial with French oregano (300 or 600 mg/day) and placebo during 15 days.**

Characteristic		Group 1 (300 mg) N=30	Group 2 (600 mg) N=30	Group 3 (placebo) N=30
Skin color	White	10 (33.3%)	15 (50.0%)	11 (36.7%)
	Non-white	20 (66.7%)	15 (50.0%)	19 (63.3%)
Women		15 (50.0%)	24 (80.0%)	24 (80.0%)
Age (years)		50 ± 18 (19 – 75)	52 ± 19 (19 – 84)	52 ± 16 (20 – 84)
Weight (Kg)		64 ± 16 (40 – 96)	72 ± 13 (48 – 97)	68 ± 15 (42 – 105)
Height (cm)		160 ± 8 (148 – 180)	165 ± 9 (148 – 180)	161 ± 12 (148 – 198)
Days with cough		6 ± 2 (2 – 10)	6 ± 2 (2 – 10)	6 ± 2 (2 – 10)
History of allergy		13 (43.3%)	13 (43.3%)	15 (50.0%)
Risk exposure (gases, dust, others)		5 (16.7%)	5 (16.7%)	4 (13.3%)
Toxic habits	Smoke	10 (33.3%)	7 (23.3%)	4 (13.3%)
	Alcohol	8 (26.7%)	8 (26.7%)	6 (20.0%)
	Coffee	25 (83.3%)	22 (73.3%)	23 (76.7%)

Data are reported as number of patients (%) or mean ± standard deviation (range).

**Figure 1****Fig. 1.** Symptomatic characterization before treatment with French oregano (300 or 600 mg/d) or placebo..

Legend: Data correspond to patients with common cold distributed into each category for each group of treatment, according to the adaptation of the Modified Borg Scale. (A): cough frequency; (B): cough intensity; (C): amount of expectoration. The contingency table chi-square test was used to establish dependency between variables and groups ( $p > 0.05$  in all cases). For a better visualization, all the scales were put at the same level.



tween these variables and treatment was no observed. The prevalence of an initial moderate cough and mild expectoration outstand in the three groups. A strong relationship of dependency between studied variables and the treatment received was obtained after seven days of treatment (Fig. 2). Daily administration of 600 mg of French oregano influenced significantly in the evolution of cough and expectoration. No cough was obtained in two thirds of patients from this group which impacted in the intensity since almost all patients were grouped as mild cough. Contrary patients treated with placebo or 300 mg of the same product achieved mostly 1-4 events in 24 hours and no cough was only reported in 6-7 patients. At this time, severe cough was only reported in these two groups.

prior to the other groups, which was only 27% and 20% for 300 mg and placebo groups, respectively (Table 2). In the group that received highest dose, patients with successful and proper response raised to 86.7%, only seven patients (23.3%) did not respond to this treatment. Non-responders (unsatisfactory) in the placebo group were 63.3%, being 50% in the group treated with the lower dose of the studied drug.

After 15 days of treatment only a minimum of patients had cough and expectoration. No influence of toxic habits or any other demographic or baseline characteristic on outcome variables was detected (data not shown).

Only six patients presented adverse events during the treatment (Table 3). Only one patient, from 300 mg group, registered

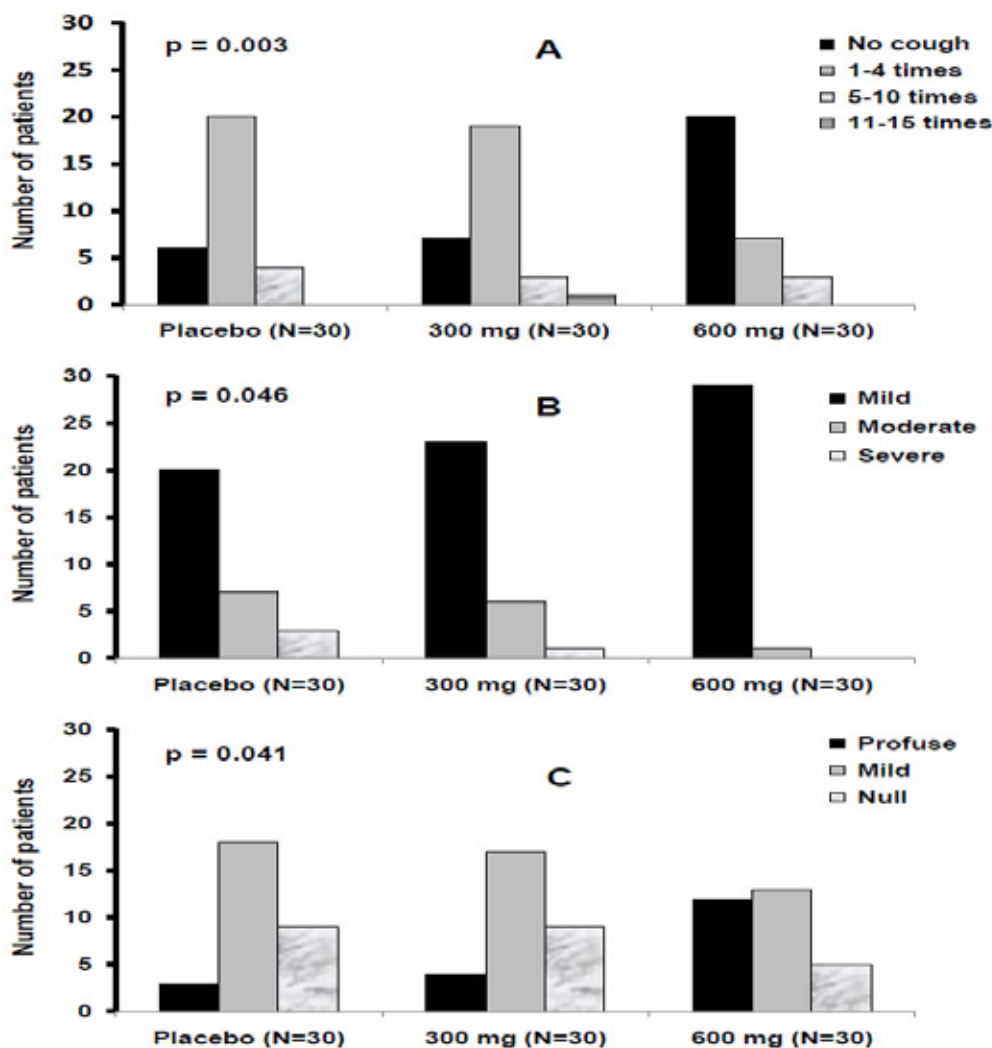


Figure 2

Fig. 2. Symptomatic characterization after seven days of treatment with French oregano (300 or 600 mg/d) or placebo.

Legend: Data correspond to patients with common cold distributed into each category for each group of treatment, according to the adaptation of the Modified Borg Scale. (A): cough frequency; (B): cough intensity; (C): amount of expectoration. The contingency table chi-square test was used to establish dependency between variables and treatments ( $p < 0.05$  in all cases). For a better visualization, all the scales were put at the same level. All the patients received the conventional symptomatic treatment.

At the seventh day expectoration was profuse in 12/30 patients treated with the highest dose, appearing in that form only in three and four patients from placebo and 300 mg groups, respectively. Even nine cases continued with null expectoration in these last groups (Fig. 2). Some patients from 600 mg group passed from initial severe intensity to no cough together with a change from null to profuse expectoration.

Consistent with the above described results, after seven days of treatment the half of patients treated daily with 600 mg of French oregano had overall successful response, markedly supe-

more than one event (pharyngeal itching, sore throat). Most of the events occurred in patients treated with French oregano but these were mostly typical respiratory symptoms classified as remotely caused by treatment.

All the events were classified as non-severe, mild intensity, resolved without therapeutic intervention between 12 and 72 hours after their appearance around eight hours after administration. Significant differences or variations in vital signs or clinical laboratory tests were not detected and mean values kept within normal ranges.

**Table 2. Overall response after seven days of treatment with French oregano (300 or 600 mg/d) or placebo.**

Response	Group 1 (300 mg) N=30	Group 2 (600 mg) N=30	Group 3 (placebo) N=30
Successful	8 (26.7%)	15 (50.0%)	6 (20.0%)
Proper	7 (23.3%)	8 (26.7%)	5 (16.7%)
Unsatisfactory	15 (50.0%)	7 (23.3%)	19 (63.3%)

Data are reported as number of patients (%).

**Table 3. List of adverse events recorded during treatment.**

Patient's code	Group	Adverse event	Severity	Intensity	Causality	Conduct	Result
LFLS-12	600 mg	Epigastric burning	NS	Mild	Remote	None	Resolved
MPP-13	300 mg	Sore throat	NS	Mild	Possible	None	Resolved
YFT-63	Placebo	Dry mouth	NS	Mild	Possible	None	Resolved
LLIN-74	300 mg	Labial mucous itching	NS	Mild	Remote	None	Resolved
MGR-77	300 mg	Pharyngeal itching	NS	Mild	Remote	None	Resolved
MGR-77	300 mg	Sore throat	NS	Mild	Remote	None	Resolved
EGC-79	600 mg	Suffocation	NS	Moderate	Remote	None	Resolved

NS: Non-severe

## DISCUSSION

In this study, French oregano at a daily dose of 600 mg, divided in 200 mg every eight hours, proved to be a rapid, effective and safe treatment in patients with common cold, reducing cough and increasing expectoration after only seven days of treatment. The increment in the amount of expectoration means a higher volume of bronchial secretions and stimulation of the mechanisms of elimination, which helps the improvement of clinical status of the patients. In that sense, patients that no longer had a cough maintained expectoration process. At the same time outcomes with daily 300 mg of the same natural product and placebo were significantly inferior and no different among them. Therefore, tablets of French oregano showed a better therapeutic effect (reversion of the initial symptoms) than symptomatic treatment, considering 600 mg every 24 hours the effective dose.

These results demonstrate that the dry extract obtained from aqueous extracts of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng leaves could act on the respiratory tract by modifying secretion and bronchial motility, reducing in turn cough intensity. The relieve of cough is produced due to the presence of a thick and irritating secretion that in concert with the mucus secreted, naturally demulcent, both protect the inflamed mucosa and reduce cough reflex.<sup>13</sup> So expectorants behave as soothing cough when it is unproductive.

Decoctions from French oregano leaves are used in traditional medicine for the treatment of common cold based in their bronchodilator and expectorant activities.<sup>14</sup> The current findings corroborate those achieved in previous preclinical studies with this extract,<sup>7,15</sup> allowing classifies it within expectorants and antitussive substances.

The administration of aqueous extract and of fluid extract as well as the syrups produced from French oregano extracts resulted in significant increase of red phenol concentration in the tracheobronchial secretion of mice. In turn, the acute administration of 100 mg tablets had the same expectorant effect as bromhexine and salbutamol.<sup>7</sup> The product had antitussive effect in the experimental model of aerosol ammonia in guinea pigs.<sup>15</sup> Toxicogenetic and subchronic studies showed that the plant is not toxic.<sup>6,8</sup>

On the other hand, French oregano tablets led to immediate contraction of the smooth musculature. French oregano showed a manifest antimuscarinic effect after induction with acetylcholine, deducing both agonist and antagonist effect of cholinergic transmission.<sup>16</sup> Moreover, the same authors found that this medication inhibited passive cutaneous anaphylaxis and increased the contractile effect of adrenaline on the vas deferens in rats and showed *in vitro* antihistamine effect on gut H1 receptors.<sup>17</sup>

Clinical trials using French oregano contained in solid dosage forms are not easily found in the literature. In the current



study, adverse events reported were mild, typical of patients with common cold, consequence of a viral infection, usually without fever and manifested by inflammation of the upper respiratory tract, with a viral incubation period lasts between 24 and 72 hours. At this time appear nasal nuisances, including pharyngeal affectations with itching and sore throat.<sup>2</sup>

Considering the problem that this disease does not have a gold standard treatment, a safe and physiologically effective new medication of natural origin could improve patient care, with a consequent improvement in their quality of life.

## Conclusions

French oregano tablets at the better dosing schedule could be a reasonable alternative to other symptomatic treatments in patients with common cold. Further, more extensive, controlled clinical trials are encouraged to confirm the rapid clinical response obtained with this natural product.

## Acknowledgments

The authors wish to thank Terasa Pujol, Maricela Cabezas, Azalia Díaz, Damaris Herrera, Denise Delgado, Lien Laguna, Bárbara Palacio, Carlos Mederos, Yenisel Cárdenas, Madelaine Castro, Isel García, Maria de las Nieves, Nilda Herrera and Ana de Armas for their assistance in the clinical work, and Osiris Blanco, Maylín Díaz, Marilyn López and Beatriz Elizagaray for their participation in the trial supporting. The study was also supported by the national project I13010: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (French oregano) formulations for sanitary registration. The authors received French oregano tablets free from CIDEM,

## Competing interests

Authors DJR, TFC and IGG are employees of the Center for Drug Research and Development (CIDEM), Havana, Cuba, where French oregano formulation is produced. The rest of the authors have no competing interests at all. The Ministry of Public Health of Cuba supported the clinical trial (hospital facilities and general medical care of the patients).

## Authors' contributions

YARC was the main investigator. DJR, JERC and TFC conceived, designed and coordinated the study, data processing and analyzed the results; DJR also participated in the manuscript writing. MGS, MCLA and JPR took care of patient recruitment, management, clinical examinations, and follow-up. ADTI contributed as data processor and statistician. IGG analyzed the results and wrote the manuscript draft. All authors read and approved the final manuscript

## Referencias bibliográficas

1. Muñoz FM, Galasso GJ, Gwaltney JM Jr, Hayden FG, Murphy B, Webster R, et al. Current research on influenza and other respiratory viruses: II International Symposium. *Antiviral Res* 2000; 46(2):91-124.
2. The Common Cold. Section B. Upper Respiratory Tract Infections. Part II Major Clinical Syndromes. In Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th Edition. Philadelphia: Saunders; 2015.
3. Heikkinen T, Järvinen A. The common cold. *Lancet* 2003; 361(9351):51-59. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12162-9.
4. Passiotti M, Maggina P, Megremis S, Papadopoulos NG. The common

- cold: potential for future prevention or cure. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014; 14(2):413. DOI: 10.1007/s11882-013-0413-5.
5. Arumugam G, Swamy MK, Sinniah UR. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. *Molecules* 2016; 21(4):369. DOI: 10.3390/molecules21040369.
6. Vizoso-Parra A, Ramos-Ruiz A, Edreira-Armenteros A, Betancourt-Badell J, Décalo-Michelena M. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (orégano francés). Estudio toxicogenético de un extracto fluido y del aceite esencial. *Rev Cubana Plant Med* 1999; 4(2). URL: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47961999000200005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47961999000200005)
7. Bázaga-Fernández P, Tillán-Capó J, Marrero-Cofiño G, Carrillo-Domínguez C, Bellma-Menéndez A, Montero-Alarcón C. Expecto- rant activity of formulations from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (French oregano). *Rev Cubana Plant Med* 2006; 14(2). URL: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962006000200008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000200008)
8. Tillán-Capó J, Bueno-Pavón V, Menéndez-Castillo R, Carrillo-Domínguez C, Ortiz-Infante M. Subchronic toxicology of the aqueous extract of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Rev Cubana Plant Med* 2008; 3(1). URL: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962008000100004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000100004)
9. Rating of perceived exertion: Borg scales. Source: [www.heartonline.org.au/resources](http://www.heartonline.org.au/resources). Reviewed 11/2014.
10. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), Version 4.0, Published: May 28, 2009 (v4.03: June 14, 2010), DCTD, NCI, NIH, DHHS. URL: [http://ctep.cancer.gov/CIGNA/E\\_Tarallo/M\\_Maruccia/M\\_Sorvillo/V\\_Pollastrini/A\\_Scuderi/N\\_Basal\\_Cell\\_Carcinoma:10\\_Years\\_of\\_Experience](http://ctep.cancer.gov/CIGNA/E_Tarallo/M_Maruccia/M_Sorvillo/V_Pollastrini/A_Scuderi/N_Basal_Cell_Carcinoma:10_Years_of_Experience). *J. Skin Cancer*. 2011 [citado 17 de junio de 2014]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/476362>.
11. Naranjo CA, Shear NH, Busto U. Adverse drug reactions. In: Kalant H, Roschlau WHE, editors. Principles of Medical Pharmacology, 6th ed. New York: Oxford University Press 1998, pp. 791-800.
12. "2N" Program for Design of Clinical Trials, Program for Calculation of Sample Size for a Clinical or Experimental Study, PhD Martín Hauer-Jensen, University of Arkansas for Medical Sciences. Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 3rd ed. Boston: PWS Kent Publishing Company; 1990.
13. Farreras Rozman. Tratado de Medicina interna. Enfermedades respiratorias agudas, 14 ed., Barcelona 2004. pp. 809-834.
14. Acosta L, Rodríguez C. Plantas Medicinales. Base para su producción sostenible. Ed. Agroinf. MINAG. La Habana. 2006. p. 134-135.
15. Núñez Y, Tillán J, Carrillo C, Menéndez R, Pavón V, León R. Evaluación de la actividad antitusiva del *Plectranthus amboinicus* [Lour] Spreng tabletas 100 mg. Informe técnico. CIDEM. La Habana, 2001.
16. Núñez-Figueroa Y, Tillán-Capó JI, Carrillo-Domínguez C, Montero-Alarcón C, Menéndez-Castillo R, Diego León R. Activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng 100 mg tablets on the intestinal smooth musculature. *Rev Cubana Plant Med* 2006; 11(3-4). URL: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962006000300003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000300003)
17. Núñez-Figueroa Y, Tillán-Capó JI, Carrillo-Domínguez C, Menéndez-Castillo R, Diego León R. Effect of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng tablets on the passive cutaneous anaphylaxis, histaminergic and adrenergic transmission. *Rev Cubana Plant Med* 2006; 11(3-4). URL: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol11\\_3-4\\_06/pla05306.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol11_3-4_06/pla05306.htm)

**Recibido:** 20 de octubre de 2016.

**Aprobado:** 3 de diciembre de 2016.

## INVESTIGACIÓN / RESEARCH

# HLA-DRB1\*1101 allele confer protection for Multiple Sclerosis disease in Cuban population

## Alelo HLA –DRB1\*11:01 asociado con la Esclerosis Múltiple en población cubana confiere protección

Fernández-de-Cossío ME, <sup>1</sup>Cintado A, <sup>1</sup>Nazabal M, <sup>1</sup>Hanlet C, <sup>1</sup>Díaz T, <sup>1</sup>Villarreal A, <sup>1</sup>Ale M, <sup>1</sup>Grass D, <sup>2</sup>Cervantes-Llanos M, <sup>1</sup>Pavon-Fuentes N, <sup>2</sup>Benitez JV, <sup>1</sup>Cabrera-Gomez JA, <sup>2</sup>Díaz de la Fe A, <sup>2</sup>Pentón-Rol G. <sup>1</sup>

\*María Elena Fernández-de-Cossío and Alberto Cintado-Benitez contributed equally to this work.

DOI. 10.21931/RB/2016.01.04.5

### ABSTRACT

Multiple sclerosis is a neuro-inflammatory autoimmune disease. The MHC class II region produces the strongest effect on Multiple Sclerosis genetic susceptibility. The purpose of this study is to evaluate DRB1\*, DQA1\*, and DQB1\* alleles among Multiple Sclerosis Cuban patients. 100 patients and 200 unrelated healthy controls were included. Ancestry informative markers were used. Multiple Sclerosis associated HLA susceptibility/protection alleles were ascertained by PCR using specific primers. Statistical analyses were conducted using STRUCTURE 2.1, ADMIXMAP 3.7, SPSS 16.0 packages. Logistic regression analysis showed odds ratio of 5.7 for Multiple Sclerosis associated with a unit change in European admixture proportion. Evidence for susceptibility to Multiple Sclerosis was observed for the presence of HLA-DRB1\*15, DRB1\*14, DQA1\*01 and DQB1\*06 alleles, with odds ratio 3.40, 4.96, 2.53, and 2.77 respectively compared to healthy controls. A protective effect of HLA DRB1\*01, DRB1\*07, DRB1\*10 was found among Multiple Sclerosis patients (odds ratio 0.35, 0.2, 0.4 respectively). After correcting for admixture, a new association to HLA-DRB1\*1101 was identified. Alleles HLA-DRB1\*, DQ were associated with Multiple Sclerosis in Cuban patients. HLA-DRB1\*1101-1104 was associated to Multiple sclerosis in this study sample, where the European ancestry proportion was identified.

**Keywords:** HLA-DR, HLA-DQ, Admixture, Multiple Sclerosis, Cuban population, AIM

### RESUMEN

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune neuroinflamatoria. La región clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) produce el mayor efecto genético sobre la EM. El objetivo de este estudio es evaluar los alelos DRB1\*, DQA1\* y DQB1\* en enfermos cubanos con EM. En el presente estudio se incluyeron 100 pacientes y 200 individuos no relacionados. Se emplearon Marcadores informativos de ascendencia. Se realizó la determinación de los alelos HLA, indicadores de protección-susceptibilidad, asociados con la EM mediante la reacción en cadena de la polimerasa y el uso de oligonucleóticos específicos. Los análisis estadísticos se desarrollaron con los paquetes estadísticos STRUCTURE 2.1, ADMIXMAP 3.7 y SPSS 16.0. El análisis de regresión logística mostró un valor de odds ratio de 5,7 para una asociación de la EM con la proporción de mezcla europea en una unidad de cambio. Los alelos HLA-DRB1\*15, DRB1\*14, DQA1\*01 y DQB1\*06, confieren susceptibilidad a la EM con valores de *odds ratio* de 3.40, 4.96, 2.53, y 2.77 respectivamente. Un efecto de protección se observó para los alelos HLA DRB1\*01, DRB1\*07, DRB1\*10 con *odds ratio* de 0.35, 0.2, 0.4 respectivamente. El alelo DRB1 \* 1101-1104 se asoció a la EM en la muestra de estudio, donde se identificó la proporción de ascendencia europea.

**Palabras clave:** HLA-DR, HLA-DQ, mezcla genética, Esclerosis Múltiple, población cubana, marcadores informativos de ascendencia

### Introducción

Multiple sclerosis (MS) is a chronic neuro-inflammatory autoimmune disease believed to arise from complex interactions of both environmental and genetic factors. A genetic contribution to the pathoge-

nesis of MS had already been assumed in 1896 with the discovery of the familial aggregation of MS.<sup>1</sup> The earliest association between genes and MS found in the Human leukocyte antigen<sup>2</sup> (HLA) and described in 1972 at 6p21 has long been recognized as the strongest locus increasing risk to MS in most populations,<sup>3</sup> nota-

<sup>1</sup> Pharmacogenomics Department, Biomedical Research Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 31 entre 158 & 190, Cubanacán, Playa, Cuba.

<sup>2</sup> International Center of Neurological Restoration, Ave 25 no 15805 entre 158 & 160 Cubanacan Playa, Cuba.

**Correspondence:** email: mariaelena.fernandez@cigb.edu.cu



bly HLADRB1\*1501 and other major histocompatibility complex (MHC) alleles.<sup>4</sup>

An association was seen for the DRB1\*1501 allele, as the main susceptibility allele in MS residing on a large, extended haplotype.<sup>5</sup> This has been fine-mapped to the HLA-DRB5\*0101-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602 extended haplotype in the Northern European population with estimated risk ratios of approximately 3, and homozygosity for this haplotype increases MS risk sixfold.<sup>6</sup>

The overall prevalence of MS is about 70 per 100,000 individuals (range from 2 to 150).<sup>7</sup> The first case of MS in Cuba was published in 1965. After 1990, the prevalence of clinically-definite MS in the different Cuban provinces was around 10 per 100,000. The latest study, in Cienfuegos province,<sup>8</sup> provides a prevalence of 25.5 per 100,000.

MS has been reported in all continents in different populations. Of these, Europe is considered a high prevalence region for MS ( $\geq 30/100000$ ) and different attempts are undergoing to evaluate how the risk of MS varies among European populations.<sup>9</sup> Brum et al., have defined that MS presents a high prevalence rate, particularly in white persons from Western countries when patients from Brazil were analyzed.<sup>10</sup>

Cintado et al., have stated a population structure in a multiethnic Cuban population from Havana City and they have reported that 85% are of Spanish descent and the African contribution is of 15% suggesting that the admixture must be considered when evaluating traits in this population.<sup>11</sup> They have outlined that differing frequencies of certain diseases in European populations compared with African and Amerindian populations

in the present study.<sup>13</sup> Unrelated healthy control (n= 200) were matched in terms of age, gender and ethnicity with the group of patients enrolled in the study. Written informed consent of each subject was obtained prior to sample collection. The study protocol was approved by the Ethical Research Board from the International Center of Neurological Restoration (Havana, Cuba) according to the guidelines of the national legislation and the Code of Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects of the World Medical Association.

Subject characteristics are shown in Table 1. The mean age of MS patients at onset was 40.01+/-13.09 years; 71.04% were woman. This study was approved by the Ethical Research Board from the International Center of Neurological Restoration (Havana, Cuba).

**DNA isolation and AIM genotyping**

Genomic DNA was isolated from whole blood using a Wizard Genomic DNA Purification Kit according to the manufacturer's instruction (Promega, Madison, WI, USA). Table 2 shows the 17 AIM analyzed in this study. AIM were identified from previous studies as having large differences in allele frequency (d. 30%) between Native American, West African, and European ancestral populations.<sup>14</sup> Genotyping was performed by PCR amplification, using sequence-specific primers (PCR-SSP), as previously described.<sup>15</sup> Amplification reactions were performed in a final volume of 25  $\mu$ L containing 100 ng of genomic DNA, 1.5–2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris HCl, 0.2 mmol/L of each dNTP, 1mmol/L of both primers, 10% DMSO, and 1UTaqDNA polymerase (Promega). All the loci were scored after electrophoresis through agarose gels.

**Table 1. Demographic characteristics of study subjects**

Characteristic	Cases	Controls
No. of subjects (n)	100	200
Gender (female %)	71.04	79.12
Age (mean +/- SD)	40,01+/- 13,09	38,6 +/- 12
*Self-identified ethnicity (%)		
White descent	76	72,5
Black descent	10,6	12,5
Mulattos	13,3	15

\* *Self-identified ethnicity*<sup>1,2</sup>

suggest that those of Spanish descent may be particularly useful for deciphering complex genetic diseases, for instance dementia and multiple sclerosis that have a higher risk in European than in African populations.<sup>12</sup>

The purpose of this study is to assess, for the first time, DRB1\*, DQA1\*, and DQB1\* alleles among MS Cuban patients to understand the nature of the HLA association with the diseases in our sample. Also, we typed a panel of 17 Ancestral informative markers (AIM) to control possible confounding traits by population stratification.

**Material and methods**

**Patients and controls**

Samples from 100 MS patients with Relapsing Remitting (MS-RR) diagnosed according to McDonald et al., were analyzed

**HLA Typing.**

Selected HLA DRB1 and DQ alleles were determined by SSP-PCR as previously described.<sup>16, 17</sup> The selection of these particular alleles was based on previous studies in which they have been reported to be implicated as part of haplotypes conferring the highest risk or protection scores.<sup>5</sup> Brief description: DRB1\* 0401-0411-0301-1501-1502 -0101-0103 -0102 -0701-0702 -1001 -1101-1104 -1401-1404 1403, DQB1\* 0602, DQA1\* 0301, \*0102. A primer pair to amplify the third intron of DRB1 genes was included in each PCR reaction as the internal positive control. These two primers matched non-allelic sequence.<sup>17, 18</sup> All primers were obtained from the Department of oligonucleotide synthesis, at Center of Genetic Engineering and Biotechnology (Havana, Cuba), and used at 0.25  $\mu$ M. Amplified products were separated by electrophoresis in 2 % agarose gels containing ethidium bromide after the addition of loading buffer, and visualized using UV illumination.

Table 2. AIM allelic frequency in the parental populations<sup>15</sup>. AIM allelic frequencies for MS subjects and controls are also shown. Asterisks precede the name of the larger allele.

AIMs	European	West Africans	Amerindian	Cases	Controls
GC-*1F	0.356	0.853	0.339	0.520	0.586
AT3*ins	0.273	0.858	0.061	0.450	0.430
LPL*ins	0.494	0.971	0.442	0.480	0.630
APOA1*ins	0.917	0.420	0.977	0.800	0.768
MID154*ins	0.333	0.806	0.420	0.378	0.415
MID187*ins	0.342	0.759	0.301	0.430	0.442
DI1S429*T	0.440	0.087	0.119	0.430	0.375
TSC11020*T	0.921	0.487	0.137	0.830	0.824
FY-null*T	0.999	0.001	1.000	0.800	0.715
OCA2*A	0.636	0.115	0.488	0.582	0.563
WI-7423*T	0.517	0.000	0.058	0.516	0.340
GS*1S	0.607	0.931	0.931	0.760	0.758
WI-14867*C	0.558	0.976	0.418	0.620	0.571
WI-16857*G	0.180	0.751	0.181	0.256	0.390
PV92*ins	0.171	0.225	0.792	0.25	0.196
CYP19-E2*T	0.287	0.332	0.741	0.239	0.419
TYR 192*A	0.485	0.005	0.034	0.400	0.359

Statistical analysis. The fit of the genotype frequencies to the Hardy-Weinberg proportions was tested by the Chi-square test. Haplotype frequencies were estimated by means of an expectation maximization algorithm.<sup>19</sup> We used parental population frequencies reported<sup>14</sup> for samples of Spanish, average of Amerindians (Mayan, southwestern US Native Americans), and average of West Africans (Central African Republic, Nigeria, and Sierra Leone) (Table 2). To test for population stratification, the STRUCTURE 2.1 program<sup>19</sup> was used. The program was run initially with 70000 iterations for the burn-in period and 100000 additional iterations to obtain parameter estimates, with a prior distribution that allowed K to take values from 1 to 3. Additional runs with longer iterations were also carried out to check the consistency of the results. The frequencies of HLA class II was compared between patients and controls using the chi-square test or the two-tailed Fisher's exact probability test. Odds Ratio (OR) (95 % CI) was also estimated (SPSS 16.0 software). The level of significance was taken as p value < 0.05. For allele comparisons, Bonferroni's method was used for the correction of multiple comparisons, multiplying the value of p obtained in the statistical test by the total number of alleles tested.<sup>16</sup> In order to control potential confounding because of population stratification as a result of admixture, the ADMIXMAP program was used.<sup>21</sup> This program performs an association analysis by means of a logistic regression for the relation of MS, as the dependent variable, and HLA, introducing individual ancestry estimates as covariates. The admixture proportions of groups were estimated by the gene identity method<sup>22</sup> using the software Admix95 kindly provided by Bertoni B (<http://www.genetica.fmed.edu.uy/software.htm>)

## Results

Allele frequencies for the 17 AIMs in ancestral populations, MS, and healthy controls are shown in Table 2. There was no deviation from Hardy-Weinberg proportions ( $p > 0.05$ ). Genetic ancestry estimates showed that European contribution was preponderant in patients and controls groups, 80.1% and 76% respectively. West African estimates reached 16.9% and Native American 2% for cases, while West African reached 21.7% and Native American 2.3% for controls. The majority of the cohort concentrates to the European component of the European-West African axis with a restricted and almost absent Native American component.

Our results indicate the presence of substructure in the whole sample. The STRUCTURE program consistently assigned individuals to two groups with a higher probability than it did to a single group or three groups. The probability of  $K=2$  (-4257.7) was higher than  $K=1$  (-4350) and  $K=3$  (-4365), indicating the presence of two distinct clusters

The result of the logistic regression analysis with MS as a dependent variable showed that *odds ratio* for MS, associated with an unit change in European admixture proportion, was estimated as 5.7 (95% CI 1.2–36).

The association of selected HLA DR/DQ alleles with MS in the Cuban sample was evaluated. HLA-DRB1 and DQ typing differed significantly between MS patients and controls. The HLA-DRB1, HLA-DQA1 and DQB1 allelic associations for MS patients and controls are shown (Table 3). Evidence for susceptibility to MS was observed for the presence of HLA-DRB1\*15, DRB1\*14, DQA1\*01 and DQB1\*06 alleles, with higher odds ratio (OR) compared to healthy controls (Table 3). A modest protective effect of HLA DRB1\*01, \*07, \*10 were found among MS patients (OR 0.35, 0.2, 0.4 respectively).

After correcting for admixture, a new association to HLA-DRB1\*1101 was identified, and associations for the alleles above



Table 3. HLA Allelic association of MS patient's vs controls

HLA	Alleles	<i>p</i> value non adjustment for admixture	<i>p</i> value adjustment for admixture	OR	95% CI
DRB1*	0301	ns	ns	0.86	(0.8-1.5)
	1501-1502	<0.01	<0.01	3.40	(1.8-6.1)
	0101-0103	ns	ns	0.35	(0.16-0.92)
	0102	ns	ns	0.24	(0.06-0.8)
	0701-0702	<0.01	<0.01	0.21	(0.1-0.5)
	1001	ns	ns	0.47	(0.25-0.91)
	1101-1104	ns	<0.01	0.19	(0.084-0.441)
	1401-1404	<0.01	<0.01	4.96	(2.29-10.7)
	1403	ns	ns	0.86	(0.25-2.92)
DQA1*	0301	ns	ns	1.25	(0.71-2.20)
	0102	<0.01	0.01	2.53	(1.48-4.32)
DQB1*	0602	<0.01	<0.01	2.77	(1.57-4.86)

OR, odds ratio; CI, confidence interval; *p* value < 0.05 corrected for Bonferroni was considered significant; ns= not significant

Table 4. Association analysis of HLA haplotypes with the MS *p* value adjustment for admixture

Haplotype	Alleles	<i>p</i> value	OR
DQA1*/DQB1*	0102/0602	0,003	2,2
DRB1*	0103/0701/1001	0,04	0,6
DRB1*/DQA1*/DQB1*	1501/0102/0602	1,3x10 <sup>-5</sup>	3,8
DRB1*/DQA1*/DQB1*	1501-0103-0701-1001/0102/0602	0,6x10 <sup>-3</sup>	3,22

*p* value < 0.05 corrected for Bonferroni was considered significant

described before admixture correction (*p*<0.01) remained significant.

The disease association at the level of four-loci haplotypes was carried out (Table 4). DQA1\*0102/DQB1\*0602 (*p*<0.003); DRB1\*1501/ DQA1\* 0102/ DQB1\*0602 and DRB1\* 1501-0103-0701-1001/DQA1\*0102/DQB1\*0602 (0.6x10<sup>-3</sup>) have odds ratios 2.2, 3.8 and 3.22 respectively, whereas DRB1\* 0103/\*0701/\*1001 (*p*<0.04) has OR 0.6. These associations remained significant after correcting for admixture.

## Discussion

MS is a complex autoimmune disease with over 100 confirmed associated genes or genetic loci and a low increasing number of confirmed environmental risk factors.<sup>5</sup> The strongest genetic predisposition correlates with the major histocompatibility complex, class II, DR beta 1 (HLA-DRB1\*1501 allele) with some contribution from other alleles.<sup>5</sup>

We report that HLA-DRB1 and DQ typing significantly differed between MS patients and controls. Evidence for susceptibility to MS was observed with the presence of HLA-DRB1\*15, DRB1\*14, DQA1\*01 and DQB1\*06 alleles with higher odds ratio (OR) compared to healthy controls (Table 3). Diaz-Horta et al reported before an opposite association for diabetic Cuban patients.<sup>23</sup> Modest protective effects of HLA DRB1\*01, DRB1\*07, DRB1\*10 were found among MS patients (OR 0.37, 0.2, 0.4 respectively).

Several genetic studies have described HLA-DRB1\*1501 as the main susceptibility allele in MS6. Dymont et al., later considered the importance of taking into account that some haplotypes or loci other than HLA-DRB1\*15 contribute to MS risk<sup>24</sup>. However, a recent genome wide association study<sup>5</sup> that includes 9,772 MS patients and 1700 controls showed that DRB1\*1501 has the strongest association with MS with a *p* value of 1x10<sup>-320</sup>. Our results agree with this report.

Other studies examined the role of ethnicity or ancestry in MS epidemiology.<sup>7, 25</sup> A relatively high prevalence of MS is found in Western Europe and North America. In Europe the prevalence ranges from 10 to 187 per 100000 with a higher rate in northern countries.<sup>26</sup> In addition, a strong association between the HLA-DRB1\*15 allele and MS has been shown in studies of northern Europeans and their descendants.<sup>27</sup>

The Cuban population is essentially a result of the mixture between Spanish, West Africans, and to a lesser degree, Amerindian tribes that inhabited the island.<sup>28</sup> Cintado et al., defined a population structure in a multiethnic Cuban population from Havana City and reported 85% of Spanish European descent.<sup>11</sup>

A typing of 17 markers having large differences in frequencies between European, West African and Native American populations was applied to the present study to associate ancestry proportions with respect to MS. We observed that European contributions predominate in patients that are mainly white (76%), with an estimated OR (*odds ratio*) of 5.7, with a wide-range confidence interval (CI 1.2-36).

Similar estimates were reported for MS patients in Brazil, also a country with a highly mixed population. According to the Brazilian study MS had a high prevalence within whites with Western Europe ancestry.<sup>10</sup> In Cuba, in respect to another autoimmune disease, it was confirmed that T1DM was associated with a preponderant genome proportion of European ancestry after ADMIXMAP evaluation.<sup>23</sup>

Toro et al have been studied the low prevalence of MS in Bogota, Colombia which present highly admixed population and have reported that HLA-DRB1\*15 allele confers susceptibility to MS whereas HLA-DRB1\*14 allele exerted resistance to disease.<sup>29</sup>

Results from the present study have defined another allele, HLA-DRB1\*1101, associated to the disease, mainly in Caucasian patients. These outcomes confirm the importance of ancestry evaluation as a robust tool to adjust for population admixture, which controls population stratification and greatly avoids false associations in case-control studies.<sup>30</sup> The distribution and diversity of DRB1\*11 alleles varies among populations. DRB1\*1101 has been described as the predominant allele, while HLA DRB1\*1104 is the second most frequent allele, as stated by a previous study that included Caucasian, Asian/Pacific Islanders, Hispanics and Native Americans.<sup>31</sup>

Even more, HLA-DRB1\*1101 is part of certain allele groups defined for their association to MS risk,<sup>7, 32</sup> which is formed by the alleles DRB1\*03, DRB1\*14, DRB1\*07 and DRB1\*11. However in the present study this allele was associated to disease protection, a result that corresponds to reports from others authors<sup>33</sup> which have found that HLA-DRB1\*14 and HLA-DRB1\*11 bearing haplotypes are protective with OR 0.75 and 0.55 respectively. In that sense Ramagopalan et al., using a Canadian dataset confirmed that HLA DRB1\*11 bearing haplotypes are novel and statistically significant resistance haplotypes.<sup>34</sup> They also defined that this allele shows a multiplicative mode of inheritance. According to these authors the protective effect of HLA DRB1\*11 over HLA-DRB1\*15 appears to be weaker than the effect of HLA -DRB1\*14, but both alleles reduce risk associated with HLA-DRB1\*17. Dominant variants on HLA-DRB1\*14 and HLA-DRB1\*11 haplotypes can generate T cells that suppress autoreactive T cells, even those generated by HLA-DRB1\*15.

Additionally a strong association of MS and haplotype DRB1\*1501, DQA1\*0102, DQB1\*0602 was observed in patients included in the present study (Table 4). This result corresponds to the previous repeatedly confirmed association of HLA class II DRB1\*1501/DQA1\*0102, DQB1\*0602 (DR2) region with MS for most Caucasians haplotypes.<sup>35</sup> Dayment *et al.*, have been fine mapped this haplotype in the North European population and they have estimated risk ratios of approximately 3, and homozygosity for this haplotype increases MS risk sixfold.<sup>6</sup> Interestingly a risk-associated haplotype to MS in our patient sample was

previously identified as protective for T1DM also among Cuban patients,<sup>23</sup> which agrees with other reports of patients with European ancestry suffering from these autoimmune diseases.

## Acknowledgements

The authors wish to thank the multiple sclerosis patients and the healthy controls that participated in this study. The authors express their acknowledgement to Dr Eduardo Penton and Miriam Ribas for their assistance with language corrections.

## Referencias bibliográficas

- Eichhrodt H. Veber infantile und Hereditäre multiple sklerose. Arch Pathol Anat Physiol; Klin Med 146 (1896) 173-192
- Jersild C., Svejgaard A., Fog T. HL-A antigens and multiple sclerosis. Lancet. 1 (1972) 1240-1241
- Jersild C, Fog T, Hansen GS, Thomsen M, Svejgaard A, et al. Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. Lancet 2 (1973) 1221-1225
- Lincoln MR, Ramagopalan SV, Chao MJ, et al. Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. Proc Natl Acad Sci USA. 106 (2009) 7542-7547
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. Nature 476 (2011) 214-219
- Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. Lancet Neurol. 3 (2004) 104-110
- Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: An update. Neurol Sci 22 (2001) 117-139
- Cabrera-Gomez JA. Esclerosis múltiple en Cuba: Epidemiología, genética y aspectos clínicos. In: Arriagada C and Nogales-Gaete J (Eds) Esclerosis Múltiple: una mirada Ibero-Panamericana. 2ND ed. Santiago de Chile. Demos Medical Publishing. (2008) 169-182
- World Health Organization: Atlas multiple sclerosis resources in the world. Geneva 2008: WHO Press
- Brum DG., Luizon MR., Santos AC, Lana-Peixoto MA, Rocha CF et al. European ancestry predominates in Neuromyelitis Optica and Multiple Sclerosis patients from Brazil. PLoS ONE 8 (2013) e58925
- Cintado A, Companioni O, Nazabal M, Camacho H, Ferrer A, Fernández de Cossío M. E, Marrero A. et al. Admixture estimates for the population of Havana City. Annals of Human Biology. 36 (2009) 350-360
- Halder I and Shriver MD. Measuring and using admixture to study the genetics of complex disease. Hum Genomics. 1 (2003) 52-62
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF. et al. Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. Annals of Neurology. 50 (2001) 121-127
- Bonilla C, Parra EJ, Pfaff CL, Dios S, Marshall JA, Hamman RE, Ferrell RE, et al. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. Ann Hum Genet. 68 (2004) 139-153
- Bonilla C, Gutierrez G, Parra EJ, Kline C, Shriver MD. Admixture analysis of a rural population of the State of Guerrero, Mexico. Am J Phys Anthropol. 128 (2005) 861-869
- Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens. 39 (1992) 225-235
- Olerup O, Alder A, Fogdell A. HLA-DQB1 and DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours. Tissue Antigens. 41 (1993) 119
- Chao MJ, Ramagopalan SV, Herrera BM, Orton SM, Handunnethi L, Lincoln MR, Dyment DA. et al. MHC transmission: insights into gender bias in MS susceptibility. Neurology. 76 (2011) 242-246
- Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. Mol Biol Evol. 5 (1995) 921-927
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155 (2000) 945-959
- Hoggart CJ, Parra EJ, Shriver MD, Bonilla C, Kittles RA, Clayton DG, McKeigue PM. Control of confounding of genetic associations in stratified populations. Am J Hum Genet. 72 (2003) 1492-1504
- Chakraborty R. Estimation of race admixture - a new method. Am J Phys Anthropol. 42 (1975) 507-511.



23. Diaz-Horta O, Cintado A, Fernandez-De-Cossio ME, Nazabal M, Ferrer A, Roca J, Camacho H. et al. Relationship of type 1 diabetes to ancestral proportions and HLA DR/DQ alleles in a sample of the admixed Cuban population. *Annals of Human Biology*. (2010) 1–11
24. Dymont DA, Herrera BM, Cader MZ, Willer CJ, Lincoln MR, Sadovnick AD, Risch N and Eberres C. Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Hum Mol Genet*. 14 (2005) 2019–2026
25. Melcon MO, Melcon CM, Bartoloni LCE, Duran JC, Grzesiuk AK et al. Towards establishing MS prevalence in Latin America and The Caribbean Multiple Sclerosis Journal.19 (2012)145-152
26. Borisow N, Doring A, Pfueller CF, Paul F, Dorr J, Hellwig K. Expert recommendations to personalization of medical approaches in treatment of multiple sclerosis: an overview of family planning and pregnancy. *EPMA J*. 3 (2012) 9
27. Alvarado-de la Barrera C, Zuniga-Ramos J, Ruis-Morales JA, Estanol B, Granados J and Llorente L. HLA class II genotypes in Mexican Mestizos with familial and non-familial multiple sclerosis. *Neurology*. 55 (2000)1897–1900
28. Guancho J. Componentes étnicos nación cubana. Colección la fuente viva, Fundación Fernando Ortiz . Ediciones Unión 1996; La Habana, Cuba.
29. Toro J, Cuellar-Giraldo D, Díaz-Cruz C, Burbano LE, et al.HLA-DRB1\*14 is a protective allele for multiple sclerosis in an admixed Colombian population. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 3 (2016) e192; doi: 10.1212/NXI.0000000000000192.
30. Enoch MA, Shen PH, Xu K, Hodgkinson C, Goldman D. Using ancestry-informative markers to define populations and detect population stratification. *J. Psychopharmacol*. 20 (2006) 19-26
31. Tang TF, Huang AY, Pappas A, Slack R, Ng J, Hartzman RJ and Hurley CK Relative frequencies of DRB1\*11 alleles and their DRB3 associations in five major population groups in a United States bone marrow registry. *Human Immunology*. 61 (2000) 820–827
32. Wu JS, James I, Wei Q, Castley A, Christiansen FT, et al. Influence of HLA-DRB1 allele heterogeneity on disease risk and clinical course in a West Australian MS cohort: a high-resolution genotyping study. *Mult Scler*. 16 (2010) 526–532
33. Mescheriakova JY, Kreft KL and Hintzen RQ. Genetics of Multiple Sclerosis. Chapter 10, T. Yamamura, B. Gran (eds.), NewYork Multiple Sclerosis Immunology. 197 (2013) 6-10
34. Ramagopalan SV, Morris AP, Dymont DA, Herrera BM, DeLuca GC, et al. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet*. 3 (2007) 1607–1613Int. J. Gynecol. Cancer 16, 71–6
35. Kenealy SJ, Pericak -Vance MA, Hines JL: The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol*. 143 (2003) 7-12

Recibido:1 noviembre 2016

Aprobado: 7 diciembre 2016

## INVESTIGACIÓN / RESEARCH

## Quantification of polysaccharide Vi in the typhoid vaccine VaxTyVi™ by sandwich ELISA using a monoclonal antibody

## Cuantificación del polisacárido Vi en la vacuna contra la fiebre tifoidea VaxTyVi™ mediante ELISA en sandwich utilizando un anticuerpo monoclonal

Elizabeth González Aznar, Fátima Reyes, Nevis Amin Blanco, Oscar Otero Alfaro, Maribel Cuello Pérez, Fidel Ramírez Bencomo and Reinaldo Acevedo Groguez

DOI. 10.21931/RB/2016.01.04.6

## ABSTRACT

VaxTyVi® is a plain polysaccharide vaccine based on the capsular polysaccharide Vi (PsVi) from *Salmonella* Typhi, produced at Finlay Institute. Quantification of PsVi in VaxTyVi™, is a mandatory requirement for final product release and has been made by inhibition ELISA. Considering the disadvantages of this type of ELISA and that recently our group obtained a MAb against PsVi, the aim of this work, was to develop a sandwich ELISA to quantify PsVi in VaxTyVi™. M&M. Using MAb 4G3E11 as the capture and detection, a sandwich ELISA was developed. Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were calculated, as well as the inter- and intra-assay for each point of the standard curve. The PsVi content in six batches of VaxTyVi™ was also determined. Results. An eight-point calibration curve with a range from 50 to 0.39 ng/mL of PsVi was obtained with a coefficient of determination ( $R^2$ )  $\geq 0.99$ . The LOD and LOQ were 0.59 ng/mL and 1.25 ng/mL respectively, representing at least 1000 times more sensitive than inhibition ELISA. The inter-assay CV was 4–15%, and the intra-assay CVs varied between 3–8% and 4–9% for intraplate and interplate respectively. The PsVi content in all VaxTyVi™ lots were found into the accepted range ( $\pm 30\%$ ). In summary, the proposed sandwich shown to be specific, reproducible and highly sensitive. The assay shown to be suitable for use in the quantitation of PsVi in VaxTyVi™, with great potential to replace the inhibition ELISA, implanted in the Finlay Institute since 2006.

**Keywords:** polysaccharide Vi quantification, sandwich ELISA, Typhoid fever, monoclonal antibodies

## RESUMEN

VaxTyVi® es una vacuna simple polisacárida basada en el polisacárido capsular Vi (PsVi) de *Salmonella* Typhi, producido en el Instituto Finlay. La cuantificación de PsVi en VaxTyVi™, es un requisito obligatorio para la liberación del producto final y se ha realizado mediante ELISA de inhibición. Teniendo en cuenta las desventajas de este tipo de ELISA y que recientemente nuestro grupo obtuvo un MAb contra PsVi, el objetivo de este trabajo, fue desarrollar un sandwich ELISA para cuantificar PsVi en VaxTyVi™. Utilizando el MAb 4G3E11 como captura y detección, se desarrolló un ELISA en sandwich. Se calcularon los límites de detección (LOD) y la cuantificación (LOQ), así como el inter e intra-ensayo para cada punto de la curva estándar. También se determinó el contenido de PsVi en seis lotes de VaxTyVi™. Se obtuvo una curva de calibración de ocho puntos con un intervalo de 50 a 0,39 ng / ml de PsVi con un coeficiente de determinación ( $R^2$ )  $\geq 0,99$ . El LOD y LOQ fueron 0,59 ng / mL y 1,25 ng / mL respectivamente, lo que representa al menos 1000 veces más sensible que ELISA de inhibición. El CV inter-ensayo fue del 4-15%, y el CV intra-ensayo varió entre 3-8% y 4-9% para intraplaca e interplate, respectivamente. El contenido de PsVi en todos los lotes VaxTyVi™ se encontró en el intervalo aceptado ( $\pm 30\%$ ). En resumen, el sandwich propuesto demostró ser específico, reproducible y altamente sensible. El ensayo demostró ser adecuado para su uso en la cuantificación de PsVi en VaxTyVi™, con gran potencial para reemplazar el ELISA de inhibición, implantado en el Instituto Finlay desde 2006.

**Palabras clave:** cuantificación del polisacárido Vi, ELISA en sandwich, fiebre tifoidea, anticuerpos monoclonales

## Introduction

Typhoid fever, also known as enteric fever, is a potentially fatal multi systemic illness caused primarily by *Salmonella Typhi* and, to a lesser extent, related serovars paratyphi A, B, and C. Humans are the only source of these bacteria; no animal or environmental

reservoirs have been identified. The microorganism is most often acquired through consumption of water or food that has been contaminated by feces of an acutely infected or convalescent person or a chronic, asymptomatic carrier.<sup>1</sup>

Typhoid fever is still a health problem, an estimated 22 million cases and 200,000 related deaths occur

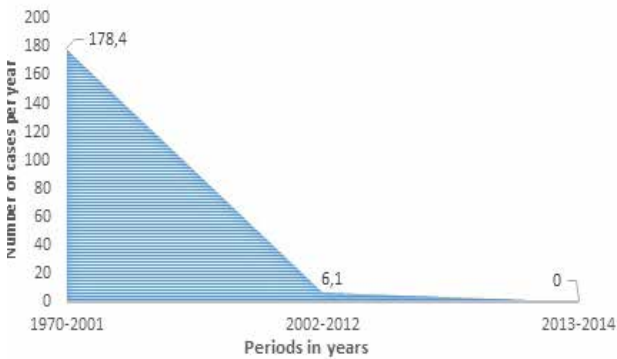
<sup>1</sup> Laboratory of Monoclonal Antibodies from the Biological Evaluation Department, Research Area, Institute of Vaccines Finlay. Havana, Cuba, A.P. 16017, Cod. 11600.

**Correspondence:** email: elygonzalez@finlay.edu.cu



worldwide each year. Its prevalence is higher in Asia, sub-Saharan Africa and some countries in South America, but 90% of fatal cases occur in Asia, specifically in India, Pakistan and Bangladesh.<sup>2</sup>

In Cuba, there has been an increasing tendency to decrease morbidity and mortality from typhoid fever, describing two stages in the epidemiology of the disease: before and after 2002. Before 2002, an average of 178.4 cases reported per year, with a rate of 1.9 per 100 000 inhabitants. Since 2002, we observed a significant decrease in the incidence of the disease, coming from six cases per year to be no reports of the disease in 2013.<sup>3</sup> Figure 1.



**Fig. 1.** Behavior of FT in Cuba. The average number of annual cases of FT shown in different periods: before 2002, from 2002 to 2012 and from 2013

The change in the behavior of the disease since 2002, is related among other factors, with the introduction since 2001 of the Cuban typhoid vaccine, VaxTyVi™, in the National Immunization Program. VaxTyVi™ is a plain polysaccharide (Ps) vaccine, based on the capsular polysaccharide Vi (PsVi) from *S. Typhi*, with proven efficacy and safety for 14 years of implementation and is produced at Finlay Institute.<sup>4</sup>

According to international standards, quantification of PsVi in VaxTyVi™, is a mandatory requirement for final product release. Several techniques have been used for quantification of PsVi. Immunological assays (IA) such as rate nephelometry or solid phase immunoassay (ELISA) are within them.<sup>5,6</sup> In the case of ELISA, different types are described in the scientific literature to quantify antigens.<sup>7</sup> In Finlay Institute, Fajardo *et al* (2006) validated an inhibition ELISA to quantify the PsVi in VaxTyVi™ and until today, it is the method used by the quality control department for the final release of vaccine lots.<sup>8</sup> However, this type of ELISA has several disadvantages, among which we can mention: more laborious, consuming more steps including inhibition or neutralization, lower sensitivity and specificity (employs polyclonal serum), and difficult interpretation of the results, because antibody-antigen-enzyme complex bound is inversely related to the concentration of antigen present in the sample.<sup>9</sup> Sandwich ELISA nevertheless, is easier to perform, and in the last decade has been more used in the quantification of total and free Ps in polysaccharide vaccines like *Haemophilus influenzae* b Tetanus toxoid conjugate vaccines and multivalent antimeningococcal polysaccharide vaccines.<sup>10,11</sup>

Recently our group obtained a MAb against PsVi coded as 4G3E11, with high purity, affinity and specificity confirmed.<sup>12,13</sup> The high specificity and affinity constant of the MAb 4G3E11 suggests its use as an analytical tool in enzyme immunoassays. The aim of the present work was to develop a sandwich ELISA to quantify the PsVi in VaxTyVi™ and thus replace the ELISA inhibition assay, considering the disadvantages mentioned above.

## Materials and methods

### Reagents and buffers

The following buffers were used: coating buffer (15 mM Na-

CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6), PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), blocking buffer (PBS, 3% non-fat dried milk), washing buffer (PBS, 0.05% Tween 20 (v/v), pH 7.4), and substrate buffer (35 mM citric acid, 67 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.012% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 5.0). All reagents were obtained from Sigma-Aldrich (USA).

### MAbs

Murine MAb against PsVi were produced and characterized as described previously.<sup>12,13</sup> Briefly, hybridomas were produced by fusion of SP2/O myeloma cell line with splenocytes of BALB/c mice that were immunized with three intraperitoneal doses (every 20 days) of PsVi conjugated to diphtheria toxoid (vaccine candidate from Finlay Institute). One hybridoma, coded as 4G3E11 were selected and produced *in vivo* grown as mouse ascites in the peritoneal cavity of pristane-primed BALB/c mice. The MAb were purified from the ascites fluid (AF) by affinity chromatography using Protein A (GE Healthcare, Germany) following manufacturer's instructions. As part of the characterization was determined: Productivity, Class and Subclass, Purity, Specificity and Affinity constant (K<sub>aff</sub>) Table 1

**Table 1.** Characteristics of MAb against PsVi

Characterization	Values
Productivity	12.32 mg per ml of AF
Purity	99%
Class and Subclass	IgG1
Specificity	High specificity (no cross-reactivity with others Ps, or carrier proteins like tetanus (TT) and diphtheria (DT) toxoid
K <sub>aff</sub>	3.13 x 10 <sup>11</sup> M <sup>-1</sup>

### Peroxidase labeling of MAbs

Purified MAb were conjugated in-house to horseradish peroxidase type VI (HRP) as described by Wilson (1978). Briefly, 8 mg of MAb was coupled to 4 mg of HRP and was purified by gel filtration chromatography. Conjugates containing 1% BSA, 0.05% thiomersal and 50% glycerol were stored in small aliquots at -20 °C.

### Sandwich ELISA

### Calibrators, quality controls and calibration curve construction

In the absence of International Standards, calibrators consisted of purified PsVi produced at Finlay Institute (Havana, Cuba) and used as internal controls (IC). PsVi concentration was quantitated using colorimetric Hestrin's assay. The IC was supplied as lyophilized powders with 100 µg of PsVi. A two-fold serial dilution of IC was used to generate an eight-point calibration curve with a range from 50 to 0.39 ng/mL. Ascent software Version 2.6 (Thermo LabSystem Oy, USA) was used for plotting the optical density (OD492) against PsVi concentration and four-parameter logistic equation (4PL) was applied to obtain the function describing a sigmoid model. The quality control (QC) consisted of PsVi powders (Finlay Institute, Havana, Cuba) which were weighted, dissolved in PBS and adjusted to a final concentration of 5 ng/mL (w/v). Calibrators and QC were stored as single ready-to-use aliquots at -20 °C.

### ELISA sandwich for PsVi quantitation Samples

Six VaxTyVi™ vaccine lots (9006, 0004, 402, 203, 304 y 405) released by quality control department, with known concentration of 50 µg/mL determined by ELISA inhibition, were evaluated. All VaxTyVi™ lots were provided by Pharmaceutical Deve-

lopment Direction of Finlay Institute and were used at dilution of 1:10000, taking into account the standard curve range.

### Procedure

Polystyrene microwell plates (Maxisorp, Nunc, USA) were coated with 10 µg/mL of MAb 4G3E11 anti PsVi, in coating buffer (100 µL/well). After overnight incubation at 4°C, the coated plates were washed three times and blocked with blocking buffer for 1 h at 37°C. The calibrators, QC and samples were added (100 µL/well) and incubated 2 h at 37°C. Subsequently, the wells were washed three times and peroxidase conjugated MAb 4G3E11 diluted 1:2500 in washing buffer containing 1% non-fat dried milk, were added to the wells (100 µL/well) and incubated for 1 h at room temperature. After four washes, 0.4 mg of OPD per mL of substrate buffer was added to the wells (100 µL/well) and following 30 min of incubation in the dark, the reaction was stopped with 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. OD was measured at 492 nm using a Microplate Reader (Multiskan Ex, Thermo LabSystem, USA). Unknown concentrations were calculated using Ascent Software Version 2.6 (Thermo LabSystem Oy, USA). The calibrator, QC and samples were run in triplicates unless otherwise stated. Three independent experiments were performed and results were expressed as mean of PsVi content. Optimal dilutions of MAb and HRP conjugated MAb were determined by standard checkerboard titrations according to the procedures described by Crowther and Walker (2009).

### Limits of detection and quantitation

Lower limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were determined and defined as the mean of blank values (n = 20) plus either 3 or 10 standard deviation (SD) respectively.

### Intra- and inter-assay precision

Intra-assay precision was determined by interplate and intraplate precision as calculated by the coefficient of variation (CV). The interplate precision was evaluated by measuring triplicates of standard curve on four distinct ELISA plates on the same day in parallel experiments. The intraplate precision was evaluated by measuring the standard curve in quadruplicate on a single

Curve	Conc.	Meas.	CalcConc.	Residual
PsVi_1	50	2.304	47.874	2.126
PsVi_2	25	2.066	27.532	-2.532
PsVi_3	12.5	1.673	11.965	0.535
PsVi_4	6.25	1.335	5.887	0.363
PsVi_5	3.125	1.078	3.303	-0.178
PsVi_6	1.563	0.792	1.574	-0.012
PsVi_7	0.781	0.578	0.789	-0.008
PsVi_8	0.391	0.406	0.379	0.011

<b>Fit type:</b>	Four parameter logistic: $y = b + (a - b) / (1 + xc)^d$			
<b>Meas. transformation:</b>	Linear			
<b>Conc. transformation:</b>	Linear			
<b>Parameters:</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>
	0.024	3.286	0.087	0.592
<b>Corr. coeff. R2:</b>	0.998			

**Fig. 2.** Calibration curve obtained from sandwich ELISA using the Ascent™ Software Version 2.6 (Thermo LabSystem Oy, USA). A four-parameter logistic equation (4PL) was applied to obtain the function describing a sigmoid model. Error bars represent standard deviations of quadruplicate samples.

ELISA plate. The inter-assay precision was determined as the CV on five separate occasions.

## Results

### Curve Construction

MAb 4G3E11 was used as the capture and a peroxidase conjugated MAb 4G3E11 was used for detection in a sandwich ELISA assay. An eight-point calibration curve with a range from 50 to 0.39 ng/mL of PsVi was obtained (Fig. 2). A four-parameter fit model was applied to obtain the function describing a sigmoid model. Coefficient of determination (R<sup>2</sup>) ≥ 0.99 was obtained.

### Sensitivity, Reproducibility and Repeatability

The LOD and LOQ were found to be 0.59 ng/mL and 1.25 ng/mL respectively and could be related with the Kaff value calculated for the MAb in the previous experiment. Table 2

**Table 2.** Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ).

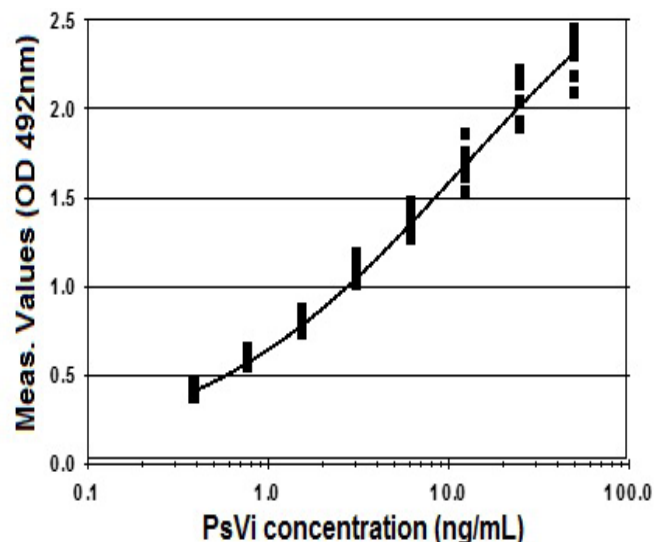
Mean Blank	SD	LOD		LOQ	
		OD	ng/mL	OD	ng/mL
0.137	0.037	0.246	0.59	0.503	1.25

LOD was calculated as mean blank + 3 × SD of reagent blank

LOQ was determined as reagent blank + 10 × SD of reagent blank.

The assay reproducibility and repeatability was determined by precision assay, calculating the inter and intra-assay expressed in CV% (Table 3).

As can be seen the proposed sandwich ELISA showed an inter-assay CVs of 4–15%, below 20% recommended for this type of assay. The intra-assay CVs varied between 3–8 % and 4–9% for the intraplate and interplate assay respectively, values that are below 10% recommended for intra-assay test in enzyme immunoassays.<sup>14</sup>





**Table 3. Inter- and intra-assay coefficient of variation (%) of PsVi standards.**

PsVi concentration ng/mL	Inter-assay n = 50			Intra-assay					
	Ave	SD	CV	Intraplate n = 4			Interplate n = 12		
	Ave	SD	CV	Ave	SD	CV	Ave	SD	CV
50	2.319	0.115	4.97	2.337	0.089	3.80	2.304	0.127	5.50
25	2.062	0.124	6.03	2.096	0.111	5.32	2.066	0.122	5.91
12.5	1.669	0.100	5.96	1.661	0.108	6.52	1.673	0.099	5.92
6.25	1.328	0.075	5.68	1.325	0.080	6.06	1.335	0.066	4.93
3.125	1.054	0.080	7.59	1.056	0.067	6.32	1.078	0.062	5.76
1.563	0.780	0.082	10.49	0.793	0.069	8.70	0.792	0.048	6.11
0.781	0.563	0.057	10.11	0.562	0.040	7.20	0.578	0.039	6.81
0.391	0.409	0.062	15.06	0.432	0.029	6.65	0.406	0.037	9.18

Ave: Average of OD, SD: Standard deviation, CV: Coefficient of variation expressed in %.

**Table 4. PsVi content of typhoid vaccine VaxTyVi™**

VaxTyVi™ Lots	Determinations			Average (µg/mL)
	1	2	3	
203	49,8	47,3	49	48,7
304	43,5	44,3	45,9	44,6
402	45,7	48,4	42,3	45,5
405	46,8	47,3	51	48,4
6014	44,5	47,4	45,2	45,7
9006	51,1	47,1	45,3	47,8

**Table 5. PsVi content of typhoid vaccine VaxTyVi™ by sandwich and inhibitor**

VaxTyVi™ Lots	Concentration by inhibition ELISA (µg/mL)	Concentration by sandwich ELISA (µg/mL)	Parameters evaluated	
			SD	CV
203	50	48,7	0,92	1,86
304	50	44,6	3,82	8,07
402	50	45,5	3,21	6,72
405	50	48,4	1,15	2,35
6014	50	45,7	3,04	6,35
9006	50	47,8	1,53	3,13

SD: Standard deviation, CV: Coefficient of variation expressed in %.

### PsVi quantitation in vaccines

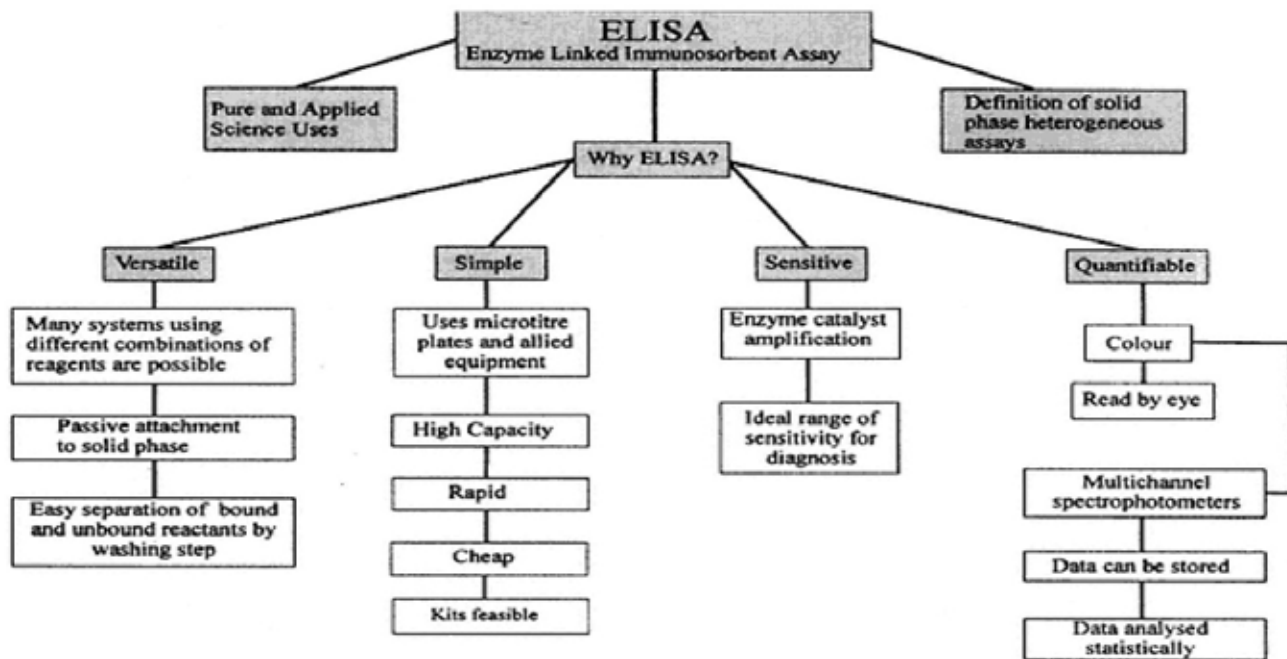
The proposed sandwich ELISA was used to measure the PsVi content in six lots of VaxTyVi™ (summarised in Table 4).

As shown in Table 5 all lots of VaxTyVi™ evaluated show concentrations of PsVi determined by the sandwich ELISA within the accepted range ( $\pm 30\%$ ) according to the product specifications (35 to 65 µg/mL).

All vaccines lots were found into the accepted range ( $\pm 30\%$ ) of PsVi content according to the available European Pharmacopoeia guidelines and the CVs were  $<4\%$  compared to the acceptance criterion of  $<15\%$  CV for immunoassays.<sup>15</sup>

### DISCUSSION

Facile techniques to analyse and quantitate the Ps components of Ps-based vaccines are essential for the evaluation of antigen content and lot-to-lot consistency of manufacture, with the associated implications for efficacy and safety. Content of Ps is directly related to the product dose.<sup>15,16</sup> For PsVi quantitation, several methods are available and suitable for use.<sup>17</sup> The concentration of the PsVi in its fully O-acetylated, acid form in eluted fractions can be measured using Hestrin's method<sup>18</sup> or another suitable method, such as Nuclear Magnetic Resonance (NMR).<sup>19</sup> The acridine orange staining method<sup>20</sup> and high performance



**Fig. 3.** Scheme showing features of ELISA that make it advantageous for a wide range of applications. Four major advantages of ELISA are promoted, all of which add to the reasons that this form of ELISA has been, and will continue to be, successful.<sup>9</sup>

anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)<sup>21</sup> have been reported to produce comparable results for PsVi in a range of 15–200 µg/ml. In the case of NMR and HPAEC-PAD, these two techniques have a high sensitivity (at least 10 times higher than Hestrin's assay) but requires the use of expensive reagents and very sophisticated equipment, not accessible for all.<sup>10</sup>

However, immunosorbent assays such as ELISAs, have been very useful in quantifying antigens in vaccines, especially for Ps antigens.<sup>10,11</sup> ELISAs have a variety of positive qualities that make them great attraction.<sup>9</sup> (Figure 3)

In Finlay Institute since 2006, an inhibition ELISA was developed and standardized, to quantify PsVi in VaxTyVi<sup>TM</sup>.<sup>8</sup> Although this ELISA has guaranteed over the years, the release of VaxTyVi<sup>TM</sup> batches efficiently and consistently, it has several disadvantages compared to sandwich ELISA. The main disadvantages are related to the number of steps and the interpretation of results.<sup>9</sup>

In this manuscript, we describe the use of a simple sandwich ELISA for the quantification of PsVi in VaxTyVi<sup>TM</sup>. The proposed sandwich ELISA that use the MAb 4G3E11 for coating and the same MAb but conjugated to peroxidase, for detection, shown to be specific, reproducible and highly sensitive.

According to the sensitivity, related with the lowest amount of analyte which can be detected in a sample, in this paper was evaluated by calculating LOD.<sup>22</sup> In the proposed sandwich ELISA the LOD was 0.59 ng/mL, value representing at least 1000 fold more sensitive than the value reported for the inhibition ELISA (0.5 µg/mL). This big difference in the detection limit between both ELISAs, could be determined by the use of MAb in sandwich ELISA, regarding the use of polyclonal antibodies (serum) in the ELISA inhibition. Moreover, if we consider that the MAb 4G3E11 used, has a high specificity and affinity constant for the antigen ( $3.13 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>13</sup>

The reproducibility and repeatability of the method, was evaluated by assay precision, which takes into account the maximum dispersion of data obtained for a sample processed several times, on different days and in different conditions. The inter-assay and intra-assay CVs were calculated for each point of the standard curve (50–0.39 ng/mL) as described Reyes F. *et al.*<sup>11</sup> Reproducibility and repeatability were in accordance with international recommendations, which define the acceptance criterion of pre-

cision for standard curves with values below 10% and 20 % for intra and inter-assay precision respectively.<sup>14</sup> These CV values obtained for inter and intra-assay were lower than those reported by Fajardo *et al.*<sup>8</sup> for inhibition ELISA (17-19.5% for inter assay and 16-19.8 % for intra assay). This result may be because, as mentioned above, in the inhibition ELISA, more steps are employed, including inhibition or neutralization step, compared with the sandwich ELISA. The use of larger number of steps, resulting in greater manipulation of the sample in the test by staff and therefore greater possibility of error, resulting in reproducibility.<sup>23</sup>

However, despite the high sensitivity and reproducibility of the proposed sandwich ELISA, was important to demonstrate the application of the assay, in quantify the amount of PsVi present in VaxTyVi<sup>TM</sup>, and it was done. Six lots of VaxTyVi<sup>TM</sup> were evaluated using the developed sandwich ELISA. All vaccines lots have an expected nominal label amount of 50 µg/mL of PsVi and all of concentrations obtained through sandwich ELISA, were within the accepted range ( $\pm 30\%$ ) of PsVi according to the European Pharmacopoeia guidelines.<sup>15</sup> The CVs were <4% compared to the acceptance criterion of <15% CV for immunoassays. In ELISA inhibition, the CV obtained were between 4.7% and 12.3% for an average of 7.7%, higher than the sandwich ELISA but also within the acceptance criteria.

Therefore, these assays can be used successfully for the quantitation of PsVi in typhoid polysaccharide vaccines, even in conjugated vaccines. In addition, using the proposed sandwich ELISA and taking into account their high sensitivity, these assays could be a useful tool to test free PsVi in conjugated vaccines, prior separation of the unbound Ps from conjugated-Ps in such vaccines. Free polysaccharide must be tested to ensure that the amount present is within the limits agreed by the regulatory authorities based on lots shown to be clinically safe and efficacious.<sup>17</sup>

In summary, the assay described here has been shown to be suitable for use in the quantitation of PsVi in VaxTyVi<sup>TM</sup>, with great potential to replace the inhibition ELISA, implanted in the Finlay Institute since 2006.

## Reference

- Romero, R., (2007). Microbiología y parasitología humana. Salmonella. Ed. Médica Panamericana. ISBN 6077743542.



2. WHO. (2014). Typhoid Fever. Available on Internet at: [http://www.who.int/topics/typhoid\\_fever/en/](http://www.who.int/topics/typhoid_fever/en/)
3. MINSAP, (2013). Anuario Estadístico de Salud. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Edición 42, Editorial MINSAP.
4. Riverón L., Cardoso D. y col. (2003). Vax-TyVi : Vacuna Cubana de Polisacárido Vi de Salmonella typhi. *Biotecnología Aplicada*; Vol.20, No.4
5. WHO Expert Committee on Biological Standardization. (2014). Guidelines on the quality, safety and efficacy of typhoid conjugate vaccines. WHO Technical Report Series No. 987, Sixty-fourth report. Annex 3
6. OMS. (2003) Manual de entrenamiento: concesión de licencias, liberación de lotes y disponibilidad de laboratorio. Vacunas y productos biológicos.
7. Voller A, Bidwell DR, Bartlett A. (1979). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe, Borough House, Guernsey GB.
8. Fajardo E., Delgado I., Riverón L., y col. (2006). Validación de un ELISA tipo inhibición para cuantificar polisacárido Vi en la vacuna antitifoidea cubana VaxTyVi\*. *VacciMonitor*, Año 15 No. 2
9. Crowther J. (2002). The ELISA Guidebook. *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*TM. Huangzhiman 2002.12.18.
10. Saydam, M., Rigsby, P. and Mawas, F., (2014) A novel Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) for the quantification of total and free polysaccharide in Haemophilus influenzae b-Tetanus toxoid conjugate vaccines in monovalent and combined vaccine formulations. *Biologicals* 42: 29-33
11. Reyes F. et al. (2014) Development of four sandwich ELISAs for quantitation of capsular polysaccharides from Neisseria meningitidis serogroups A, C, W and Y in multivalent vaccines. *Journal of Immunological Methods*. 11834; No of Pages 5.
12. Amin N. y col. (2015). Obtención de un anticuerpo monoclonal murino que reconoce al polisacárido capsular Vi de Salmonella Typhi. *VacciMonitor*. 24(2):57-63
13. González E. y col. (2015). Producción, purificación y caracterización del AcM contra polisacárido capsular Vi de Salmonella Typhi y su aplicabilidad en ensayos de identidad. *Revista BioProcesos*. Vol.1, No.3.
14. Ochoa RF. (2013). Técnicas inmunoenzimáticas en el desarrollo clínico de vacunas. Finlay Ediciones; p.3-13.
15. European Pharmacopoeia. (2002). Typhoid polysaccharide vaccine. 4th Edition, Version 4.2, 07/2002:1160.
16. CECMED. (2000). Requisitos para la liberación de lotes de vacunas. Regulación No.19.
17. World Health Organization. (2013). Guidelines on the quality, safety and efficacy of typhoid conjugate vaccines. Adopted by the 64th meeting of the WHO Expert Committee on Biological Standardization, 21-25 October.
18. Hestrin S. (1949). The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *Journal of Biological Chemistry*, 180:249-261.
19. Lemerclinier X. et al. (2000). Use and validation of an NMR test for the identity and O-acetyl content of the Salmonella typhi Vi capsular polysaccharide vaccine. *Biologicals*, 28:17-24.
20. Stone AL, Szu SC. (1988). Application of optical properties of the Vi capsular polysaccharide for quantitation of the Vi antigen in vaccines for typhoid fever. *Journal of Clinical Microbiology*, 26:719-725.
21. Micoli F et al. (2011). Vi-CRM 197 as a new conjugate vaccine against Salmonella Typhi. *Vaccine*, 29:712-720.
22. Armbruster DA. and Pry T. (2008). Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin Biochem Rev*. Vol 29 Suppl (i) August, S49
23. Bartlett JW. and Frost C. (2008). Reliability, repeatability and reproducibility: analysis of measurement errors in continuous variables. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31: 466-475.

**Recibido:** 19 de octubre de 2016.

**Aprobado:** 30 de noviembre de 2016.

## REVISIÓN / REVIEW

**Microalgae: An outstanding tool in nanotechnology****Microalgas: Una excelente herramienta en nanotecnología**Si Amar Dahoumane,<sup>1\*</sup> Mourad Mechouet,<sup>2</sup> Francisco J. Alvarez,<sup>1</sup> Spiros N. Agathos,<sup>1</sup> Clayton Jeffries.<sup>3\*</sup>

DOI. 10.21931/RB/2016.01.04.7

**ABSTRACT**

Microalgae are microorganisms of choice in biotechnology thanks to their wide range of potential bio-applications, such as over-expression of pigments, bioremediation, biofuel production and toxicity studies. Recently, microalgae have been gaining attention from material scientists worldwide owing to their versatility, and the ease and the variety of procedures through which the biosynthesis of valuable nanomaterials is implemented. This has resulted mainly in the production of nanoparticles made of noble metals, alloys, oxides and chalcogenides. Although still burgeoning, the biosynthesis of nanomaterials based on the exploitation of microalgal resources may thrive and witness dramatic developments in the near future.

**Keywords:** Microalgae, Nanobiotechnology, Biosynthesis, Nanomaterials, Sustainability, Photobioreactors.

**RESUMEN**

Las micro algas son organismos de elección en la biotecnología gracias a su amplia gama de potenciales bio-aplicaciones, como la sobre expresión de pigmentos, la biorremediación, la producción de biocombustibles y los estudios de toxicidad. Recientemente, las micro algas han estado ganando atención, a nivel mundial, de los científicos de materiales debido a su versatilidad, facilidad y la variedad de procedimientos a través de los cuales se implementa la biosíntesis de valiosos nanomateriales. Esto ha funcionado principalmente en la producción de nanopartículas hechas de metales nobles, aleaciones, óxidos y halógenos. Aunque sigue floreciendo, la biosíntesis de nanomateriales basada en la explotación de las micro algas estos procedimientos pueden prosperar y ser testigo de dramáticos acontecimientos en un futuro próximo.

**Palabras clave:** Microalgas, Nanobiología, Biosíntesis, Nanomateriales, Sustentabilidad, Fotobioreactores.

**Introduction**

Microalgae are generally single-celled, colonial or filamentous photosynthetic microorganisms belonging to several algal divisions, such as *Chlorophyta*, *Charophyta* and *Bacillariophyta*, and Kingdoms, such as Plantae, Chromista and Protozoa. Microalgae, except for the prokaryotic cyanobacteria, have a nucleus surrounded by a membrane and are therefore eukaryotes. Microalgae form a substantial part of the World's biodiversity. By some estimates, there are hundreds of thousands to millions of microalgal species, most of which have not been isolated or characterized.<sup>1,2</sup> Microalgae display a wide variety of shapes and sizes and can be found in different habitats, either aquatic or se-

mi aquatic, such as seas and lakes, rivers and swamps, polar areas and deserts.

Microalgae possess the ability to convert solar energy and CO<sub>2</sub> into high levels of lipids and secondary carotenoids in their biomass. This synthesis is carried out at ambient temperatures and pressures and in simple aqueous media at benign pH values. As a result, microalgae are emerging as important, cost-effective cell factories for the production of commercial products such as carotenoids<sup>3,4</sup> and fatty acids.<sup>5</sup> The conversion of algal lipids into biofuels is also a promising area of research.<sup>6</sup> Recently, the United States Department of Energy (2016) launched the MEGA-BIO program to investigate algae as a biofuel platform. To this end, several species of microalgae have already demonstrated the capacity to accumulate intracellular concentrations

<sup>1</sup>School of Biological Sciences and Engineering, Yachay Tech University, San Miguel de Urcoquí, Ecuador

<sup>2</sup>Laboratoire de Physique et Chimie des Matériaux, Université Mouloud Mammeri, Route de Hasnaoua, BP 17 RP 15000, Tizi-Ouzou, Algeria.

<sup>3</sup>Nanobiomaterials and Bioprocessing (NAB) Laboratory, Dan F. Smith Department of Chemical Engineering, Lamar University, Beaumont, TX, USA.

**Correspondencia:** SAD: sdahoumane@yachaytech.edu.ec

CJ: cjeffries@lamar.edu



of over 50% lipids on a dry cell weight basis under species-specific stresses such as nitrate<sup>7</sup> or silicon<sup>8</sup> limitation, while the carotenoid producer *Haematococcus pluvialis* has the ability to accumulate up to 5% of its biomass as astaxanthin, a valuable carotenoid.<sup>9</sup> Recent efforts have also used genetic engineering to enable the production of recombinant proteins,<sup>10</sup> even inducing gene expression by optogenetic control.<sup>11</sup>

A nanoparticle (NP) is an object with at least one dimension spanning from 1 nm to 200 nm. Several methodologies have been designed in order to produce inorganic nanomaterials of different compositions, shapes and sizes thus enabling the nanostructures to display interesting and valuable properties. Besides the physico-chemical routes,<sup>12,13</sup> biological processes have proved efficient in the biosynthesis of a large range of nanomaterials, such as oxides, chalcogenides and metallic NPs, using several resources, namely bacteria,<sup>14</sup> fungi,<sup>15</sup> plants<sup>16</sup> and algae.<sup>17,18</sup>

The aim of the present review is to provide the readership with some interesting facts about the exploitation of microalgae in the emerging field of inorganic nanoparticle synthesis using biological resources in which algae, in general, and microalgae, in particular, are gaining much more attention owing to their diversity, availability and physiological features.

### Production of metallic nanoparticles using microalgae

Among the community of nanomaterial scientists, several methodologies have been devised in order to implement the synthesis of metallic nanoparticles (Me-NPs) using microalgae starting from aqueous solutions of the corresponding salts. Authors tend to classify these methodologies according to arbitrary criteria. As the field is quite new, however, attracting new teams of scientists worldwide, this aspect is yet to be clarified. So far, researchers describe their findings as “intracellular” when the biosynthesis of the NPs occurs inside the cells and “extracellular” for the other occurrences even if their experimental setups do not involve cells directly but extracted biomass or biomolecules. In our opinion, the term “extracellular” may be used exclusively when whole, intact cells are involved for processes occurring outside them. If we refer strictly to the process itself, the biosynthesis of nanomaterials based on microalgae abilities can be categorized into four routes (Fig. 1): the first method resides in the exploitation of the extracted biomolecules, either identified and characterized or not, from disrupted cells of microalgae. This method was described within the first papers reporting on the use of microalgae in the field of nanobiotechnology; the second method consists in the use of supernatants devoid of cells, made of culture media from which the cells were removed but without being subjected to any treatment other than their recovery using centrifugation or filtration; the third method relies on harvested whole cells of microalgae, removed from their culture media and re-suspended in distilled water, to promote the biosynthesis of NPs of different natures; the last method relies on the use of living cells of microalgae maintained under their normal culturing conditions.

### Biosynthesis of NPs using extracted biomolecules from microalgae

In 2007, a Singaporean team extracted biomolecules from *Chlorella vulgaris*, a unicellular green microalga, in order to carry out the synthesis of Au-NPs<sup>19</sup> and Ag-NPs<sup>20</sup> via two distinct methodologies. To obtain gold nanoplates, the biomass of *C. vulgaris*, first lyophilized, was then subjected to reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) until the protein responsible for directing the shape of the NPs, coined GSP for Gold Shape-directing Protein, was isolated.<sup>19</sup> Depending on the amount of GSP brought into contact with an aqueous solution of 1 mM HAuCl<sub>4</sub>,<sup>14</sup> the reaction yields the production of mostly gold nanoplates in the shape of triangles, truncated triangles and hexagons, and a few spherical gold nanoparticles. In the case of Ag-NPs, low and high molecular weight proteins, PLW and PHW, respectively, contained in the biomass of *C. vulgaris*, were isolated using a dialysis membrane and tested for their ability to promote the reduction of cationic silver into its metallic counterpart.<sup>20</sup> As a result, only PHW were able to promote the biosynthesis of Ag-NPs, under the shape of spheres, nanodisks and triangular nanoplates, once challenged by an aqueous solution of AgNO<sub>3</sub> (Fig. 2-A).

The pigment C-phycoerythrin, either lab-extracted from *Limnospira* sp. or commercially purchase and isolated from *Spirulina*, has been shown to promote the biosynthesis of Ag-NPs starting from an aqueous solution of AgNO<sub>3</sub>.<sup>21</sup> Importantly, the reduction of cationic silver into its metallic counterpart occurs only under light, suggesting that this process is light-dependent. A similar trend has been observed when exopolysaccharides of the green microalga *Scenedesmus* sp. were used to implement the same synthesis.<sup>21</sup>

### Biosynthesis of Me-NPs using cell-free supernatants

Patel and colleagues reported on the exploitation of cell-free supernatants of several species of cyanobacteria and Chlorophyta for the biosynthesis of Ag-NPs starting from an aqueous solution of AgNO<sub>3</sub>.<sup>24</sup> Although the authors did not provide information regarding the NP features nor the nature of the biomolecules involved, the production of the Ag-NPs occurred only when the reaction media were exposed to light. This fact may suggest that the bio-chemical pathways leading to the appearance of Ag-NPs is light-driven. Besides the ability of harvested whole cells, Sudha et al. described the biosynthesis of Ag-NPs of 40-80 nm using the filtrate of the cyanobacterium *Microcoleus* sp.<sup>26</sup>

### Biosynthesis of Me-NPs using harvested whole cells of microalgae

This method, consisting in the use of harvested whole cells of microalgae for the biosynthesis of Me-NPs, is much easier to implement than the previous ones as the grown cells are harvested through centrifugation/washing cycles before being brought

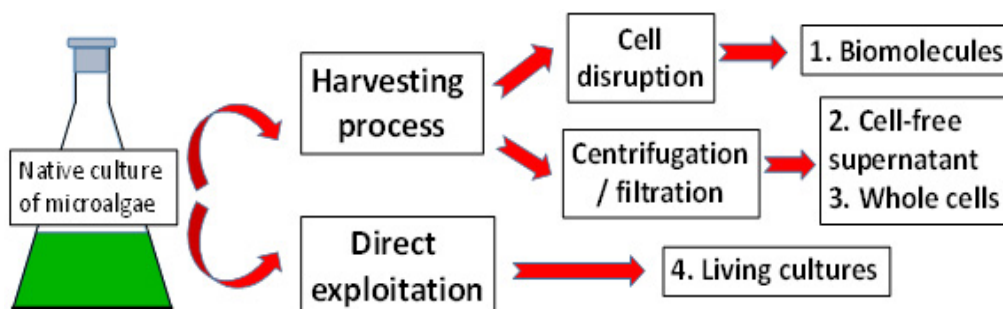


Fig. 1. Different methodologies devised for the exploitation of microalgae in the biosynthesis of nanomaterials.

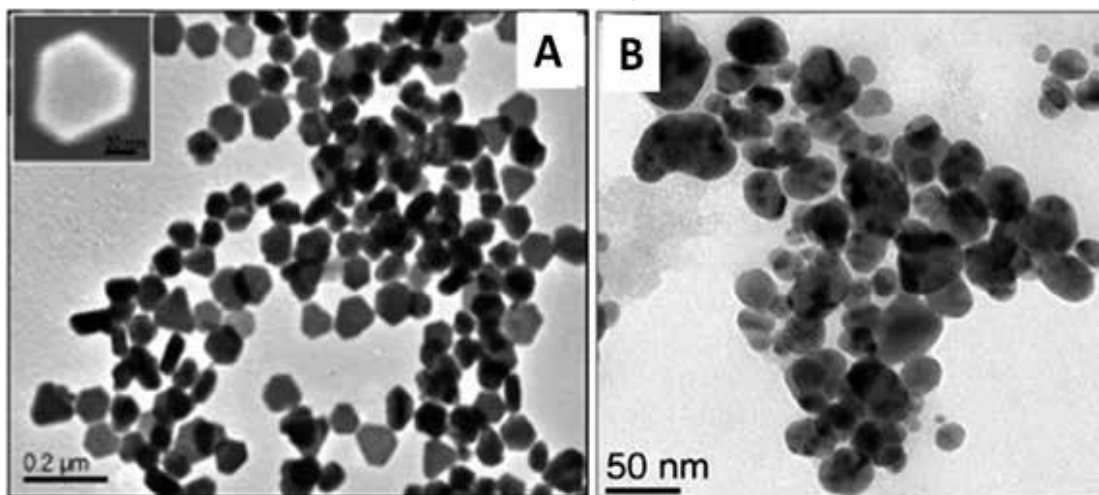
into contact with metallic salts. Even if the cells remain intact and do not suffer from any damage, they may lose their metabolic activity within hours as they are isolated from their growth media and re-suspended in distilled water, the latter medium constituting a stressful environment exposing them to high osmotic pressure.

For instance, whole cells of *Plectonema boryanum*, a filamentous cyanobacterium, proved efficient in promoting the production of Au-NPs,<sup>28</sup> Ag-NPs,<sup>29</sup> Pt-NPs<sup>30</sup> and Pd-NPs<sup>31</sup> when ex-

cells allow to affirm that the NP biosynthesis process is intracellular, independently of the targeted metal and the division of algae to which the species belongs, in a similar way to that reported for living cultures (vide infra).

### Biosynthesis of Me-NPs using microalgal living cultures

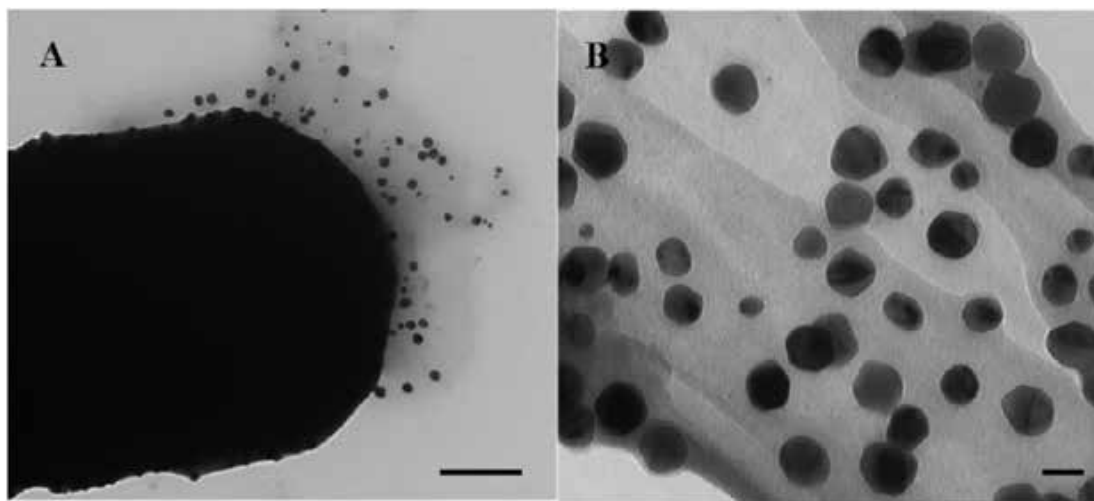
Among the microorganisms and other biological resources exploited so far, microalgae are the only entities that allow the design of photobioreactors for the sustainable and scalable pro-



**Fig. 2.** (A) TEM micrograph of Ag-NPs synthesized by PHW (Proteins of High molecular Weight) extracted from *Chlorella vulgaris*. Adapted with permission from Ref.20 Copyright (2007) American Chemical Society. (B) TEM micrograph of irregular Ag-NPs produced by *Amphora sp.* extract. Adapted with permission from Ref.23 Copyright (2015) Elsevier.

posed to the corresponding salts of these metals. The experiments were carried out at different temperatures for a certain amount of time. This yielded the appearance of a population of NPs displaying different shapes and different sizes. Importantly, the process occurs both on the surface of the cells and in solution (Fig. 3-A and B, respectively). However, in the absence of thin sections on the cells, it is impossible to either affirm that the process is partly intracellular or to deny it. Other species of cyanobacteria were successfully screened for their ability to promote the production of Ag-NPs<sup>24,32-35</sup> and Au-NPs.<sup>36-38</sup> Likewise, several species of green microalgae demonstrated the same capabilities and promoted the production of Ag-NPs<sup>24,25,39</sup> and Au-NPs.<sup>40,41</sup> Furthermore, harvested cells of *Euglena gracilis* and *Euglena intermedia* (Euglenozoa) carried out the biosynthesis of Ag-NPs<sup>22</sup> while those of *Navicula minima* (diatom) were used for the production of Au-NPs.<sup>36</sup> The studies that generated photonic pictures of the

duction of nanomaterials as the experiments are carried out at room temperature and atmospheric pressure, through a one-step process consisting in adding the aqueous solution of the corresponding salts directly to the cells maintained under their usual culturing conditions. On a fundamental point of view, these experiments may also allow to gain insights in the understanding of the underlying mechanisms that govern those processes while the cells are still alive and behave as whole biological entities.<sup>17,42</sup> Since the advent of this methodology a decade ago, cells belonging to more than a half-dozen of algal phyla have been tested for their ability to promote the production of Me-NPs. For instance, the cyanobacterial strains of *Anabaena flos-aquae*, *Calothrix pulvinata* and *Leptolyngbya foveolarum*, were able to implement the biosynthesis of nanoparticles of Au, Ag, Pt and Pd.<sup>43</sup> Once synthesized within the cells, the NPs are released into the culture media where they form stable colloids easing therefore their recovery.



**Fig. 3.** (A) TEM micrograph of a cell of *Plectonema boryanum* (cyanobacteria) incubated with an aqueous solution of PdCl<sub>2</sub> at 60 °C for 28 days and displaying Pd-NPs on its surface. (B) Pd-NPs in solution. Scale bars: 20 and 200 nm, respectively. Reprinted with permission from Ref.31 Copyright (2007) American Chemical Society.



The biosynthesis of Ag-NPs was reported using several species of microalgae belonging to *Cyanobacteria*,<sup>35</sup> *Haptophyta*,<sup>44</sup> *Ochrophyta*<sup>45</sup> and *Chlorophyta*<sup>44-46</sup> while the biosynthesis of Au-NPs was described using living cultures of *Bacillariophyta*, *Cyanobacteria*,<sup>47, 48</sup> *Euglenozoa*,<sup>49</sup> *Chlorophyta*<sup>46, 50, 51</sup> and *Charophyta*.<sup>52</sup> Moreover, the biosynthesis of bimetallic alloy NPs of silver and gold was implemented using microalgal strains of *Cyanobacteria*<sup>53, 54</sup> and *Chlorophyta*.<sup>46</sup>

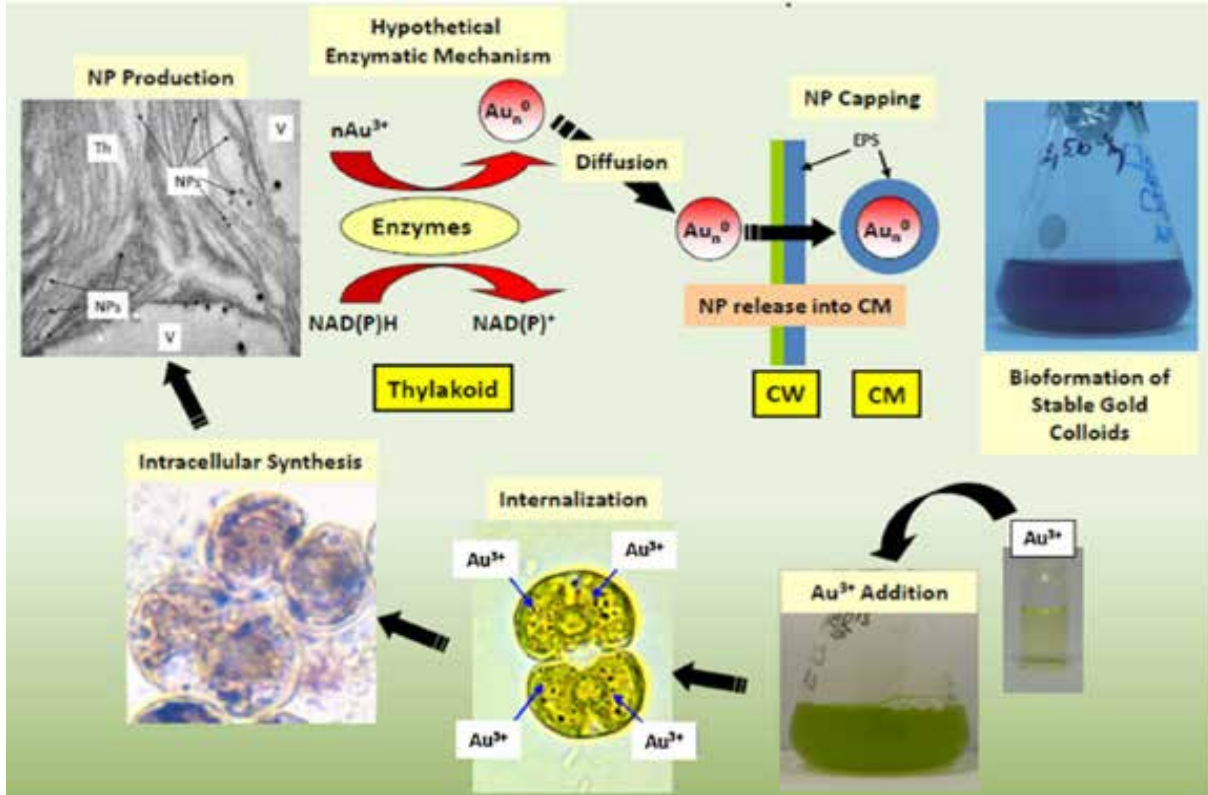
The biosynthesis of noble metal nanomaterials using living cultures of microalgae possesses very special and valuable features. The whole process is depicted in Fig. 4. Each cell – birthplace of the NPs owing to the presence of a complex photosynthetic enzymatic machine – seems to behave as a microscopic photosynthetic factory while the whole culture acts as a photobioreactor. As the biosynthesis process occurs within the cells, the NPs are, in their vast majority, spheres of a few nm in diameter with a narrow distribution in size.<sup>47</sup> On their path towards their release to the surrounding medium of the cells, they are wrapped within an organic matrix made of polysaccharides present within and on the cell surface.<sup>51, 55</sup> Once released into the supernatant, the NPs form stable colloids due to their capping biopolymers. These latter hinder the NPs from undergoing any alteration in shape and/or size. As a result, the colloids of the emergent NPs can be easily separated from the cells. The addition of fresh culture media will trigger the remaining still viable cells to multiply and allow a new cycle of biosynthesis to be carried out. Bearing in mind the fact that the cells can survive the toxicity of the metallic cations, they can also develop a resistance towards these same cations through mechanisms yet to be clarified, allowing them to handle higher concentrations of those chemicals.<sup>52</sup> Another key-feature of microalgae resides in the uptake of silver and gold salts without any predilection, leading thus to the formation of bimetallic alloy

NPs of well controlled compositions paving the way to very interesting future developments in the production of NPs of desired compositions.<sup>46, 53</sup> All these features make microalgae a biological resource of choice regarding the biosynthesis of nanomaterials. In addition to that, microalgae maintain their NP biosynthetic capabilities when entrapped within either an inorganic matrix<sup>56</sup> or organic capsules.<sup>57</sup>

### Biosynthesis of oxide- and chalcogenide-based nanoparticles using microalgae

Compared to the biosynthesis of noble metal NPs, only a handful of papers describe the biosynthesis of oxide- and chalcogenide-based nanomaterials using microalgae. For instance, living cultures of *Limnithrix planctonica*, *Synechococcus leopoldiensis* and *Pseudoanabaena limnetica* (cyanobacteria), proved efficient in removing mercury from their environment by adsorbing  $Hg^{2+}$  cations and, then, transforming them mostly to meta-cinnabar ( $\beta$ -HgS).<sup>58</sup> The phytochelatins (PCs) of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* were able to promote the fabrication of CdS-NPs through a two-step process: first, the PCs reacted with  $Cd^{2+}$ , resulting in the formation of PC-Cd complexes, which were then exposed to  $Na_2S$  leading to the fabrication of CdS-NPs. A similar process carried out with the pigment C-phycoerythrin, extracted from the cyanobacterium *Phormidium tenue*, yielded the production of CdS-NPs.<sup>59</sup> Harvested whole cells of *Spirulina* sp. (cyanobacterium) challenged with cadmium nitrate produced photoluminescent CdS-NPs displaying a photocatalytic activity.<sup>60</sup>

So far, the biosynthesis of iron-based nanomaterials has been implemented through the use of whole cells, either maintained in their culture media or removed, washed and re-suspended in distilled water. The first route involved the use of *Anabaena flos-aquae* and *Calothrix pulvinata* (cyanobacteria),<sup>61, 62</sup> and



**Fig. 4.** The hypothetical mechanism of the biosynthesis of Au-NPs by living cultures of microalgae. Reprinted with permission from Ref.51 Copyright (2014) Springer. First, gold cations are added into a fresh, healthy culture of microalgae. The salts are then internalized by the cells where they are reduced into metallic gold within the thylakoids (Th) through an enzymatic mechanism leading therefore to the formation of Au-NPs. Then, these NPs diffuse to the cell wall (CW) where they are capped by exopolysaccharides (EPS). Finally, the as-produced biohybrids (NPs-EPS) are released into culture media (CM) resulting in the formation of stable colloids.

*Klebsormidium flaccidum* (Charophyta) and yielded the apparition of nanorods of akaganeite (FeOOH).<sup>62</sup> On the other hand, the use of *Euglena gracilis* (Euglenozoa) induced the production of tiny spherical NPs of ferrihydrite.<sup>63</sup> Through the second route, cells of *Chlorococcum sp.*<sup>64</sup> (Chlorophyta) promoted the production of spherical iron NPs of 20-50 nm while those of *Chlorella sp.*<sup>65</sup> (Chlorophyta) ensured the bioformation of spherical NPs of metallic iron and iron oxide of 5-50 nm in size.

## Conclusion and perspectives

The present article reviews the biosynthesis of different nanomaterials using microalgae. It details the particular methodologies devised by materials scientists in concert with biologists and bioengineers resulting in the bioproduction of valuable nanomaterials. It also describes some important technical features regarding each process, opening the route towards the transformation of this technology from an empirical one to one based on well-understood principles and controlled parameters. It appears that microalgae, owing to their diversity and physiology, and the versatility of the designed processes, hold a special position within nanobiotechnology as not only do they possess the features of other microorganisms but they offer additional interesting advantages. This is why this field is expected to evolve tremendously in the near future. Indeed, microalgae offer different ways for their exploitation in the biosynthesis of nanomaterials either at the molecular scale or cellular level. Therefore, we expect the number of released papers in that field to increase and the described nanomaterials to diversify by, for instance, including more oxide- and chalcogenide-based ones, in addition to new metallic-based NPs.

## References

1. F. B. J. Metting, *J. Ind. Microbiol.*, 1996, 17, 477-489.
2. J. Sheehan, T. Dunahay, J. Benemann and P. Roessler, A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program—biodiesel from algae, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, USA, 1998.
3. M. A. Borowitzka, *J. Appl. Phycol.*, 2013, 25, 743-756.
4. M. A. Borowitzka, in *Single Cell Oils*, eds. C. Ratledge and Z. Cohen, AOCS Publishing, Urbana, IL, USA, 2010, pp. 225-240.
5. A. Mendes, A. Reis, R. Vasconcelos, P. Guerra and T. Lopes da Silva, *J. Appl. Phycol.*, 2008, 21, 199-214.
6. M. A. Borowitzka and N. R. Moheimani, *Algae for Biofuels and Energy*, Springer, New York, NY, USA, 2013.
7. L. Gouveia and A. C. Oliveira, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 36, 269-274.
8. C. Jeffries, J. Rosenberger and G. L. Rorrer, *Algal Res.*, 2013, 2, 16-27.
9. S. Boussiba, W. Bing, J.-P. Yuan, A. Zarka and F. Chen, *Biotechnol. Lett.*, 1999, 21, 601-604.
10. F. Hempel, J. Lau, A. Klingl and U. G. Maier, *PlosOne*, 2011, 6, e28424.
11. K. Abe, K. Miyake, M. Nakamura, K. Kojima, S. Ferri, K. Ikebukuro and K. Sode, *Microb. Biotechnol.*, 2014, 7, 177-183.
12. B. R. Cuenya, *Thin Solid Films*, 2010, 518, 3127-3150.
13. E. Boisselier and D. Astruc, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 38, 1759-1782.
14. T. Klaus-Joergler, R. Joergler, E. Olsson and C.-G. Granqvist, *Trend. Biotechnol.*, 2001, 19, 15-20.
15. K. B. Narayanan and N. Sakthivel, *Adv. Colloid. Interfac.*, 2010, 156, 1-13.
16. S. Iravani, *Green Chem.*, 2011, 13, 2638-2650.
17. S. A. Dahoumane, E. K. Wujcik and C. Jeffries, *Enzyme Microb. Tech.*, 2016, 95, 13-27.
18. S. A. Dahoumane, M. Mechouet, K. Wijesekera, C. D. M. Filipe, C. Sicard, D. A. Bazylnski and C. Jeffries, *Green Chem.*, DOI: 10.1039/c6gc02346k.
19. J. Xie, J. Y. Lee, D. I. C. Wang and Y. P. Ting, *Small*, 2007, 3, 672-682.
20. J. Xie, J. Y. Lee, D. I. C. Wang and Y. P. Ting, *ACS Nano*, 2007, 1, 429-439.
21. L. Castro, M. L. Blazquez, J. A. Munoz, F. Gonzalez and A. Ballester, *IET Nanobiotechnol.*, 2013, 7, 109-116.
22. Y. Li, S. Tang, W. Song, Z. Zhu, X. Liu, X. Yan, C. Jin and Q. Ren, *IET Nanobiotechnol.*, 2015, 9, 19-26.
23. J. Jena, N. Pradhan, B. P. Dash, P. K. Panda and B. K. Mishra, *J. Saudi. Chem. Soc.*, 2015, 19, 661-666.
24. V. Patel, D. Berthold, P. Puranik and M. Gantar, *Biotechnol. Report*, 2015, 5, 112-119.
25. I. Barwal, P. Ranjan, S. Kateriya and S. C. Yadav, *J. Nanobiotechnol.*, 2011, 9:56.
26. S. S. Sudha, K. Rajamanickam and J. Rengaramanujam, *Ind. J. Exp. Biol.*, 2013, 52, 393-399.
27. K. S. Uma Suganya, K. Govindaraju, V. Ganesh Kumar, T. Stalin Dhas, V. Karthick, G. Singaravelu and M. Elanchezhian, *Spectrochim. Acta A*, 2015, 144, 266-272.
28. M. F. Lengke, M. E. Fleet and G. Southam, *Langmuir*, 2006, 22, 2780-2787.
29. M. F. Lengke, M. E. Fleet and G. Southam, *Langmuir*, 2007, 23, 2694-2699.
30. M. F. Lengke, M. E. Fleet and G. Southam, *Langmuir*, 2006, 22, 7318-7323.
31. M. F. Lengke, M. E. Fleet and G. Southam, *Langmuir*, 2007, 23, 8982-8987.
32. M. Mahdieh, A. Zolanvari, A. S. Azimee and M. Mahdieh, *Sci. Ira. F.*, 2012, 19, 926-929.
33. L. Cepoi, L. Rudi, T. Chiriac, A. Valuta, I. Zinicovscaia, G. Duca, E. Kirkesali, M. Frontasyeva, O. Culicov, S. Pavlov and I. Bobrikov, *Can. J. Microbiol.*, 2015, 61, 13-21.
34. D. MubarakAli, M. Sasikala, M. Gunasekaran and N. Thajuddin, *Dig. J. Nanomater. Bios.*, 2011, 6, 385-390.
35. P. Roychoudhury, P. K. Gopal, S. Paul and R. Pal, *J. Appl. Phycol.*, DOI: 10.1007/s10811-016-0852-1.
36. N. Chakraborty, A. Banerjee, S. Lahiri, A. Panda, A. N. Ghosh and R. Pal, *J. Appl. Phycol.*, 2009, 21, 145-152.
37. D. Parial, H. K. Patra, A. K. R. Dasgupta and R. Pal, *Eur. J. Phycol.*, 2012, 47, 22-29.
38. D. Parial, H. K. Patra, P. Roychoudhury, A. K. Dasgupta and R. Pal, *J. Appl. Phycol.*, 2012, 24, 55-60.
39. J. Jena, N. Pradhan, R. R. Nayak, B. P. Dash, L. B. Sukla, P. K. Panda and B. K. Mishra, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 24, 522-533.
40. D. Parial and R. Pal, *J. Appl. Phycol.*, 2015, 27, 975-984.
41. S. Senapati, A. Syed, S. Moez, A. Kumar and A. Ahmad, *Mater. Lett.*, 2012, 79, 116-118.
42. C. Jeffries, S. N. Agathos and G. Rorrer, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2015, 33, 23-31.
43. R. Brayner, H. Barberousse, M. Hemadi, C. Djédjat, C. Yéprémian, T. Coradin, J. Livage, F. Fiévet and A. Couté, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2007, 7, 2696-2708.
44. D. D. Merin, S. Prakash and B. V. Bhimba, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2010, 3, 797-799.
45. M. Mohseniazar, M. Barin, H. Zarredar, S. Alizadeh and D. Shanebandi, *BioImpacts*, 2011, 1, 149-152.
46. S. A. Dahoumane, K. Wijesekera, C. D. Filipe and J. D. Brennan, *J. Colloid Interface Sci.*, 2014, 416, 67-72.
47. S. A. Dahoumane, C. Djédjat, C. Yéprémian, A. Couté, F. Fiévet, T. Coradin and R. Brayner, *J. Nanopart. Res.*, 2012, 14:883.
48. L. M. Rösken, S. Körsten, C. B. Fischer, A. Schönleber, S. van Smaalen, S. Geimer and S. Wehner, *J. Nanopart. Res.*, 2014, 16:2370.
49. S. A. Dahoumane, C. Yéprémian, C. Djédjat, A. Couté, F. Fiévet, T. Coradin and R. Brayner, *J. Nanopart. Res.*, 2016, 18:79.
50. T. Luangpipat, I. R. Beattie, Y. Chisti and R. G. Haverkamp, *J. Nanopart. Res.*, 2011, 13, 6439-6445.
51. S. A. Dahoumane, C. Yéprémian, C. Djédjat, A. Couté, F. Fiévet, T. Coradin and R. Brayner, *J. Nanopart. Res.*, 2014, 16:2607.
52. S. A. Dahoumane, C. Djédjat, C. Yéprémian, A. Couté, F. Fiévet, T. Coradin and R. Brayner, *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, 109, 284-288.
53. K. Govindaraju, S. K. Basha, V. G. Kumar and G. Singaravelu, *J. Mater. Sci.*, 2008, 43, 5115-5122.
54. P. Roychoudhury, S. Ghosh and R. Pal, *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, 2016, 25, 73-78.
55. A. Schröfel, G. Kratošová, M. Bohunická, E. Dobročka and I. Vávra, *J. Nanopart. Res.*, 2011, 13, 3207-3216.
56. C. Sicard, R. Brayner, J. Margueritat, M. Hémadi, A. Couté, C. Yéprémian, C. Djédjat, J. Aubard, F. Fiévet, J. Livage and T. Coradin, *J. Mater. Chem.*, 2010, 20, 9342-9347.
57. C. Spedaleri, C. Sicard, M. Perullini, R. Brayner, T. Coradin, J. Livage, S. A. Bilmes and M. Jobbágy, *J. Mater. Chem. B*, 2015, 3, 3189-3194.



58. D. D. Lefebvre, D. Kelly and K. Budd, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73, 243-249.
59. D. MubarakAli, V. Gopinath, N. Rameshbabu and N. Thajuddin, *Mater. Lett.*, 2012, 74, 8-11.
60. R. P. Mandal, S. Sekh, N. Sen Sarkar, D. Chattopadhyay and S. De, *Mater. Res. Express*, 2016, 3:055007.
61. S. A. Dahoumane, C. Djédiat, C. Yeprémian, A. Couté, F. Fiévet and R. Brayner, *Thin Solid Films*, 2010, 518, 5432-5436.
62. R. Brayner, C. Yeprémian, C. Djédiat, T. Coradin, F. Herbst, J. Livage, F. Fiévet and A. Couté, *Langmuir*, 2009, 25, 10062-10067.
63. R. Brayner, T. Coradin, P. Beaunier, J. M. Grenèche, C. Djédiat, C. Yeprémian, A. Couté and F. Fiévet, *Colloid. Surface. B*, 2012, 93, 20-23.
64. V. Subramaniyam, S. R. Subashchandrabose, P. Thavamani, M. Megharaj, Z. Chen and R. Naidu, *J. Appl. Phycol.*, 2015, 27, 1861-1869.
65. V. Subramaniyam, S. R. Subashchandrabose, V. Ganeshkumar, P. Thavamani, Z. Chen, R. Naidu and M. Megharaj, *Bioresour. Technol.*, 2016, 211, 698-703.

**Recibido:** 10 de septiembre de 2016.

**Aprobado:** 20 de noviembre de 2016.

## REVISIÓN / REVIEW

## Purificación y caracterización de la ficocianobilina

### Purification and characterization of phycocyanobilin

Alexey Llopiz<sup>1, a</sup>, Ariadna Milián<sup>2, a</sup>, Gabriela Díaz Domínguez<sup>3, b</sup>

DOI. 10.21931/RB/2016.01.04.8

**RESUMEN**

La ficocianobilina es el grupo prostético de las ficobiliproteínas C-ficocianina y Aloficocianina, las que se encuentran presentes en las algas verde-azules. Entre las estrategias empleadas para la purificación de este pigmento tetrapirrólico se encuentra la extracción de las proteínas y posterior ruptura del enlace tioéter, mediante el que está unido las cadenas polipeptídicas. Posteriormente se lleva a cabo el proceso de extracción con un solvente orgánico y la purificación basada en la cromatografía en placa, en *batch* o columna. La caracterización de esta molécula implica métodos cromatográficos, espectroscópicos y la determinación de la actividad antioxidante. En esta revisión presentamos un resumen de las estrategias de purificación empleadas para la obtención de este pigmento, así como los métodos de caracterización fundamentales. Adicionalmente comentamos sobre posibles estrategias que se pudieran emplear para la obtención de preparaciones de la PCB con elevadas purezas, que puedan ser empleadas para la evaluación de sus propiedades potenciales en la industria biofarmacéutica.

**Palabras clave:** ficocianobilina, tetrapirrol, grupo-prostético, ficobiliproteínas.

**ABSTRACT**

Phycocyanobilin is a prosthetic group of phycobiliproteins named C-phycocyanin and allophycocyanin, which are located in blue-green alga. Purification of PCB implies protein extraction, thioether bond rupture and extraction in organic solvent followed by separation on chromatographic system. Characterization of PCB is accomplished through chromatographic analysis, spectroscopic techniques and antioxidant capacity determinations. In this review, we present different strategies for PCB purification as well as many methods used for pigment characterization. Also, we propose some procedures to obtain this molecule from cellular as starting material to produce PCB in enough quantity to evaluate its biological potential in biopharmaceutical industry.

**Keywords:** malaria, invasion, esporozoíto, merozoíto, Plasmodium.

**Introducción**

La ficocianobilina es el pigmento tetrapirrólico que constituye el grupo prostético de la C-ficocianina (CPC) y la Aloficocianina (APC). Estas proteínas son constituyentes de los ficobilisomas presentes en las algas verde-azules<sup>1</sup> y han sido asociadas a propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras y citoprotectoras.<sup>2-6</sup> Adicionalmente se ha demostrado que muchas de estas propiedades biológicas están asociadas al sistema tetrapirrólico que está presente en estas proteínas como grupo prostético.<sup>2,7,8</sup> Presumiblemente la acción de la PCB está relacionada con la inhibición de la enzima NADPH oxidasa y con su capacidad antioxidante.<sup>2,9,10</sup> Adicionalmente debido a sus propiedades físico-químicas es posible que esta molécula pueda ejercer su acción traspasando la membrana hemato-encefálica, por

lo que potencialmente podría ser un producto con aplicaciones en el tratamiento de la isquemia cerebral.<sup>7,11</sup>

Los métodos descritos para la purificación y caracterización de la PCB implican la extracción previa de las ficobiliproteínas en las que está contenido este grupo prostético. Posteriormente el pigmento es liberado de la estructura polipeptídica mediante el tratamiento con ácido concentrado o reflujo con un alcohol.<sup>12,13</sup> La extracción posterior se realiza con solventes orgánicos como cloroformo o diclorometano debido a la solubilidad del pigmento en estos sistemas. Finalmente, el proceso de purificación puede implicar un método cromatográfico ya sea en placa, *batch* o columna.<sup>14</sup> Una alternativa que emplea herramientas biotecnológicas está asociada a la co-expresión de las enzimas involucradas en la modificación del grupo hemo a Biliverdina (BV) y posteriormente a PCB.<sup>9</sup> El organismo

<sup>1</sup> Licenciado en Bioquímica. Máster en Biotecnología Mención Investigación de nuevos productos.

<sup>2</sup> Técnico en Química Industrial.

<sup>3</sup> Licenciada en Bioquímica y Biología Molecular.

<sup>a</sup> Departamento de Ciencias Químicas. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Universidad de Las Américas. Quito. Ecuador.

<sup>b</sup> Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana. Cuba.

**Correspondencia:** Dirección: José Queri, Quito 170137, Ecuador. Correo electrónico: alexey-llopiz@outlook.com y a.llopiz@udlanet.ec.



que se utiliza para la expresión heteróloga de estas enzimas es la bacteria *Escherichia coli*. La estrategia descrita involucra la obtención del pigmento en su forma libre, por lo que el proceso de purificación comenzaría con la ruptura celular y la extracción con un solvente orgánico del pigmento, así como su posterior separación cromatográfica.

Por otra parte, las técnicas analíticas empleadas para la caracterización de la PCB comprenden métodos cromatográficos,<sup>9</sup> entre los que se encuentran la RP-HPLC y la TLC. El análisis espectroscópico se lleva a cabo mediante espectroscopía UV-visible (UV-vis), fluorescencia,<sup>13</sup> Infrarojo (IR),<sup>15</sup> Espectrometría de Masas (MS)<sup>1,9,12</sup> y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).<sup>16</sup>

Aunque en la literatura científica se han reportado algunas metodologías para la purificación de la ficocianobilina han sido con fines analíticos. De tal forma estas resultan ser trabajosas y difícilmente escalables. También en su mayoría utilizan como materia de partida las ficobiliproteínas (al menos parcialmente purificadas) en lugar de las células de las algas verde-azules donde está contenido este pigmento.

En este trabajo realizamos un análisis sobre los principales métodos descritos para la obtención y caracterización del pigmento ficocianobilina. También se hace énfasis en algunas estrategias que se pudieran desarrollar para su obtención a partir de las células o de preparaciones de ficobiliproteínas con purezas bajas.

## Métodos

Las estructuras químicas obtenidas del Pubchem17 fueron visualizadas y/o analizadas con el programa PC3D (Jandel Scientific, Corte Madera, CA, USA) y las obtenidas del PDB con el programa UCSF Chimera.<sup>18</sup> Las comparaciones de las secuencias de proteínas se realizaron con las aplicaciones BLAST, Smart-BLAST<sup>19</sup> y CLUSTAL OMEGA.<sup>20</sup>

## La ficocianobilina es el grupo prostético de las ficobiliproteínas presentes en *Arthrospira platensis*

La C-ficocianina y la A-ficocianina son las ficobiliproteínas que forman parte del aparato fotosintético de la cianobacteria *Arthrospira platensis*.<sup>15</sup> Estos polipéptidos (CPC/APC) son constituyentes de los ficobilisomas de este microorganismo, y se encuentran aproximadamente en una proporción de 10:1 formando estructuras dodecaméricas y hexaméricas, respectivamente.<sup>21,22</sup> Ambas ficocianinas tienen unido el cromóforo ficocianobilina (PCB) a cisteínas específicas mediante un enlace tioéter. Lemberg (revisado en el trabajo de OHEOCHA<sup>13</sup>) demostró que la PCB se une de forma covalente a la cadena polipeptídica y que su estructura es semejante a la de un pigmento tetrapirrólico. De hecho, este fue erróneamente identificado como mesovioliverdina.<sup>13,23</sup>

La posición de cada cromóforo fue determinada mediante estudios estructurales<sup>24</sup> y el sitio de unión entre el cromóforo y la proteína por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).<sup>23</sup> Para la CPC de *A. platensis* los sitios de unión son las cisteínas 84 de la cadena alfa, y las 82 y 153 de la cadena beta. La posición de unión del cromóforo en esta proteína es un sitio altamente conservado, de acuerdo al análisis realizado con la aplicación CLUSTAL OMEGA<sup>20</sup> (Figura 1).

El alineamiento múltiple de secuencia se realizó con los resultados obtenidos del BLAST<sup>19</sup>, que tuvieron al menos un 70 % de identidad con cada una de las estructuras correspondientes a las cadenas de la CPC. Adicional a las posiciones correspondientes de las cisteínas donde se une el grupo prostético PCB, también existen otras regiones de estas proteínas que son altamente conservadas (Figura 2). Presumiblemente esto pudiera estar relacionado con el mantenimiento de la estructura tridimensional que caracteriza a cada una de las cadenas de la CPC.

La comparación de las dos cadenas de la CPC indica un grado de similitud estructural a nivel de estructura primaria de un 28 % (Figura 2A). La diferencia entre ambas cadenas polipeptídicas está dada por inserciones en la cadena beta, en relación a la

### Cadena\_alfa\_CPC

```
sp|P00308|PHCA1_SYNP6
sp|Q5N459|PHCA2_SYNP6
tr|L8LZG7|L8LZG7_9CYAN
tr|K9Z7Q5|K9Z7Q5_CYAAP
tr|A0A0D6ADX6|A0A0D6ADX6_9CHRO
tr|A0A0D6AUG3|A0A0D6AUG3_9CHRO
sp|P20776|PHCA_SYNY1
```

```
YSKFPYTTSTPGNNFASTPEGKAKCARDIGYLLRIVTYALVAGGTGPIDEYLLAGLDEIN
YSKFPYTTSTPGNNFASTPEGKAKCARDIGYLLRIVTYALVAGGTGPIDEYLLAGLDEIN
YSKFPYTTSTPGNSYASTPEGKAKCSRDIGYLLRMVYTYCLISGGTGPMDEYLIAGLDEIN
YKFFPYPYTTSTPGNSYASTPEGKAKCARDIGYLLRMVYTYCYVAGGTGPMDEYLIAGIDEIN
YSKFPYTTTTPGANFASATAEGKAKCSRDIGYLLRMVYTYCLVAGGTGPMDEYLIAGIDEIN
YSKFPYTTTTPGANFASATAEGKAKCSRDIGYLLRMVYTYCLVAGGTGPIDEYLIAGIDEIN
YKFFPYPYTTTTPGANFASATAEQGKAKCSRDIGYLLRMVYTYCLVAGGTGPIDEYLIAGIDEIN
* * *: * * :: * * ** **::: * * : * : .***: * * : * * *
```

### Cadena\_beta\_CPC

```
tr|A0A0S3TNS2|A0A0S3TNS2_9CYAN
tr|A0A0D6YLF6|A0A0D6YLF6_MASLA
tr|A0A0M0SQT8|A0A0M0SQT8_9CYAN
tr|V5V5E1|V5V5E1_9CHRO
tr|Q71RW8|Q71RW8_THEVL
sp|P50033|PHCB_THEEB
tr|K9RWE6|K9RWE6_SYNP3
tr|K9SCQ3|K9SCQ3_9CYAN
tr|K9VZU9|K9VZU9_9CYAN
```

```
FEEQPQLISPGGNAYTNRMAACL RDMEIILRYVYTYAILAGDASVLLDDRCLNGLRETYQA
FEEQPQLISPGGNAYTNRMSACL RDMEIILRYVYTYAILAGDASVLLDDRCLNGLRETYQA
FEEQPQLISPGGNAYTNRMSACL RDMEIILRYVYTYAILAGDASVLLDDRCLNGLRETYQA
FAEQPQLIQPGGNAYTNRMAACL RDMEIILRYVYTYAILAGDSSVLLDDRCLNGLRETYQA
FAEQPQLIQPGGNAYTNRMAACL RDMEIILRYVYTYAILAGDSSVLLDDRCLNGLRETYQA
FAEQPQLIQPGGNAYTNRMAACL RDMEIILRYVYTYAILAGDSSVLLDDRCLNGLRETYQA
FAEQPQLIQPGGNAYTNRMAACL RDMEIILRYVYTYAILAGDSSVLLDDRCLNGLRETYQA
FEEQPQLIQPGGNAYTSRMAACL RDMEIILRYVYTYATMAGDSSVLLDDRCLNGLRETYQA
FEDQPQLIQPGGNAYTNRMAACL RDMEIILRYVYTYATIAGDSSVLLDDRCLNGLRETYQA
* * : * * ** ** * ** * *: * *: * * : * * : * * * ** *
```

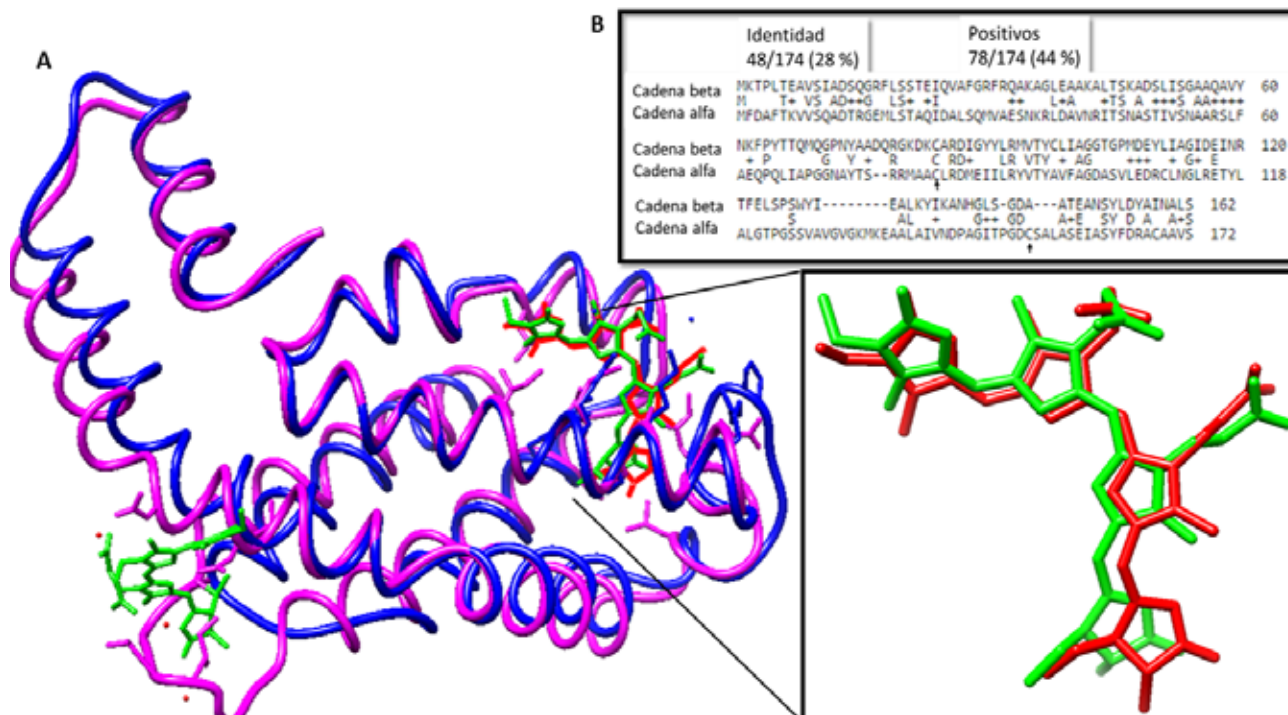
```
tr|A0A0S3TNS2|A0A0S3TNS2_9CYAN
tr|A0A0D6YLF6|A0A0D6YLF6_MASLA
tr|A0A0M0SQT8|A0A0M0SQT8_9CYAN
tr|V5V5E1|V5V5E1_9CHRO
tr|Q71RW8|Q71RW8_THEVL
sp|P50033|PHCB_THEEB
tr|K9RWE6|K9RWE6_SYNP3
tr|K9SCQ3|K9SCQ3_9CYAN
tr|K9VZU9|K9VZU9_9CYAN
```

```
LGTPGSSVAVGVQKMK EA AIN IANDPNGITKGDCSALMSEVASYFDRAAAA VAV
LGTGSSVAVGVQKMK EA AAVGIANDPNGITKGDCSALMSEVASYFDRAAAA VAV
LGTGSSVAVAVIQKMKDA AIAIANDPNGITGDCSALMSEIAGYFDRAAAA VAV
LGTGSSVAVAVIQKMKDA AIAIANDPNGITGDCSALMSEIAGYFDRAAAA VAV
LGTGSSVAVAVIQKMKDA AIAIANDPNGITGDCSALMSEIAGYFDRAAAA VAV
LGTPGSSVAVAVIQKMKDA AIAIANDPNGITGDCSALMSEIAGYFDRAAAA VAV
LGTGSSVAVAVIQKMKDA AIAIANDPNGITGDCSALMSEIAGYFDRAAAA VAV
LGTGSSVAVAVIQKMKDA AIAIANDPNGITGDCSALMSEIAGYFDRAAAA VAV
LGTGSSVAVAVIQKMKDA AIAIANDPNGITGDCSALMSEIAGYFDRAAAA VAV
LGTGSSVAVAVIQKMKDA AIAIANDPNGITGDCSALMSEIAGYFDRAAAA VAV
** ** * . . . : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :
```

Fig. 1. Fragmentos de los resultados obtenidos del análisis de "alineamiento múltiple de secuencia" con el CLUSTAL OMEGA de varias secuencias aminoácidas de la C-ficocianina. Las cisteínas donde está presente el enlace tioéter se señalan con flechas.

estructura de la cadena alfa. Estas inserciones implican dos regiones específicas: 73–74 y 146–155. Este cambio de la secuencia en las dos cadenas presumiblemente está asociado a la acomodación de otro cromóforo en la cadena beta.<sup>21</sup>

La estructura está conformada por dos grupos carboxilos y adicionalmente contiene varias insaturaciones conjugadas, las que probablemente están relacionadas con sus propiedades antioxidantes.<sup>26</sup> También están presentes los grupos aminas en los

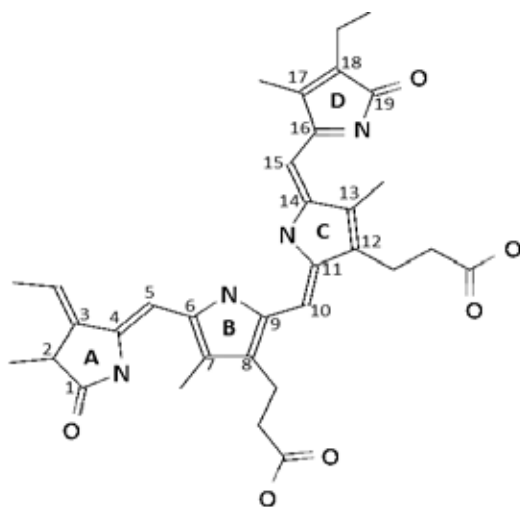


**Fig. 2.** Comparación de las estructuras de las cadenas alfa y beta de la CPC de *A. platensis*. A) Alineamiento de las secuencias de las cadenas alfa y beta de la CPC. El cromóforo se une en las posiciones 84 de la cadena alfa, y en las 82 y 153 de la cadena beta. B) Superposición de las estructuras tridimensionales de las cadenas alfa (azul) y beta (magenta) de la CPC. En la ampliación de la superposición de la estructura de los cromóforos de la cadena alfa (mostrado en rojo) y de la cadena beta (mostrado en verde) se observa que ocupan básicamente la misma posición espacial. Las estructuras fueron obtenidas del Protein Data Bank<sup>25</sup> (1GHO).

Las dos cadenas de la CPC también son conservadas en relación a sus estructuras tridimensionales (Figura 2B). Incluso en el contexto del posicionamiento del grupo prostético en la cadena polipeptídica existe una elevada complementariedad (ampliación en Figura 2B).<sup>21</sup>

### Estructura de la ficocianobilina

La ficocianobilina corresponde a la de un sistema conjugado formado por cuatro anillos pirrólicos, denotados por las letras A-D. Para esta estructura pueden existir dos estereoisómeros (Z y E) en la posición 3 (Figura 3, PubChem CID 6438349).



**Fig. 3.** Estructura de la ficocianobilina, el grupo prostético de las ficobiliproteínas C-ficocianina y aloficocianina. El sistema tetrapirrólico está conformado por cuatro anillos (A, B, C y D) que dan lugar a un compuesto con insaturaciones conjugadas.

anillos centrales (B y C) y amidas en los ubicados en los extremos (A y D). La unión del cromóforo y cada cisteína de las cadenas polipeptídicas ocurre en el C3' del anillo A.<sup>27,28</sup>

### Purificación de la ficocianobilina

El proceso de purificación de la ficocianobilina depende del material de partida del que se extraerá este pigmento. Sin embargo, este se obtiene mayoritariamente de preparaciones de ficobiliproteínas con diferentes grados de pureza.<sup>1,13,29,30</sup> Cuando la PCB es obtenida a partir de la proteína al menos parcialmente purificada, se eliminan sustancias orgánicas poco solubles en el medio acuoso empleado para la extracción de las proteínas. Una alternativa a este material de partida sería obtener el pigmento directamente a partir de las células en las que se encuentra contenido la PCB, lo cual está poco descrito en la literatura científica. En este caso también se realizaría el proceso de extracción de las proteínas en un medio acuoso. Posteriormente las proteínas se pudieran precipitar con sulfato de amonio<sup>31</sup> o medio ácido y lavar el material insoluble con un solvente orgánico, previo al proceso de liberación del pigmento de la cadena polipeptídica, el que implica calentamiento a temperaturas sobre los 40 °C.<sup>14</sup> Contrariamente si el proceso se llevara a cabo con un solvente orgánico (como un alcohol) y calentamiento, este disgrega la estructura de la membrana citoplasmática y extrae todos los compuestos que sean solubles en este medio.

### Ruptura del enlace tioéter

La ficocianobilina fue obtenida por primera vez, por Lemberg en 1930, a partir de la liberación de la cadena polipeptídica de la CPC mediante calentamiento de esta proteína con ácido clorhídrico concentrado a 80 °C en ausencia de aire. Aunque este constituye un método establecido para la obtención de este pigmento, se debe tener en cuenta que el tratamiento con ácido con-



centrado produce diferentes estructuras, en función del tiempo de tratamiento y la concentración del ácido.<sup>13</sup> Otro procedimiento empleado para la obtención de PCB es el reflujo de HBr en una solución de CPC/ TFA1.

En 1962 Fujita y Hattori informaron que este tetrapirrol puede ser obtenido por reflujo de la ficobiliproteína con metanol neutro.<sup>23</sup> La reacción de metanólisis puede ser optimizada al realizarla a 40 °C en la oscuridad y en presencia de cloruro mercúrico. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las sales mercúricas son sustancias con toxicidad comprobada. Esta reacción de alcoholólisis también puede ocurrir con otros solventes como el etanol o el 1-butanol.<sup>32</sup> Debido a que las ficobiliproteínas en las que se encuentran la PCB como grupos prostéticos son poco solubles en alcoholes y a la naturaleza del enlace tioéter, las reacciones de alcoholólisis se deben llevar a cabo a temperaturas cercanas al punto de ebullición del alcohol, con reflujo y/o agitación.<sup>14</sup>

Adicionalmente existen estrategias para la obtención del grupo prostético en el contexto de una estructura peptídica. Estas implican el tratamiento de las proteínas con enzimas proteolíticas como subtilisina,<sup>14</sup> pepsina<sup>33</sup> y tripsina.<sup>23,34,35</sup>

### Obtención mediante métodos biotecnológicos

La PCB también ha sido obtenida en *E. coli* por la co-expresión de la hemo-oxigenasa. Esta enzima está relacionada con la formación del pigmento BV a partir del grupo hemo. Posteriormente este pigmento es reducido para dar lugar a la PCB, proceso catalizado por la enzima ficocianobilina:ferredoxina oxidoreductasa.<sup>36-38</sup> Los resultados de Ge *et al.* están relacionados específicamente con la obtención de la PCB libre por vía recombinante.<sup>9</sup> Luego de la obtención del pigmento en *E. coli*, este es extraído con metanol y posteriormente purificado mediante RP-HPLC. La pureza obtenida fue de un 95 % (de acuerdo al análisis mediante RP-HPLC en condiciones analíticas) y un rendimiento final aproximado de 0.3 mg de PCB/L de cultivo. Aunque el objetivo de esta revisión está relacionado con la obtención de la PCB, cabe mencionar que también existen estrategias que implican la formación de las estructuras proteicas que contienen el pigmento unido de modo covalente.<sup>39</sup>

### Extracción de la ficocianobilina con solventes orgánicos

Aunque las ficobiliproteínas son estructuras hidrosolubles, la solubilidad en agua del pigmento liberado luego de la ruptura del enlace tioéter es relativamente baja. Sin embargo, la solubilización de la PCB en solventes orgánicos es posible,<sup>9</sup> en especial si el diácido obtenido se esterifica con un alcohol como el metanol.<sup>14</sup> Entre las fases orgánicas más empleadas para la extracción del pigmento se encuentran el diclorometano, 1-butanol y cloroformo.<sup>19,13</sup> Los sistemas más empleados para la obtención de las dos fases (orgánica y acuosa) implica el uso de embudos separadores para la recuperación de la fase orgánica componente de la molécula de interés. Por otro lado, si se desea acelerar el proceso de formación de las dos fases se pudiera realizar mediante centrifugación.

### Purificación mediante métodos cromatográficos

La ficocianobilina y sus derivados pueden ser separados mediante cromatografía en gel de sílica con una fase móvil isocrática conformada por una mezcla de solventes como benceno/acetato de etilo/agua en una proporción 80/20/0.13 (v/v).<sup>14</sup> La separación implica dos isómeros del éster metílico de la PCB, así como el aducto formado con el metanol. Estas separaciones se pueden realizar en dos modos: (1) cromatografía en placa delgada (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) o (2) mediante cromatografía líquida (LC, del inglés *Liquid Chromatography*) en una columna pre-empacada o en batch. Adicionalmente se pudieran emplear otros sistemas que implican cromatografía líquido-líquido (CC, del inglés *Countercurrent Chromatography*).<sup>40</sup>

Otra de las técnicas empleadas para la purificación de la fi-

cocianobilina implica el uso de la cromatografía en fase reversa (RP). En este sistema generalmente se emplean columnas de C18 y las fases móviles pueden estar conformadas por solventes orgánicos como el metanol, acetonitrilo,<sup>9</sup> acetona,<sup>41</sup> etanol/ácido acético.<sup>16</sup>

### Estrategias generales para la purificación de la ficocianobilina a partir de células de *A. platensis*

La mayoría de los procedimientos descritos para la purificación de ficocianobilina a partir de fuentes naturales no permiten obtener grandes cantidades de este pigmento. Este hecho está relacionado con dos elementos fundamentales: (1) la proporción de la PCB en el sistema natural del que se extrae y (2) difícil escalabilidad de los procedimientos establecidos.

El proceso de purificación de la ficocianobilina tiene una serie de etapas (Figura 4) que comienzan con la extracción del sistema celular en el que está contenido este pigmento. La mayoría de las estrategias implican la purificación de las ficobiliproteínas como un paso previo a la liberación del pigmento de la fracción polipeptídica. Posteriormente se emplean varios pasos de extracción en dos fases inmiscibles y/o procesos cromatográficos. Sin embargo, estos procedimientos se han realizado en su mayoría con la finalidad de estudios estructurales y/o funcionales de la ficocianobilina.

En la literatura científica están escasamente descritas las estrategias adecuadas para la obtención de este pigmento a partir de células de cianobacterias o algas. Una alternativa muy conveniente para la purificación de la PCB implicaría la ruptura celular en un medio acuoso y ácido (TFA, TCA, HCl, etc.), en el que se extraerían algunas proteínas (y otras podrían precipitar). De esta forma, a la vez se propiciaría la ruptura del enlace tioéter, y la liberación correspondiente de la PCB (Figura 4). Alternativamente se pudieran romper las células en un medio acuoso y precipitar las proteínas extraídas en un medio salino o ácido. Posteriormente se lavarían con metanol para eliminar contaminantes de naturaleza orgánica, como la clorofila y otros pigmentos que se solubilizan a temperatura ambiente. Sólo al calentar a temperaturas sobre los 40 °C se favorecería el proceso de ruptura del enlace tioéter y la liberación del pigmento de interés.<sup>14</sup> Si el proceso de obtención del pigmento se lleva a cabo por vía biotecnológica entonces no se tendría que llevar a cabo el proceso de metanólisis, ya que esta molécula se obtendría en un modo no conjugado.<sup>9</sup>

Una vez ocurrido el proceso de metanólisis los componentes proteicos se obtendrían como un precipitado luego de centrifugar. En el material soluble estaría presente la PCB, junto a contaminantes que deben ser eliminados mediante extracción en sistemas líquidos bifásicos. Otro elemento asociado a este proceso debe ser un paso cromatográfico. Entre las alternativas más adecuadas se encuentran las cromatografías líquidas ya sean en fase normal (gel de sílica)<sup>14</sup> o en fase reversa (RP).<sup>9</sup> También pudieran realizarse procesos cromatográficos que impliquen partición entre dos fases líquidas (estacionaria y móvil), así como separaciones en placas delgadas (TLC).<sup>42</sup>

### Caracterización de la ficocianobilina Métodos cromatográficos

La cromatografía en fase reversa (RP-HPLC) es el método cromatográfico fundamental para la caracterización de las preparaciones de PCB.<sup>12,16,41</sup> Esta técnica permite la separación de productos con elevada similitud estructural con la PCB, entre los que se encuentran la BV y el aducto PCB-metanol. Otras de las alternativas cromatográficas que pueden tener aplicaciones analíticas es la configuración en placa delgada (TLC).<sup>42</sup>

### Métodos espectroscópicos

Debido a la presencia del sistema de enlaces múltiples conjugados, este pigmento presenta un máximo absoluto de absorción alrededor de los 360 nm y un máximo relativo cerca de los



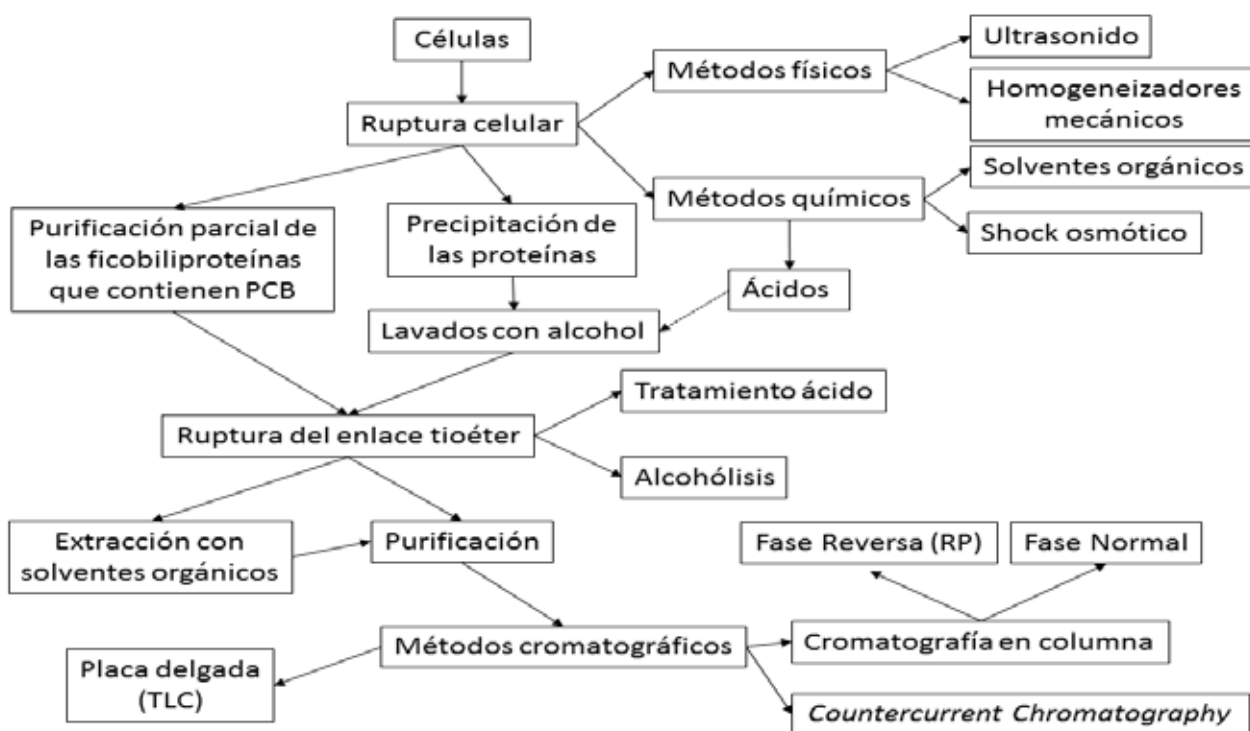


Fig. 4. Estrategia general para la extracción y purificación de la ficocianobilina a partir de células de cianobacterias y algas.

620 nm. Sin embargo, se debe mencionar que el micro-entorno en el que se encuentra el pigmento determina el máximo de absorción absoluto.<sup>1</sup> Cuando está formando parte de la CPC este valor se encuentra alrededor de los 620 nm, pero si el sitio donde se encuentra unida es en la APC el máximo de absorción tiene un corrimiento hasta los 650 nm. El espectro de fluorescencia de la PCB muestra un máximo de emisión alrededor de los 678 nm, el cual se desplaza hasta un valor de 633 nm en presencia de cinc.<sup>13</sup>

El espectro IR de la ficocianobilina presentó un máximo en 3470  $\text{cm}^{-1}$ , lo que indica la presencia de grupos hidroxilos en la estructura. La señal a 1462  $\text{cm}^{-1}$  es indicativa del grupo carbonilo, el cual se encuentra en forma de ácidos carboxílicos y amidas. La señal a 1461  $\text{cm}^{-1}$  está asociada al grupo isopropililo y la de 850  $\text{cm}^{-1}$  a enlaces C-H de sistemas aromáticos o heterociclos.<sup>15</sup> También se detectaron otras señales a 1157, 1116, 1032, 602 y 190 nm, las que no fueron asignadas.

La estructura química de la PCB fue establecida mediante espectrometría de masas (MS). En este estudio la PCB fue obtenida mediante reflujo con metanol y tratamiento con ácido concentrado. Luego el producto fue extraído en cloroformo y esterificado. El éster volátil fue separado en gel de sílica y analizado por MS.<sup>14</sup> La relación  $m/z$ , determinada mediante FAB (del inglés *Fast Atom Bombardment*) fue de 586 Th y 588 Th para la PCB sin esterificar.<sup>15</sup> Cuando se emplea un método de ionización "suave" (MALDI-TOF) la  $m/z$  es 587.2 Th, estructura que corresponde también al análisis de la preparación de PCB sin esterificar.<sup>9</sup>

#### Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de la PCB ha sido determinada por los métodos basados en el DPPH<sup>9</sup> y en el ORAC.<sup>2</sup> También se ha evaluado el efecto de esta molécula en la protección de lípidos ante la oxidación por AAPH.<sup>10, 29</sup>

En conclusión, la ficocianobilina es un sistema tetrapirrólico presente en las ficobiliproteínas aloficocianina y C-ficocianina, que tiene aplicaciones potenciales en la industria farmacéutica por sus propiedades inmunomoduladoras, citoprotectoras y antioxidantes. Entre las materias primas empleadas para obtener este pigmento se encuentran las cianobacterias y las algas en las que se encuentran las ficobiliproteínas denominadas ficocianinas. Adicionalmente, la ficocianobilina puede ser obtenida también por métodos biotecnológicos, donde la bacteria *E. coli* ha sido

uno de los sistemas más empleados. Por otra parte, aunque existen varias estrategias que implican la obtención de PCB con puridades elevadas, la mayoría de estos tienen el inconveniente de ser poco escalables, además de que los rendimientos son bajos. En este trabajo se proponen estrategias que implicarían la obtención de PCB a partir de un sistema celular, el cual pudiera constituir un proceso escalable.

#### References

- Schram, B. L. & Kroes, H. H. Structure of Phycocyanobilin. *Eur. J. Biochem.* 19, 581–594 (1971).
- Benedetti, S., Benvenuti, F., Scoglio, S. & Canestrari, F. Oxygen radical absorbance capacity of phycocyanin and phycocyanobilin from the food supplement *Aphanizomenon flos-aquae*. *J. Med. Food* 13, 223–7 (2010).
- Bhat, V. B. & Madyastha, K. M. C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 20–5 (2000).
- Marín-Prida, J. et al. C-Phycocyanin protects SH-SY5Y cells from oxidative injury, rat retina from transient ischemia and rat brain mitochondria from  $\text{Ca}^{2+}$ /phosphate-induced impairment. *Brain Res. Bull.* 89, 159–167 (2012).
- Pentón-Rol, G. et al. C-Phycocyanin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. *Int. Immunopharmacol.* 11, 29–38 (2011).
- Pentón-Rol, G. et al. C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. *Brain Res. Bull.* 86, 42–52 (2011).
- Marín-Prida, J. et al. Phycocyanobilin promotes PC12 cell survival and modulates immune and inflammatory genes and oxidative stress markers in acute cerebral hypoperfusion in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 49–60 (2013).
- Mccarty, M. F. & Longevity, C. Phycocyanobilin from *Spirulina* - the Master Antioxidant. 3–8
- Ge, B. et al. Combinational biosynthesis of phycocyanobilin using genetically-engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 35, 689–693 (2013).
- Tanaka, M. Radical Scavenging Activity of Phycocyanobilin *Spirulina* Prepared from the Cyanobacterium, *Takashi platensis* Niizeki, and *Morihiiko Spirulina platensis* contains phycocyanin as a light-harvesting protein for photosynthesis. *Phycocyanin has an in tense b.* 65, 971–972 (1999).
- Mccarty, M. F., Barroso-Aranda, J. & Contreras, F. Oral phycocyanobilin may diminish the pathogenicity of activated brain microglia

- in neurodegenerative disorders. *Med. Hypotheses* 74, 601–5 (2010).
12. Fu, E., Friedman, L. & Siegelman, H. W. Mass-spectral identification and purification of phycoerythrobilin and phycocyanobilin. *Biochem. J.* 179, 1–6 (1979).
  13. OHEOCHA, C. SPECTRAL PROPERTIES OF THE PHYCOBILINS. I. PHYCOCYANOBILIN. *Biochemistry* 3, 1343–50 (1964).
  14. Beuhler, R. J., Pierce, R. C., Friedman, L. & Siegelman, H. W. Cleavage of phycocyanobilin from C-phycocyanin. Separation and mass spectral identification of the products. *J. Biol. Chem.* 251, 2405–11 (1976).
  15. Aboshady, A. M. Spectroscopic Study of Phycocyanobilin from the Cyanobacterium *Spirulina-Platensis*. *Biol. Plant.* 37, 631–633 (1995).
  16. Beale, S. I. & Cornejo, J. Biosynthesis of Phycobilins. *J Biol Chem* 266, 22328–22332 (1991).
  17. No Title. at <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>
  18. Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–12 (2004).
  19. No Title. at <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=bl>>
  20. No Title. at <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>
  21. Padyana, A. K., Bhat, V. B., Madyastha, K. M., Rajashankar, K. R. & Ramakumar, S. Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 893–8 (2001).
  22. MacColl, R., Lee, J. J. & Berns, D. S. Protein aggregation in C-phycocyanin. Studies at very low concentrations with the photoelectric scanner of the ultracentrifuge. *Biochem. J.* 122, 421–6 (1971).
  23. Arciero, D. M., Dallas, J. L. & Glazer, A. N. In vitro attachment of bilins to apophycocyanin. II. Determination of the structures of tryptic bilin peptides derived from the phycocyanobilin adduct. *J. Biol. Chem.* 263, 18350–7 (1988).
  24. Williams, V. P. & Glazer, A. N. Structural studies on phycobiliproteins. I. Bilin-containing peptides of C-phycocyanin. *J. Biol. Chem.* 253, 202–11 (1978).
  25. No Title. at <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1GH0>>
  26. van den Berg, J. J. M., Cook, N. E. & Tribble, D. L. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids* 30, 599–605 (1995).
  27. van Thor, J. J., Mackeen, M., Kuprov, I., Dwek, R. A. & Wormald, M. R. Chromophore Structure in the Photocycle of the Cyanobacterial Phytochrome Cph1. *Biophys. J.* 91, 1811–1822 (2006).
  28. Bishop, J. E. et al. Phycobiliprotein-bilin linkage diversity. I. Structural studies on A- and D-ring-linked phycocyanobilins. *J. Biol. Chem.* 261, 6790–6 (1986).
  29. Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T. & Sakaguchi, M. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.* 12, 435–439 (2000).
  30. Chapman, D. J., Cole, W. J. & Siegelman, H. W. Cleavage of Phycocyanobilin From C-Phycocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 153, 692–698 (1968).
  31. Wang, H. The C-Phycocyanin / Beta Protein Inhibits Cancer Cell Proliferation. (2008).
  32. Fu, E., Friedman, L. & Siegelman, H. W. Mass-spectral identification and purification of phycoerythrobilin and phycocyanobilin. *Biochem. J.* 179, 1–6 (1979).
  33. Minic, S. L. et al. SC. *J. Proteomics* (2016). doi:10.1016/j.jprot.2016.03.043
  34. Wallin, R., Selset, R. & Sletten, K. Characterization of chromophoric peptides from C-phycocyanin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 1319–28 (1978).
  35. Bishop, J. E. et al. Phycobiliprotein-Bilin Linkage Diversity. *J. Biol. Chem.* 261, 6790–6796 (1986).
  36. Mukougawa, K., Kanamoto, H., Kobayashi, T., Yokota, A. & Kohchi, T. Metabolic engineering to produce phytochromes with phytochromobilin, phycocyanobilin, or phycoerythrobilin chromophore in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 580, 1333–1338 (2006).
  37. Gambetta, G. A. & Lagarias, J. C. Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 10566–10571 (2001).
  38. Beale, S. I. & Cornejo, J. Enzymic Transformation of Biliverdin to Phycocyanobilin by Extracts of the Unicellular Red Alga *Cyanidium caldarium*. *Plant Physiol.* 76, 7–15 (1984).
  39. Guan, X. et al. Combinational Biosynthesis of a Fluorescent Cyanobacterial Holo- $\alpha$ -Phycocyanin in *Escherichia coli* by Using One Expression Vector. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142, 52–59 (2007).
  40. Du, Q., Jerz, G. & Winterhalter, P. Isolation of two anthocyanin sambubiosides from bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1045, 59–63 (2004).
  41. Beale, S. I. & Cornejo, J. Biosynthesis of phycobilins. Ferredoxin-mediated reduction of bilverdin catalyzed by extracts of *Cyanidium caldarium*. *J. Biol. Chem.* 266, 22328–22332 (1991).
  42. Bishop, J. E., Nagy, J., Connell, J. F. O. & Rapport, H. Diastereoselective Synthesis of Phycocyanobilin-Cysteine Adducts. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 8024–8035 (1991).

**Recibido:** 15 de marzo de 2016.

**Aprobado:** 21 de mayo de 2016.

## REVISIÓN / REVIEW

## Péptidos que atraviesan la membrana celular como potenciales transportadores de fármacos

### Cell Penetrating Peptides as potential drug carriers

Ximena Carolina Pulido<sup>1,2,3</sup>, Miriam Royo<sup>2,3</sup>, Fernando Albericio<sup>2,3,4,5</sup> y Hortensia Rodríguez<sup>3,4,6</sup>

DOI. 10.21931/RB/2016.01.04.9

#### RESUMEN

El descubrimiento y desarrollo de secuencias peptídicas (naturales o sintéticas), así como de peptidomiméticos que puedan penetrar en las células (CPPs, por sus siglas del inglés: Cell penetrating peptides), constituye un avance prometedor en la identificación de entidades capaces de promover la entrega no invasiva e íntegra de moléculas pequeñas, ADN plasmídico, ARN de interferencia, proteínas, virus y nanopartículas, entre otras, al interior de la célula. Por lo general, estas secuencias peptídicas están compuestas de 5-30 aminoácidos y se pueden clasificar en catiónicos, anfipáticos e hidrofóbicos, teniendo en cuenta sus características estructurales. La presente revisión explora la clasificación y el estado del arte en general de esta temática, con especial énfasis en el tipo de unión entre el péptido con capacidad de atravesar la membrana celular (CPP) y la entidad a transportar.

**Palabras clave:** Péptidos, Barrera hematoencefálica, transportadores moleculares, CPPs

#### ABSTRACT

The discovery and development of natural, synthetic or peptidomimetic cell-penetrating peptides (CPPs) is a promising breakthrough to achieve non-invasive delivery of non-permeable biomolecules in the intracellular compartment. The CPPs are able to carry small molecules, plasmid DNA, interfering RNA, proteins, viruses, nanoparticles among others, across the cellular membrane, resulting in internalization of the intact cargos. In general, are sequence with 5-30 aminoacids, which are classified in cationics, amphipathics or hydrophobics, depending on its structural characteristics. The present review explores the classification, as well as the "state of the art" of this topic, focuses on the link between CPP and cargo.

**Keywords:** Peptides, Molecular transportes, cell penetrating peptides, blood-brain barrie

#### Introducción

Las barreras biológicas son las interfaces generadas durante la evolución, que hicieron posible que los organismos abandonaran el agua y se establecieran en la tierra. Durante el proceso evolutivo, la necesidad de especificación promovió su diferenciación, con el fin de regular procesos como la homeostasis del agua, la entrada de nutrientes, el intercambio de gases o la excreción de compuestos tóxicos.<sup>1</sup> Las barreras biológicas más estudiadas incluyen la piel, las membranas mucosas, la barrera hematoencefálica (BHE) y las barreras celulares. Estas últimas (por ejemplo, el núcleo o la mitocondria) constituyen las barreras de mayor importancia biológica si nos interesa potenciar el transporte de fármacos a través de ellas para mejorar la efectividad de los agentes terapéuticos.<sup>1,2</sup>

Las membranas celulares son las responsables de la comunicación y el transporte de iones y nutrientes. El transporte de moléculas a través de estas barreras comprende desde la entrada de nutrientes del ambiente, hasta la salida de moléculas tóxicas. Son estos procesos naturales de transporte los que se utilizan para incorporar entidades terapéuticas al organismo, cuya eficacia dependerá, en gran medida, de su capacidad de atravesar dichas barreras.<sup>1</sup> Factores como: la expulsión de las moléculas por los transportadores de salida,<sup>1</sup> su degradación *in vivo* mediada por enzimas proteolíticas<sup>2</sup> y la baja permeabilidad de la barreras biológicas frente a las biomoléculas, limitan la distribución de compuestos terapéuticos y constituyen uno de los retos actuales de la biomedicina.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, 546 Ibagué, Colombia

<sup>2</sup>Unidad de Química Combinatoria, Parque Científico de Barcelona, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, España

<sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en red. Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), España

<sup>4</sup>Departamento de Química Orgánica, Universidad de Barcelona, 080028 Barcelona, España

<sup>5</sup>Escuela de Química, Universidad Kwa-Zulu-Natal, 4001 Durban, Sudafrica.

<sup>6</sup>Escuela de Química, Yachay Tech, Ciudad del conocimiento Yachay, Urququí, Ecuador

Correspondencia: Ximena Carolina Pulido. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima e-mail: xpulido@ut.edu.co



Los factores anteriormente mencionados, conllevan a que los sistemas de administración de fármacos se diseñen como plataformas terapéuticas que interaccionen con estas barreras y faciliten la administración de un determinado principio activo a un tejido o tipo de célula específica. Durante las dos últimas décadas, la conjugación de compuestos con alto interés terapéutico a moléculas capaces de atravesar las membranas celulares conocidas como transportadores moleculares, se ha utilizado ampliamente como estrategia de punta en el área de la administración de fármacos. El objetivo de estos procedimientos es la búsqueda continua del incremento de la permeabilidad celular en determinados tejidos o células para favorecer la administración de fármacos. Esta revisión, pretende describir el estado del arte de la temática que enmarca a una gran variedad de péptidos (naturales o sintéticos) capaces de travesar la membrana celular (CPPs, por sus siglas del inglés: *Cell penetrating peptides*) que se han utilizado en los últimos años como transportadores moleculares eficientes, remarcando el tipo de unión generado entre el principio activo y la secuencia peptídica.

### Antecedentes y generalidades de los CPPs

Sin lugar a dudas, el descubrimiento de determinados péptidos naturales con capacidad de atravesar la membrana celular marca el inicio de esta temática. Estas biomoléculas emergieron como una clase especial de transportadores, que constituyen una de las herramientas más utilizadas en el transporte intracelular no invasivo de fármacos, al unirse a principios activos mediante la formación de enlaces químicos o por la formación de complejos estables no covalentes.<sup>3</sup> La capacidad de transporte de los CPPs, permitió la internalización celular de moléculas de distinto grado de complejidad con propiedades terapéuticas, como moléculas pequeñas,<sup>4,5</sup> ácidos nucleicos,<sup>6,7</sup> proteínas,<sup>8</sup> liposomas,<sup>4,9</sup> quantum dots<sup>10</sup> y agentes de contraste de resonancia magnética,<sup>11</sup> entre otros.

Los CPPs comprenden una gran diversidad de secuencias y estructuras, pero presentan características similares que son las responsables de su capacidad de atravesar la membrana citoplasmática y alcanzar el interior de la célula, otorgándole a estas estructuras varias ventajas con respecto a otros transportadores.<sup>4,9,12,13,14</sup> (Figura 1).

especificidad, lo que disminuye su interacción con otras moléculas y la probabilidad de producir efectos secundarios. Además, presentan baja acumulación en los tejidos y no generan metabolitos secundarios, lo que les confiere baja toxicidad.<sup>23</sup> Sin embargo, los CPPs tienen un uso limitado debido a su baja biodisponibilidad, la cual se asocia a su baja resistencia frente a proteasas, que conjuntamente con el hecho de quedar embebido en los endosomas, conduce a una rápida degradación de los mismos, siendo incapaces de llegar al citosol o al sitio de interés.<sup>24</sup> En general, estos péptidos presentan algunas desventajas con respecto a otras moléculas terapéuticas tradicionales, como un mayor costo de síntesis y su baja vida media; esta última debido a que al carecer de estructura terciaria, son particularmente sensibles a la degradación enzimática.<sup>25</sup>

Con el fin de superar estos inconvenientes, se han desarrollado oligómeros conocidos como plegómeros (*foldamers*) que mimetizan péptidos naturales. El término plegómero fue acuñado por Gellman para definir a cualquier oligómero, que en solución es capaz de plegarse en un estado conformacionalmente ordenado.<sup>26</sup> Estas estructuras se estabilizan mediante interacciones no covalentes entre las unidades de monómeros no adyacentes que conforman el plegómero, favoreciendo una estructura secundaria definida. La investigación en la química de estos compuestos ha permitido explorar el plegamiento de esqueletos no naturales para entender la relación secuencia-plegamiento en los oligómeros naturales y desarrollar nuevos oligómeros que mimetizan polímeros naturales con diferentes aplicaciones terapéuticas.<sup>27</sup> Dentro de los plegómeros más estudiados, los péptidos ocupan un lugar importante debido a que cubren un amplio rango de aplicaciones biomédicas (Figura 2). En esta categoría de compuestos se incluyen los beta-péptidos,<sup>28</sup> los  $\gamma$ -péptidos<sup>29</sup> y los péptidos cuya secuencia está compuesta por D-aminoácidos.

La capacidad de permeabilidad celular de determinadas secuencias como el Tat ha impulsado en los últimos años, las investigaciones en esta área de los péptidos Penetradores en la Célula (CPP, *Cell Penetrating Peptides*), en busca de secuencias aminoácídicas que faciliten la entrada de agentes terapéuticos a la célula.<sup>2</sup> (Figura 3) Nuestro grupo ha sido pionero en la investigación de plegómeros como CPP, concretamente  $\gamma$ -péptidos derivados de las 4-aminoprolina.

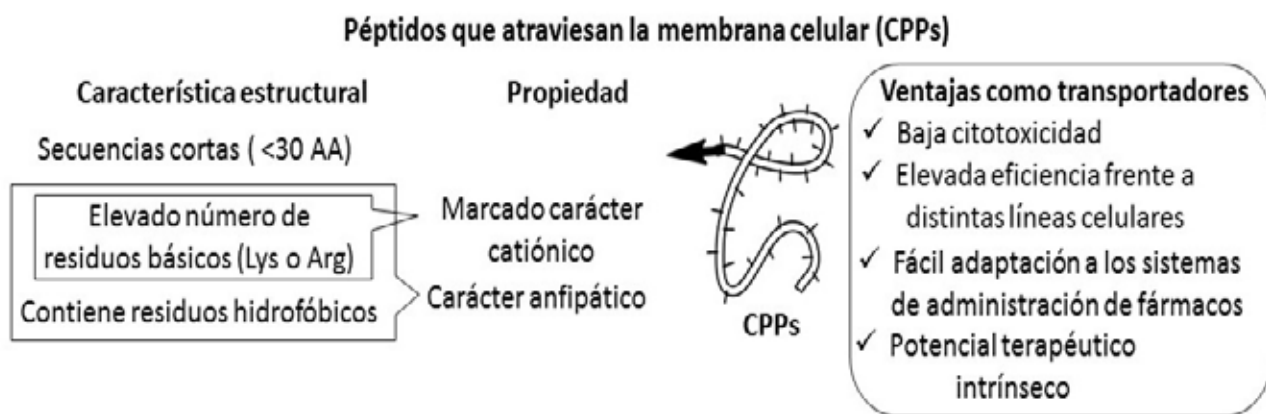


Fig. 1. Relación estructura/propiedad y ventajas como transportadores de los péptidos que atraviesan las membranas celulares (CPPs).

En este contexto, la secuencia peptídica conocida como Tat, correspondiente al fragmento (48-60) del dominio básico de la proteína Tat del virus de inmunodeficiencia humana,<sup>2,15</sup> ha sido el CPPs más estudiado y prometedor como transportador de fármacos.<sup>15</sup> Además, otras secuencias como el pAntp (también conocido como penetratina),<sup>16</sup> las poliargininas,<sup>17,18</sup> el MPG,<sup>19</sup> el Pep-1,<sup>20</sup> el pVEC<sup>21</sup> y péptidos derivados de la calcitonina humana<sup>22</sup> se han desarrollado como eficientes CPPs y potenciales transportadores de fármacos.

Desde el punto de vista terapéutico, los péptidos son particularmente atractivos ya que presentan actividad biológica y alta

### Clasificación de los CPPs.

Los CPPs pueden clasificarse en subgrupos definidos por su origen o las características de su secuencia.<sup>15</sup> Hasta la fecha, se conocen más de 800 CPPs de orígenes y características diversas. La mayoría de los CPPs presentan una carga neta positiva (83%), también se encuentran CPPs aniónicos que no forman ninguna categoría propia y son asignados a las otras diferentes clases (anfipática e hidrofóbica) analizándolos caso por caso.<sup>24</sup> Los péptidos anfipáticos, formados tanto por catiónicos como por aniónicos constituyen el 44% de todos los CPPs, mientras los hidrofóbicos solo el 15%. El estado del arte de la temática permite demostrar la

elevada variedad de estos péptidos teniendo en cuenta las secuencias, el origen, la función y las aplicaciones biomédicas de cada uno de ellos.<sup>2</sup> Teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas de los CPPs, es posible clasificarlos en tres subgrupos principales: catiónicos, anfipáticos o hidrofóbicos (Tabla 1).<sup>2,9,15</sup>

se encuentran el Tat, el R9,<sup>31</sup> el hLF y el (RXR)<sup>4</sup>, entre otros (Tabla 1). Algunos trabajos agrupan dentro de esta categoría aquellos péptidos con carga neta positiva necesaria para la internalización celular, pero que no forman una hélice anfipática.<sup>24</sup>



Fig. 2. Aplicaciones biomédicas de los plegómeros peptídicos.

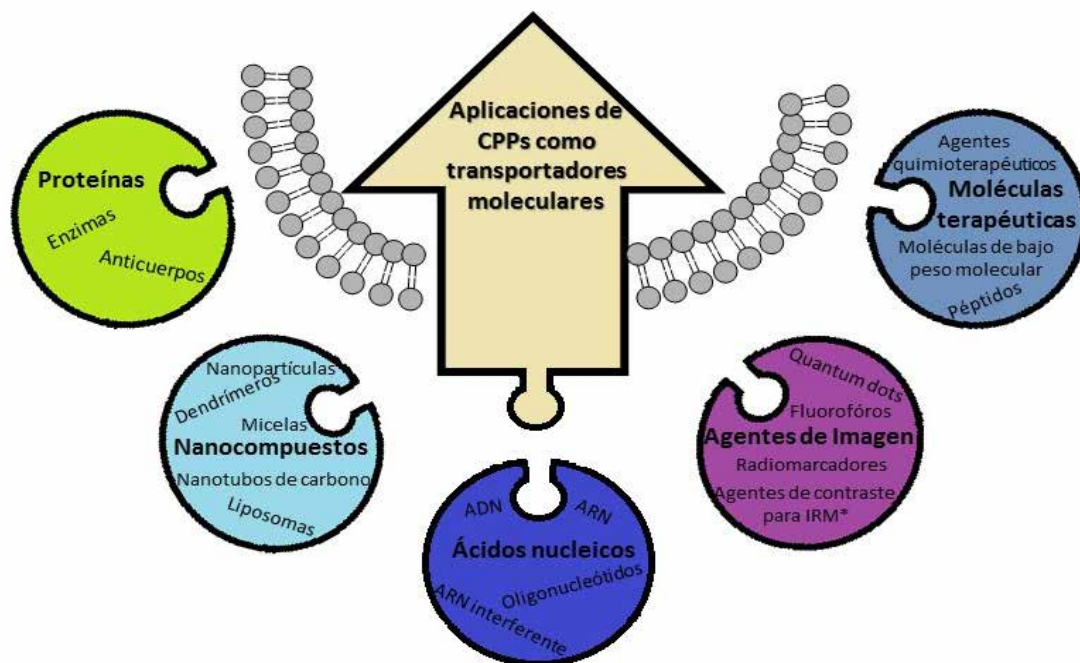


Fig. 3. Aplicaciones de los CPPs como transportadores moleculares.

\*IRM: por sus siglas del Inglés, *Imaging Magnetic Resonance* (Imágenes obtenidas mediante resonancia magnética).

### CPPs catiónicos.

Los péptidos catiónicos son aquellos que presentan una carga neta positiva elevada. Diversos estudios realizados sugieren que al menos se necesitan ocho cargas netas positivas para una eficiente absorción de estos compuestos.<sup>24</sup> Estas moléculas fueron originalmente consideradas como vehículos de transporte de tipo “caballos de Troya”, internalizándose en las células sin generar respuesta.<sup>30</sup> Sin embargo, los péptidos catiónicos pueden inducir un amplio rango de efectos secundarios relacionados con la integridad de la membrana celular y la viabilidad celular, los cuales pueden resultar más sutiles de determinar que la muerte celular. Dentro de los CPPs de carácter catiónico más estudiados

### CPPs hidrofóbicos.

Los CPPs hidrofóbicos son aquellos que contienen sólo residuos apolares. Dentro de esta familia se encuentran los péptidos grapa (*stapled peptides*),<sup>32</sup> los prenilados<sup>33</sup> y el pepducin.<sup>34</sup> Hasta el momento, solo unos pocos CPPs de carácter hidrofóbico han sido descubiertos, como son los derivados de secuencias de señalización de la proteína beta 3 integrina (VTVLALGALAGV-GVG) y del factor de crecimiento de fibroblastos Kaposi.<sup>35</sup> Los CPPs anfipáticos como el MAP<sup>36</sup> y otros CPPs quiméricos de cadenas largas, están compuestos por aminoácidos hidrofóbicos y adicionalmente, presentan residuos catiónicos que incrementan la permeabilidad de la membrana (Tabla 1).<sup>37</sup>

CPPs	Secuencia	Origen
<b>Catiónicos</b>		
Tat (48-60)	GRKKRRQRRRPPQ	Dominio VIH-Tat
Penetratina	RQIKIWFAQNRMRKWKK	Homodominio de Antennapedia
R9	RRRRRRRRR	Sintético
Poliargininas	(R) <sub>n</sub> 6<n<12	Sintéticos
R6W3	RRWWRWR	Sintético
(RXR) <sub>4</sub>	(R-Ahx <sup>8</sup> -R) <sub>4</sub>	Sintético
<b>Anfipáticos</b>		
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKK KRV	gp41-VIH/antígeno T SV40
pVEC	LLILRRRIRKQAHASK	Cadherina (615-632)
CADY	GLWRALWRLRLSLWRLWRA	Sintético
vT5	DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGD KPD	Proteínas virales
ARF (1-22)	MVRRFLVTLRIRACGPPRVV	Proteína p14ARF
MAP	KLALKLAKAALKLA	Quimérico
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKRV	Racimo enriquecido con triptófanos
<b>Péptidos ricos en prolina</b>		
Bac-7	RRIRPRPPRLPRPRPLPFPRPG	Péptidos antimicrobianos de la familia de la Bactenecin
(PPR) <sub>n</sub>	(PPR) <sub>3</sub> , (PPR) <sub>4</sub> , (PPR) <sub>5</sub> , (PPR) <sub>6</sub>	Sintéticos
(PRR) <sub>n</sub>	(PRR) <sub>3</sub> , (PRR) <sub>4</sub> , (PRR) <sub>5</sub> , (PRR) <sub>6</sub>	Sintéticos
aPP4R1	GPSQPTYPGDDAPVRDLIRFYRDL QRYLNVVTRHRY	Sintéticos
aPP5R1	GPSQPTYPGDDAPVRDLIRFYRDL RRYLNVTTRH	
aPP6R1	GPSQPTYPGDDAPVRDLRRFYRD LRYLNVVTRHRY	
P8LKK P11LKK P8LRR P11LRR	FL-G(P <sub>L</sub> XX) <sub>n</sub> P <sub>L</sub> -CONH <sub>2</sub> X=P <sub>K</sub> o P <sub>R</sub> , n=2 o 3	Sintéticos
SAP	VRLPPPVRLLPPP	Sintético
SAP(E)	VELPPPVELPPPVELPPP	Sintético
<b>Hidrofóbicos</b>		
PFV	PFVYLI	C105Y
SG3	RLSGMNEVLSFRWL	Quimioteca peptídica aleatoria
Pep-7	SDLWEMMMVSLACQY	CHL8
FGF	PIEVCMYREP	Proteínas virales y celulares

Table 1. CPPs representativos de cada subgrupo.2,<sup>14</sup>

### CPPs anfipáticos.

Se definen como péptidos anfipáticos aquellos que contienen en su estructura regiones polares y apolares.<sup>24</sup> Se incluyen en este subgrupo el MPG,<sup>19</sup> la penetratina o pAntp<sup>16</sup> y el CADY (Tabla 1), en los cuales el carácter anfifílico se encuentra estrechamente relacionado con su estructura primaria.

Algunos CPPs como el MPG, son péptidos quiméricos obtenidos mediante la unión covalente de un dominio hidrofóbico como diana de las membranas celulares a una secuencia de localización celular (SLC). Otros CPPs anfipáticos son derivados de proteínas naturales, como el pVEC, el ARF (1-22) y el BPrPr (1-28).

Los CPPs anfipáticos con estructura secundaria de tipo alfa-hélice contienen una parte altamente hidrofóbica, mientras que la parte polar puede ser catiónica, aniónica o sin carga. Aquellos con estructura secundaria de tipo lámina beta, se basan en alternar secuencias hidrofóbicas e hidrofílicas que se encuentran expuestas al disolvente, como el vT5.<sup>24</sup>

### Péptidos ricos en prolina como atractiva familia de CPPs anfipáticos.

Los péptidos ricos en prolina constituyen otra clase interesante de CPPs anfipáticos que han sido estudiados en diversas familias, diferentes en secuencia y estructura, pero con presencia del fragmento prolina (esqueleto pirrolidínico) como característica común. La prolina se caracteriza por poseer el anillo pirrolidí-

nico, el cual induce rigidez conformacional cuando está presente en un esqueleto peptídico. A pesar de su carácter hidrofóbico, los péptidos ricos en prolina tienen la gran ventaja de ser solubles en agua y en diferentes disolventes orgánicos.<sup>38</sup>

Debido a las propiedades de la prolina, los péptidos ricos en este aminoácido pueden adoptar dos estructuras secundarias: la poliprolina I (PPI) y la poliprolina II (PPII). La PPI es la conformación principal en presencia de alcoholes alifáticos, mientras que la PPII es la conformación principal en medio acuoso o en presencia de ácidos alifáticos. La PPI forma una hélice compacta dextrógira, compuesta por 3,3 residuos por giro, en la cual los enlaces peptídicos adoptan la conformación *cis*. Por otra parte, la PPII forma una hélice extendida levógira, que está compuesta de tres residuos por giro, con todos los enlaces peptídicos en conformación *trans*. Debido al proceso de equilibrio existente entre ambos isómeros conformacionales (*cis/trans*) asociado a los enlaces peptídicos, las secuencias peptídicas ricas en prolina pueden alternar en solución entre las dos estructuras secundarias anteriormente descritas, mediante un simple cambio del disolvente.<sup>38</sup>

Varios trabajos han demostrado que algunos péptidos ricos en prolina pueden ser considerados CPPs ya que internalizan en células eucarióticas.<sup>39</sup> Además, esta clase de CPPs presentaron propiedades de autoensamblaje interesantes que fueron estudiadas mediante difracción circular (DC) y microscopía electrónica



de transmisión (TEM, *transmission electron microscopy*). Algunos de los péptidos pertenecientes a este grupo, son derivados del dominio N-terminal de la  $\gamma$ -zeína (proteína de almacenamiento del maíz). Otros, como el Bactenecin-7 (Bac-7) están sintéticamente basados en hélices de poliprolina basadas en la repetición del motivo PRP.<sup>39</sup>

Dentro de los CPPs ricos en prolina más estudiados hasta la fecha, es posible distinguir dos categorías dependiendo de si los aminoácidos presentes en la secuencia peptídica son o no naturales:

#### i) CPPs lineales ricos en prolina compuestos por aminoácidos naturales.

Este grupo está integrado por aquellas secuencias lineales formadas por aminoácidos naturales, pero también por otras más sofisticadas con estructuras dendriméricas.<sup>38</sup> Tam y cols.<sup>40</sup> utilizaron una proteína de 59 residuos conocida como Bac-7 (Tabla 1), que pertenece a la familia de la Bactenecin, como patrón para el diseño de CPPs. Esta proteína mostró actividad antimicrobiana mediante la inhibición intracelular de la maquinaria de la síntesis proteica. Desde el punto de vista estructural presenta una elevada densidad de carga neta positiva y posee 3 copias de una cadena de 14 residuos. Los estudios realizados en base a la estructura de Bac-7 permitieron acceder a nuevos CPPs en los cuales todas las secuencias contienen el motivo Pro-Xaa y permiten la absorción de la NeutrAvidin por parte de las células. Estos CPPs mostraron estructuras secundarias híbridas entre una alfa-hélice y una PPII, debido al alto contenido de prolina presente en los mismos.<sup>40</sup>

Dentro de esta categoría, también se encuentran los CPPs ricos en prolina derivados del dominio N-terminal de la  $\gamma$ -zeína, (proteína de almacenamiento del maíz). Desde el punto de vista estructural, esta proteína contiene tres dominios: un dominio N-terminal rico en prolina, un dominio repetitivo central (PX)<sub>n</sub> y un dominio C-terminal rico en cisteínas. El dominio g-ZNPRD contiene la secuencia (VXLPPP)<sub>8</sub>, que es la responsable de dirigir la proteína hacia el retículo endoplasmático.<sup>37</sup>

#### ii) CPPs lineales miméticos de prolina: g-péptidos.

Dentro de los péptidos miméticos con capacidad de atravesar membranas celulares se encuentran los  $\gamma$ -péptidos sintetizados a partir de la *cis*- $\gamma$ -amino-L-prolina, cuyo esqueleto se construye a través del grupo  $\gamma$ -amino (Figura 4). Estos péptidos pueden ser funcionalizados en los grupos alfa-amino de cada monómero mediante reacciones de acilación, alquilación o guanidilación para obtener entidades peptídicas con características hidrofóbicas, hidrofílicas o anfipáticas,<sup>3</sup> como los hexapéptidos funcionalizados con guanidinos (Na-guanidil-g-hexapéptido) o con grupos alquílicos (Na-alquil-g-hexapéptido) o con un fragmento *di*-oxa-octanoico, mostraron capacidad de atravesar la membrana celular en células HeLa y COS-1.<sup>41</sup>

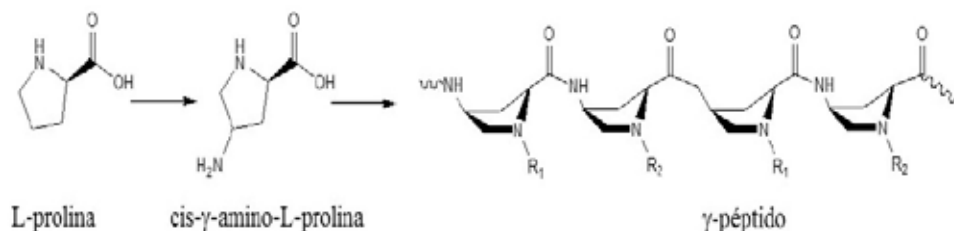


Fig. 4. gamma-péptidos derivados de prolina.

Farrera-Sinfrey y col.<sup>41</sup> reportaron la síntesis y el estudio del potencial de actividad biológica de  $\gamma$ -péptidos, algunos de los cuales tienen la habilidad de atravesar membranas celulares. La quimioteca incluía péptidos formados por  $\gamma$ -amida oligómeros de *cis*- $\gamma$ -amino-L-prolina, con diferentes modificaciones en el grupo alfa-amino (acilo, alquilo y guanidinio) que mimetizaban las cadenas laterales de los aminoácidos naturales.<sup>42</sup> Estos péptidos se sintetizaron utilizando la combinación de dos grupos ortogonales

Fmoc y Boc en fase sólida (estrategia Fmoc/Boc), donde el Fmoc fue el grupo protector temporal para el grupo  $\gamma$ -amino de cada monómero y el Boc el grupo protector semipermanente para el grupo alfa-amino. El esqueleto de estos péptidos contiene enlaces peptídicos entre la función carboxílica y la función  $\gamma$ -amino de los residuos sucesivos. Estos  $\gamma$ -péptidos presentaron baja citotoxicidad incluso a altas concentraciones, estabilidad frente a la proteólisis enzimática y en general buena solubilidad.<sup>42,43</sup> Además, la capacidad de estos péptidos de actuar como transportadores se corroboró cuando uno de los  $\gamma$ -péptidos sintetizados se conjugó a nanopartículas de óxido de hierro y se demostró que eran capaces de favorecer la internalización en células HeLa.<sup>43</sup> Todas las propiedades de los  $\gamma$ -péptidos mencionadas anteriormente hacen que estos compuestos puedan ser considerados candidatos para ser utilizados como transportadores de moléculas con valor terapéutico.

#### Secuencias Peptídicas capaces de atravesar la membrana celular: tipos de unión.

Los CPPs se han utilizado para vencer las limitaciones extracelulares e intracelulares y favorecer la entrada de otras entidades a las células. Los CPPs se unen a moléculas biológicamente activas (principio activo) y las transportan a través de las membranas celulares hasta alcanzar el citoplasma y/u otros orgánulos celulares (Figura 3). De esta manera, se mejora el tráfico intracelular y se facilitan las interacciones con las dianas moleculares.<sup>3,44</sup> Para la formación de estos híbridos moleculares, se han descrito dos estrategias basadas en el tipo de unión entre el CPP y la molécula terapéutica. Estas uniones pueden ser de carácter covalente mediante la formación de una gran variedad de enlaces en los que podrían intervenir grupos funcionales como  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SH}$ , formación de heterociclos, entre otros; así como de carácter no covalente, generando complejos moleculares entre ambas moléculas (CPP y la molécula terapéutica)<sup>3,45</sup> (Figura 5).

#### Híbridos covalentes entre el CPP y la molécula terapéutica.

Se consideran híbridos covalentes CPP-molécula terapéutica aquellos en los que ambas entidades están unidas a través de un enlace químico covalente, incluyendo tanto aquellos compuestos en que la unión se realiza mediante métodos químicos o bioconjugación, (Figura 5) como híbridos de carácter proteico que se obtienen mediante la clonación de la proteína terapéutica fusionada al CPP y posterior expresión de la misma.<sup>3</sup>

Aunque los métodos de conjugación química ofrecen varias

ventajas como la posibilidad de racionalización y el control del híbrido molecular formado, se debe tener en cuenta que el enlace covalente que se genera podría inducir cambios estructurales capaces de alterar la actividad biológica de la molécula a transportar.<sup>29</sup>

Los métodos de conjugación más utilizados para la unión del CPP a la molécula a transportar utilizan el grupo tiol de una cisteína, introducida en uno de los extremos del CPP y/o en la

molécula a transportar para formar puentes disulfuro o un anillo tiazolidínico. En el caso de la formación de enlaces disulfuros, el ambiente reductivo de la célula facilita la escisión de este enlace, promoviendo la liberación de la molécula en el interior de la célula. La utilización de grupos amino, como el grupo N-terminal propio del CPP o el grupo épsilon-amino de una lisina para formar un enlace amida con un ácido carboxílico es también una estrategia muy extendida, así como el uso de espaciadores homo o heterobifuncionales como el SMCC (éster 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de N-hidroxisuccinimida) para unir ambos componentes. Los espaciadores heterobifuncionales se han utilizado ampliamente para unir los CPPs a diferentes tipos de moléculas, tales como anticuerpos monoclonales, proteínas,

tando su potencial terapéutico. Los CPPs desarrollados en los últimos años, podrían solucionar esta limitación, facilitando la entrada al interior de la célula de fármacos/péptidos de acción intracelular, dando lugar a estructuras con un amplio rango de aplicaciones biomédicas. El desarrollo constante en este campo, ha conducido a que siete CPPs (compuesto único o conjugados a otras moléculas terapéuticas) se encuentren en ensayos clínicos y preclínicos para el tratamiento de diversas afecciones (Tabla 3).<sup>24</sup>

A pesar de los esfuerzos realizados por la comunidad científica en las dos últimas décadas, aún no aparecen publicados estudios en humanos en los que se emplee cualquiera de los CPPs, ya sea como agentes terapéuticos o de diagnóstico, lo que denota la presencia de obstáculos que deben superarse, antes de que las

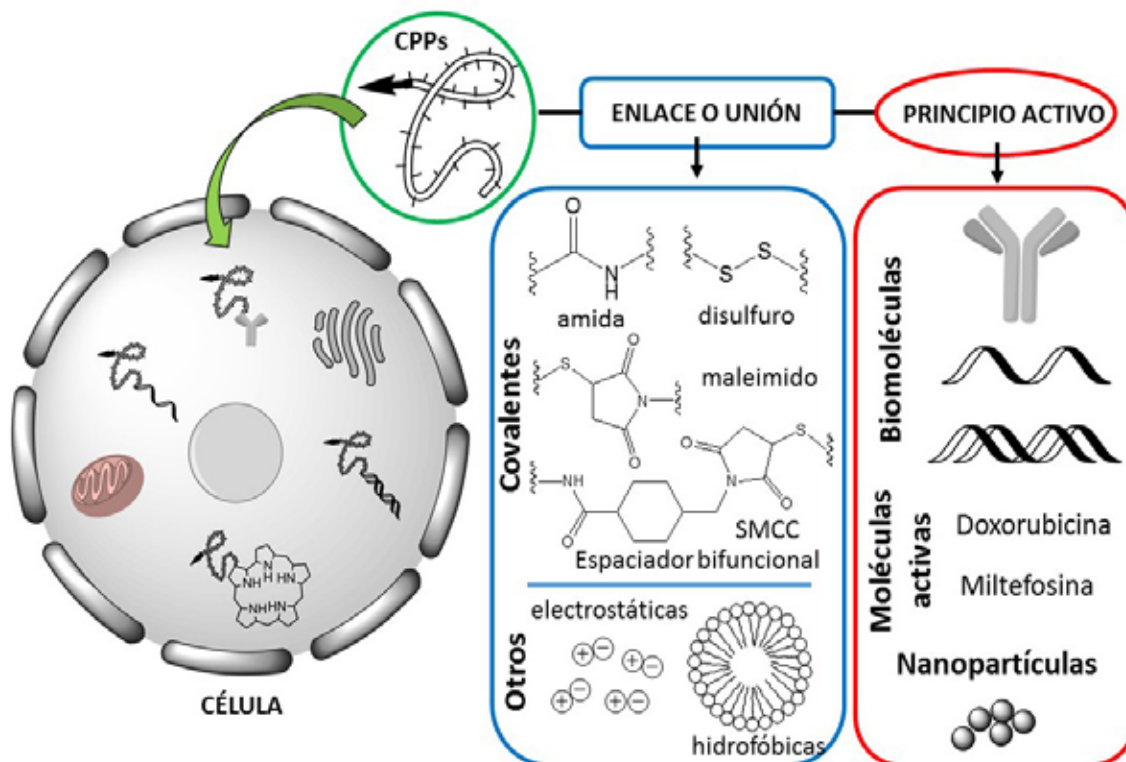


Fig. 5. CPPs como transportadores moleculares.

### Formación de complejos no covalentes entre el CPP y la molécula terapéutica.

La formación del complejo no covalente entre el CPP y la molécula de interés, involucra interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas (Figura 5). Se conocen varios ejemplos de esta clase de conjugados, como el MPG con la SiRNA,<sup>29</sup> la interacción de la avidina con el complejo biotina-CPP,<sup>45</sup> entre otros.

La principal ventaja de este método, es la fácil preparación de estos complejos. Además, los CPPs pueden ser utilizados para conjugar un rango amplio de moléculas sin implicar modificaciones químicas.<sup>46</sup>

Diversos conjugados derivados de fármacos como la doxorubicina y la miltefosina, se han formado a partir de uniones covalentes o no covalentes entre el CPP y el fármaco. Estos fármacos se han conjugado a una gran variedad de CPPs de manera directa o formando parte de nanoencapsulados y se han probado en diferentes modelos para estudiar su capacidad de atravesar membranas citoplasmáticas de distintas líneas celulares, así como la barrera hematoencefálica (BHE) (Tabla 2).

### Péptidos con capacidad de atravesar la membrana celular (CPPs) en estudios clínicos.

Hasta el 2014, más de 60 péptidos terapéuticos se habían introducido en el mercado farmacéutico y cuatro de ellos con elevadas ganancias en el mercado global (Ej, Copaxone, Lupron, Zoladex y Sandostatin). Sin embargo, ninguno de estos péptidos tienen como diana terapéutica las proteínas intracelulares, limi-

aplicaciones potenciales de los CPPs tengan utilidad clínica. El primer factor que obstaculiza el avance en este sentido es el costo sintético, lo cual es una desventaja, especialmente cuando se trata del escalado de la síntesis peptídica con la finalidad de realizar los estudios correspondientes en animales y humanos. Adicionalmente, estos péptidos no son oralmente biodisponibles, lo que trae como consecuencia que en los ensayos clínicos realizados hasta la fecha, se suministran a través de aplicaciones tópicas, o por vía intravenosa. Otra cuestión a tener en cuenta es que los CPPs de tipo catiónico y hidrofóbicos, a pesar de ser transductores potentes y eficientes, presentan una absorción altamente no específica, potenciando los efectos secundarios causados con relación al efecto terapéutico. Por último, como con cualquier medicamento terapéutico nuevo, será imprescindible valorar el efecto de estas nuevas entidades en el riñón, así como la toxicidad hepática que presenten vs el beneficio terapéutico que reporten.

## CONCLUSIONES

Los péptidos que atraviesan la membrana celular (CPPs) pueden definirse como péptidos pequeños de 5-30 aminoácidos de longitud que, gracias a características estructurales y conformacionales definidas, tienen el potencial para transportar numerosos tipos de agentes terapéuticos a través de la membrana celular. Entre las características más comunes para estas entidades resalta la presencia de carga neta positiva, así como el carácter anfipático

Fármaco	Tipo de unión	CPPs	Modelo	Ref.
Doxorubicina	Covalente	D-penetratina SynB1	Ratón y rata (BHE)	47
	Covalente	Angiopep-2	Ratón (BHE)	48
	No covalente	CADY-1	Células HeLa y ratones	49
	Covalente	ACPP	Células HT-1080 y MCF-7	50
	Covalente	oligoargininas (R8)	Ratón	51
	Covalente	pVEC- gHo	Células HEK 293, U87 y HeLa, ratón	52
	Covalente	oligoargininas (R8) y péptido rico en prolinas	Células MCF-7, HT-1080	44
Liposomas-doxorubicina*	Covalente	Tat (AYGRKKRRQRRR)	Células endoteliales de los capilares del cerebro, C6 y ratón	53
Doxorubicina-liposomas*	Covalente	PFV	Células MCF-7, MCF-7/Adr 4T1, ratón	54
Micela-doxorubicina*	Covalente	R8-RGD	Células HeLa y 293T	55
Nanopartículas de CaCO <sub>3</sub> -doxorubicina*	No covalentes	KALA	Células HeLa	56
Nanotubo-doxorubicina*	Covalente	Angiopep-2	Células endoteliales de los capilares del cerebro, C6 y ratón	57
Doxorubicina-liposoma-(Tf*)	Covalente	Tat Penetratina Mastoparan	Células Daoy, U87 y bEnd.3	58
Miltefosina-BODIPY	Covalente	Tat	<i>Leishmania</i>	59

**Table 2.** Ejemplos de CPPs transportadores de doxorubicina y miltefosina. HT-1080 (fibrosarcoma humano), MCF-7 (adenocarcinoma de seno humano), HEK 293 (riñón de embrión humano), U87 (similar al epitelio, glioma humano), HeLa (cáncer de cérvico-uterino), HT-29 (carcinoma de colon humano), C6 (células glioma). \* El CPP se une de forma covalente al nanocompuesto, mientras que el fármaco está encapsulado en el interior del nanocompuesto.

Conjugado CPPs-principio activo	Aplicación	Estudios clínicos	Compañía
AZX100	Cicatrices queloides	Fase II	Capstone Therapeutics
RT001	Arrugas en la piel	Fase II	Revances Therapeutics
KAI-9803	Infarto de miocardio	Fase II	KAI Pharmaceuticals
XG-102	Pérdida de la audición	Fase II	Auris medical
Psorban (ciclosporina-poliarginina)	Psoriasis	Fase II	CellGate, Inc.
(RAhx-R)4	Previene el bloqueo eventual de la vena transplantada después de la cirugía de bypass vascular	Fase I	Avio Biopharma
p28	Tratamiento de tumores sólidos que expresan p53 y tumores malignos en el CNS	Fase I	clinicaltrials.gov
ISS P-002	Vacuna del VIH	Fase I	Istituto Superiore di Sanita and Novartis
DTS-108	Tratamiento del cáncer	Fase I	Drais Pharmaceuticals y Diatos SA
AVI5038	Tratamiento de distrofia muscular de Duchenne	Fase preclínica	AVI BioPharma Inc.

**Table 3.** CPPs que se encuentran en ensayos clínicos. <sup>15,24</sup>



de estas estructuras. Otro aspecto importante que augura el éxito de las plataformas terapéuticas que empleen estos compuestos, es sin duda la versatilidad que brindan cuando se trata de formar la unión CPP-principio activo, abarcando una gran variedad de uniones covalentes (enlace amida, enlace tiol, espaciadores homo o heterobifuncionales, etc), así como uniones no covalentes, siendo las interacciones electrostáticas o las interacciones homofóbicas las más reportadas dentro de este contexto.

Aunque los primeros CPPs estudiados fueron de origen natural (Tat, pAntp, MPG, etc), en los últimos años los peptidomiméticos y/o plegómeros peptídicos han ocupado un lugar importante en los estudios realizados, demostrando que su empleo minimiza problemas relacionados con la baja biodisponibilidad, la absorción no específica y la degradación enzimática de las secuencias peptídicas naturales. Como consecuencia, plegómeros peptídicos como los  $\gamma$ -péptidos sintetizados a partir de la *cis*- $\gamma$ -amino-L-prolina, se encuentran en el punto de mira para su utilización en el desarrollo de plataformas terapéuticas eficientes con un amplio rango de aplicaciones biomédicas.

## Referencias bibliográficas

- Schneider, M. et al. Crossing biological barriers for advanced drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 84, 239–41 (2013). DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.03.009
- Wang, F. et al. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. *J. Control. Release* 174, 126–36 (2014). DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.11.020
- Munyendo, W. L., Huixia, L., Benza-Ingoula, H., Baraza, L. D. & Zhou, J. Cell penetrating peptides in the delivery of biopharmaceuticals. *Biomolecules* 2, 187–202 (2012). DOI: 10.3390/biom2020187
- Regberg, J., Srimanee, A. & Langel, Ü. Applications of Cell-Penetrating Peptides for Tumor Targeting and Future Cancer Therapies. *Pharmaceuticals* 5, 991–1007 (2012). DOI:10.3390/ph5090991
- Lee, J. Y., Bae, K. H., Kim, J. S., Nam, Y. S. & Park, T. G. Intracellular delivery of paclitaxel using oil-free, shell cross-linked HSA--multi-armed PEG nanocapsules. *Biomaterials* 32, 8635–44 (2011). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.063
- Nakase, I., Tanaka, G. & Futaki, S. Cell-penetrating peptides (CPPs) as a vector for the delivery of siRNAs into cells. *Mol. Biosyst.* 9, 855–61 (2013). DOI: 10.1039/C2MB25467K
- Bai, H. et al. Antisense inhibition of gene expression and growth in gram-negative bacteria by cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids targeted to rpoD gene. *Biomaterials* 33, 659–67 (2012). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.075
- Liu, B. R., Liou, J. S., Chen, Y. J., Huang, Y. W. & Lee, H. J. Delivery of nucleic acids, proteins, and nanoparticles by arginine-rich cell-penetrating peptides in rotifers. *Mar. Biotechnol. (NY)*. 15, 584–95 (2013). DOI: 10.1007/s10126-013-9509-0
- Galdiero, S. et al. Intracellular delivery: exploiting viral membranotropic peptides. *Curr. Drug Metab.* 13, 93–104 (2012). DOI: 10.2174/138920012798356961
- Marín, S., Pujals, S., Giralt, E. & Merkoçi, A. Electrochemical investigation of cellular uptake of quantum dots decorated with a proline-rich cell penetrating peptide. *Bioconjug. Chem.* 22, 180–5 (2011). DOI: 10.1021/bc100207w
- Zappavigna, S., Misso, G., Falanga, A., Perillo, E., Novellino, E., Galdiero, M., Grieco, P., Caraglia, M., Galdiero, S. Nanocarriers Conjugated with Cell Penetrating Peptides: New Trojan Horses by Modern Ulysses. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 17, 8, 700–722 (2016). DOI: 10.2174/1389201017666160415155145
- Jiao, C.Y. et al. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J. Biol. Chem.* 284, 33957–65 (2009). <http://www.jbc.org/content/284/49/33957.full>
- Guo, Z., Peng, H., Kang, J. & Sun, D. Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications (Review). *Biomedical reports*. 4, 528–534 (2016). DOI: 10.3892/br.2016.639
- Bechara, C. & Sagan, S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* 587, 1693–702 (2013). DOI: 10.1016/j.febslet.2013.04.031
- Koren, E. & Torchilin, V. P. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends Mol. Med.* 18, 385–93 (2012). DOI: 10.1016/j.molmed.2012.04.012
- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. & Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 10444–50 (1994). <http://www.jbc.org/content/269/14/10444.full.pdf>
- Futaki, S. et al. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* 276, 5836–40 (2001). DOI: 10.1074/jbc.M007540200
- Wender, P. A., Cooley, C. B. & Geihe, E. I. Beyond cell penetrating peptides: designed molecular transporters. *Drug Discov. Today Technol.* 9, e49–e55 (2012). DOI: 10.1016/j.ddtec.2011.07.004
- Morris, M. C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F. & Divita, G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 25, 2730–6 (1997). <http://nar.oxfordjournals.org/content/25/14/2730.full.pdf+html>
- Gros, E. et al. A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 384–93 (2006). DOI: 10.1016/j.bbame.2006.02.006
- Elmqvist, A., Lindgren, M., Bartfai, T. & Langel U. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp. Cell Res.* 269, 237–44 (2001). DOI: 10.1006/excr.2001.5316
- Krauss, U., Müller, M., Stahl, M. & Beck-Sickingler, A. G. In vitro gene delivery by a novel human calcitonin (hCT)-derived carrier peptide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 51–54 (2004). DOI: 10.1016/j.bmcl.2003.10.014
- Vlieghe, P. & Khrestchatsky, M. Peptide-based vectors for blood-brain barrier targeting and delivery of drugs to the central nervous system. *Ther. Deliv.* 1, 489–94 (2010). DOI: 10.4155/tde.10.44
- Milletti, F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* 17, 850–60 (2012). DOI: 10.1016/j.drudis.2012.03.002
- Kaspar, A. & Reichert, J. M. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discov. Today* 18, 807–17 (2013). DOI: 10.1016/j.drudis.2013.05.011
- Gellman SH. Foldamers: A Manifesto. *Acc Chem Res.* 1998;31(4):173–180. doi:10.1021/ar960298r.
- Smith, B. J. et al. Structure-guided rational design of  $\alpha/\beta$ -peptide foldamers with high affinity for BCL-2 family prosurvival proteins. *Chembiochem* 14, 1564–72 (2013). DOI: 10.1002/cbic.201300351
- Farrera-Sinfreu, J. et al. A new class of foldamers based on *cis*- $\gamma$ -amino-L-proline. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 6048–57 (2004). DOI: 10.1021/ja0398621
- Morris, M. C., Deshayes, S., Heitz, F. & Divita, G. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol. Cell* 100, 201–17 (2008). DOI: 10.1042/BC20070116
- Liu, B. R. et al. Endocytic trafficking of nanoparticles delivered by cell-penetrating peptides comprised of nona-arginine and a penetration accelerating sequence. *PLoS One* 8, e67100 (2013). DOI:10.1371/journal.pone.0067100
- Schafmeister, C. E., Po, J. & Verdine, G. L. An all-hydrocarbon cross-linking system for enhancing the helicity and metabolic stability of peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 5891–5892 (2000). DOI: 10.1021/ja000563a
- Ochocki, J. D., Mullen, D. G., Wattenberg, E. V. & Distefano, M. D. Evaluation of a cell penetrating prenylated peptide lacking an intrinsic fluorophore via in situ click reaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 4998–5001 (2011). DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.04.138
- Covic, L., Gresser, A. L., Talavera, J., Swift, S. & Kuliopulos, A. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 643–8 (2002). DOI: 10.1073/pnas.022460899
- Watkins, C. L. et al. Cellular uptake, distribution and cytotoxicity of the hydrophobic cell penetrating peptide sequence PFVYLI linked to the proapoptotic domain peptide PAD. *J. Control. Release* 140, 237–44 (2009). DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.04.028
- Oehlke, J. et al. Cellular uptake of an  $\alpha$ -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta* 1414, 127–39 (1998). doi:10.1016/S0005-2736(98)00161-8
- Deshayes, S., Decaffmeyer, M., Brasseur, R. & Thomas, A. Structural polymorphism of two CPP: an important parameter of activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1197–205 (2008). DOI:10.1016/j.bbame.2008.01.027
- Pujals, S. & Giralt, E. Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 473–84 (2008). DOI:10.1016/j.addr.2007.09.012
- Li, L., Geisler, I., Chmielewski, J. & Cheng, J.-X. Cationic amphiphilic polyproline helix P11LR targets intracellular mitochondria. *J. Con-*

- trol. Release 142, 259–66 (2010). DOI:10.1016/j.jconrel.2009.10.012
39. Fernández-Carneado, J., Kogan, M. J., Castel, S., & Giralt, E. (2004). Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 43(14), 1811–4. <http://doi.org/10.1002/anie.200352540>
  40. Sadler, K., Eom, K. D., Yang, J.-L., Dimitrova, Y. & Tam, J. P. Translocating proline-rich peptides from the antimicrobial peptide Bactenecin 7. *Biochemistry* 41, 14150–157 (2002). DOI: 10.1021/bi0266611
  41. Farrera-Sinfreu, J., Giralt, E., Castel, S., Albericio, F. & Royo, M. Cell-penetrating cis  $\gamma$ -amino-L-proline-derived peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 9459–68 (2005). DOI: 10.1021/ja051648k
  42. Gorrea, E., Carbajo, D., Gutiérrez-Abad, R., Illa, O., Branchadell, V., Royo, M., Ortuño, R.M. Searching for new cell-penetrating agents: hybrid cyclobutane-proline  $\gamma,\gamma$ -peptides. *Org. Biomol. Chem.* 10, 20, 4050–4057(2012). DOI: 10.1039/c2ob25220a.
  43. Cavalli, S., Carbajo, D., Acosta, M., Lope-Piedrafita, S., Candiota, A. P., Arús, C., Royo, M., & Albericio, F. Efficient  $\gamma$ -amino-proline-derived cell penetrating peptide–superparamagnetic iron oxide nanoparticle conjugates via aniline-catalyzed oxime chemistry as bimodal imaging nanoagents. *Chem. Commun.*, 48, 5322–5324 (2012). DOI: 10.1039/c2cc17937g
  44. Lelle, M., Frick, S. U., Steinbrink, K. & Peneva, K. Novel cleavable cell-penetrating peptide-drug conjugates: synthesis and characterization. *J. Pept. Sci.* 20, 323–33 (2014). DOI: 10.1002/psc.2617
  45. Pooga, M. & Langel, Ü. Synthesis of cell-penetrating peptides for cargo delivery. *Methods Mol. Biol.* 298, 77–89 (2005). DOI: 10.1385/1-59259-877-3:077
  46. Sarko, D. et al. The Pharmacokinetics of cell-penetrating peptides. *Mol. Pharm.* 7, 2224–31 (2010). DOI: 10.1021/mp100223d
  47. Rousselle, C. et al. New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy. *Mol. Pharmacol.* 57, 679–86 (2000). DOI: 10.1124/mol.57.4.679
  48. Ché, C. et al. New Angiopep-modified doxorubicin (ANG1007) and etoposide (ANG1009) chemotherapeutics with increased brain penetration. *J. Med. Chem.* 53, 2814–24 (2010). DOI:10.1021/jm9016637
  49. Li, Y. et al. Self-assembled peptide (CADY-1) improved the clinical application of doxorubicin. *Int. J. Pharm.* 434, 209–14 (2012). DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.003
  50. Shi, N.-Q., Gao, W., Xiang, B. & Qi, X. R. Enhancing cellular uptake of activable cell-penetrating peptide-doxorubicin conjugate by enzymatic cleavage. *Int. J. Nanomedicine* 7, 1613–21 (2012). DOI: 10.2147/IJN.S30104
  51. Nakase, I., Konishi, Y., Ueda, M., Saji, H. & Futaki, S. Accumulation of arginine-rich cell-penetrating peptides in tumors and the potential for anticancer drug delivery in vivo. *J. Control. Release* 159, 181–8 (2012). DOI:10.1016/j.jconrel.2012.01.016
  52. Eriste, E. et al. Peptide-based glioma-targeted drug delivery vector gHoPe2. *Bioconjug. Chem.* 24, 305–13 (2013). DOI: 10.1021/bc300370w
  53. Qin, Y. et al. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for improving brain delivery and therapeutic efficacy on brain glioma in animals. *Int. J. Pharm.* 420, 304–12 (2011). DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.09.008
  54. Cai, D. et al. Hydrophobic penetrating peptide PFVYLI-modified stealth liposomes for doxorubicin delivery in breast cancer therapy. *Biomaterials* 35, 2283–94 (2014). DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.11.088
  55. Chen, J.-X. et al. Construction of surfactant-like tetra-tail amphiphilic peptide with RGD ligand for encapsulation of porphyrin for photodynamic therapy. *Biomaterials* 32, 1678–84 (2011). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.047
  56. Zhao, D., Zhuo, R.-X. & Cheng, S.-X. Modification of calcium carbonate based gene and drug delivery systems by a cell-penetrating peptide. *Mol. Biosyst.* 8, 3288–94 (2012). DOI: 10.1039/C2MB25233C
  57. Ren, J. et al. The targeted delivery of anticancer drugs to brain glioma by PEGylated oxidized multi-walled carbon nanotubes modified with angiopep-2. *Biomaterials* 33, 3324–33 (2012). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.025
  58. Sharma G, Modgil A, Zhong T, Sun C, Singh J. Influence of short-chain cell-penetrating peptides on transport of doxorubicin encapsulating receptor-targeted liposomes across brain endothelial barrier. *Pharm Res.* 2014;31(5):1194-1209. doi:10.1007/s11095-013-1242-x.
  59. De la Torre, B. G. et al. A BODIPY-embedding miltefosine analog linked to cell-penetrating Tat(48-60) peptide favors intracellular delivery and visualization of the antiparasitic drug. *Amino Acids* 46, 1047–58 (2014). DOI: 10.1007/s00726-013-1661-3

**Recibido:** 17 de septiembre de 2016.

**Aprobado:** 12 de noviembre de 2016.

NOTICIAS Y OPINIONES / NEWS AND VIEWS

## Guardian de las alturas andinas. Estado de conservación actual del condor andino (*Vultur Gryphus*)

### Guardian of the Andean heights. Conservation status of the Andean condor (*Vulture Gryphus*)

Jorge Simón Tanquero

DOI. 10.21931/RB/2016.01.04.10

#### RESUMEN

Sobrevolando la cordillera de los Andes, el Cóndor Andino, *Vultur Gryphus* de la familia *Cathartidae*, se destaca como el ave no marina de mayor envergadura del planeta, especie endémica de la zona y emblema nacional de numerosos países suramericanos vinculado al folclore. Sus benignos hábitos carroñeros mantienen limpias largas extensiones montañosas, páramos y desiertos, evitando la proliferación de enfermedades, sin embargo, en la actualidad la falta de una adecuada difusión de información sobre esta especie y la agresiva invasión de su hábitat causan que su conservación se encuentre en estado crítico, siendo la presencia humana el principal factor de mortalidad. Por ello, desde hace varias décadas, a través de la labor conjunta internacional se ha avanzado significativamente en el estudio, conservación y repoblamiento de antiguos hábitats, evitándose la pérdida irreversible de las poblaciones, considerándose la limitada capacidad de respuesta rápida demográfica de esta ave. Para ello, una continua y activa divulgación de la realidad y la lucha del Cóndor Andino han ayudado a evitar que sus características biológicas en conjunto a las amenazas humanas que enfrentan se conviertan en una combinación irremediable para su supervivencia.

Palabras clave: *Vultur gryphus*, Suramérica, conservación, vulnerabilidad.

#### ABSTRACT

Overflying the Andes Mountains, the Andean Condor, *Vultur Gryphus* of the *Cathartidae* family, stands out as the largest non-marine bird on the planet, an endemic species of the area and national emblem of many South American countries linked through folklore. Their benign carrion habits keep clean long mountain ranges, moors and deserts, preventing the proliferation of diseases, however, at the present the lack of an adequate diffusion of information on this species and the aggressive invasion of its habitat cause that its conservation is found in critical condition, being the human presence the main factor of mortality. For this reason, for several decades, through joint international efforts, significant progress has been made in the study, conservation and repopulation of ancient habitats, avoiding the irreversible loss of populations, considering the limited demographic fast response capacity of this bird. To this end, a continuous and active dissemination of the reality and the struggle of the Andean Condor have helped to avoid that their biological characteristics, together with the human threats they face, become an hopeless combination for their survival.

Keywords: *Vultur gryphus*, South America, conservation, vulnerability.

#### Introducción

Como venerados dueños de las alturas, el Cóndor de los Andes (*Vultur gryphus*) se alza ante el majestuoso paisaje y el folclor andino como fuente de inspiración. Alcanzando fácilmente los 6 mil metros de altura, el Cóndor Andino se distingue en la distancia por su brillante plumaje negro-azulado y su gran envergadura. De cerca, la blanca gargantilla y una cabeza rosa desprovista de plumas son los rasgos que definen al cóndor, que en caso de ser macho adorna su cabeza con una cresta roja, carnosa y prominente. Llegando hasta los 3.2 metros de envergadura, los 130 centímetros de largo y pesando de 8 a 15 kilos no es de extrañar que por tal imponente presencia y los mitos que le

acompañan, se le otorgara valor religioso en el pasado, apareciendo en innumerables cerámicas o pinturas rupestres.<sup>1</sup> Valor que en el presente se manifiesta a través de su figura como símbolo nacional para varios países andinos, entre ellos Chile, Argentina y Ecuador.

Presente en las cordilleras de los Andes de América del Sur hasta las montañas Santa Martha, el cóndor se extiende desde Argentina hasta Venezuela, habitando acantilados, cuevas en altas montañas, pastizales, páramos e incluso desiertos, viajando hasta 200 kilómetros durante el día en busca de carroña y criaturas pequeñas o moribundas de las cuales se alimenta, labor para la cual se sirve de recias patas, afiladas garras y un aguzado sentido del olfato. Para detectar su comida, el cóndor se vale del olor de gases tales como el mer-

Jorge Simón Tanquero  
Yachay Tech University, Urucuqui, Ecuador  
Corresponding author: E.mail . jorge.simon@yachaytech.edu.ec





Cóndor de los Andes (*Vultur gryphus*) © Ammit | Dreamstime.com Male Andean Condor In Flight Photo

captano de etilo que se desprende de cuerpos en descomposición, y para ello basa su dieta predilecta en mamíferos pericidos de gran tamaño como caballos, cabras, llamas y venados, los cuales no consume de inmediato, sino que puede esperar hasta tres días antes animarse a hacerlo.<sup>1</sup> Son precisamente estas costumbres alimenticias las que mantienen al páramo y los valles libres de animales en putrefacción, evitan la proliferación de enfermedades, y dan nombre a la familia *Cathartidae* a la que pertenece el Cóndor, nombre que viene del griego *kathartes* que significa “el que limpia”.<sup>2</sup>

En el aspecto reproductivo, durante su vida, el Cóndor Andino es monógamo y conserva una única pareja. Curiosamente, en ocasiones se puede observar al macho durante el cortejo obsequiar a la hembra pequeños trozos de ramitas y hojas que luego colocan bajo sus alas, un peculiar comportamiento que solo se ha podido registrar en aquellos que viven en cautiverio.<sup>1</sup> Una vez seleccionada la pareja, el macho puede vivir en el nido con la hembra hasta 2 meses antes de aparearse y 2 meses después de realizada la cópula, tiempo durante el cual ambos padres se turnan en el proceso de incubación de un único huevo. Una vez nacida la cría ambos padres proveen los cuidados necesarios hasta que el polluelo crece al tamaño de sus padres en el transcurso de 2 años. El joven cóndor por su parte no será sexualmente maduro hasta pasados los 8 años, llegando a tener propiamente solo una cría cada 2-3 años.<sup>3</sup>

En caso que los padres de una cría hayan fallecido o desaparecido, para mantener al polluelo vivo, se minimiza el contacto humano con la cría; alimentándose los polluelos con titeres de látex semejantes a cóndores adultos con el fin de evitar la impronta de los polluelos con los seres humanos, lo cual podría ponerlos en peligro al ser liberados, pues no reconocerían a los seres humanos como un peligro. Ya crecidos, los cóndores se mantienen en aviaros durante tres meses antes de su liberación en donde se aclimatan a un ambiente similar al entorno donde serán liberados. Una vez libres, se les da seguimiento por satélite con el fin de observar sus movimientos y cerciorarse que permanecen vivos.<sup>4</sup>

En la actualidad, la situación del Cóndor Andino en el Ecuador es crítica, “Casi Amenazado” según la Unión Internacional

para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 2013), pues se estima en la actualidad existen menos de 58 ejemplares en estado silvestre en el país.<sup>3</sup> A pesar de su marcada longevidad, llegando a vivir hasta los 70 años, el cóndor se enfrenta a muy baja tasa de natalidad. A su vez, a pesar de no poseer depredadores naturales, la principal amenaza que enfrenta en toda su área de distribución es el hombre, a través de la caza furtiva incentivada por falsas creencias de lugareños sobre su supuesta actividad depredadora sobre el ganado, la destrucción progresiva de su hábitat mediante la expansión agrícola hacia los bosques alto andinos, el envenenamiento por la ingesta de carroña con cebos tóxicos o pesticidas y el agotamiento excesivo de especies de las cuales se alimenta ya sea por la caza indiscriminada o la presencia de especies introducidas, como lo son los perros domésticos o salvajes, que compiten por la carroña.<sup>5</sup>

En su estado silvestre el estado sanitario de las poblaciones es muy escaso, solo teniéndose algunos registros esporádicos que sugieren que en ciertos casos pueden sufrir de aspergilosis o sea, infecciones respiratorias de hongos pertenecientes al género *Aspergillus*.<sup>5</sup>

Para su conservación en el Ecuador y restaurar a estas aves a su hábitat natural, se ha habilitado la labor conjunta de zoológicos y centros de rescate y conservación, además de fundarse el Grupo Nacional de Conservación del Cóndor, un censo de aves silvestres y cautivas enfocado en documentar el manejo de cóndores en cautiverio.<sup>6</sup> Por su parte, el Quito Zoo (Quito) lidera un plan para compartir experiencias y obtener más pichones de cóndor en colaboración con el Proyecto Cóndor Huasi (Zuleta), el Parque Cóndor (Imbabura), el Zoológico San Martín de Baños (Tungurahua) y el Centro de Rescate Hacienda El Iltío (Cotopaxi). Además de que se proyecta para un futuro un espacio ambientado en Zulueta para que jóvenes cóndores sean liberados con seguridad, contando con el apoyo de las comunidades que habitan los páramos.<sup>6</sup>

Aumentar el número existente de cóndores en el Ecuador se ha convertido en una labor más prometedora gracias a la Estrategia Nacional de Conservación del Cóndor Andino bajo programas que contemplan la capacitación de guardabosques en



Andean Condor (*Vultur gryphus*) © Ammit | Dreamstime.com perched on rocks. Photo taken on: March 09th, 2008

rescate y muestreo de individuos; la implementación de primeros auxilios para cóndores silvestres rescatados; y la reproducción y reintroducción de especímenes, además del apoyo del público con campañas de educación en el país que disuadan su cacería o captura.<sup>7</sup>

Por su parte, desde 1991 el zoológico de Buenos Aires y la Fundación Bioandina Argentina vienen trabajando en el Proyecto de Conservación Cóndor Andino, al cual se suman Aves Chile y el Parque Metropolitano de Santiago en el 2000 para crear el Programa Binacional de Conservación Cóndor Andino Chile-Argentina, donde se habilitó un centro de incubación artificial y cría en aislamiento humano para la posterior reintroducción de las aves.<sup>8</sup> Recientemente este programa binacional también recolecta información sobre factores de amenaza para la especie a través de la evaluación física o necropsia de los cóndores hallados.<sup>5</sup>

La reincorporación de cóndores ha sido una estrategia utilizada por varios países desde mediados del 1990, siendo Argentina y Chile los países con mayor desarrollo de esta estrategia, lográndose liberar exitosamente individuos rehabilitados, así como aquellos criados en cautiverio, los cuales se han mantenido rastreados de forma satelital.<sup>8</sup>

Para Sur América en general, el Cóndor Andino representa un fragmento de su herencia cultural y un símbolo de su pasado y emblema de la civilización andina. Por ello su cuidado y preservación se ha vuelto ecológicamente indispensable, por su valor en la cadena trófica y por su magnífica estampa que se ha convertido en un ícono de fuerza, dedicación, orgullo y libertad con la que se identifica el pueblo latinoamericano.

**Recibido:** 20 de octubre de 2016.

**Aprobado:** 10 de diciembre de 2016.

## References

1. <http://www.bioenciclopedia.com/condor-de-los-andes/>
2. Héctor F. Aguilar. "El cóndor de los andes *Vultur gryphus* linnaeus, 1758 (ciconiiformes: ciconiidae: cathartinae): un visitante ocasional en Venezuela". Centro de investigación y reproducción de especies silvestres, Cires. Venezuela. *Revista Ecol. Lat. Am.* Vol. 6 N° 3. 2000.
3. Pedro A. Ospina Salinas. "Situación del cóndor andino (*Vultur gryphus*) en Latinoamérica". Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria, Perú. 2013.
4. <http://www.bioandina.org.ar/pcca> Luis Jácome, Dir. Proyecto de Conservación Cóndor. Proyecto de Conservación Cóndor. 2016.
5. Sergio A. Lambertucci. "Biología y conservación del cóndor andino (*Vultur gryphus*) en Argentina". Laboratorio Ecotono, Universidad Nacional del Comahue. Argentina. 2007
6. <http://www.quitozoo.org/index.php/fze/conservacion/condor-andino>
7. Estrategia nacional para conservación del Cóndor Andino. Marcela Aguinaga Vallejo, Ministra del ambiente. Acuerdo Ministerial 51. 24-Julio-2009. Vigente. República del Ecuador.
8. Jácome L, Astore V. 2009. "Cuidados y desarrollo del primer pichón de cóndor andino nacido en la costa Atlántica patagónica". *Newsletter Conservación & Ciencia* N°5, 01/11/2009. Jardín Zoológico de la Ciudad de Buenos Aires. Argentina



# ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS E INGENIERÍA



Yachay Tech es la primera universidad de investigación interdisciplinaria en Ecuador. Su objetivo es convertir a la región Andina en un centro que forme ciudadanos que contribuyan a la tecnología, la economía, la cultura y el espíritu empresarial del mundo.

La Universidad está en búsqueda de investigadores Ph.Ds que deseen unirse al cuerpo docente de su Escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería y que deseen aportar activamente al desarrollo de la institución.

La escuela está liderada por el decano Spiros Agathos, Ph.D., cuenta con su propio Jardín Botánico para investigación, laboratorios de última tecnología y un importante equipo de trabajo que permite ampliar las conexiones de colaboración para la implementación de grandes proyectos.

Contacto de aplicaciones:  
Spiros Agathos, Ph.D  
sagathos@yachaytech.edu.ec



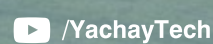
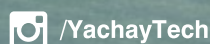
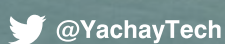
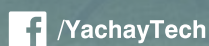
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS E INGENIERÍA



[www.yachaytech.edu.ec](http://www.yachaytech.edu.ec)



UNIVERSIDAD DE INVESTIGACIÓN DE TECNOLOGÍA EXPERIMENTAL







Presenta a usted el **Vademécum Farmacéutico Edifarm**, el compendio de información más completo del país.

[http://edifarm.com.ec/edifarm\\_quickmed/](http://edifarm.com.ec/edifarm_quickmed/)

*Vademécum multimedia con la información básica para prescribir de aproximadamente 5.000 productos farmacéuticos ecuatorianos, presenta búsquedas por:*

- Producto
- Ingrediente Activo
- Laboratorio
- Clasificación ATC.
- Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE10)



Versión Web

Además de incluye **precios de venta al público referenciales**: totales y unitarios, dosis en pediatría, reacciones adversas e interacciones medicamentosas.

Otras versiones:



Versión Mobile (QuickMed®)

Teléfonos inteligentes y tablets  
<http://edifarm.com.ec/mobile>



[www.edifarm.com.ec](http://www.edifarm.com.ec)

Azuarcas N45-311 y Malvas - Teléfonos: (593-2) 292-3105 / 292-3106  
Quito • Ecuador

