

Los quitosanos y la lucha contra los coronavirus

Cristóbal Lárez Velásquez^{1*}, Maura Rojas Pirela²

¹⁾ Grupo de Polímeros, Departamento de Química, Facultad de Ciencias,
Universidad de Los Andes, Mérida 5101 – Venezuela

²⁾ Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

(*) clarez@ula.ve

Recibido: 25/03/2020

Aceptado: 30/04/2020

Resumen

En el presente trabajo se presenta una visión amplia de las potenciales aplicaciones que puede tener el biopolímero quitosano, y sus derivados, en cada una de las estrategias que se desarrollan en la actualidad en la lucha contra el virus asociado a la pandemia de la COVID-19. En primer lugar se presenta información resumida acerca de las características más importantes de la familia de los coronavirus y las principales enfermedades en humanos asociadas a ellos. A continuación se exponen las principales características (inocuidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, muco-adhesividad, hemostático, espesante, permeación mucosal, anti-tumoral, anti-inflamatoria, etc.) que hacen del quitosano y sus derivados excelentes candidatos para estos fines. Finalmente se muestran algunos ejemplos de los estudios realizados con estos materiales como adyuvantes en la administración de vacunas (especialmente vía intranasal), agentes antivirales, en el control de la tormenta de citocinas y en la terapia pasiva de antígenos. Este trabajo muestra claramente la impresionante potencialidad de estos materiales en la lucha contra estos patógenos.

Palabras claves: quitosano; SARS-CoV-2; vacunas; pandemia; antiviral; coronavirus

Abstract

Chitosans and the fight against the coronaviruses. This work presents a broad vision of the potential applications that chitosan biopolymer, and its derivatives, may have in each of the strategies currently developed in the fight against the virus associated with the COVID-19 pandemic. Summary information about the most important characteristics of the coronavirus family and their main associated human diseases is presented. The main characteristics (harmlessness, biocompatibility, biodegradability, muco-adhesiveness, hemostatic, thickener, mucosal permeation, anti-tumor, anti-inflammatory, etc.) that make chitosan and its derivatives excellent candidates for these purposes are exposed. Finally, some selected examples of the studies carried out with these materials such as adjuvants in the administration of vaccines (especially intranasal route), antiviral agents, control of cytokine storm, and passive antigen therapy, are shown. This work clearly shows the impressive potential of these materials in the fight against these pathogens.

Keywords: Chitosan; SARS-CoV-2; Vaccines; Pandemic; Antiviral; Coronavirus

Introducción

La dramática situación derivada de la pandemia que vive la humanidad desde hace ya algunos meses, desde enero de 2020 en algunos países, ha permitido observar algunas características de la especie humana casi inimaginables hace solo unos cuantos días. En primer lugar mostró que es tan frágil como cualquier otra especie habitante del planeta, además de confirmar que existen en ella sectores más vulnerables, por mucho que haya avanzado el mundo en la búsqueda de la igualdad y la protección de los derechos humanos. En segundo lugar se puede mencionar que algunas de las naciones económicamente más poderosas del globo han usado descaradamente su poder para lograr los insumos necesarios en el tratamiento de su situación. En tercer lugar, ha mostrado de manera palpable la necesidad que tienen los países de formar sus

propios científicos y expertos en todas las áreas del conocimiento humano; sin embargo, también se ha podido apreciar que no es suficiente con disponer de este personal de alto nivel, es necesario que los gobernantes presten atención a sus recomendaciones. En ese sentido, parece increíble lo que ha ocurrido en algunos países donde los gobernantes han impuesto sus caprichos personales por sobre las recomendaciones de sus propios expertos, e incluso por sobre una inmensa cantidad de las personas que los han elegido, en relación a las políticas sanitarias a seguir, con resultados catastróficos para sus naciones.

Afortunadamente la pandemia no ha mostrado solo el lado negativo de los seres humanos, también ha permitido reconocer el trabajo abnegado, y ahora se comprende que salarialmente subvalorado con relación a otros oficios, de muchos

gremios prestadores de servicios en el área de la salud, distintos al de los héroes médicos, como por ejemplo el de los enfermeros, los técnicos especializados en servicios hospitalarios, asistentes de laboratorios clínicos, paramédicos, conductores de ambulancias, personal de aseo y mantenimiento, etc., quienes en general prestan sus servicios con un alto grado de responsabilidad y arriesgando su vida y la de sus familiares; un riesgo que siempre ha estado allí presente pero que se visualiza por primera vez en toda su magnitud. Para ellos el reconocimiento simbólico ha sido mundial, como se ha visto a lo largo y ancho del globo. Esperemos que también ese reconocimiento se haga salarialmente, con mayor justicia, y que al menos estos héroes anónimos logren devengar cifras similares a la de otros héroes que en tiempos de paz arriesgan menos, como los deportistas o los militares.

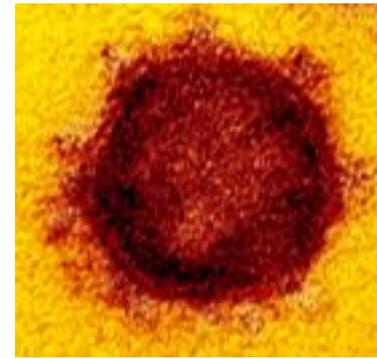
Similarmente, otro gremio cuyo trabajo callado y tesonero debería ser valorado en su justa dimensión luego de la pandemia es el de los investigadores científicos relacionados al área de la salud. Y aunque en muchos casos hayan podido darse situaciones de competencia entre investigadores, en general, lo que se ha visto es que muchos laboratorios alrededor del mundo han combinado recursos y personal de alto nivel para tratar de encontrar a la mayor brevedad posible alguna solución para el problema. En ese sentido, merece la pena destacar el trabajo publicado muy recientemente por 54 autores, de 8 instituciones distintas, el cual abre muchas esperanzas porque demuestra que una vacuna experimental aplicada a macacos les confirió inmunidad cuando son expuestos a nuevos contagios¹.

En el presente trabajo se revisan de manera muy resumida las posibilidades que presentan el biopolímero quitosano y algunos de sus derivados en los cuatro aspectos fundamentales en los que se ha enfocado la lucha contra los coronavirus, incluyendo el actual causante de la pandemia: el tristemente célebre SARS-CoV-2.

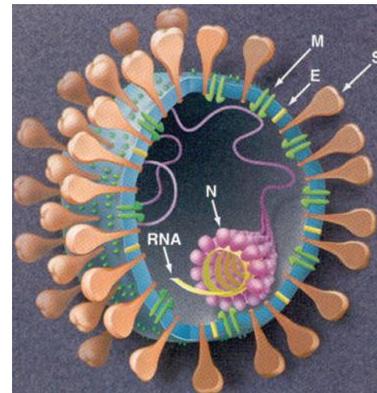
La familia de los coronavirus

Los coronavirus (CoVs) son virus pertenecientes a la familia de los *Coronaviridae*, orden *Nidovirales*, responsables de causar infecciones respiratorias, entéricas, hepáticas y neurológicas en humanos y animales². En el caso de los humanos, estos virus no se consideraban patógenos hasta el brote del síndrome respiratorio agudo severo (SARS por sus siglas en inglés) en 2002-2003, ocurrido en la provincia de Guangdong, China^{3,4}. Antes de este brote en Guangdong, los coronavirus solo eran asociados a infecciones leves, principalmente en individuos inmunocompetentes⁵. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS), define a los coronavirus como una “*amplia familia de virus que pueden causar diversas afecciones, desde el resfriado común hasta enfermedades más graves, como ocurre con el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y el que ocasiona el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV)*”⁶.

Estructuralmente, los CoVs son virus con un tamaño que oscila entre 80-220 nm; poseen una envoltura caracterizada por lar-



(a)



(b)

Fig. 1: (a) Micrografía en el microscopio de transmisión electrónica del SARS-CoV-2 causante de la pandemia de COVID-19 (vista parcial de la fotografía tomada de <https://www.flickr.com/photos/niaid/49530315718/in/album-72157712914621487/>); (b) Ilustración de la organización de las estructuras que conforman un CoV típico (SRAS-CoV)³, M = membrana, S = espigas, E = glicoproteínas de la envoltura, RNA = ácido ribonucleico, una mono hebra de nucleotidos, N = cápside. Con licencia número 4833940432286 de la Asociación Americana para el Avance de la Ciencia (*The American Association for the Advancement of Science*).

gas proyecciones de proteínas, similares a espigas, que sobresalen de ella semejando una corona cuando son vistos en el microscopio electrónico (figura 1a). En su parte interna se encuentra el núcleo conteniendo el genoma, conformado por RNA monocatenario positivo (ARNmc+) no segmentado, el cual está protegido por la nucleocápside (figura 1b). Muchos de los CoVs se distinguen por tener genomas muy grandes, que pueden alcanzar hasta 32 kilobases⁷.

Inicialmente esta familia fue dividida en tres grupos basados en métodos serológicos; sin embargo, luego de la implementación de técnicas moleculares para su reconocimiento, su división ha sido reorganizada en cuatro grupos: alfa-, beta-, gamma- y delta-CoV⁸. Los CoVs se caracterizan por tener una amplia diversidad de huéspedes y tropismo tisular⁹. En humanos, los alfa- y beta-coronavirus suelen causar enfermedades respiratorias. Algunos CoVs se han encontrado solo en ciertas especies, lo cual no significa que tienen restricción en sus hospedadores; algunos beta-coronavirus (SARS- y MERS-CoV) tienen la capacidad de pasar de sus reservorios zoonóticos a los humanos, atravesando las barreras entre especies^{5,10,11}. La tabla 1 detalla los tipos de CoVs conocidos, con algunos ejemplos de sus enfermedades asociadas en animales y humanos.

Tabla 1. Algunos tipos de coronavirus causantes de enfermedades en animales y humanos.

Tipo	En animales	En humanos
Alfa	<p>Coronavirus entérico felino (FECV): descubierto al inicio de los años 1960¹² se considera el agente etiológico de infecciones entéricas persistentes y asintomáticas de felinos domésticos y salvajes¹³.</p> <p>Virus de la peritonitis infecciosa de felinos (FIPV): es una patotipo virulento del FECV¹⁴ causante de una infección sistémica severa y letal, que produce lesiones en múltiples órganos, con predominio en el peritoneo¹⁵.</p> <p>Coronavirus caninos (CCoV): reconocido en 1971 como patógeno de perros¹⁶, en los cuales es muy común y causa enteritis autolimitante, acompañada por un cuadro diarreico leve¹⁷.</p> <p>Virus de la enfermedad epidémica porcina (PEDv): causa una enfermedad entérica descrita en 1978 en Europa¹⁸, caracterizada por vómito y diarrea acuosa principalmente en lechones lactante¹⁹.</p>	<p>HCoV-229E: reportado por primera vez en 1966²⁰ y ha sido asociado al resfriado común y a la neumonía²¹, aunque recientemente se reportó un caso de síndrome de distrés respiratorio agudo asociado a este patógeno como único causante²².</p> <p>HCoV-NL63: reportado por primera vez en 2004^{23,24} y fue asociado a bronquiolitis²³ y neumonía²⁴ en niños hospitalizados.</p>
Beta	<p>Coronavirus virus de la hepatitis del ratón (MHV): descrito en 1949 por primera vez²⁵, es de los virus más comunes en ratones de laboratorios²⁶. La infección se caracteriza por daños en el hígado y cerebro, llevando al desarrollo de la hepatitis y encefalitis desmielizante²⁷; también se ha reportado que algunas cepas pueden causar SARS y neumonía²⁸.</p> <p>Coronavirus respiratorio canino (CRCoV): inicialmente identificado en el 2003, en muestras de las vías respiratorias de perros con infecciones respiratorias²⁹. La infección se caracteriza por ser leve y autolimitante, acompañada por una tos seca y cortante³⁰. Sin embargo, en algunos casos la enfermedad puede progresar a una bronconeumonía, potencialmente letal³¹.</p> <p>Coronavirus bovino (BCoV): identificado en 1973 como agente etiológico de la diarrea neonatal en terneros³² y disentería invernal en vacas³³. Los signos clínicos son variables, desde su ausencia completa a severos, incluyendo fiebre, signos respiratorios y diarrea con o sin sangre³⁴.</p> <p>Coronavirus equino (ECoV), aislado inicialmente en 1999³⁵, es asociado con fiebre, anorexia, letargo, así como cólicos y diarrea en caballos³⁶. Adicionalmente se han documentado complicaciones vinculadas con la alteración de la barrera gastrointestinal, endotoxemia y septicemia³⁷.</p>	<p>HCoV-OC43: reportado por primera vez en 1966³⁸; ha sido asociado al resfriado común³⁹ y otras infecciones respiratorias graves como neumonía, bronquitis y bronquiolitis⁴⁰. Se ha propuesto que su infección puede tener un rol importante en el desarrollo de algunas enfermedades neurológicas como la enfermedad desmielinizante crónica y la encefalomielitis aguda⁴¹. Los estudios moleculares han identificado cuatro genotipos (A, B, C y D)⁴².</p> <p>HCoV-HKU: identificado por primera vez el año 2005 en Hong Kong⁴³ y ha sido vinculado al resfriado común, neumonía y bronquiolitis⁴⁴.</p> <p>SARS-CoV: fue identificado por primera vez entre 2002-2003³ y su infección lleva al desarrollo de un SARS⁴⁵ cuya clínica típica es la de neumonía viral con deterioro respiratorio rápido, acompañado de una diarrea acuosa, disfunción hepática, trombotosis arterial pulmonar, anomalías neuromusculares y, en algunos casos, ataques epilépticos⁴⁶⁻⁴⁸.</p> <p>MERS-CoV: aislado inicialmente en 2012 de un paciente de 60 años⁴⁹; su infección está vinculada a una neumonía aguda, acompañada en la mayoría de los casos por insuficiencia renal y fallas multiorgánicas^{50,51} con un desenlace fatal.</p> <p>SARS-CoV-2: reportado en diciembre de 2019⁵²; su infección lleva a la aparición de síntomas similares a los de SARS y MERS⁵³. Algunos pacientes desarrollan neumonía con un amplio espectro de severidad y patrones de progresión⁵²; en algunos casos, hay una progresión rápida, con desarrollo de SARS, sepsis, disfunción orgánica múltiple e incluso la muerte⁵²⁻⁵⁴.</p>
Gamma	<p>Virus de la bronquitis infecciosa (IBV): reportado en 1930 como patógeno respiratorio aviar⁵⁵; causa bronquitis en pollos afectando los riñones y el tracto reproductivo^{56,57}.</p> <p>Coronavirus del pavo (TCoV): aislado en 1973⁵⁸ ha sido asociado a la enteritis transmisible de los pavos y al síndrome de mortalidad de polluelos por enteritis (PEMS en inglés) en pavos y pollos⁵⁹.</p> <p>Coronavirus de la ballena SW1 (Whale-CoV SW1): descrito por primera vez en el 2008⁶¹; causa disfunción pulmonar generalizada e insuficiencia hepática aguda terminal en ballenas belugas (<i>Delphinapterus leucas</i>)⁶⁰.</p> <p>Coronavirus del delfín nariz de botella (BdCoV) HKU22: descubierto en 2014 en muestras fecales de delfines nariz de botella (<i>Tursiops aduncus</i>)⁶¹; no causa daño hepático y no induce síntomas clínicos, a diferencia del Whale-CoV SW1, lo que sugiere una infección asintomática⁶².</p>	<p>No se han reportado enfermedades causadas por gamma-coronavirus en humanos.</p>
Delta	<p>Deltacoronavirus porcino (PDCoV) o (CoV HKU15): enteropatógeno identificado en 2012¹ (aunque la diarrea PDCoV fue reportada por primera vez en 2014⁶³). Se asocia con diarrea, vómitos agudos, deshidratación y mortalidad en lechones neonatales⁶⁴. Se demostró que PDCoV puede ser transmitido de cerdos a aves, desarrollando éstas síntomas como la diarrea⁶⁵.</p>	<p>No se han reportado enfermedades causadas por delta-coronavirus en humanos.</p>



(a)



(b)

Fig. 2: Fotografía de (a) la civeta de la palma asiática, sospechosa de haber transmitido a los humanos el virus SARS-CoV (tomada de <https://www.flickr.com/photos/86666094@N00/4536733266>); (b) el pangolín, sospechoso de haber transmitido el virus del SARS-CoV-2 a los humanos (tomada de <https://www.lavanguardia.com/ciencia/20200227/473809390510/origen-coronavirus-covid-19-pangolin.html>).

Se ha propuesto que la transmisión de estos patógenos a los seres humanos ha sido mediada por algunos animales, en un proceso que se conoce como transmisión zoonótica. En el caso del MERS-CoV se cree que la transmisión ocurrió de los camellos a los seres humanos⁶⁶ mientras que el contagio del SARS-CoV a los humanos se dio a través de la civeta de la palma⁶⁷ (figura 1). Un nuevo coronavirus ha sido identificado preliminarmente (codificado inicialmente como 2019-nCoV pero recientemente cambiado a SARS-CoV-2) como el causante de la pandemia de COVID-19 que estremece actualmente la humanidad, aunque no se sabe exactamente como llegó a los seres humanos pero se sospechó inicialmente que pasó desde el murciélago⁶⁸ a través del pangolín⁶⁹ (figura 1b); ello debido a que la gran mayoría de los casos iniciales estuvieron relacionados a personas que trabajaban en el mercado de Huanan, en la ciudad de Wuhan, capital de la provincia de Hubei (China), donde se expenden comidas y se comercializan productos del mar así como muchos tipos de animales silvestres vivos⁷⁰. Sin embargo, los científicos responsables del estudio con el pangolín informaron posteriormente que, aunque éste no puede ser descartado completamente, los resultados no son concluyentes debido a una confusión en los análisis⁷¹. También se estima que existen otros CoV circulando en animales que todavía no han infectado al ser humano.

Quitosano: definiciones y propiedades importantes

El quitosano es un polisacárido muy bien conocido y estudiado en la actualidad debido a las numerosísimas aplicaciones que se le han encontrado y también a sus derivados⁷²⁻⁷⁶. Químicamente se puede definir como un copolímero formado por dos unidades repetitivas simples: la glucosamina (β -(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos) y la N-acetil-glucosamina (β -(1,4)-2-acetamido-2-desoxi-D-4-glucopiranos). Usualmente se acepta que, para tener la denominación de quitosano, el material debe contener dichas unidades distribuidas aleatoriamente y en proporciones tales que el material resulte soluble en medio acuoso ácido, lo cual normalmente ocurre cuando la proporción de glucosamina es mayoritaria. Por lo general estos materiales se nombran como poli(β -1,4-glucosamina-co-N-acetil- β -1,4-glucosamina) y su fuente principal de obtención es la desacetilación química termo-alcalina de la quitina o

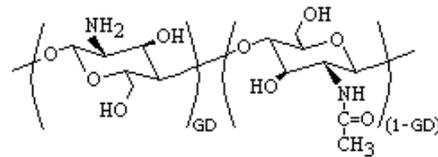


Fig. 3: Las dos unidades repetitivas en la estructura del quitosano se hayan aleatoriamente distribuidas a lo largo de la cadena. La fracción de unidades desacetiladas definen el GD mientras que las unidades acetiladas están representadas por la fracción remanente (1-GD).

poli(N-acetil β -1,4-glucosamina), aunque se puede hallar naturalmente en algunos hongos, especialmente de la especie *Mucor*. La reacción de desacetilación usualmente conduce a una distribución aleatoria de las unidades acetiladas y desacetiladas a lo largo de la cadena, en proporciones denotadas por un parámetro conocido como el grado de desacetilación (GD = fracción de unidades desacetiladas en la cadena del biopolímero). La figura 3 permite aclarar esta definición⁷⁷.

La presencia del grupo amina que porta cada una de las unidades glucosamina a lo largo de la cadena le confiere a este biopolímero un rasgo bastante distintivo del resto de los polisacáridos más usados y conocidos (pectina, dextrano, agarosa, carragenano, etc.). Así, mientras estos polisacáridos muestran propiedades ácidas en soluciones acuosas, el quitosano, debido a la protonación de estos grupos aminos, manifiesta un débil carácter básico. Similarmente, se ha propuesto que la actividad biológica de este biopolímero deriva del carácter catiónico asociado a esta protonación⁷⁸.

Generalmente el quitosano comercial se encuentra en forma de hojuelas o como un polvillo de color entre blanco y beige, cuya temperatura de transición vítrea depende del peso molecular, GD (usualmente entre 0,50-0,95) y del contenido de humedad en la muestra analizada. Por otro lado, es soluble en ácidos orgánicos de cadena corta como el fórmico, el láctico, el cítrico, el tartárico, el acético, etc., siendo una solución acuosa al 1 % de ácido acético el solvente más comúnmente reportado; en todos los casos, se debe garantizar que las soluciones ácidas usadas para su disolución tengan valores de pH < 6. También es soluble en frío en soluciones diluidas (~1%) de ácidos minerales como el ácido clorhídrico, el perclórico, el nítrico, el fosfórico, pero resulta insoluble en ácido sulfúrico

diluido, aunque puede disolver parcialmente con calentamiento⁷⁹.

El quitosano posee una serie de propiedades que le han permitido ser considerado para una amplia gama de aplicaciones, en múltiples campos. Así, por ejemplo, puede usarse como agente espesante en alimentos debido a que forma soluciones acuosas muy viscosas, es muco-adhesivo, forma complejos polielectrolitos, posee excelentes propiedades filmogénicas, actúa como agente quelante para muchos metales, posee el potencial para unirse a células microbianas y de mamíferos y, debido a su efecto regenerativo, es un excelente material para la preparación de andamiajes en ingeniería de tejidos así como para la formación de hueso. Algunas de sus aplicaciones, que ya son aprovechadas a nivel comercial, su uso agrícola como estimulante del crecimiento e inductor de mecanismos de defensa en plantas, protección de semillas, protección post-cosecha de frutos, etc.; y su uso en el área médica como vendajes y apósitos para el tratamiento de hemorragias corporales u odontológicas. Adicionalmente, en la tabla 2 se muestran algunas de las propiedades que han sido estudiadas para estos biomateriales y que resultan muy útiles en el área de liberación inteligente de sustancias bioactivas.

Estrategias para combatir las enfermedades causada por coronavirus usando quitosano y sus derivados

Aunque la Academia Militar China de Ciencias Médicas anunció en marzo de 2020 haber recibido permiso para iniciar pruebas clínicas tempranas⁸⁰, luego de indicar que han preparado con éxito una vacuna para el COVID-19, las investigaciones para encontrar tratamientos eficaces para vencer o

contener la pandemia se siguen desarrollando frenéticamente en muchos centros de investigación de diversos países. Las cuatro principales estrategias que se desarrollan para abatir la enfermedad son: la preparación y ensayo de vacunas, el uso de antivirales, el control de la tormenta de citocinas y la terapia pasiva de anticuerpos. En esta sección se presentan resumidamente algunas de las posibles aplicaciones del quitosano que se han venido investigando con anterioridad a la pandemia pero que están muy relacionadas a estas estrategias.

Uso del quitosano en sistemas de vacunación

El quitosano, y algunos de sus derivados, han sido ensayados como adyuvantes para la administración experimental de vacunas en animales⁸¹ y humanos⁸². Una de las rutas de administración de vacunas en la cual estos materiales parecieran poder brindar mejores prestaciones es a través de las mucosas, en cualquiera de sus distintas ubicaciones: oral, nasal, vaginal, rectal, etc. En tal sentido, se debe tomar en consideración que muchos de ellos poseen propiedades muco-adhesivas, asumiéndose que éstas surgen de la interacción electrostática entre sus cargas catiónicas y las cargas negativas de las mucinas, con lo cual lograrían que el antígeno tenga tiempos de residencias mayores en la superficie de las mucosas, generando mayores posibilidades para su entrada a través de las células epiteliales especializadas⁸³ (conocidas como células M) Adicionalmente, resulta sumamente interesante que ésta, y otras importantes propiedades de los quitosanos, se pueden controlar mediante la variación de parámetros fisicoquímicos específicos de estas moléculas, como por ejemplo la masa molar, el grado de desacetilación, el porcentaje de sustitución

Tabla 2. Propiedades biológicas importantes del quitosano y algunos de sus derivados.

Propiedad	Aplicaciones
Inocuidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad	El quitosano ha sido aprobado desde el año 2009 por la Administración de Alimentos y Medicinas de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) como un material generalmente seguro (GRAS, su acrónimo en inglés) para uso en alimentación ⁸⁴ . Aunque solo existen en el mercado farmacéutico unos pocos productos que incluyan el quitosano como un excipiente, estas propiedades ya han sido demostradas en numerosos trabajos ⁸⁵ , convirtiéndolo en un candidato seguro para su uso en este rol cuando se cuidan aspectos relativos a su pureza, especialmente cuando se usan crustáceos y otros productos del mar para su obtención.
Viscosificante	Mejorar el tiempo de residencia pre-corneal en formulaciones oftálmicas ⁸⁶ .
Hemostática	Existen varios productos comerciales que aprovechan esta propiedad, como por ejemplo los apósitos tipo hidrogel (nombre comercial Chitogel) para uso post-operatorio en cirugía de senos nasales ⁸⁷ así como los apósitos y vendajes (nombre comercial HemCon) ⁸⁸ usados para contener sangrados copioso luego de extracciones dentales y heridas en batalla, respectivamente.
Biocida	Numerosos son los trabajos en los cuales se demuestra la actividad fungicida y bactericida del quitosano ⁸⁹ ; sin embargo, los trabajos relacionados al control de patógenos en humanos son menos abundantes, aunque muchos de ellos lucen prometedores, tanto para hongos ⁹⁰ y levaduras ⁹¹ como para bacterias ⁹² .
Muco-adhesividad y permeación mucosal	Se han realizado diversas investigaciones para estudiar el quitosano, y algunos de sus derivados, como adyuvante o co-adyuvante en la administración de antígenos vía mucosal, a través de sus diferentes ubicaciones: oral ⁹³ , nasal ⁹⁴ , vaginal ⁹⁵ , sub-cutánea ⁹⁶ , etc.
Antit-umoral	Existe fuerte evidencia que el quitosano activa las células asesinas naturales del organismo (NK cells, en inglés), tanto para la producción de interferón y como en su citotoxicidad ⁹⁷ .
Inmuno-potenciadora	El quitosano promueve la maduración de las células dendríticas al inducir interferón tipo I (IFN-I) y mejora las respuestas antígeno-específicas del auxiliar T1 (Th1, en inglés) de una manera dependiente del receptor de IFN-I ⁹⁸ .
Anti-inflamatoria	Yoon y col. mostraron en 2007 que el quitosano puede tener efectos anti-inflamatorios importantes en procesos inducidos por lipopolisacáridos ⁹⁹ estos efectos podrían ser mediados por inducción de la expresión de inhibidores de citocinas, como por ejemplo el factor tumoral de necrosis (TNF- α en inglés) y la isoleucina 6.

y el tipo de sustituyente (en el caso de quitosanos modificados), el solvente, etc. El control fino de estas variables durante la preparación de los sistemas de transporte/liberación genera una gran potencialidad para su empleo tanto en vacunas basa-

das en partes estructurales del patógeno¹⁰⁰ como en patógenos inactivados¹⁰¹. En la tabla 3 se muestran unos pocos ejemplos de vacunas experimentales donde se ha ensayado el quitosano o alguno de sus derivados.

Tabla 3. Algunos sistemas de vacunación ensayados contra virus relacionados con el quitosano.

Antígeno	Sistema de administración	Resultados obtenidos
ADN-plásmido que codifica epítopes de la proteína M2 de virus sincinal respiratorio (RSV en inglés).	Se prepararon complejos del ADN-plásmido ADN con quitosano se administraron intranasalmente en un estudio con ratones	El complejo administrado fue capaz de inducir una respuesta protectora de linfocitos T citotóxicos (CTL en inglés) similar a la obtenida después de administración intradérmica del ADN plásmido solo ¹⁰² .
Vacuna comercial trivalente con virus de la influenza inactivados.	Se mezclaron los componentes de la vacuna trivalente con glutamato de quitosano acuoso (al 0,5%) y la solución resultante se administró intra-nasalmente, mediante spray, en un estudio con humanos adultos saludables.	La vacuna fue bien tolerada por los pacientes aunque hubo síntomas de rinorrea de corta duración. La media geométrica del título de anticuerpos HI inducidos por la vacuna cumple los requisitos del Comité de Medicamentos de Uso Humano. La suero-conversión y los niveles protectores de anticuerpos obtenidos no fueron estadísticamente diferentes de aquellos obtenidos con la vacunas salinas vía intramuscular ⁸² .
Virus inactivado A/H5N2 de pato (adaptado a ratones).	Se inyectaron intramuscularmente 0,2 ml de una preparación conteniendo 3 µg de hema-glutinina viral y 0,5% de quitosano, en un estudio realizado en ratones.	El uso del quitosano como adyuvante realzó la inmunogenicidad y la efectividad protectora del virus inactivado. Se propone que la protección contra las variantes del virus de la influenza podría ser mejor cuando se usa quitosano como adyuvante en las vacunas ¹⁰³ .
Proteína 2 de la matriz del virus de la influenza A aviar sin transmembrana (sM2) (recombinante).	La sM2 se administró tres veces, intranasalmente, a ratones, en combinación con quitosano como adyuvante (en intervalos de tres semanas).	Se obtuvo una completa protección contra el virus homólogo así como un 90 y 30% de protección contra los virus heterólogos H1N1 y H5N5, respectivamente ¹⁰⁴ .
ADN-plásmido codificando proteínas del núcleo cápside (pVAXN) of SARS-CoV	Se prepararon nanopartículas de quitosano biotinilado funcionalizadas con proteínas de fusión (bFp) y se cargaron con pVAXN para luego ser administradas nasalmente en ratones	La aplicación de este sistema de administración inteligente resultó en la obtención de altas respuestas sistémicas y mucosales ¹⁰⁵ , mostrando un comportamiento superior al de sistemas similares, los cuales usualmente necesitan dosis más elevadas de la proteína o mayor número de inmunizaciones ¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ .
Poliovirus inactivado (PVI)	Se depositaron 10 capas alternativas de PVI y trimetil-quitosano sobre micro-agujas sensibles al pH. Se usó un arreglo de 24 micro-agujas para aplicar la inmunización en la oreja durante 1 minuto (2 veces, la segunda luego de tres semanas).	Aunque los resultados mostraron que el sistema presentó características de estabilidad de la forma activa del antígeno, se pudo demostrar que este sistema induce una respuesta alta de anticuerpos específicos al antígeno ¹⁰⁸ .
Virus porcino de influenza A H1N2 inactivado	Se prepararon nanopartículas por gelación iónica de quitosano y tripolifosfato de sodio conteniendo el virus inactivado; las nanovacunas fueron aplicadas intranasalmente en aerosol dos veces en cerdos de crianza.	Los cerdos vacunados con las nanopartículas cargadas con antígeno inactivado exhibieron respuestas mayores para anticuerpos IgG en suero e IgA en las mucosas nasales, fluidos de lavados broncoalveolar y lisados pulmonares que fueron reactivos contra homólogos (H1N2), heterólogos (H1N1) y hetero-subtípicos (H3N2) cepas de virus de influenza A ¹⁰⁹ .

Actividad antiviral del quitosano

La actividad antiviral del quitosano ha sido conocida desde hace algunas décadas¹¹⁰, habiéndose reportado numerosos estudios sobre la inducción de resistencia a infecciones virales en plantas¹¹¹ y también acerca de la inhibición de infecciones virales en células animales¹¹². En el caso de las plantas, desde el comienzo de estos estudios se ha propuesto que el quitosano puede actuar mediante diversos mecanismos, bien sean que éstos logren su cometido indirectamente, como en el caso de la activación de genes relacionados con mecanismos generales de defensa en las plantas, o directamente, como por ejemplo por el bloqueo de la replicación del ARN del virus o la inhibición de proteínas específicas¹¹³.

En el caso de los coronavirus que han causado enfermedades graves en los seres humanos, como por ejemplo los MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV-2, muy recientemente se ha

propuesto que varios derivados del quitosano, denominados genéricamente como cloruros de N-[(2-hidroxi-3-trimetilammonio)-propil]-quitosano (HTCC, figura 2), con diferentes grados de sustitución, podrían ser usados como antivirales

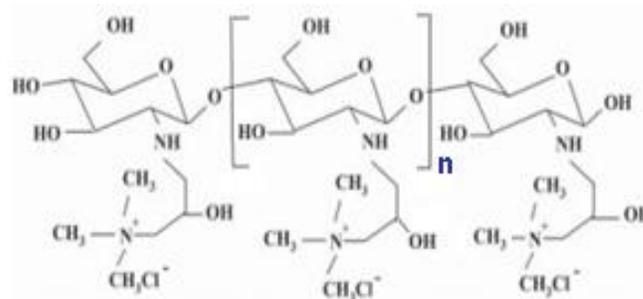


Fig. 4: Estructura del cloruro de N-[(2-hidroxi-3-trimetilammonio)-propil]-quitosano.

altamente efectivos y selectivos en la inhibición de distintos coronavirus asociados a enfermedades respiratorias agudas, incluyendo la COVID-19¹¹⁴. Uno de estos compuestos había sido reportado previamente como un adyuvante seguro y efectivo para vacunas formuladas con polipéptidos recombinantes del virus de la hepatitis E que se aplicaron en ratones¹¹⁵. El mecanismo de acción propuesto para el HTCC-63 durante la inhibición del SARS-CoV, derivado básicamente de los estudios de microscopía confocal, se ha asociado al bloqueo de los receptores de entrada del virus, los cuales exhiben la proteína dipeptidil peptidasa (DPP4); se especula que tal interacción puede ocurrir debido a la naturaleza concatémica de la superficie del virus y al hecho de que el polímero posee una apropiada distribución de carga, pudiendo interactuar de mejor manera con múltiples sitios de la superficie. La longitud de las moléculas del HTCC-63 se ha estimado en unos 700 nm¹¹⁴.

Quitosano en el control de la tormenta de citocinas

Se ha demostrado que algunos quitosanos, preferencialmente de naturaleza oligomérica, poseen propiedades inhibitorias en relación a la producción de diversas citocinas estimuladas por lipopolisacáridos (LPP), tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α por sus siglas en inglés) y la interleucina-6 (IL-6)^{99,116}. Este comportamiento es parecido al que se ha observado para el medicamento antimalárico cloroquina¹¹⁷.

Por otra parte, el quitosano también ha sido ensayado como coadyuvante en la administración de inhibidores naturales de la producción de citocinas estimuladas por LPP, como por ejemplo la curcumina. Así, por ejemplo, la aplicación de nanocristales de curcumina recubiertos con quitosano tuvo mejores prestaciones que la curcumina sola para la reducción de la secreción de TNF- α y NO en líneas celulares J774 de macrófagos¹¹⁸; en este caso se propone que este tipo de sistemas actúa dualmente: i) por efectos anti-endotoxina para la neutralización de los LPP generados por el quitosano y ii) efectos anti-inflamatorios y antioxidantes aportados por la curcumina.

Terapia pasiva de anticuerpos (TPA) y quitosano

Una TPA que pueda reconocer regiones epitópicas en una partícula entrante del virus puede disminuir la replicación de éste previniendo de esta manera la severidad de la infección¹¹⁹. Los anticuerpos necesarios para esta terapia podrían ser aislados de la sangre de pacientes recuperados o pueden ser obtenidos en los laboratorios apropiados. La experiencia previa en el tratamiento de otras infecciones virales similares, como el SARS y el MERS, indica que la administración temprana de plasma procedente de pacientes convalecientes, o inmunoglobulina hiper-inmune, procedente de pacientes que exhiben valores significativos de anticuerpos, puede llegar a reducir la carga viral y la mortalidad de la enfermedad¹²⁰.

Durante la revisión bibliográfica realizada no se encontraron trabajos relacionados al uso de quitosano en TPA para casos asociados a coronavirus. Sin embargo, esta vía terapéutica no se puede descartar en estos casos debido a que se han encon-

trado algunos estudios de TPA usando quitosano, con resultados favorables, para enfermedades asociadas a otro tipo de patógenos, como se desprende de los resultados publicados muy recientemente por Eslam y col.¹²¹. En dicho trabajo se cargaron nanopartículas de quitosano con proteínas de la membrana exterior de *Acinetobacter baumannii*, las cuales se administraron intra-nasalmente a ratones, generando una respuesta inmune mucosal y sistémica, incluyendo un aumento de los anticuerpos; la inmunización pasiva con suero obtenido de estos ratones generó una mayor supervivencia en comparación con la inmunización con suero de ratones inmunizados por vía subcutánea. Una exploración similar pudiera plantearse para proteínas estructurales de los coronavirus.

Consideraciones relevantes

Se puede intuir que los coronavirus seguirán siendo patógenos letales a los seres humanos durante mucho tiempo, independientemente de que se logren establecer medidas sanitarias y terapéuticas para controlar los ya conocidos. Peor aún, se estima que existen muchos de estos coronavirus patógenos que aún no han realizado el salto hacia los seres humanos, un hecho altamente preocupante porque no hay forma de saber actualmente acerca de su letalidad, aunque por lo observado a la fecha con el SARS-CoV-2 no hay buenas expectativas. Por si fuera poco, la posibilidad de que estos patógenos puedan experimentar mutaciones que los hagan más patogénicos y nocivos está siempre presente.

Por ello, las investigaciones relacionadas con el control de estos patógenos seguirá siendo por mucho tiempo un área activa de investigación. En tal sentido, el quitosano y sus derivados lucen con muy buenas perspectivas para ser ensayados a corto plazo en aplicaciones relacionadas a varias de las estrategias planteadas en la lucha contra este flagelo. Específicamente, algunos de los derivados conocidos como cloruros de N - [(2 -hidroxi -3 -trimetilamonio) - propil]-quitosano parecen candidatos ideales debido a que se ha comprobado su capacidad para bloquear los receptores de entrada de estos virus (DDP4 en el caso del SARS-CoV-2). Igualmente estimulantes son los resultados de los estudios con ratas que se han hecho usando micro-esferas de estos materiales como transportadores seguros de fármacos a los pulmones¹²², así como la efectividad de la inmunización de animales vía intranasal usando diversos antígenos. De esta manera, quedan abiertas las puertas para el diseño de vacunas inteligentes basadas fundamentalmente en estos materiales, como por ejemplo micro-esferas de quitosano para administración intranasal, cargadas con proteína recombinante de la espiga del coronavirus, acompañada también por HHTC como antiviral. Irónicamente, la pandemia causada por el SARS-CoV-2 también ha llevado a la disminución de la producción de algunas plantas productoras de quitosano¹²³.

Referencias

1. J Yu, LH Tostanoski, L Peter, NB Mercado, K Mc-Mahan1, SH Mahrokhan *et al.* DNA vaccine protection against SARS-

- CoV-2 in Rhesus macaques. **Science**, 10.1126/science.abc6284 (2020).
2. PC Woo, SK Lau, CS Lam, CC Lau, AK Tsang, JH Lau *et al.* Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. **J. Virology**, **86**, 3995–4008 (2012).
 3. NS Zhong, BJ Zheng, YM Li, Poon, ZH Xie, KH Chan *et al.* Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. **Lancet**, **362(9393)**, 1353–1358 (2003).
 4. C Drosten, S Günther, W Preiser, S van der Werf, HR Brodt, S Becker *et al.* Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. **New England J. Medicine**, **348(20)**, 1967–1976 (2003).
 5. J Cui, F Li, ZL Shi. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Rev. Microbiol.**, **17(3)**, 181–192 (2019).
 6. <https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus>. Consultado: 30/03/2020.
 7. F Li. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. **Annual Review of Virology**, **3(1)**, 237–261 (2016).
 8. K Pyrc, A Milewska, M Nowakowska, K Szczubialka, K Kaminski. The use of chitosan polymer in the treatment and prevention of infections by coronaviruses. European Patent Office EP 2849763B1 (2017).
 9. JK Millet, GR Whittaker. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. **Virus Research**, **202**, 120–134 (2015).
 10. E de Wit, N van Doremalen, D Falzarano, VJ Munster. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. **Nature Rev. Microbiol.**, **14(8)**, 523–534 (2016).
 11. XX Qu, P Hao, XJ Song, SS Jiang, YX Liu, PG Wang *et al.* Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy. **J. Biol. Chem.**, **280**, 29588–29595 (2005).
 12. J Holzworth. Some important disorders of cats. **Cornell Vet.**, **53**, 157–160 (1963).
 13. JA Jaimes, GR Whittaker. Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function. **Virology**, **517**, 108–121 (2018).
 14. MA Brown, JL Troyer, J Pecon-Slattery, ME Roelke, SJ O'Brien. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. **Emerg. Infect. Dis.**, **15**, 1445–1452 (2009).
 15. G Tekes, HJ Thiel. Feline Coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis. **Advances in virus research**, **96**, 193–218 (2016).
 16. LN Binn, EC Lazar, KP Keenan, DL Huxsoll, RH Marchwicki, FW Scott. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. **Proc. Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc.**, **78**, 359–366 (1974).
 17. BN Licitra, GE Duhamel, GR Whittaker. Canine enteric coronaviruses: emerging viral pathogens with distinct recombinant spike proteins. **Viruses**, **6**, 3363–3376 (2014).
 18. MB Pensaert, P de Bouck. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. **Archives of virology**, **58(3)**, 243–247 (1978).
 19. GW Stevenson H Hoang KJ Schwartz, ER Burrough, D Sun, D Madson *et al.* Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. **J. Vet. Diagn. Invest.**, **25(5)**, 649-654 (2013).
 20. D Hamre, JJ Procknow. A new virus isolated from the human respiratory tract. **Exp. Biology & Medicine**, **121(1)**, 190–193 (1966).
 21. F Pene, A Merlat, A Vabret, F Rozenberg, A Buzyn, F Dreyfus, *et al.* Coronavirus 229E-related pneumonia in immuno-com-promised patients. **Clinical Infectious Diseases**, **37(7)**, 929–932 (2003).
 22. F Vassilara, A Spyridaki, G Pothitos, A Deliveliotou, A Papadopoulos. A Rare Case of Human Coronavirus 229E Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in a Healthy Adult. **Case Reports in Infectious Diseases**, artículo número 6796839, 4 páginas (2018).
 23. L van der Hoek, K Pyrc, MF Jebbink, W Vermeulen-Oost, RJ Berkhout, KC Wolthers *et al.* Identification of a new human coronavirus. **Nat. Med.**, **10(4)**, 368-373 (2004).
 24. RA Fouchier, NG Hartwig, TM Bestebroer, B Niemeyer, JC de Jong, JH Simon, AD Oserhaus. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. **Proc. National Academy of Sciences**, **101(16)**, 6212-6216 (2004).
 25. FS Cheever, JB Daniels. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. **J. Exp. Medicine**, **90(3)**, 181–210 (1949).
 26. FR Homberger. Enterotropic mouse hepatitis virus. **Lab Anim.**, **31(2)**, 97-115 (1997).
 27. A Khanolkar, SM Hartwig, BA Haag, DK Meyerholz, LL Epping, JS Haring *et al.* Protective and pathologic roles of the immune response to mouse hepatitis virus type 1: implications for severe acute respiratory syndrome. **J. Virology**, **83(18)**, 9258–9272 (2009).
 28. Z Yang, J Du, G Chen, J Zhao, X Yang, L Su *et al.* L. Coronavirus MHV-A59 infects the lung and causes severe pneumonia in C57BL/6 mice. **Virologica Sinica**, **29(6)**, 393–402 (2014).
 29. K Erles, C Toomey, HW Brooks, J Brownlie. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. **Virology**, **310(2)**, 216–223 (2003).
 30. A Szczepanski, K Owczarek, A Milewska, Z Baster, Z Rajfur, J Mitchell *et al.* Canine respiratory coronavirus employs caveolin-1-mediated pathway for internalization to HRT-18G cells. **Vet. Research**, **49(1)**, 55 (2018).
 31. K Erles, J Brownlie. Canine respiratory coronavirus: an emerging pathogen in the canine infectious respiratory disease complex. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, **38(4)**, 815–825 (2008).

32. CA Mebus, EL Stair, MB Rhodes, MJ Twiehaus. Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. **American J. Vet. Res.**, **34(2)**, 145–150 (1973).
33. LJ Saif, DR Redman, KV Brock, EM Kohler, RA Heckert. Winter dysentery in adult dairy cattle: detection of coronavirus in the faeces. **Vet. Rec.**, **123**, 300–301 (1988).
34. M Bok, M Alassia, F Frank, CG Vega, A Wigdorovitz, V Parreño. Passive immunity to control Bovine coronavirus diarrhea in a dairy herd in Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, **50(1)**, 23–30 (2018).
35. JS Guy, JJ Breslin, B Breuhaus, S Vivrette, LG Smith. Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal. **J. Clin. Microbiol.**, **38**, 4523–4526 (2000).
36. N Pusterla, R Vin, CM Leutenegger, LD Mittel, TJ Divers. Enteric coronavirus infection in adult horses. **Vet. Journal (London)**, **231**, 13–18 (2018).
37. N Pusterla, R Vin, C Leutenegger, LD Mittel, TJ Divers. Equine coronavirus: An emerging enteric virus of adult horses. **Equine Vet. Education**, **28(4)**, 216–223 (2016).
38. D Hamre JJ Procknow. A new virus isolated from the human respiratory tract. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **121**, 190-193 (1966).
39. A Vabret, T Mourez, S Gouarin, J Petitjean, F Freymuth. An Outbreak of Coronavirus OC43 Respiratory Infection in Normandy, France. **Clinical Infectious Diseases**, **36(8)**, 985–989 (2003).
40. A Jean, C Quach, A Yung, M Semret. Severity and Outcome Associated With Human Coronavirus OC43 Infections Among Children. **Ped. Infectious Disease J.**, **32(4)**, 325–329 (2013).
41. S Morfopoulou, JR Brown, EG Davies, G Anderson, A Virasami, W Qasim *et al* Human coronavirus OC43 associated with fatal encephalitis. **N. Engl. J. Med.**, **375**, 497–498 (2016).
42. SK Lau, P Lee, AK Tsang, CC Yip, H Tse, RA Lee *et al*. Molecular epidemiology of human coronavirus OC43 reveals evolution of different genotypes over time and recent emergence of a novel genotype due to natural recombination. **J. Virology**, **85(21)**, 11325-11337 (2011).
43. SK Lau, PC Woo, CC Yip, H Tse, H Tsoi, VC Cheng *et al*. Coronavirus HKU1 and Other Coronavirus Infections in Hong Kong. **J. Clinical Microbiology**, **44(6)**, 2063–2071 (2006).
44. S Bosis, S Esposito, HG Niesters, E Tremolati, S Pas, N Principi *et al*. Coronavirus HKU1 in an Italian pre-term infant with bronchiolitis. **J. Clinical Virology**, **38(3)**, 251–253 (2007).
45. AA Rabaan, SH Al-Ahmed, S Haque, R Sah, R Tiwari, YS Malik *et al*. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. **Le infezioni in medicina**, **28(2)**, 174–184 (2020).
46. VC Cheng, IF Hung, B S Tang, C M Chu, MM Wong *et al*. (2004). Viral replication in the nasopharynx is associated with diarrhea in patients with severe acute respiratory syndrome. **Clin. Infect. Dis.**, **38**, 467–475 (2004).
47. TN Chau, KC Lee, H Yao, TY Tsang, TC Chow, YC Yeung *et al*. SARS-associated viral hepatitis caused by a novel coronavirus: report of three cases. **Hepatology**, **39**, 302-310 (2004).
48. LK Tsai, ST Hsieh, CC Chao, YC Chen, YH Lin, SC Chang *et al*. Neuromuscular disorders in severe acute respiratory syndrome. **Arch. Neurol.**, **61**, 1669-1673 (2004).
49. AM Zaki, S van Boheemen, TM Bestebroer, AD Osterhaus, RA Fouchier. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. **New England J. Medicine**, **367(19)**, 1814–1820 (2012).
50. RH Cha, J Joh, I Jeong, JY Lee, HS Shin, G Kim *et al*. Critical Care Team of National Medical Center Renal Complications and Their Prognosis in Korean Patients with Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus from the Central MERS-CoV Designated Hospital. **J. Korean Medical Sci.**, **30(12)**, 1807–1814 (2015).
51. ML Yeung, Y Yao, L Jia, JF Chan, KH Chan, KF Cheung *et al*. MERS coronavirus induces apoptosis in kidney and lung by upregulating Smad7 and FGF2. **Nature Microbiology**, **1(3)**, 1-8 (2016).
52. C Huang, Y Wang, X Li, L Ren, J Zhao, Y Hu *et al*. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, **395(10223)**, 497–506 (2020).
53. YF Tu, CS Chien, AA Yarmishyn, YY Lin, YH Luo, YT Lin *et al*. A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. **Int. J Molecular Sci.**, **21(7)**, 2657 (2020).
54. H Li, L Liu, D Zhang, J Xu, H Dai, N Tang *et al*. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. **Lancet**, **395(10235)**, 1517-1520 (2020).
55. A Schalk, M Hawn. An apparently new respiratory disease of baby chicks. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **78**, 413–416 (1931).
56. SY Lin, HW Chen. Infectious Bronchitis Virus Variants: Molecular Analysis and Pathogenicity Investigation. **Int. J. Mol. Sci.**, **18(10)**, artículo número 2030, 17 págs. (2017).
57. MW Jackwood. Review of infectious bronchitis virus around the world. **Avian Dis.**, **56(4)**, 634-641 (2012).
58. B Panigrahy, SA Naqi, CF Hall. Isolation and characterization of viruses associated with transmissible enteritis (bluecomb) of turkeys. **Avian Diseases**, **17**, 430– 438 (1973).
59. JS Guy. Turkey coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian coronaviruses: A review. **Avian Pathology**, **29**, 207–212 (2000).
60. KA Mihindukulasuriya, G Wu, J St Leger, RW Nordhausen, D Wang. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. **J. Virology**, **82(10)**, 5084–5088 (2008).
61. PC Woo, SK Lau, CS Lam, AK Tsang, SW Hui, RY Fan *et al*. Discovery of a Novel Bottlenose Dolphin Coronavirus Reveals a Distinct Species of Marine Mammal Coronavirus in Gamma-coronavirus. **J. Virology**, **88(2)**, 1318–1331 (2013).
62. H Schütze. Coronaviruses in Aquatic Organisms. **Aquaculture Virology**, 327–335 (2016).

63. G Li, Q Chen, KM Harmon, KJ Yoon, KJ Schwartz, MJ Hoogland *et al.* Full-Length Genome Sequence of Porcine Deltacoronavirus Strain USA/IA/2014/8734. **Genome Announcements**, **2(2)**, e00278-14 (2014).
64. K Jung, H Hu, LJ Saif. Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis. **Virus Research**, **226**, 50–59 (2016).
65. PA Boley, MA Alhamo, G Lossie, K Yadav, M Vasquez-Lee, LJ Saif *et al.* Porcine Deltacoronavirus Infection and Transmission in Poultry, United States. **Emerging Infectious Diseases**, **26(2)**, 255-265 (2020).
66. MG Hemida, A Elmoslemay, F Al-Hizab, A Alnaeem, F Almathen, B Faye *et al.* Dromedary camels and the transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). **Transboundary and Emerging Diseases**, **64(2)**, 344–353 (2017).
67. HD Song, CC Tu, GW Zhang, SY Wang, K Zheng, LC Lei *et al.* Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. **Proc. National Academy of Sciences of the United States of America**, **102(7)**, 2430–2435 (2005)..
68. P Zhou, XL Yang, XG Wang, B Hu, L Zhang, W Zhang *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature** (2020). Doi: 10.1038/s41586-020-2012-7
69. KP Xiao, JQ Zhai, YY Feng, N Zhou, X Zhang, JJ Zou *et al.* Isolation and characterization of 2019-nCoV-like coronavirus from malayan pangolins. bioRxiv (2020). Doi: 10.1101/2020.02.17.951335
70. WB Yu, GD Tang, L Zhang, RT Corlett. Decoding the evolution and transmissions of the novel pneumonia corona-virus (SARS-CoV-2) using whole genomic data. chinaXiv (2020). Doi: 10.12074/202002.00033
71. D Cyranoski. Mystery deepens over animal source of coronavirus. **Nature**, **579(7797)**, 18-19 (2020).
72. WM Argüelles-Monal, J Lizardi-Mendoza, D Fernández-Quiroz, MT Recillas-Mota, M Montiel-Herrera. Chitosan Derivatives: Introducing New Functionalities with a Controlled Molecular Architecture for Innovative Materials. **Polymers**, **10**, artículo número 342, 33 páginas (2018).
73. L Xing, YT Fan, TJ Zhou, JH Gong, LH Cui, KH Cho *et al.* Chemical Modification of Chitosan for Efficient Vaccine Delivery. **Molecules**. **23(2)**, artículo número E229 (2018).
74. L Dong, HJ Wichers, C Govers. Beneficial Health Effects of Chitin and Chitosan. En: *Chitin and Chitosan: Properties and Applications*. Editado por LAM van den Broek y CG Boeriu. Primera edición, capítulo 6, John Wiley & Sons Ltd (2020).
75. MA Mohammed, JTM Syeda, KM Wasan, EK Wasan. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. **Pharmaceutics**, **9**, 53- (2017).
76. C Lárez-Velásquez, M Rojas Pirela, A Chirinos, L Rojas Avelizapa. Nuevos retos en agricultura para los biopolímeros de quitina y quitosano. Parte 1: Efectos beneficiosos para los cultivos. **Revista Iberoamericana de Polímeros y Materiales**, **20(3)**, 118-136 (2019).
77. C Lárez Velásquez. Quitosano y nanopartículas. En: *Nanopartículas: fundamentos y aplicaciones*. Capítulo 8. Editores: C Lárez Velásquez, Floralba López, S Koteich. Comisión de Publicaciones del Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela (2015).
78. C Lárez-Velásquez. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. **UDO-Agrícola**, **8(1)**, 1-22 (2008).
79. G Roberts. Chitin Chemistry. Chapter 6. The MacMillan Press LTD. London (1992).
80. Clinical Arena Trial. Covid-19: China to launch clinical trials for coronavirus vaccine. 18 de marzo (2020).
Disponible en: <https://www.clinicaltrialsarena.com/news/china-launches-coronavirus-vaccine-clinical-trials>. Consultado: 05/04/ 2020.
81. YQ Wang, Y Liu, YX Wang, YJ Wu, PY Jia, JJ Shan *et al.* The potential adjuvanticity of quaternized chitosan hydrogel based microparticles for porcine reproductive and respiratory syndrome virus inactivated vaccine. **Int. Immunopharmacol.**, **39**, 84-91 (2016).
82. RC Read, SC Naylor, CW Potter, J Bond, I Jabbal-Gill, A Fisher *et al.* Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan. **Vaccine**, **23(35)**, 4367-4374 (2005).
83. (a) E Szymańska, K Winnicka. Stability of Chitosan - A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. **Mar. Drugs**, **13**, 1819-1846 (2015).
(b) J Smith, E Wood, M Dornish. Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. **Pharm. Res.**, **21**, 43–49 (2004).
84. CSFAN. FDA’s Center for Food Safety and Applied Nutrition (CSFAN)’s GRAS approval (2009).
Disponible en: <https://www.foodsafety.gov/~rdb/opa-gras.html>
Consultado: 28/04/2020.
85. Baldrick. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, **56(3)**, 290-299 (2010).
86. O Felt, P Furrer, JM Mayer JM, B Plazonnet, P Buri, R Gurny. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. **Int. J. Pharmaceutics**, **180(2)**, 185–193 (1999).
87. <https://www.chitogel.com/chitogel/>
88. <https://www.tricolbiomedical.com/product/hemcon-dental-dressing-pro-10-mm-x-12-mm-ships-us/>
89. (a) MA Matica, FL Aachmann, A Tøndervik, H Sletta, V Ostafe. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. **Int. J. Mol. Sci.**, **20**, artículo número 5889 (2019).
(b) KS Huang, CH Yang, SL Huang, CY Chen, YY Lu, YS Lin. Recent Advances in Antimicrobial Polymers: A Mini-Review. **Int. J. Mol. Sci.**, **17**, artículo número 1578 (2016).

90. F Lopez-Moya, LV Lopez-Llorca. Omics for Investigating Chitosan as an Antifungal and Gene Modulator. **J. Fungi (Basel)**, **2(1)**, artículo número 11 (2016).
91. A Peña, NS Sánchez, M Calahorra. Effects of Chitosan on *Candida albicans*: Conditions for its antifungal activity. **BioMed Res. Int.**, **Volume 2013**, artículo número 527549 (2013).
92. IS Dragland, HV Rukke, ISR Stenhagen, J Lönn-Stensrud, HM Kopperud. Antibacterial and Antibiofilm Effect of Low Viscosity Chitosan against *Staphylococcus epidermidis*. **Int. J. Microbiology**, **Volume 2016**, artículo número 9159761, 7 pags (2016).
93. IM van der Lubben, G Kersten, MM Fretz, C Beuvery, J Coos Verhoef, HE Junginger. Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: Oral and nasal efficacy studies in mice. **Vaccine**, **21**, 1400–1408 (2003).
94. B Slütter, SM Bal, I Que, E Kaijzel, C Löwik, J Bouwstra, W Jiskoot. Antigen-adjuvant nanoconjugates for nasal vaccination: An improvement over the use of nanoparticles? **Mol. Pharm.**, **7**, 2207–2215 (2010).
95. E Szymańska, K Winnicka, A Amelian, U Cwalina. Vaginal Chitosan Tablets with Clotrimazole - Design and Evaluation of Mucoadhesive Properties Using Porcine Vaginal Mucosa, Mucin and Gelatine. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, **62(2)**, 160–167 (2014).
96. SM Bal, B Slütter, R Verheul, JA Bouwstra, WA Jiskoot. Adjuvanted antigen loaded N-trimethyl chitosan nano-particles for nasal and intra-dermal vaccination: Adjuvant- and site-dependent immunogenicity in mice. **Eur. J. Pharm. Sci.**, **45**, 475–481 (2012).
97. X Li, W Dong, AP Nalin, Y Wang, P Pan, B Xu *et al.* The natural product chitosan enhances the anti-tumor activity of natural killer cells by activating dendritic cells. **Onco-immunology**, **7(6)**, artículo número e1431085 (13 pags.) (2018).
98. EC Carroll, L Jin, A Mori, N Muñoz-Wolf, E Oleszycka, HBT Moran *et al.* The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons. **Immunity**, **44**, 597–608 (2016).
99. HJ Yoon, ME Moon, HS Park, SY Im, YH Kim. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **358(3)**, 954–959 (2007).
100. (a) HC Arca, M Günbeyaz, S Şenel. Chitosan-based systems for the delivery of vaccine antigens. **Expert review of vaccines**, **8(7)**, 937-953 (2009).
(b) N Hagenaaars, RJ Verheul, I Mooren, P de Jong, EM Harrie, L Glansbeek *et al.* Relationship between structure and adjuvanticity of N,N,N-trimethyl chitosan (TMC) structural variants in a nasal influenza vaccine. **J. Control Release**, **140(2)**, 126–133 (2009).
101. (a) L Illum, I Jabbal-Gill, M Hinchcliffe, AN Fisher, SS Davis. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, **51**, 81–96 (2001).
(b) B Singh, S Maharjan, P Sindurakar, KH Cho, YJ Choi, CS Cho. Needle-Free Immunization with Chitosan Based Systems. **Int. J. Mol. Sci.**, **19(11)**, Artículo número 3639 (2018).
102. M Iqbal, W Lin, I Jabbal-Gill, S Davis, M Steward, L Illum. Nasal delivery of chitosan - DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice. **Vaccine**, **21(13-14)**, 1478–1485 (2003).
103. Y Ghendon, S Markushin, O Krivtsov, I Akopova. Chitosan as an adjuvant for parenterally administered inactivated influenza vaccines. **Archives of Virology**, **153(5)**, 831–837 (2008).
104. Z Sui, Q Chen, R Wu, H Zhang, M Zheng, H Wang, Z Chen. Cross-protection against influenza virus infection by intranasal administration of M2-based vaccine with chitosan as an adjuvant. **Arch. Virol.**, **155(4)**, 535–544 (2010).
105. D Raghuvanshi, V Mishra, D Das, K Kaur, MR Suresh. Dendritic cell targeted chitosan nanoparticles for nasal DNA immunization against SARS CoV nucleocapsid protein. **Molecular pharmaceuticals**, **9(4)**, 946-956 (2012).
106. K Khatri, Ak Goyal, PN Gupta, N Mishra, SP Vyas. Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B. **Int. J. Pharm.**, **354(1-2)**, 235-241 (2008).
107. J Xu, W Dai, Z Wang, B Chen, Z Li, X Fan. Intranasal vaccination with chitosan-DNA nanoparticles expressing pneumococcal surface antigen A protects mice against nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. **Clin. Vaccine Immunol.**, **18(1)**, 75-81 (2011).
108. KVD Maaden, E Sekerdag, P Schipper, G Kersten, W Jiskoot, JA Bouwstra. Layer-by-layer assembly of inactivated poliovirus and N-trimethyl chitosan on pH-sensitive microneedles for dermal vaccination. **Langmuir ACS J. Surf. Colloids**, **31**, 8654–8660 (2015).
109. S Dhakal, S Renu, S Ghimire, Y Shaan Lakshmanappa, BT Hogshead, N Feliciano-Ruiz *et al.* Mucosal Immunity and Protective Efficacy of Intranasal Inactivated Influenza Vaccine Is Improved by Chitosan Nanoparticle Delivery in Pigs. **Front. Immunol.**, **9**, artículo número 934 (2018).
110. (a) H Pospieszny, JG Atabekov. Effect of chitosan on the hypersensitive reaction of bean to alfalfa mosaic virus (ALMV). **Plant Sci.**, **62**, 29-31 (1989).
(b) Kulikov, SN Chirkov, AV Ilina, SA Lopatin, VP Varlamov. Effect of the Molecular Weight of Chitosan on Its Antiviral Activity in Plants. **Applied Biochemistry and Microbiology**, **42(2)**, 200–203 (2006).
111. H Pospieszny, S Chirkov, J Atabekov. Induction of antiviral resistance in plants by chitosan. **Plant Sci.**, **79**, 63-68 (1991).
112. N Chirkov. The Antiviral Activity of Chitosan (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, **38(1)**, 1–8 (2002).
113. LA Hadwiger, DF Kendra, BW Fristensky, W Wagoner. Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. En: *Chitin in Nature and Technology*. R Muzzarelli, C Jeuniaux and GW Gooday (Eds.), Plenum Press, pags. 209-214 (1986).

114. A Milewska, Y Chic, A Szczepanska, E Barreto-Durana, K Liud, D Liud *et al.* HTCC as a highly effective polymeric inhibitor of SARS-CoV-2 and MERS-CoV. **bioRxiv** (2020). Doi: 10.1101/2020.03.29.014183
115. W Tao, HQ Zheng, T Fu, ZJ He, Y Hong. N-(2-hydroxy) propyl-3-trimethylammonium chitosan chloride: An immune-enhancing adjuvant for hepatitis E virus recombinant polypeptide vaccine in mice. **Human Vacc. Immunotherap.**, **13(8)**, 1818–1822 (2017).
116. J Zhu, Y Zhang, G Wu, Z Xiao, H Zhou, X Yu. Inhibitory effects of oligochitosan on TNF- α , IL-1 β and nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells. **Molecular Medicine Reports**, **11**, 729-733 (2014).
117. CH Jang, JH Choi, MS Byun, DM Jue. Chloroquine inhibits production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 from lipo-poly-saccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. **Rheumatology**, **45(6)**, 703–710 (2006).
118. P Shukla, AK Verma, J Dewangan, SK Rath, PR Mishra. Chitosan coated curcumin nanocrystal augments pharmacotherapy via improved pharmacokinetics and interplay of NF κ B, Keap1 and Nrf2 expression in Gram negative sepsis. **RSC Advances**, **5(70)**, 57006-57020 (2015).
119. B Shanmugaraj, K Siri wattananon, K Wangkanont, W Phoolcharoen. Perspectives on monoclonal antibody therapy as potential therapeutic intervention for Coronavirus disease-19 (COVID-19). **Asian Pac. J. Allergy Immunol.**, **38**, 10-18 (2020).
120. J Mair-Jenkins, M Saavedra-Campos, JK Baillie, P Cleary, FM Khaw, WS Lim *et al.* The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. **J. Infect. Dis.**, **211(1)**, 80-90 (2015).
121. ED Eslam, SD Alipour Astanehb, I Rasooli, S Nazarian, A Jahangiri. Passive immunization with chitosan-loaded biofilm-associated protein against *Acinetobacter baumannii* murine infection model. **Gene Reports**, en prensa (2020). Doi: 10.1016/j.genrep.2020.100708
122. TT Yang, BF Wen, K Liu, M Qin, YY Gao, DJ Ding *et al.* Cyclosporine A/porous quaternized chitosan microspheres as a novel pulmonary drug delivery system. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, **46(2)**, 552-564 (2018).
123. https://www.nutraaceuticalbusinessreview.com/news/article_page/Coronavirus_affects_Chinese-sourced_chitosan_ingredient/163134