

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

Año 2021 Volumen 25, Número 3
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotechnología y Bioingeniería



MESA DIRECTIVA

2020 – 2022

Dr. Jaime Ortega López

Presidente

Dra. Romina Rodríguez Sanoja

Vicepresidenta

Dr. Álvaro R. Lara Rodríguez

Secretario

Dra. Angélica Meneses Acosta

Tesorero

Dra. Beatriz Ruiz Villafán

Subsecretaria

Dr. Gerardo Reséndiz Cardiel

Vocal Profesional

P. Biol. Teresa Elizabeth Martínez Oropeza

Vocal Estudiante

COMISIÓN DE PREMIOS

Dra. Katiushka Niño Arévalo

Universidad Autónoma de Nuevo León

Instituto de Biotecnología. Facultad de

Ciencias Biológicas.

Dra. Carolina Peña Montes

Tecnológico Nacional de México/ Instituto

Tecnológico de Veracruz

Dra. Andrea Sabido Ramos

Unidad Cuajimalpa- UAM

Departamento de Procesos y Tecnología

Dr. Cuauhtémoc Licona Cassani

ITESM/Centro de Biotecnología FEMSA,

Campus Monterrey

EDITORIA

Dra. María Soledad Córdova Aguilar

UNAM

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Isadora Martínez Arellano

Dr. Jorge Gracida Rodríguez

Dra. Silvia Armenta Jaime

Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

Dra. Itzel López Rosas

Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta

Dra. Andrea Sabido Ramos

Dra. María Eugenia de la Torre

Dra. Virginia Villacruz

Dra. Beatriz Ruiz Villafán

Formación y edición

Q.A. Ilse M. Mendoza Ortega

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM), en LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), los artículos se encuentran en Google Académico. Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México. o a la siguiente dirección electrónica revista_biotecnologia@smbb.mx.

Índice

Instrucciones para los autores	4
Editorial	8
Premio Sergio Sánchez Esquivel 2021	
Mejores protocolos de tesis en Biotecnología y Bioingeniería	9
Artículos	
Genome-scale metabolic modeling for the development of rational strategies applied to bioremediation	
Luis Caleb Damas Ramos, Luis Mauricio Salazar García and Cuauhtémoc Liconá-Cassani	10
The Neutrophil's role during health and disease, new insights, and open questions	
Josue Uriel Amador Hernandez, Roberto Rodríguez Moncayo, Jose Luis Garcia Cordero	25
Premio Alfredo Sánchez Marroquín 2021	
Mejores tesis en Biotecnología y Bioingeniería	36
Artículos	
Andamios electrohilados de gelatina con potencial aplicación en ingeniería tisular dérmica	
José Luis Quijano-Mendoza, Fernando Hernández-Sánchez, José Manuel Cervantes-Uc, Nayeli Rodríguez-Fuentes	37
Cuencas y sistemas arrecifales del Golfo de México en el estado de Veracruz: Contaminación por hidrocarburos y biorremediación	
Leticia Narciso-Ortiz, Karen A. Vargas-García, Ana L. Vázquez-Larios, Tannia A. Quiñones-Muñoz, Ricardo Hernández-Martínez, Manuel A. Lizardi-Jiménez	54
The classical secretion pathway during recombinant protein production in CHO cells: an omics perspective	
Saumel Pérez-Rodríguez, Mauricio A. Trujillo-Roldán, Norma A. Valdez-Cruz	71

Instrucciones para los autores

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original, así como de revisión en los campos de la Biotecnología y Bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas en los que se puede publicar en la revista son el español y el inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Para evitar errores innecesarios se recomienda usar el corrector de gramática y ortografía del procesador de palabras. Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, μ l), de peso (kg, g, mg, μ g), ADN, ARN y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde aspectos fundamentales hasta sus aplicaciones, incluyendo: Enzimas y Biocatálisis, Microbiología, Biotecnología Agrícola y Vegetal, Biotecnología Marina, Alimentos y bebidas, Biotecnología farmacéutica, Biotecnología Ambiental, Bioingeniería y fermentaciones, Bioenergía y biocombustibles, Biología de sistemas y bioinformática, Biología sintética, Nanobiotecnología y biomateriales, Ingeniería metabólica, Omicas, Bioseguridad y Bioética.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito se escribirá en negritas con letra Arial o equivalente tamaño 14. El título deberá estar centrado y ser conciso e informativo. Evite el uso de abreviaciones y fórmulas.

Instrucciones para los autores

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño 12. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como la dirección de correo del autor corresponsal. Si el responsable fuera un estudiante, deberá incluir una carta del tutor o director del trabajo autorizándolo.
3. Se deberá añadir un Resumen de no más de 250 palabras en español y el correspondiente Abstract en inglés.
4. Se incluirán entre 3 a 6 Palabras clave: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en español y en inglés (Key words).
5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste de pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño 10. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño 10. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras.
7. Las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto, pero se anexarán en hojas separadas y al igual que las figuras, al final del manuscrito.
8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribirá como sigue: “Gutiérrez et al. (2003), han demostrado...” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado...”

Instrucciones para los autores

Si la cita es una página de Internet, la dirección URL deberá escribirse completa y entre paréntesis directamente en el texto.

9. La lista de Referencias se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) y con sangría francesa de acuerdo con el siguiente formato:

Artículos:

Bayegan AH, Clote P (2020) RNAmountAlign: Efficient software for local, global, semiglobal pairwise and multiple RNA sequence/structure alignment. PLoS ONE 15(1): e0227177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227177>.

Libros:

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

Capítulos de libros:

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Congresos y reuniones:

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solis S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus HL*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Instrucciones para los autores

Sitios en internet:

CAZY, Carbohydrate-Active Enzymes Database. (<http://www.cazy.org/>)

Tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de safranal. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos se someten en línea en la página electrónica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología, en la dirección <https://smbb.mx/publicaciones/publicacion-de-articulo/>. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor correspondiente. La dirección para mantener comunicación con el editor es: revista_biotecnologia@smbb.mx y marisol.cordova@icat.unam.mx.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC <http://www.smbb.com.mx/>.

Editorial

Premios Sergio Sánchez Esquivel y Alfredo Sánchez Marroquín 2021

Es siempre un motivo de orgullo para la SMBB premiar a los mejores protocolos y tesis de los socios que participan con gran entusiasmo en sus convocatorias. En esta ocasión, la participación de los estudiantes en el concurso por el *Premio Sergio Sánchez Esquivel* a los mejores protocolos de tesis fue inusualmente baja, probablemente como un reflejo de las condiciones de confinamiento a las que desafortunadamente nos vimos sometidos durante el año 2020. En contraste, ese mismo confinamiento permitió a muchos estudiantes finalizar con la escritura y revisión de sus tesis y a su respectiva titulación o graduación. Lo anterior lo vimos reflejado con una nutrida participación en la convocatoria para el *Premio Alfredo Sánchez Marroquín* que reconoce a las mejores tesis. Así mismo, se tuvieron muchos trabajos de alta calidad por lo que se otorgaron varias menciones honoríficas en cada categoría. La entrega de estos dos premios siempre se lleva a cabo durante la realización del *Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Este año el **XIX Congreso Nacional** se realizó virtualmente debido a las condiciones de contingencia y para evitar contagios con el virus SARS- CoV-2 entre los congresistas. De esta misma forma, la premiación debió ajustarse a esta modalidad y en lo posible, lograr transmitir la alegría y emoción de los premiados.

El uso de las plataformas de comunicación virtuales seguramente permanecerá en adelante para la realización de reuniones y juntas vía remota. Esto nos ayudó en gran medida para que se reunieran los miembros de la Comisión de Premios, cuyos integrantes pertenecen a instituciones tan distantes como la *Dra. Katiushka Arévalo Niño* de la Universidad Autónoma de Nuevo León, la *Dra. Carolina Peña Montes* del Instituto Tecnológico de Veracruz, la *Dra. Andrea Sabido Ramos* de la UAM - Unidad Cuajimalpa y el *Dr. Cuauhtémoc Liconá Cassani* del Centro de Biotecnología FEMSA del Tecnológico de Monterrey. Quiero hacer aquí un paréntesis para agradecer a todos los miembros de la Comisión de Premios su participación en la evaluación de todos los trabajos concursantes en ambas convocatorias.

Finalmente, quiero volver a felicitar a todos los ganadores de los dos Premios por el esfuerzo dedicado a su trabajo de planeación y experimentación, que les permitió obtener esta distinción. Este número de la **Revista BioTecnología** recopila los trabajos de todos los ganadores de ambos premios.

Dra. Beatriz Ruiz Villafan
Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM
beatrizruiz@iibiomedicas.unam.mx

Premio Sergio Sánchez Esquivel 2021
a los mejores protocolos de tesis en Biotecnología y Bioingeniería

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C. (SMBB), en conjunto con *Applikon Biotechnology Inc.* han establecido este premio desde 2011 para estimular a estudiantes mexicanos sobresalientes que estén inscritos en instituciones de Educación Superior o de investigación nacionales y sean miembros vigentes de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A. C., para presentar protocolos de investigación relacionados con su trabajo de tesis, la cual realizarán para la obtención del título de Licenciatura o de los grados de Maestro y de Doctor en las áreas de Biotecnología y Bioingeniería.

Los protocolos ganadores de la convocatoria 2021 son:

Maestría

Luis Caleb Damas Ramos

Escuela de Ingeniería y Ciencias, Tecnológico de Monterrey, Monterrey, NL.

Protocolo: Diseño de estrategias racionales de ingeniería metabólica para la co-producción de pirocianina y ramnolípidos en *Pseudomonas aeruginosa* IGPR1 para la biorremediación de cuerpos de agua contaminados con hidrocarburos.

Doctorado

Josué Uriel Amador Hernández

Laboratorio de Microtecnologías para Biomedicina, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Monterrey, NL.

Protocolo: Análisis dinámico-temporal de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) bajo condiciones dinámicas de estimulación mediante microfluídica e inteligencia artificial.

Genome-scale metabolic modeling for the development of rational strategies applied to bioremediation

Luis Caleb Damas Ramos, Luis Mauricio Salazar García
and Cuauhtémoc Licona-Cassani*

Escuela de Ingeniería y Ciencias, Tecnológico de Monterrey,
Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Tecnológico, 64849, Monterrey, N.L.

clicona@tec.mx

Abstract

The *omics era* has eased the access to high throughput biological data such as annotated genomes, transcriptomes, proteomes, metabolomes, etc. Genome-scale data can be integrated into metabolic reconstructions to obtain an integrated picture of the physiological state of a specific organism through gene-reaction-protein associations. Genome-scale models (GEMs) allow the improvement of strain metabolism using both, non-genetic engineering, and genetic engineering techniques and metabolic fluxes simulations, resulting in optimized processes of metabolite production, media formulation, growth rate, or compound degradation rate (*i.e.*, pollutants). The applications of GEMs enlarge as the access to omics data increases. Bioremediation applications of GEMs are particularly interesting due to the design of rational strategies that are more effective than trial and error traditional approaches. The aim of this review is to describe the advances made in bioremediation using GEMs of individual strains and microbial communities in order to guide design of metabolic engineering strategies applied to bioremediation. We further discussed opportunities in oil bioremediation integrating the different approaches of GEMs use here reviewed.

Key words: Genome-scale models, metabolic engineering, bioremediation, microbial community engineering, oil spill water contamination.

Resumen

La era de las ciencias ómicas ha facilitado el acceso a información biológica de alta calidad, como genomas anotados, proteomas, metabolomas, etc., estos datos pueden ser integrados en modelos metabólicos a escala genómica (GEMs) para obtener una mejor perspectiva del metabolismo de un organismo específico a través de asociaciones gen-reacción-proteína. Los GEMs permiten el mejoramiento de cepas utilizando técnicas tradicionales y de ingeniería genética, así como simulaciones de flujos metabólicos, resultando en procesos optimizados de producción de metabolitos, formulaciones de medios de cultivo, tasas de crecimiento, o tasas de degradación de compuestos (como contaminantes). Las aplicaciones de los GEMs van en aumento conforme el acceso a información ómica incrementa. El uso de GEMs en bioremediación es particularmente interesante debido al diseño de estrategias racionales que son más efectivas que los enfoques tradicionales de prueba y error. El propósito de esta revisión es describir los avances hechos en bioremediación mediante la aplicación de GEMs en cepas individuales y comunidades microbianas, así como guías para la toma de decisiones en las estrategias de ingeniería metabólica aplicadas a la biorremediación. Asimismo, discutimos oportunidades en la biorremediación de hidrocarburos mediante la integración de las diferentes aplicaciones de los GEMs cubiertas en esta revisión.

Palabras clave: Reconstrucciones metabólicas a escala genómica, ingeniería metabólica, biorremediación, ingeniería de comunidades microbianas, contaminación de agua por hidrocarburos.

Introducción

Mexico's economy heavily depends on the oil industry, most activities in the country use fossil fuels, and a considerable proportion of government budget is destined to oil (Bermudez Delgado et al., 2018). However, Mexico follows the global trend regarding use of oil; according to Wu and Chen (2019) crude oil constituted approximately 34.21% of the total primary energy supply in 2017, having the United States, China, South Korea, Japan and Canada as the main users. Beyond representing an economic concern, the extensive use of oil and its derivatives constitutes an enormous risk to the environment. Oil handling (including its exploitation, use, transport and disposal) represents an environmental threat due to accidental spills; it is estimated that more than 7 million tons of oil have been released to the environment since the first reported oil spill in 1907 (Li et al., 2016).

Mexico has been affected by the two largest accidental marine oil spills in history, the *Deepwater Horizon Disaster* (DWH) in the Gulf of Mexico (585,000 tons), and the *Ixtoc I* oil spill in Campeche Bay (480,000 tons) (Rafferty, 2021). Oil spills consequences span the social, environmental, and economic spheres. Two of the most famous spills, *Deepwater Horizon* and *Exxon-Valdez* disasters, had serious impacts; for instance, approximately more than 250,000 seabirds died after the latter occurred, and the former costed more than US\$61 billion (Li et al., 2016). *Deepwater Horizon Disaster* repercussions persist more than 10 years later, affecting the biodiversity in the Gulf of Mexico, health and socioeconomic wellness of Mexico and USA shore population (Sandifer et al., 2021).

Several approaches help remediation and prevention of oil spills, including physical, chemical, thermal, and biological methods. While widely used, the physical and chemical methods have limitations that decrease their efficacy and reliability (Ndimele et al., 2018). Physical methods are mainly focused on containing the oil with using physical barriers; this involves a significant amount of work force. While chemical methods certainly diminish human intervention, they are subject of public concern due to health risks associated to their use. A study found

increased neurological symptoms in workers exposed to chemical dispersants compared to workers that were not exposed to it during the DWH disaster (Krishnamurthy et al., 2019).

Biological methods, also called "bioremediation", are the most promising and advantageous water and soil clean-up techniques for heavy metals and organic pollutants released to the environment (Tyagi et al., 2011). Bioremediation is the elimination of toxic compounds from the environment by speeding up the normal metabolism of bacteria, fungi, algae, plants (or endogenous enzymes) to transform pollutants into less toxic compounds such as carbon dioxide (CO₂), water, inorganic salts, microbial biomass, and other by-products (commonly, secondary metabolites) (Kumar et al., 2018). There are two main strategies in bioremediation: biostimulation and bioaugmentation. The former consists in adding or supplementing nutrients and other compounds that enrich the polluted zone with an ideal pH, water content, oxygen, temperature to promote microbial growth and metabolism (Kumar et al., 2018; Tyagi et al., 2011). In bioaugmentation, indigenous or non-indigenous microorganisms with better pollutant degradation capability are added to the contaminated site, they can also be genetic modified strains with increased degradability potential (Kumar et al., 2018). However, due to the *in situ* bioremediation progress is directly associated with the catabolic potential of the microorganisms present and the bioavailability of the contaminants, biological treatment processes still remains a challenging task (Antizar-Ladislao et al., 2006; Szulc et al., 2014).

Most of the bioremediation techniques are based on intuition and experience, following trial and error experiments (Xu et al., 2019). These approaches are costly and time consuming because the performance evaluation of the microorganism is laborious, requiring long iterative cycles to obtain a desired biodegradability rate. For instance, diesel degradation percentages using biostimulation and bioaugmentation were lower than with natural attenuation in a study lasting 12 weeks (Bento et al., 2005); in another study, 57% hexadecane degradation took 24 days, reporting around 30 days in previous studies (Zhao et al., 2017). In

addition, bacteria may not respond as expected, such as the dramatic CFU (colony forming units) decline found in the phenanthrene degrading GFP-tagged bacterium *Novosphingobium* sp. LH128 4 hours after inoculation in soil (Fida et al., 2017). Overall, this supposes an impediment to bioremediation, delaying its application. A better understanding of the physiology of the bacteria used for this purpose could accelerate the application of bioremediation approaches (Xu et al., 2019). Biostimulation and bioaugmentation techniques require a deep understanding of the bacterial metabolism (individually and as consortium) and the interactions with biotic and abiotic factors (pH, water content, oxygen/air availability, temperature, carbon sources, etc.). Genome-scale models (GEMs) are one of the most relevant *in silico* approaches that help contextualization of phenotypic behavior of microorganisms and represent a valuable tool to understand the pollutant degradation capability and survival of the bacteria.

Genome scale models (GEMs) are bioinformatic tools that connect genes, proteins, and reactions encoded in a genome. They give the entire picture of the metabolism of an organism allowing for simulation of metabolic routes to predict metabolic flux changes with Flux Balance Analysis (FBA) and other algorithms to optimize the production of a metabolites (Fang et al., 2020). Due to the increasing availability of genomes and GEMs building software the number of GEMs that have been reconstructed has augmented, by February 2019, 6239 organisms had GEM reconstructions (Gu et al., 2019).

GEMs have proved to be useful in bioremediation, several applications successfully removed pollutants using model and non-model microorganisms, as well as individual and community models (Dhakar et al., 2021). The use of non-model and environmental microorganisms is a challenge in the bioremediation process because there is a significant physiological-data gap, and as environmental strains respond notably different to model strains, the mass production yields of bioremediation valuable metabolites are deficient. More importantly, GEMs serve as tools to obtain better comprehension of the physiological response of a given microorganism towards different milieus conditions to develop cost-effective

bioremediation procedures that surpass current techniques (Ofaim et al., 2020). Here, we review and discuss the effectiveness and benefits of GEMs applied to the design of rational bioremediation strategies using individual strains and microbial communities.

GEMs and their relevance in the study of organisms

GEMs have been used for different applications including optimization of metabolic pathways for utilization of carbon sources such as glucose, xylose, and acetic acid in *Escherichia coli* ML1515 (Monk et al., 2017); the genome scale metabolic model of *Streptomyces coelicolor* was analyzed to predict growth rate in 62 carbon sources and two nitrogen sources identifying essential reactions, the model also helped to fill gaps in genome annotation (Borodina et al., 2005). Eukaryotic models such as *Saccharomyces cerevisiae* GEM Yeast v6.0 are also useful, the model was reconstructed with the aim of rigorous metabolic examination (Aung et al., 2013). GEMs have served to carry out studies in pathogenic organisms to understand their metabolic reactions, for instance, a study evaluated antibiotic pressure responses using a GEM of *Mycobacterium tuberculosis* (Kavvas et al., 2018); the recent GEM of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 includes reactions to decipher metabolic mechanisms of drug resistance (Dahal & Yang, preprint). Furthermore, GEMs are used to improve the production of metabolites of interest, for example, an enhanced erythromycin production was achieved performing predictions with the metabolic reconstruction of the actinomycete *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338, the authors found 5 predicted amino acids capable of improve the yield, *in vitro* testing confirmed 4 out of the 5 amino acids to increase erythromycin titers (Licona-Cassani et al., 2012). Moreno-Avitia et al. (2020) analyzed the feasibility of maximizing the production of phenazine-1-carboxamide using an experimentally validated metabolic reconstruction of *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446. Thus, GEMs allow the metabolic analysis and simulation of several organisms of all the domains of life under different conditions (Table 1); this is one important reason for keeping metabolism databases updated.

Artículos

Table 1. Examples of organisms with a reported genome-scale model (GEM)

Organism	Model	Description	Reference
Bacteria			
<i>Escherichia coli</i>	iML1515	Contains information on 1515 open reading frames, it also has some specific contexts, for example iML1515-ROS version has additional reactions associated with the generation of reactive oxygen species.	(Monk et al., 2017)
<i>Bacillus subtilis</i>	iBsu1144	It was developed by incorporating thermodynamic information for the reactions to improve intracellular parameters.	(Kocabas et al., 2017)
	iYO844	Version that integrates principles of GECKO (GEM with Enzymatic Constraints using Kinetic and Omics data) to improve the prediction accuracy of central carbon flux.	(Massaiu et al., 2019)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	iEK1101	Provides knowledge about the metabolism of this pathogenic microorganism and it has been used to evaluate responses to antibiotics.	(Kavvas et al., 2018)
<i>Streptomyces coelicolor</i>		Metabolic model for improvement of antibiotic yields, also used for the annotation of several genes.	(Borodina et al., 2005)
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>		A model actinomycete for antibiotic production, used for erythromycin enhanced synthesis by optimizing the metabolic route based on the GEM developed. They formulated a medium with glucose and four amino acids to obtain high erythromycin yields.	(Licona-Cassani et al., 2012)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	iSD1511	An updated GEM with high accuracy for substrate utilization data, strain specific reactions (e.g., phenazine transport and redox metabolism, cofactor metabolism, carnitine metabolism, oxalate production, etc.) and can simulate data in aerobic and anaerobic conditions.	(Dahal & Yang, preprint)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ATCC9446	iMA1267	The first experimentally validated GEM for <i>Pseudomonas chlororaphis</i> ATCC9446. Used to analyze strategies to maximize PCN production, to study the denitrification process and describe the ability of the strain to consume several carbon sources.	(Moreno-Avitia et al., 2020)
Archaea			
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	iST807	It has information about the methanogenesis pathway of <i>M. acetivorans</i> and represents a useful resource for the study of unusual reactions.	(Peterson et al., 2016)
Eukarya			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yeast 7	Constructed by an international collaborative effort to include consensus metabolic networks. The version Yeast 7.Fe includes information on iron metabolism.	(Aung et al., 2013) (Dikicioglu & Oliver, 2019)
<i>Mus musculus</i>		A model that employed genetic tools for data extraction, storage and flux simulation that can be used as example for developing a model. The model can simulate basic growth and metabolic functions.	(Quek & Nielsen, 2008)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	WormJam	The reconstruction involves metabolic compounds distributed across four different compartments, cytosol, mitochondria, nucleus, and extracellular secretions.	(Witting et al., 2018)
<i>Arabidopsis thaliana</i>		A model organism for plants that predict accurate fluxes, and it considers the transport costs associated with nutrient uptake and protein translocation between organelles.	(Cheung et al., 2013)
<i>Homo sapiens</i>	Recon3D	It has GPR associations and structural information on metabolites and enzymes. It is the latest version of a <i>Homo sapiens</i> GEM.	(Brunk et al., 2018)
	iAdipocytes1809	An adipocyte-based metabolic reconstruction. Contains information on subcellular localization and tissue specific gene expression based on the Human Protein Atlas database.	(Mardinoglu et al., 2013)

Metabolic reconstruction approaches.

Reconstruction of GEMs complexity varies depending on the approach followed and the use of software, however it is a laborious work, it involves many hours of database research, coding, and manual curation. The average time required for the reconstruction of a GEM goes from 6 months to two years, conditioned to the genomic size and study status of the bacteria (Thiele & Palsson, 2010). There are two main approaches to reconstruct GEMs, bottom-up and top-down. The former consists in building the model from scratch, and the latter in constructing it from an already made universal model. Some software, such as CarveMe, use the top-down strategy, providing a draft model in short time; nevertheless, most software employ the bottom-up strategy, requiring more manual curation (Machado et al., 2018; Mendoza et al., 2019). Both approaches need an annotated high quality genome as starting material. In the traditional or bottom-up strategy, the annotation is input in a software that automatically generates a draft model by comparing reactions databases and the annotated genome (by homology or orthology) (Machado et al., 2018). Then, the user manually cures the draft to obtain the final model.

Top-down strategy is usually faster, the whole process is described somewhere else (Machado et al., 2018), briefly, a universal model is created by integrating all models available in a database, namely BiGG, then it is manually curated. This universal model serves as a template for the new model; hence, the annotated genome of a given organism is compared to the universal model by orthology/homology using a software, during this process reactions present in the organism are included (together with metabolites) in the model, the unnecessary reactions are removed. The output is a functional curated model; however, further manual curation is needed. A key step in the reconstruction process is the correct establishment of orthology and homology, it is of utmost importance to take in consideration the precise selection of related and reference strains, particularly when working with environmental strains. The quantity and

quality of information found in reaction databases relies mostly in this step (Thiele & Palsson, 2010). Manual curation also depends on the collected data; in cases where there is not enough information of a given organism, physiological and experimental data have to be compared with model reconstruction to ensure model accuracy (Thiele & Palsson, 2010).

GEMs are constantly growing and evolving as new data for the given organism is available. Though metabolic models do not cover the whole metabolism, predictions obtained are helpful approaches and guidelines to design rational strategies that are more efficient, reliable, and accurate than trial and error scheme. In the case of environmental strains, metabolic models give a powerful insight to make conscious decisions.

Genome scale metabolic modeling to improve bioremediation using individual species

Several studies have successfully used GEMs for biostimulation and bioaugmentation. As of January 2013, only seven species including *Acinetobacter baylyi*, *Dehalococcoides ethenogenes*, *Geobacter metallireducens*, *G. sulfurreducens*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus erythropolis*, and *Shewanella oneidensis* and nine GEMs were constructed for bioremediation applications, these are discussed in another review (Xu et al., 2013). To date, the number of GEMs applications in bioremediation is growing and more interest is being put in them as they show high efficacy.

GEMs can be reconstructed for individual strains and microbial communities, most GEMs in bioremediation are for individual strains, moreover they are mainly used for biostimulation purposes due to the challenges bioaugmentation imply; these, along with microbial community GEMs, will be further discussed. They are helpful in non-model and environmental organisms, such as *Paenarthrobacter aurescens*; Ofaim and collaborators reconstructed a metabolic model of the TC1 strain to study the degradation of the pollutant herbicide atrazine with 100 different compounds to supplement the

medium Ofaim et al. (2020). They found the optimal combination of compounds to enhance degradation, further tested the predictions *in vitro* and confirmed them, highlighting the importance of GEMs to capture complexities that go beyond biochemical knowledge and to screen hundreds to thousands of compounds with no cost. In another study, a reconstruction of a toluene-degrader strain *Pseudomonas veronii* 1YdBTEX2 was reported. *P. veronii* is a bacterium used in bioaugmentation, the GEM reported included REMI (Relative Expression and Metabolomics Integrations), a method to integrate omics data into metabolic models and specific-context models, to predict the growth of the strain during transition from exponential to stationary phase and adaptation from liquid medium to sand (Hadadi et al., 2020). The optimization of microbial activity of *Variovorax* sp. SRS 16 through simulation of linuron degradation outcomes under several conditions was performed reconstructing a GEM (Dhakar et al., 2021). *Ralstonia eutropha* H16 GEM RehMBEL1391 was reconstructed to analyze its metabolic capacities, the strain is able of degrading several aromatic compounds (Park et al., 2011).

Model organisms such as, *E. coli* str. K-12 substr. MG1655 and *Pseudomonas putida* KT2440 have been used in bioaugmentation. Iman and collaborators used the *E. coli* GEM *ijO1366* to study the degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and to design mutant strains with higher TNT degradation yields than wild type strain (Iman et al. 2017). *Pseudomonas putida* KT2440 is a non-pathogenic soil bacterium with the metabolic capacity of degrading toluene, lignin and other xenobiotics. The first GEM *ijN746* and the most recent and curated *ijN1462* model have been used to analyze the biodegradability of such contaminants as well as the strain potential as a biofactory to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) (Nogales et al., 2008, 2020).

Microbial communities engineering strategies to enhance bioremediation methods

As mentioned earlier, micro-environmental conditions are a key factor to be considered for the design of bioremediation strategies. There is a lack of information about

how the inoculated bacteria will be affected by the new environmental conditions. In other words, an engineered strain may not behave similarly under laboratory compared to real environmental non-controlled conditions causing physiological stress and decreasing its performance. The results are mixed and the inoculation goals are commonly not achieved; inoculated bacteria may not survive or express the desired metabolic activity (Morales et al., 2021). Therefore, bioaugmentation techniques are commonly accompanied by biostimulation to aid during the adaptation stage and increase the pollutant removal, these include the use of a microbial community or nutrients (Nikolopoulou et al., 2013).

In nature, microorganisms coexist taking advantage of their produced metabolites and interchanging nutrients. Thus, in bioaugmentation methods it is important to study the interaction of the inoculated bacteria with the indigenous bacteria to increase the efficacy of the technique. Studying the metabolism of the microbial community by performing enzymatic tests and growth curves in different media *in vitro* could be time and money consuming. Microbial communities metabolic modeling represents an approach that has allowed to know which reactions are relevant to drive microbial interactions within specific environments. For example, the context-specific metabolic reconstruction of two communities present in polyaromatic contaminated soil allowed the analysis of naphthalene degradation with and without biostimulation, these results can aid in the development of better bioremediation strategies (Tobalina et al., 2015). A possible outcome of studying microbial communities is the design of synthetic consortia.

Synthetic consortia are constructed through microbial community engineering, which allows the accomplishment of highly complex tasks that pose a challenge for monocultures (Tsoi et al., 2019). Genome-scale metabolic modeling has proved to be a successful tool to design synthetic communities with applications in bioremediation. For example, a study reconstructed GEMs of the atrazine-degrading bacterium *Arthrobacter aurescens* TC1 (*Paenarthrobacter aurescens* TC1) and other four non-atrazine degrading soil bacteria to

analyze the community interactions (Xu et al., 2019). In this study, the model was used to predict community performances considering growth, atrazine degradation, and specific exchange fluxes. The main contribution of such simulations was the increase in atrazine-degrading efficiency by specific interactions of a synthetic consortium of *Arthrobacter*, *Halobacillus* and *Halomonas*. It was also possible to present a model of which metabolites are degraded (and used) by the community, describing the metabolic pathways involved. Zhuang and collaborators also studied the bioremediation of uranium using community GEMs, they first analyzed the competition for nutrients between *Geobacter sulfurreducens* and *Rhodoferrum ferrireducens* (two bacteria coexisting in uranium polluted sites) in order to explain how these interactions may influence *in situ* uranium bioremediation (Zhuang et al., 2011). Further, they studied a microbial community composed of *Geobacter sulfurreducens* and sulfate-reducing bacteria (SRBs) to design a rational strategy for uranium bioremediation, they found that the concentration of *G. sulfurreducens* could be kept low with a constant supply of acetate and Fe(III) (Zhuang et al., 2012). Additionally, (Zomorodi et al., 2014) introduced d-OptCom, a tool for the dynamic metabolic modeling of microbial communities, and designed an improved synthetic consortia of *Geobacter sulfurreducens*, *Rhodoferrum ferrireducens*, and *Shewanella oneidensis* to reduce uranium; they found an increased uranium remediation with the addition of lactate.

Genome-scale metabolic modeling and metabolic engineering for bioremediation

Indigenous bacteria and known pollutant degraders can naturally degrade the contaminants at their site, however their metabolic pathways are not always suitable for large scale degradation, decreasing the bioremediation efficiency (Dangi et al., 2019). The use of improved strains through metabolic engineering can solve this problem. Metabolic engineering comprises the use of already

existing metabolic pathways to rewire them, or the introduction of exogenous pathways to optimize the production of specific metabolites. Metabolic engineering requires a detailed comprehension of the metabolic pathways of the microorganism used, GEMs are a powerful tool to design rational strategies.

GEMs are broadly used in metabolic engineering, for instance, predicting gene modification strategies to overproduce desired compounds accelerating the process, like the achieved by metabolic rewiring in *Pseudomonas putida* KT2440 for indigoidine production (Banerjee et al., 2020). In the study they used the MCS (minimal cut set) to determine the targets to enhance the production, however, most optimizations are performed with FBA and related algorithms like OptKnock (Burgard et al., 2003).

Despite the extended use of GEMs in metabolic engineering, the limitations of introducing modified strains into natural habitats hamper the development of this field (Ofaim et al., 2020). Therefore, only few studies have reported the use of metabolic engineering and GEMs in bioremediation. Izallalen et al. (2008) applied the metabolic reconstruction of the bacterium *Geobacter sulfurreducens* to predict gene deletions to increase the respiration rate using OptKnock. They performed the predicted deletions to do metabolic engineering in a strain and successfully increased the respiration rates and diminished the cell growth and biomass yield. This engineered strain has applications in bioremediation of uranium as it is preferred a rapid biodegradation with low biomass.

Furthermore, the *in silico* strain design of *E. coli* was possible through the GEM iJO1366 to obtain increased 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) degradation rates than the wild type strain, the results could be used as a future reference for the design of better bioremediation techniques (Iman et al., 2017). Additionally, other studies pointed out the feasibility of using their metabolic reconstructions in metabolic engineering to improve bioremediation strategies (Aggarwal et al., 2011; Sohn et al., 2010).

Future directions: The potential use of genome-scale metabolic modeling as a mean to improve oil spill bioremediation

Contaminated sites are constantly changing as pollutants vary in concentration and dispersion over time; some polluted zones, such as oil spills move faster due to the oceanic currents and wind (Li et al., 2019), therefore response time is crucial to diminish the ecological impact. The GEMs applications discussed in this review are promising approaches to develop enhanced oil spill bioremediation strategies.

The GEM-guided synthetic microbial consortia design is particularly interesting because of the feasibility of using these consortia in different sites. The characterization of the autochthonous communities living in oil-polluted zones as well as oil degraders is essential to develop a synthetic consortium that can be applicable to different scenarios. The *omics era* has made oil-degrader microorganisms identification faster and more accurate. Recent studies mention the existence of more than 79 genera with petroleum hydrocarbons degradation capability, including *Pseudomonas*, *Dietzia*, *Aquamicrobium*, *Alkanindiges*, *Staphylococcus*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Streptobacillus*, *Kocuria*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Marinobacter*, *Paraburkholderia*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Streptococcus*, *Bradyrhizobium*, *Alteromonas*, *Pandoraea*, *Leifsonia* and *Rhodococcus*, among others (Geng et al., 2022; Xu et al., 2018). Furthermore, studies have analyzed the composition of microbial communities present in oil contaminated soil (Cai et al., 2020) and water (Neethu et al., 2019). This information allows for the design of synthetic consortia with increased petroleum degradation using GEMs to analyze the interactions between degraders and non-degraders. Recently, the GEM-guided design of a synthetic consortium composed by hexadecane-degrading bacterium *Dietzia* sp. strain DQ12-45-1b and non-degrader *Pseudomonas stutzeri* SLG510A3-8 successfully removed 85.54% diesel oil in 15 days (Hu et al., 2020). Using the GEM *IBH1908*, authors found that *P. stutzeri*,

despite not being able of degrading C₁₆ (hexadecane), could survive using the metabolic intermediaries produced by *Dietzia* sp when metabolizing acetate and glutamate produced by *P. stutzeri*.

Synthetic consortia have demonstrated to achieve high bioremediation yields, however the combination of synthetic consortia from autochthonous bacteria with biostimulation is a promising strategy to maximize the biodegradation. A study analyzed the use of biostimulation (addition of KNO₃ and KH₂PO₄, or uric acid and lecithin), a pre-adapted indigenous population, and rhamnolipids, to degrade spilled oil (Nikolopoulou et al., 2013). They mixed the variables and found that 3 of the 6 treatments showed the best results; seawater + crude oil + KNO₃ + KH₂PO₄ + rhamnolipids + pre-adapted indigenous population (NPKMR), seawater + crude oil + uric acid + lecithin + rhamnolipids (ULR), and seawater + crude oil + uric acid + lecithin + rhamnolipids + pre-adapted indigenous population (ULRM) obtained a degradation of 99%, 97% and 88%, respectively, within 15 days.

Additionally, findings by [Nikolopoulou et al. \(2013\)](#), serve as a guide for the design of bioremediation strategies using GEMs, for example, the design of a synthetic consortium biostimulated with biosurfactants, such as rhamnolipids. Biosurfactants have attracted some research groups for bioremediation because the amphiphilic nature of these compounds, promoting the partitioning of the hydrophobic contaminants into internal cores of micelles and detaching the pollutants to the sediments and increase their bioavailability (Dell' Anno et al., 2021). Biosurfactants have advantages such as being environmentally friendly, with reduced toxicity and high biodegradability compared to chemical surfactants (Mnif et al., 2017). For instance, rhamnolipids are the most studied biosurfactants, they are glycolipids that consist in a β -hydroxy (3-hydroxy) fatty acid glycosylated with either one or two rhamnose residues (mono- and di-rhamnolipids, respectively) produced by some *Pseudomonas* species (Thomas et al., 2021; Varjani & Upasani, 2017). Several studies show the efficacy of rhamnolipids in the removal of hydrocarbon pollutants. A diesel

degradation yield of 70% was achieved by the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AHV-KH10 (Pourfadakari et al., 2021). Another study reports removal of up to 80% petroleum hydrocarbons using a mixture of rhamnolipids, biochar and nitrogen (Wei et al. 2020). Thomas and collaborators found that rhamnolipids have similar capacity as chemical surfactants (Superdispersant 25, Finasol OSR 52, and Slickgone NS) to remove hydrocarbons (Thomas et al. 2021).

Despite rhamnolipids are the biosurfactants with higher yields, their commercialization and applications are limited due to the low level of production of *Pseudomonas* strains (Soberón-Chávez et al., 2021). Several studies have achieved increased production of rhamnolipids by metabolic engineering, utilization of different substrates and culture media. Nonetheless, results are far from achieving process economic feasibility - for a more detailed insight of these studies check the review by Soberón-Chávez and collaborators (Soberón-Chávez et al. 2021). Recently, the use of pyocyanin, a blue pigment exclusively produced by *Pseudomonas* strains, was found to assist rhamnolipids emulsification of petrol, hexadecane and diesel (Das & Ma, 2013). They observed that strains with higher production of pyocyanin increased hydrocarbon emulsification. While tests were performed using cell-free supernatants, the results may indicate the role of pyocyanin as an enhancer of the emulsification by rhamnolipids (Das & Ma, 2013). This poses the opportunity of using GEM for the fine tuning of the biosynthesis of an optimal ratio of rhamnolipids and pyocyanin to use them as biostimulators (Gonçalves & Vasconcelos, 2021).

The use of pyocyanin and rhamnolipids for bioremediation is complicated because of the complexity of their metabolic routes, they derive and intersect from central metabolism pathways; moreover, *Pseudomonas* possesses an elaborated *quorum sensing* (QS) system in which both metabolites are involved (Soberón-Chávez et al., 2021). As a future perspective, GEMs can overcome the problems discussed and furthermore, be used to design an improved synthetic

consortium of hydrocarbon degraders biostimulated with rhamnolipids and pyocyanin to speed up oil removal. The metabolic reconstruction of a non-virulent *Pseudomonas aeruginosa* strain with optimized pyocyanin and rhamnolipids co-production could guide the metabolic engineering strategies to solve the problems metabolic pathways suppose. However, the modeling of quorum sensing is more difficult, at the moment of writing this review, few attempts have been done to incorporate regulation systems (Chung et al., 2021) and quorum sensing pathways into GEMs (Botero et al., 2020); hence, similar strategies could be followed to obtain a well-nurtured GEM. This system of oil bioremediation can be designed to be universally applicable.

Further research is needed to extend the applications of GEMs and to overcome current limitations, such as viability, cellular regulation, genetic engineering, among others. Withal, GEMs have a plethora of advantages and applications, their versatility, as one reconstruction can be reutilized for different purposes, increases the possible outcomes, and allows the simulation of thousands of scenarios, making them a great tool to improve bioremediation.

References

- Aggarwal, S., Karimi, I. A., & Lee, D. Y. (2011). Reconstruction of a genome-scale metabolic network of *Rhodococcus erythropolis* for desulfurization studies. *Molecular BioSystems*, 7(11), 3122–3131. <https://doi.org/10.1039/c1mb05201b>
- Antizar-Ladislao, B., Lopez-Real, J., & Beck, A. J. (2006). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an aged coal tar contaminated soil under in-vessel composting conditions. *Environmental Pollution*, 141(3), 459–468. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.066>
- Aung, H. W., Henry, S. A., & Walker, L. P. (2013). Revising the Representation of Fatty Acid, Glycerolipid, and Glycerophospholipid Metabolism in the Consensus Model of Yeast Metabolism. *Industrial Biotechnology (New Rochelle, N.Y.)*, 9(4), 215–228. <https://doi.org/10.1089/ind.2013.0013>

- Banerjee, D., Eng, T., Lau, A. K., Sasaki, Y., Wang, B., Chen, Y., Prah, J.-P., Singan, V. R., Herbert, R. A., Liu, Y., Tanjore, D., Petzold, C. J., Keasling, J. D., & Mukhopadhyay, A. (2020). Genome-scale metabolic rewiring improves titers rates and yields of the non-native product indigoidine at scale. *Nature Communications*, 11(1), 5385. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19171-4>
- Bento, F. M., Camargo, F. A. O., Okeke, B. C., & Frankenberger, W. T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96(9), 1049–1055. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.008>
- Bermudez Delgado, N. A., Bermudez Delgado, E., & Saucedo, E. (2018). The relationship between oil prices, the stock market and the exchange rate: Evidence from Mexico. *The North American Journal of Economics and Finance*, 45, 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.najef.2018.03.006>
- Borodina, I., Krabben, P., & Nielsen, J. (2005). Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Research*, 15(6), 820–829. <https://doi.org/10.1101/gr.3364705>
- Botero, D., Monk, J., Rodríguez Cubillos, M. J., Rodríguez Cubillos, A., Restrepo, M., Bernal-Galeano, V., Reyes, A., González Barrios, A., Palsson, B. Ø., Restrepo, S., & Bernal, A. (2020). Genome-Scale Metabolic Model of *Xanthomonas phaseoli* pv. manihotis: An Approach to Elucidate Pathogenicity at the Metabolic Level. *Frontiers in Genetics*, 11, 837. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00837>
- Brunk, E., Sahoo, S., Zielinski, D. C., Altunkaya, A., Dräger, A., Mih, N., Gatto, F., Nilsson, A., Preciat Gonzalez, G. A., Aurich, M. K., Plić, A., Sastry, A., Danielsdottir, A. D., Heinken, A., Noronha, A., Rose, P. W., Burley, S. K., Fleming, R. M. T., Nielsen, J., ... Palsson, B. O. (2018). Recon3D enables a three-dimensional view of gene variation in human metabolism. *Nature Biotechnology*, 36(3), 272–281. <https://doi.org/10.1038/nbt.4072>
- Burgard, A. P., Pharkya, P., & Maranas, C. D. (2003). Optknock: A bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(6), 647–657. <https://doi.org/10.1002/bit.10803>
- Cai, P., Ning, Z., Liu, Y., He, Z., Shi, J., & Niu, M. (2020). Diagnosing bioremediation of crude oil-contaminated soil and related geochemical processes at the field scale through microbial community and functional genes. *Annals of Microbiology*, 70(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01580-x>
- Cheung, C. Y. M., Williams, T. C. R., Poolman, M. G., Fell, David. A., Ratcliffe, R. G., & Sweetlove, L. J. (2013). A method for accounting for maintenance costs in flux balance analysis improves the prediction of plant cell metabolic phenotypes under stress conditions. *The Plant Journal*, 75(6), 1050–1061. <https://doi.org/10.1111/tpj.12252>
- Chung, C. H., Lin, D.-W., Eames, A., & Chandrasekaran, S. (2021). Next-Generation Genome-Scale Metabolic Modeling through Integration of Regulatory Mechanisms. *Metabolites*, 11(9), 606. <https://doi.org/10.3390/metabo11090606>
- Dahal, S., & Yang, L. (2021). Genome-scale modeling of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 unveils its broad metabolic capabilities and role of metabolism in drug potentiation [Preprint]. *Systems Biology*. <https://doi.org/10.1101/2021.04.15.439930>
- Dangi, A. K., Sharma, B., Hill, R. T., & Shukla, P. (2019). Bioremediation through microbes: Systems biology and metabolic engineering approach. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(1), 79–98. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1500997>
- Das, P., & Ma, L. Z. (2013). Pyocyanin pigment assisting biosurfactant-mediated hydrocarbon emulsification. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.07.013>

- Dell' Anno, F., Rastelli, E., Sansone, C., Brunet, C., Ianora, A., & Dell' Anno, A. (2021). Bacteria, Fungi and Microalgae for the Bioremediation of Marine Sediments Contaminated by Petroleum Hydrocarbons in the Omics Era. *Microorganisms*, 9(8), 1695. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081695>
- Dhakar, K., Zarecki, R., van Bommel, D., Knossow, N., Medina, S., Öztürk, B., Aly, R., Eizenberg, H., Ronen, Z., & Freilich, S. (2021). Strategies for Enhancing in vitro Degradation of Linuron by *Variovorax* sp. Strain SRS 16 Under the Guidance of Metabolic Modeling. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 602464. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.602464>
- Dikicioglu, D., & Oliver, S. G. (2019). Extension of the yeast metabolic model to include iron metabolism and its use to estimate global levels of iron-recruiting enzyme abundance from cofactor requirements. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(3), 610–621. <https://doi.org/10.1002/bit.26905>
- Fang, X., Lloyd, C. J., & Palsson, B. O. (2020). Reconstructing organisms in silico: Genome-scale models and their emerging applications. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(12), 731–743. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00440-4>
- Fida, T. T., Moreno-Forero, S. K., Breugelmans, P., Heipieper, H. J., Röling, W. F. M., & Springael, D. (2017). Physiological and Transcriptome Response of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading *Novosphingobium* sp. LH128 after Inoculation in Soil. *Environmental Science & Technology*, 51(3), 1570–1579. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03822>
- Geng, S., Qin, W., Cao, W., Wang, Y., Ding, A., Zhu, Y., Fan, F., & Dou, J. (2022). Pilot-scale bioaugmentation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil using an indigenous bacterial consortium in soil-slurry bioreactors. *Chemosphere*, 287, 132183. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132183>
- Gonçalves, T., & Vasconcelos, U. (2021). Colour me blue: The history and the biotechnological potential of pyocyanin. *Molecules*, 26(4). Scopus. <https://doi.org/10.3390/molecules26040927>
- Gu, C., Kim, G. B., Kim, W. J., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2019). Current status and applications of genome-scale metabolic models. *Genome Biology*, 20(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1730-3>
- Hadadi, N., Pandey, V., Chiappino-Pepe, A., Morales, M., Gallart-Ayala, H., Mehl, F., Ivanisevic, J., Sentchilo, V., & Meer, J. R. van der. (2020). Mechanistic insights into bacterial metabolic reprogramming from omics-integrated genome-scale models. *NPJ Systems Biology and Applications*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41540-019-0121-4>
- Hu, B., Wang, M., Geng, S., Wen, L., Wu, M., Nie, Y., Tang, Y.-Q., & Wu, X.-L. (2020). Metabolic Exchange with Non-Alkane-Consuming *Pseudomonas stutzeri* SLG510A3-8 Improves n-Alkane Biodegradation by the Alkane Degrader *Dietzia* sp. Strain DQ12-45-1b. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(8), e02931-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02931-19>
- Iman, M., Sobati, T., Panahi, Y., & Mobasheri, M. (2017). Systems Biology Approach to Bioremediation of Nitroaromatics: Constraint-Based Analysis of 2,4,6-Trinitrotoluene Biotransformation by *Escherichia coli*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(8), E1242. <https://doi.org/10.3390/molecules22081242>
- Izallalen, M., Mahadevan, R., Burgard, A., Postier, B., Didonato, R., Sun, J., Schilling, C. H., & Lovley, D. R. (2008). *Geobacter sulfurreducens* strain engineered for increased rates of respiration. *Metabolic Engineering*, 10(5), 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.06.005>
- Kavvas, E. S., Catoi, E., Mih, N., Yurkovich, J. T., Seif, Y., Dillon, N., Heckmann, D., Anand, A., Yang, L., Nizet, V., Monk, J. M., & Palsson, B. O. (2018). Machine learning and structural analysis of *Mycobacterium tuberculosis* pan-genome identifies genetic signatures of antibiotic resistance. *Nature Communications*, 9(1), 4306. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06634-y>

- Kocabas, P., Calik, P., Çalik, G., & Özdamar, H. (2017). Analyses of extracellular protein production in *Bacillus subtilis* – I: Genome-scale metabolic model reconstruction based on updated gene-enzyme-reaction data. *Biochemical Engineering Journal*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.07.005>
- Krishnamurthy, J., Engel, L. S., Wang, L., Schwartz, E. G., Christenbury, K., Kondrup, B., Barrett, J., & Rusiecki, J. A. (2019). Neurological symptoms associated with oil spill response exposures: Results from the Deepwater Horizon Oil Spill Coast Guard Cohort Study. *Environment International*, 131, 104963. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104963>
- Kumar, V., Shahi, S. K., & Singh, S. (2018). Bioremediation: An Eco-sustainable Approach for Restoration of Contaminated Sites. In J. Singh, D. Sharma, G. Kumar, & N. R. Sharma (Eds.), *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development* (pp. 115–136). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0_6
- Li, P., Cai, Q., Lin, W., Chen, B., & Zhang, B. (2016). Offshore oil spill response practices and emerging challenges. *Marine Pollution Bulletin*, 110(1), 6–27. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.020>
- Li, Y., Yu, H., Wang, Z., Li, Y., Pan, Q., Meng, S., Yang, Y., Lu, W., & Guo, K. (2019). The forecasting and analysis of oil spill drift trajectory during the Sanchi collision accident, East China Sea. *Ocean Engineering*, 187, 106231. <https://doi.org/10.1016/j.oceaneng.2019.106231>
- Licona-Cassani, C., Marcellin, E., Quek, L.-E., Jacob, S., & Nielsen, L. K. (2012). Reconstruction of the *Saccharopolyspora erythraea* genome-scale model and its use for enhancing erythromycin production. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102(3), 493–502. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9783-2>
- Machado, D., Andrejev, S., Tramontano, M., & Patil, K. R. (2018). Fast automated reconstruction of genome-scale metabolic models for microbial species and communities. *Nucleic Acids Research*, 46(15), 7542–7553 <https://doi.org/10.1093/nar/gky537>
- Mardinoglu, A., Agren, R., Kampf, C., Asplund, A., Nookaew, I., Jacobson, P., Walley, A. J., Froguel, P., Carlsson, L. M., Uhlen, M., & Nielsen, J. (2013). Integration of clinical data with a genome-scale metabolic model of the human adipocyte. *Molecular Systems Biology*, 9, 649. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.5>
- Massaiu, I., Pasotti, L., Sonnenschein, N., Rama, E., Cavaletti, M., Magni, P., Calvio, C., & Herrgård, M. J. (2019). Integration of enzymatic data in *Bacillus subtilis* genome-scale metabolic model improves phenotype predictions and enables in silico design of poly-γ-glutamic acid production strains. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1052-2>
- Mendoza, S. N., Olivier, B. G., Molenaar, D., & Teusink, B. (2019). A systematic assessment of current genome-scale metabolic reconstruction tools. *Genome Biology*, 20(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1769-1>
- Mnif, I., Sahnoun, R., Ellouz-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2017). Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.02.002>
- Monk, J. M., Lloyd, C. J., Brunk, E., Mih, N., Sastry, A., King, Z., Takeuchi, R., Nomura, W., Zhang, Z., Mori, H., Feist, A. M., & Palsson, B. O. (2017). IML1515, a knowledgebase that computes *Escherichia coli* traits. *Nature Biotechnology*, 35(10), 904–908. <https://doi.org/10.1038/nbt.3956>
- Morales, M., Sentschilo, V., Hadadi, N., & van der Meer, J. R. (2021). Genome-wide gene expression changes of *Pseudomonas veronii* 1YdBTEX2 during bioaugmentation in polluted soils. *Environmental Microbiome*, 16(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40793-021-00378-x>

- Moreno-Avitia, F., Utrilla, J., Bolívar, F., Nogales, J., & Escalante, A. (2020). Metabolic reconstruction of *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446 to understand its metabolic potential as a phenazine-1-carboxamide-producing strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(23), 10119–10132. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10913-4>
- Ndimele, P. E., Saba, A. O., Ojo, D. O., Ndimele, C. C., Anetekhai, M. A., & Erondy, E. S. (2018). Chapter 24—Remediation of Crude Oil Spillage. In P. E. Ndimele (Ed.), *The Political Ecology of Oil and Gas Activities in the Nigerian Aquatic Ecosystem* (pp. 369–384). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809399-3.00024-0>
- Neethu, C. S., Saravanakumar, C., Purvaja, R., Robin, R. S., & Ramesh, R. (2019). Oil-Spill Triggered Shift in Indigenous Microbial Structure and Functional Dynamics in Different Marine Environmental Matrices. *Scientific Reports*, *9*(1), 1354. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37903-x>
- Nikolopoulou, M., Pasadakis, N., & Kalogerakis, N. (2013). Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, *72*(1), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.04.007>
- Nogales, J., Mueller, J., Gudmundsson, S., Canalejo, F. J., Duque, E., Monk, J., Feist, A. M., Ramos, J. L., Niu, W., & Palsson, B. O. (2020). High-quality genome-scale metabolic modelling of *Pseudomonas putida* highlights its broad metabolic capabilities. *Environmental Microbiology*, *22*(1), 255–269. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14843>
- Nogales, J., Palsson, B. Ø., & Thiele, I. (2008). A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: I JN746 as a cell factory. *BMC Systems Biology*, *2*(1), 79. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-79>
- Ofaim, S., Zarecki, R., Porob, S., Gat, D., Lahav, T., Kashi, Y., Aly, R., Eizenberg, H., Ronen, Z., & Freilich, S. (2020). Genome-scale reconstruction of *Paenarthrobacter aurescens* TC1 metabolic model towards the study of atrazine bioremediation. *Scientific Reports*, *10*(1), 13019. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69509-7>
- Park, J. M., Kim, T. Y., & Lee, S. Y. (2011). Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Ralstonia eutropha* H16 for polyhydroxyalkanoate synthesis, lithoautotrophic growth, and 2-methyl citric acid production. *BMC Systems Biology*, *5*, 101. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-101>
- Peterson, J. R., Thor, S., Kohler, L., Kohler, P. R. A., Metcalf, W. W., & Luthey-Schulten, Z. (2016). Genome-wide gene expression and RNA half-life measurements allow predictions of regulation and metabolic behavior in *Methanosarcina acetivorans*. *BMC Genomics*, *17*(1), 924. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3219-8>
- Pourfadakari, S., Ghafari, S., Takdastan, A., & Jorfi, S. (2021). A salt resistant biosurfactant produced by moderately halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* (AHV-KH10) and its application for bioremediation of diesel-contaminated sediment in saline environment. *Biodegradation*, *32*(3), 327–341. <https://doi.org/10.1007/s10532-021-09941-2>
- Quek, L.-E., & Nielsen, L. K. (2008). On the reconstruction of the *Mus musculus* genome-scale metabolic network model. *Genome Informatics. International Conference on Genome Informatics*, *21*, 89–100.
- Rafferty, J. P. (2021). 9 of the Biggest Oil Spills in History. In *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/list/9-of-the-biggest-oil-spills-in-history>
- Sandifer, P., Ferguson, A., Finucane, M., Partyka, M., Solo-Gabriele, H., Hayward Walker, A., Wowk, K., Caffey, R., & Yoskowitz, D. (2021). Human Health and Socioeconomic Effects of the Deepwater Horizon Oil Spill in the Gulf of Mexico. *Oceanography*, *34*(1), 174–191. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2021.125>

- Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M. P., & Cocotl-Yañez, M. (2021). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: From molecular genetics to the market. *Microbial Biotechnology*, *14*(1), 136–146. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13700>
- Sohn, S. B., Kim, T. Y., Park, J. M., & Lee, S. Y. (2010). *In silico* genome-scale metabolic analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 for polyhydroxyalkanoate synthesis, degradation of aromatics and anaerobic survival. *Biotechnology Journal*, *5*(7), 739–750. <https://doi.org/10.1002/biot.201000124>
- Szulc, A., Ambrożewicz, D., Sydow, M., Ławniczak, Ł., Piotrowska-Cyplik, A., Marecik, R., & Chrzanowski, Ł. (2014). The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. *Journal of Environmental Management*, *132*, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.11.006>
- Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature Protocols*, *5*(1), 93–121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.203>
- Thomas, G. E., Brant, J. L., Campo, P., Clark, D. R., Coulon, F., Gregson, B. H., McGenity, T. J., & McKew, B. A. (2021). Effects of Dispersants and Biosurfactants on Crude-Oil Biodegradation and Bacterial Community Succession. *Microorganisms*, *9*(6), 1200. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061200>
- Tobalina, L., Bargiela, R., Pey, J., Herbst, F.-A., Lores, I., Rojo, D., Barbas, C., Peláez, A. I., Sánchez, J., von Bergen, M., Seifert, J., Ferrer, M., & Planes, F. J. (2015). Context-specific metabolic network reconstruction of a naphthalene-degrading bacterial community guided by metaproteomic data. *Bioinformatics*, *31*(11), 1771–1779. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv036>
- Tsoi, R., Dai, Z., & You, L. (2019). Emerging strategies for engineering microbial communities. *Biotechnology Advances*, *37*(6), 107372. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.011>
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. C. R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, *22*(2), 231–241. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology*, *232*, 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>
- Wei, Z., Wang, J. J., Gaston, L. A., Li, J., Fultz, L. M., DeLaune, R. D., & Dodla, S. K. (2020). Remediation of crude oil-contaminated coastal marsh soil: Integrated effect of biochar, rhamnolipid biosurfactant and nitrogen application. *Journal of Hazardous Materials*, *396*, 122595. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122595>
- Witting, M., Hastings, J., Rodriguez, N., Joshi, C. J., Hattwell, J. P. N., Ebert, P. R., van Weeghel, M., Gao, A. W., Wakelam, M. J. O., Houtkooper, R. H., Mains, A., Le Novère, N., Sadykoff, S., Schroeder, F., Lewis, N. E., Schirra, H.-J., Kaleta, C., & Casanueva, O. (2018). Modeling Meets Metabolomics—The WormJam Consensus Model as Basis for Metabolic Studies in the Model Organism *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *5*, 96. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00096>
- Wu, X. F., & Chen, G. Q. (2019). Global overview of crude oil use: From source to sink through inter-regional trade. *Energy Policy*, *128*, 476–486. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2019.01.022>
- Xu, C., Liu, L., Zhang, Z., Jin, D., Qiu, J., & Chen, M. (2013). Genome-scale metabolic model in guiding metabolic engineering of microbial improvement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(2), 519–539. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4543-9>
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H., & Yu, H. (2018). Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2885. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>

Artículos

- Xu, X., Zarecki, R., Medina, S., Ofaim, S., Liu, X., Chen, C., Hu, S., Brom, D., Gat, D., Porob, S., Eizenberg, H., Ronen, Z., Jiang, J., & Freilich, S. (2019). Modeling microbial communities from atrazine contaminated soils promotes the development of biostimulation solutions. *The ISME Journal*, 13(2), 494–508. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0288-5>
- Zhao, D., Kumar, S., Zhou, J., Wang, R., Li, M., & Xiang, H. (2017). Isolation and complete genome sequence of *Halorientalis hydrocarbonoclasticus* sp. Nov., a hydrocarbon-degrading haloarchaeon. *Extremophiles*, 21(6), 1081–1090. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0968-5>
- Zhuang, K., Izallalen, M., Mouser, P., Richter, H., Risso, C., Mahadevan, R., & Lovley, D. R. (2011). Genome-scale dynamic modeling of the competition between *Rhodoferrax* and *Geobacter* in anoxic subsurface environments. *The ISME Journal*, 5(2), 305–316. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.117>
- Zhuang, K., Ma, E., Lovley, D. R., & Mahadevan, R. (2012). The design of long-term effective uranium bioremediation strategy using a community metabolic model. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(10), 2475–2483. <https://doi.org/10.1002/bit.24528>
- Zomorodi, A. R., Islam, M. M., & Maranas, C. D. (2014). d-OptCom: Dynamic multi-level and multi-objective metabolic modeling of microbial communities. *ACS Synthetic Biology*, 3(4), 247–257. <https://doi.org/10.1021/sb4001307>

The Neutrophil's role during health and disease, new insights, and open questions

Josue Uriel Amador Hernandez, Roberto Rodríguez Moncayo,
Jose Luis Garcia Cordero*.

Laboratory of Microtechnologies for Biomedicine, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), CP. 66600 Monterrey, NL, Mexico.

jlgarcia@cinvestav.mx

Abstract

Neutrophils are the most abundant leukocytes in human blood, constituting 40 to 80% of the total circulating white blood cells. These cells participate as part of the host's first line of defense against invading pathogens, performing three main functions: (i) phagocytosis, (ii) degranulation, and (iii) generation of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). This review focuses on NETs and the NETosis process. The most studied signaling pathways of NETs induction and dynamics of nuclear decondensation during NETosis are described. In addition, we describe how neutrophils contribute to the production and secretion of cytokines which are important for the recruitment of immune cells and the homeostasis of the immune response. We also review how the non-specificity of cytotoxic proteins in NETs and prolonged host exposure to proinflammatory cytokines contribute to chronic inflammatory diseases, cancer, autoimmune diseases, and, more recently, COVID 19. Although fundamental aspects about the induction, process, and termination of the signaling pathways of NETs have been studied in recent years, conventional NETosis assays have been limited to end-point assays, taking measurements only when the experiment is over. NETosis end-point studies measure the response of a cell population to an inducer at different concentrations, resulting in the loss of the response at the individual level and temporal evolution of the NETosis process. Therefore, there is still a growing interest in developing comprehensive studies at the individual cell level, the temporality of NETosis, and dynamic stimulation conditions, which could lead to a better understanding of the pathologies in which neutrophil-derived cytokines and NETs participate.

Key words: Biomarkers, cytokines, immunecells, neutrophils, neutrophil extracellular traps (NETs).

Resumen

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la sangre humana, constituyendo del 40 al 80% del total de glóbulos blancos circulantes. Estas células participan como parte de la primera línea de defensa del huésped contra patógenos invasores, realizando tres funciones principales: (i) fagocitosis, (ii) desgranulación y (iii) generación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs). Esta revisión se centra en las NETs y el proceso de NETosis. Se describen las vías de señalización más estudiadas de inducción de NETs y la dinámica de descondensación nuclear ocurridos durante la NETosis. Además, describimos cómo los neutrófilos contribuyen a la producción y secreción de citocinas, que son importantes para el reclutamiento de células inmunes y la homeostasis de la respuesta inmunitaria. También revisamos cómo la inespecificidad de las proteínas citotóxicas de los NETs y la exposición prolongada del huésped a citocinas proinflamatorias contribuyen a las enfermedades inflamatorias crónicas, el cáncer, las enfermedades autoinmunes y más recientemente COVID 19. Aunque los aspectos fundamentales sobre la inducción, el proceso y la terminación de las vías de señalización de los NETs se han estudiado en los últimos años, los ensayos convencionales de NETosis se han limitado a estudios de punto final. Los estudios de punto

final de NETosis miden la respuesta de una población celular a un inductor a diferentes concentraciones, lo que resulta en la pérdida de la respuesta a nivel individual y la evolución temporal del proceso de NETosis. Por lo tanto, todavía hay un interés creciente en el desarrollo de estudios integrales a nivel celular individual, la temporalidad de la NETosis y las condiciones de estimulación dinámica, que podrían conducir a una mejor comprensión de las patologías en las que participan las citocinas de neutrófilos y los NETs.

Palabras clave: Biomarcadores, células inmunes, citocinas neutrófilos, trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).

Introducción

Neutrophils are a type of polymorphonuclear myeloid-derived leukocytes, recognized as key actors of the immune response against pathogens (Niels Borregaard, 2010a). Due to the neutrophil's requirement to perform active migration from blood vessels to the site of the infection quickly and efficiently, they are highly mobile and sensitive to stimuli. Furthermore, neutrophils are recognized as the first leukocytes recruited in an inflammatory site (Fousert et al., 2020) and are regarded as the principal effectors during acute inflammation.

Over the past 50 years, there has been rapid growth and interest in the field of inflammatory disease (Turner et al., 2014). Indeed, new research approaches aim to elucidate how neutrophil's main signaling molecules (i.e., cytokines and chemokines) contribute to pathological processes (Poeta et al., 2019).

Being myeloid-derived cells, neutrophils are produced in the bone marrow. Given their high numbers and relevance in acute inflammation, up to ~ 55-60% of the bone marrow is dedicated exclusively to the production of neutrophils. Under normal conditions, up to 2×10^{11} cells are produced per day (Niels Borregaard, 2010b); however, this can increase to 10^{12} cells per day during inflammation or infection (Liew & Kubes, 2019). Neutrophils can also be found in organs such as the spleen, liver, or lung and have been proposed as potential reservoirs of mature neutrophils. These reservoirs allow the neutrophils to deploy rapidly to nearby sites of inflammation or infection (Liew & Kubes, 2019).

Neutrophils are considered short-lived cells with a lifespan of 5-9 h (Liew & Kubes,

2019). However, their lifespan increases up to 5.4 days during inflammation (Pillay et al., 2010). The increase of both cell number and lifespan of neutrophils during infection ensures the continuous presence of prepared neutrophils at the site of infection, contributing to an adequate immune response in the presence of pathogens.

Neutrophils are considered the most abundant type of leukocytes in the blood, constituting 40 to 80% of humans' total circulating white blood cells (Ley et al., 2018). In circulation, mature neutrophils exhibit a segmented nucleus, are approximately 7 to 10 μm in diameter and have a cytoplasm enriched with granules and vesicles, filled with proinflammatory proteins (Niels Borregaard, 2010b). Neutrophil granules are classified into four types:

Primary granules, also known as azurophilic granules: contain myeloperoxidase (MPO), neutral proteases, cathepsin G, neutrophil elastase (NE), and proteinase 3. These granules are responsible for releasing proteins and peptides directed towards the destruction and digestion of pathogens and are the first to occur during the development of neutrophils (N. Borregaard et al., 1990; Sheshachalam et al., 2014).

Secondary granules: specific granules contain proteins such as b558 and lactoferrin associated with iron and copper sequestration (N. Borregaard et al., 1990; Sheshachalam et al., 2014).

Tertiary or gelatinase granules: contain matrix metalloproteinase 9 "MMP9", essential to degrade the extracellular matrix and activation of IL-1 β , among other functions.

Finally, the fourth type of granules, known as secretory granules, contains serum

albumin and cytokines (N. Borregaard et al., 1990; Sheshachalam et al., 2014).

The proteins inside the granules are highly cytotoxic and are released to the surrounding environment as a defense mechanism against pathogens (Kobayashi & DeLeo, 2009). Besides degranulation, neutrophils effector functions include phagocytosis, the production of reactive oxygen species (ROS), chemokines, and cytokines to recruit other immune cells that maximize the host's immune response (Scapini & Cassatella, 2014).

Despite neutrophils effector functions being highly efficient in the adequate elimination of pathogens with minimal adverse effects for the host, these effector mechanisms may be insufficient to control massive bacterial infections or the attack of other large pathogenic cells (Liew & Kubes, 2019). An alternative mechanism performed by neutrophils was first described by Brinkmann et al. in 2004, which involves releasing DNA fibril structures to the extracellular space, which act as pathogen capture networks. These networks are composed of DNA decorated with azurophilic granule proteins that increase the ability of neutrophils to capture and kill pathogens (Brinkmann et al., 2004) and are known as Neutrophil Extracellular Traps (NETs). The production of NETs is a consequence of a regulated form of cell death called NETosis (Remijsen et al., 2011). The term NETosis was first accepted in 2012 as a type of granulocyte death, different from apoptosis and necrosis, demonstrated by the insensitivity of NETosis to the inhibition of caspase and necrostatin, considered essential mediators of apoptosis and necrosis, respectively (Mesa & Vasquez, 2013). The antimicrobial role associated with NETs has been widely studied, demonstrating its effectiveness in the elimination of a broad group of pathogens such as:

(i) Bacteria, including *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, and *Propionibacterium* (Brinkmann et al., 2004).

(ii) Virus, inhibits viral replication by blocking the PKC pathway or by histones promoting viral aggregation and neutralization, leading to a significant decrease in viral replication (Hoeksema et al., 2015).

(iii) Fungi, including *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Cryptococcus spp.* The ability of NETs to trap and kill large pathogens *in vivo* is critical to fungal defense (McCormick et al., 2010), and parasitic diseases, including *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii*, where NETs prevent the spread of the parasites (Guimarães-Costa et al., 2012).

The broad spectrum of microbes that induce NETosis highlights the important role that neutrophils play as part of the first line of defense within the innate immune response. However, since much of the effective elimination of pathogens by NETs is primarily due to the cytotoxicity of components that include: histones, cathepsin G, NE, MPO, lactoferrin, antimicrobial peptide LL37, pentraxin 3, gelatinase, proteinase 3, produced in cytoplasmic granules of neutrophils (N. Borregaard et al., 1990; Sheshachalam et al., 2014), and because these molecules are highly cytotoxic, deregulated NETosis processes would evoke in the undesirable release of these molecules into the surrounding tissue, causing unwanted damage to the host.

NETosis regulation and dynamic stimulation conditions.

The mechanisms that induce NETosis are highly regulated by large and complex cell signaling pathways (Liew & Kubes, 2019). Likewise, the release of neutrophils from the blood vessels to the site of inflammation is conditioned by an activation process. Neutrophil activation can be a two-step process. Initially, a priming step is necessary before the activation process. Maximum neutrophil degranulation and NADPH oxidase activation have been reported to occur only in cells that have been primed before activation (Guthrie et al., 1984). The priming step includes an initial exposure to mediators such as cytokine, which can be divided into early-phase cytokines (such as TNF- α , histamine,

IL-1 β) (Kolaczowska & Kubes, 2013), and late-phase chemoattractants, pathogen-associated molecular patterns (PAMP), such as endotoxin or growth factors (Summers et al., 2010). Neutrophil activation by chemoattractant includes chemokines such as CXCL8 (also known as IL-8) in humans and its analogs in mice CXCL1 (KC), CXCL2, CXCL5 (LIX), or macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) (Liew & Kubes, 2019). These chemokines send signals through CXCR2 to activate the neutrophils that subsequently migrate through chemotactic processes that promote their adhesion to the endothelium via integrins. Finally, neutrophils extravasate towards the inflamed tissue, where they perform their effector functions (e.g., apoptosis, necrosis, and NETosis) to control pathogen invasion (Pruenster et al., 2009).

However, although the signaling pathways leading to NETosis have been identified, they are considered complex and not yet fully understood (Mutua & Gershwin, 2020). Likewise, the factors that trigger the production of NETs are considered multifactorial since NETosis can be activated by many compounds or stimuli (Zawrotniak & Rapala-Kozik, 2013). Some molecules reported as NET inducers are: proteins exposed on the surface of pathogenic cells, such as Gram-positive and Gram-negative bacteria, or some fungi, even numerous chemical compounds, such as phorbol ester (PMA), hydrogen peroxide, nitric oxide, ionomycin, calcium ions, glucans, mannans and lipopolysaccharides among others (Zawrotniak & Rapala-Kozik, 2013).

Most of the stimuli inducing NETosis are recognized by different surface receptors of neutrophils, known as pattern recognition receptors (PRR), such as Toll-like receptors, including TLR2, TLR4, TLR7, and TLR8, complement system receptors (CR), Fc receptors, C-type lectin receptors (CLR), which activating different molecular mechanisms to forming NETs (Zawrotniak et al., 2017). Therefore, it is known that signaling pathways are not static events, but complex patterns resulting from a broad cross-dialogue between various biochemical and molecular events at different levels, as well as feedback loops, which make them highly dynamic systems. Deciphering how neutrophils signals from the extracellular

environment (e.g., integrative or differential) to carry out specific tasks is a complex task, historically limited by the capacity of technical tools (Purvis & Lahav, 2013).

The two main pathways that induce NETs formation, and the most studied, are:

a) NADPH oxidase (Nox)-dependent NETosis. This pathway can be activated by molecules such as PMA, lipopolysaccharides (LPS), or bacterial components; this pathway is controlled upstream by different kinases, such as protein kinase C (PKC) or mitogen-activated kinases (MAPK). In the Nox-dependent pathway, the enzymes MPO and NE are translocated from the azurophilic granules to the nucleus, inducing histone degradation and promoting chromatin decondensation (Ravindran et al., 2019).

b) Nox-independent NETosis. It occurs due to an increase in the intracellular calcium concentration [Ca²⁺]. This pathway is induced through stimuli such as calcium ionophores (a23187, ionomycin), the increase in [Ca²⁺] allows the formation of calcium and peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4) complexes, which are then translocated to the nucleus. PAD4 produces histone citrullination inside the nucleus, leading to chromatin relaxation (Ravindran et al., 2019).

Correlation of NETs and diseases

NETosis is widely regulated through complex signaling pathways and activation mechanisms to prevent the release of cytotoxic compounds in unwanted situations, i.e., if the host is not under infection or inflammation conditions. However, the nonspecific effects of the granular proteins released during NETosis can lead to an uncontrolled inflammatory response that causes tissue injury in the host (Mutua & Gershwin, 2020). Therefore, the process can be both beneficial and counterproductive, acting also against host cells. So, although NETs can protect the host against microbes, excessive NETosis can be harmful. Recent discoveries *in vitro* and animal models demonstrated the crucial role of NETs in the pathogenesis of some diseases such as:

Autoimmunity

a) Psoriasis is a chronic disease characterized by demarcated erythematous plaques on the skin. Neutrophils are recruited to psoriasis lesions, where they clump together, forming spongiform pustules and Munro micro-abscesses and producing proinflammatory cytokines such as IL-6, IL-8, and IL-17. These compounds have been shown to promote NETosis (Pinegin et al., 2015).

b) Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by high levels of IFN- α with the activation of self-reactive B cells. The possible production of autoantibodies against nucleic acids released by neutrophils undergoing NETosis has been reported as a contributor to the pathogenicity of the disease. (Pan et al., 2020).

c) Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease characterized by persistent synovial inflammation that leads to cartilage and bone damage in the joints. Circulating neutrophils from RA patients have been reported to be more easily stimulated to NETosis than those from healthy subjects. (Chen et al., 2018).

d) Type 1 diabetes mellitus (DM1) is an autoimmune disease characterized by the destruction of pancreatic β cells leading to hyperglycemia. An increased risk has been reported in the development of neutropenia in patients with DM1, and neutrophils can be found in the infiltrates of the pancreatic islets, inducing the formation of NETs under conditions of elevated TNF- α (Berezin, 2019a).

e) Small blood vessel vasculitis (SVV) is a systemic disease in which patients have inflammation of the blood vessels, leading to organ damage. The etiology of the disease is unknown; however, it has been shown that SVV patients have antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), which leads to endothelial damage (Mutua & Gershwin, 2020).

Chronic inflammatory diseases

a) Gout is an auto-inflammatory disease in which inflammatory responses are enhanced by the deposition of monosodium urate crystals (MSU) in the joints, attracting leukocytes and inducing NETs that promote inflammation (Mutua & Gershwin, 2020).

b) Inflammatory bowel diseases (IBD) are characterized by uncontrolled chronic inflammation that affects the gastrointestinal tract. Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) represent the two main forms of IBD (Mutua & Gershwin, 2020).

Metabolic diseases

a) Type 2 diabetes is a chronic metabolic disease characterized by the accumulation of glucose in the bloodstream (hyperglycemia) and insulin-insensitive cells. Hyperglycemia has been reported to predispose neutrophils to release NETs, and consequently, NE, MPO, and cfDNA are found in high concentrations (Berezin, 2019b).

b) Obesity is a metabolic condition characterized by the accumulation and excess deposit of adipose tissue. An association between obesity and chronic inflammation has been shown with increased neutrophil activity, increased superoxide radicals, and NET formation (Mutua & Gershwin, 2020).

NETs as biomarkers

Over the last year, the particular interest in studying and quantifying the blood products directly involved in the formation of NETs has grown, such as citrullinated histone H3 (citH3); circulating free DNA (cfDNA); myeloperoxidase (MPO), and neutrophil elastase (NE) (Thålin et al., 2019), due to its potential to be used as biomarkers associated with autoimmune, autoinflammatory and metabolic diseases (Fousert et al., 2020). Therefore, authors such as Thålin et al., (2019) have associated a high plasma content of citH3 (involved in the NETosis process) as a significant indicator of short-term mortality in some cancer patients.

Furthermore, recently the cytoplasmic granular proteins directly involved in the formation of NETs have demonstrated outstanding potential as biomarkers of SARS-CoV-2. High serum levels of cell-free DNA complexes of DNA-MPO and citH3 have been detected in COVID-19, which correlate with the severity of the disease (Huang et al., 2020; Liu et al., 2020; Zou et al., 2020). High levels of interalveolar neutrophils have been reported in post-mortem lung samples from patients with COVID-19 (Blanco-Melo et al., 2020), documenting their presence in up to 81.5% of the total cases studied (Carsana et al., 2020). Other authors suggest that SARS-CoV-2 can directly induce the formation of NETs in healthy neutrophils by a currently unknown mechanism (Monastero & Pentylala, 2017); however, the presence of NETs and neutrophils are involved in the exacerbation of respiratory failure and microvascular injury in COVID-19. The above has led authors, such as Barnes et al. (2020), to propose that neutrophils and NETs could play a prominent role as biomarkers in COVID-19.

Dynamics of nuclear decondensation of neutrophils during NETosis.

In addition to the complex signaling pathways activated during the formation of NETs, complex intracellular changes occur concomitantly (some mechanisms are still unknown), mainly the nuclear decondensation of neutrophils. The release of DNA through the Nox dependent pathway takes about 1 to 4 hours and is quite complex (Papayannopoulos et al., 2010). The reactive oxygen species formed are thought to be involved in the stability of the granules and the nuclear envelope. While proteins stored in neutrophil granules (NE and MPO) are translocated to the nucleus, contributing to histone degradation. They also cooperate with the enzyme PAD4, which catalyzes citrullination of histones (H3 and H4) (Papayannopoulos et al., 2010). The modification of histones leads to the relaxation and decondensation of chromatin, modifying the structure of the nucleus and finally causing the disappearance of the nuclear membrane. Shortly thereafter, DNA moves into the cytoplasm and mixes with granular proteins, and then this mixture is expelled out of the cell.

Despite the knowledge generated in the dynamics of nuclear decondensation during NETosis, over the years, it has been reported that only a fraction of neutrophils can produce NETs, indicating the heterogeneity of the neutrophil population (Fousert et al., 2020). Whether this heterogeneity reflects different activation states (against variable stimuli) or cell subpopulations is unclear. For example, a distinct subpopulation of neutrophils is known to be more predisposed to form NETs in systemic lupus erythematosus (SLE) patients (Fousert et al., 2020). In addition, individuals with chronic granulomatous disease (CGD) have been reported to possess a subpopulation of neutrophils that have limited NADPH-oxidase activity (Moussavi-Harami et al., 2016). Thus, neutrophils do not behave like a homogeneous population. Additionally, the homogeneity of observed phenotypes in these subpopulations is not clear (Rosales, 2018), i.e., several neutrophil phenotypes have been described that exhibit specialized functions even though they theoretically belong to a homogeneous cell population (Hellebrekers et al., 2018). So, It is not clear whether these cells belong to separate parallel lineages originating from the bone marrow (Hellebrekers et al., 2018). In this way, several subpopulations of neutrophils have been suggested in various conditions of health and disease (Sollberger et al., 2018). Therefore, it is essential to characterize NETs in a dynamic way (dynamic-temporal stimulation); this will allow us to understand the relationships between the cellular microenvironment and the NETotic subpopulation response and their specific participation during the development of autoimmunity and various diseases.

Monitoring the intracellular processes during NETosis can be of great relevance in identifying and quantifying NETotic subpopulations of neutrophils. Since DNA is the backbone of NETs, this process is commonly studied using DNA fluorescent dyes, such as Hoechst 33342 and Sytox green. Although Sytox green has been widely employed, it eventually leads to unspecified cell death studies. Sytox green is a DNA-binding molecule impervious to cells, allowing the quantification of extracellular DNA. In NETosis, Sytox green binds to neutrophil DNA only when the process is at the breaking point of the cell membrane. Consequently,

fluorescence is recorded (Sytox green), and it is generally inferred that neutrophils developed the NETosis process (Carmona-Rivera & Kaplan, 2016; Khan et al., 2018). The combined use of specific fluorescent markers has demonstrated the ability to assess nuclear decondensation dynamics in a simple and reproducible way (Carmona-Rivera & Kaplan, 2016; Gupta et al., 2018; Khan et al., 2018; Magán-Fernández et al., 2020). Likewise, tools such as high-speed multispectral image flow cytometry have been used to detect and quantify the stages of NETosis that precede cell lysis (Zhao et al., 2015). However, this tool is limited to only taking images of cells actively suffering NETosis, overlooking those cells that have already died or have a delayed response, generating biases in quantifying NETotic populations. On the other hand, live-cell microscopy, such as intravital multiphoton microscopy, spinning-disk confocal intravital, fluorescent labeling, two-photon microscopy, or the IncuCyte ZOOM system, among others (Alasmari, 2020; Gupta et al., 2018), can provide a comprehensive analysis of the different types of cell death (apoptosis, NETosis, and necrosis) that neutrophils can suffer under various stimuli (Gupta et al., 2018). However, live-cell microscopy and in general methods for quantification of NETs are laborious, lengthy, and require labor and specialized equipment to develop.

Neutrophils and cytokines

Finally, neutrophils are also recognized as essential sources of secreted cytokines, either constitutively or by stimulus (Tecchio et al., 2014). Cytokines are produced as an innate immune response to pathogens and contribute to maintaining the inflammatory response (Tecchio et al., 2014). Cytokines expressed by neutrophils include proinflammatory cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, MIF), anti-inflammatory cytokines (IL-1ra, TGF β 1, TGF β 2), chemokines (CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8), immunoregulatory cytokines, members of the tumor necrosis factor superfamily (TNF- α , TRAIL, FasL) and angiogenic and fibrogenic factors (Tecchio et al., 2014). Among its primary functions is the regulation of inflammation, so cytokines are essential to play a vital role in regulating the immune response in health. Neutrophil-derived cytokines can be measured in cell-free

supernatants or cell lysates using several methods, including enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), radioimmunoassay, immunoprecipitation after metabolic marking, immunohistochemistry, intracellular staining coupled with flow cytometry, commercial multiplex matrices such as FirePlex, confocal microscopy, bead-based assays, among others (Tecchio et al., 2014; Zhou et al., 2010).

Conclusions

Due to the complexity of performing dynamic studies, conventional NETosis assays (e.g., use of specific fluorescent markers and multispectral image flow cytometry) are end-point assays and measure a population's response to an inductor at different concentrations. It quantifies either the released DNA or the number of cells that produce NETs. End-point bioassays result in the loss of valuable information on the response at the individual level and the temporal evolution of the process.

In addition, despite the importance of neutrophil-derived cytokines and chemokines and their involvement in exacerbated cytotoxicity or recruitment of other immune cells, until a year ago, there were no concurrent studies that concomitantly evaluated the NETosis process and the cytokine/chemokine secretion of neutrophils (Tatsiy et al., 2020). On the other hand, although basic aspects about the induction, process, and culmination of the signaling pathways of the NETs are already known, the temporal evolution of the NETosis and the response at the individual cell level under dynamic stimulation must still be clarified in greater detail. For example, it is unknown whether neutrophils actively suffering NETosis concomitantly produce cytokines that exacerbate the pro-inflammatory response or whether the generation of these cytokines is mediated through paracrine or juxtacrine communication. In addition, it is unknown whether differences in the dynamics in the input signals (i.e., stimuli) of a neutrophil affect the output signal (i.e., response) and how neutrophils process the different signals received from the outside environment.

References

- Alasmari, S. Z. (2020). In Vivo Imaging of Neutrophil Extracellular Traps (NETs): Visualization Methods and Outcomes. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4192745>
- Barnes, B. J., Adrover, J. M., Baxter-Stoltzfus, A., Borczuk, A., Cools-Lartigue, J., Crawford, J. M., Daßler-Plenker, J., Guerci, P., Huynh, C., Knight, J. S., Loda, M., Looney, M. R., McAllister, F., Rayes, R., Renaud, S., Rousseau, S., Salvatore, S., Schwartz, R. E., Spicer, J. D., ... Egeblad, M. (2020). Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *Journal of Experimental Medicine*, 217(6), 1–7. <https://doi.org/10.1084/jem.20200652>
- Berezin, A. (2019a). Neutrophil extracellular traps: The core player in vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 13(5), 3017–3023. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.07.010>
- Berezin, A. (2019b). Neutrophil extracellular traps: The core player in vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 13(5), 3017–3023. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.07.010>
- Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W. C., Uhl, S., Hoagland, D., Møller, R., Jordan, T. X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T. T., Schwartz, R. E., Lim, J. K., Albrecht, R. A., & tenOever, B. R. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, 181(5), 1036–1045.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
- Borregaard, N., Christensen, L., Bjerrum, O. W., Birgens, H. S., & Clemmensen, I. (1990). Identification of a highly mobilizable subset of human neutrophil intracellular vesicles that contains tetranectin and latent alkaline phosphatase. *Journal of Clinical Investigation*, 85(2), 408–416. <https://doi.org/10.1172/JCI114453>
- Borregaard, Niels. (2010a). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, 33(5), 657–670. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>
- Borregaard, Niels. (2010b). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, 33(5), 657–670. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303(5663), 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- Carmona-Rivera, C., & Kaplan, M. J. (2016). Induction and quantification of NETosis. *Current Protocols in Immunology*, 2016(November), 4.41.1–4.41.14. <https://doi.org/10.1002/cpim.16>
- Carsana, L., Sonzogni, A., Nasr, A., Rossi, R. S., Pellegrinelli, A., Zerbi, P., Rech, R., Colombo, R., Antinori, S., Corbellino, M., Galli, M., Catena, E., Tosoni, A., Gianatti, A., & Nebuloni, M. (2020). Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(10), 1135–1140. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30434-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30434-5)
- Chen, W., Wang, Q., Ke, Y., & Lin, J. (2018). Neutrophil function in an inflammatory milieu of rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology Research*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8549329>
- Foussert, E., Toes, R., & Desai, J. (2020). Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Take the Central Stage in Driving Autoimmune Responses. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040915>
- Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T. C., Wardini, A. B., Pinto-Da-Silva, L. H., & Saraiva, E. M. (2012). ETosis: A microbicidal mechanism beyond cell death. *Journal of Parasitology Research*, 2012(Table1). <https://doi.org/10.1155/2012/929743>
- Gupta, S., Chan, D. W., Zaal, K. J., & Kaplan, M. J. (2018). A High-Throughput Real-Time Imaging Technique To Quantify

- NETosis and Distinguish Mechanisms of Cell Death in Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*, 200(2), 869–879. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700905>
- Guthrie, B. Y. L. A., Mcphail, L. C., Henson, P. M., Johnston, R. B., & Al, G. E. T. (1984). Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. *160(december)*, 1656–1671.
- Hellebrekers, P., Vrisekoop, N., & Koenderman, L. (2018). Neutrophil phenotypes in health and disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 48(April). <https://doi.org/10.1111/eci.12943>
- Hoeksema, M., Tripathi, S., White, M., Qi, L., Taubenberger, J., Van Eijk, M., Haagsman, H., & Hartshorn, K. L. (2015). Arginine-rich histones have strong antiviral activity for influenza A viruses. *Innate Immunity*, 21(7), 736–745. <https://doi.org/10.1177/1753425915593794>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Khan, M. A., Philip, L. M., Cheung, G., Vadakepeedika, S., Grasemann, H., Swezey, N., & Palaniyar, N. (2018). Regulating NETosis: Increasing pH promotes NADPH oxidase-dependent NETosis. *Frontiers in Medicine*, 5(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00019>
- Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2009). Role of neutrophils in innate immunity: A systems biology-level approach. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 1(3), 309–333. <https://doi.org/10.1002/wsbm.32>
- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), 159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- Ley, K., Hoffman, H. M., Kubes, P., Cassatella, M. A., Zychlinsky, A., Hedrick, C. C., & Catz, S. D. (2018). Neutrophils: New insights and open questions. *Science Immunology*, 3(30). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat4579>
- Liew, P. X., & Kubes, P. (2019). The Neutrophil's role during health and disease. *Physiological Reviews*, 99(2), 1223–1248. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2018>
- Liu, J., Li, S., Liu, J., Liang, B., Wang, X., Wang, H., Li, W., Tong, Q., Yi, J., Zhao, L., Xiong, L., Guo, C., Tian, J., Luo, J., Yao, J., Pang, R., Shen, H., Peng, C., Liu, T., ... Zheng, X. (2020). Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*, 55(December 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102763>
- Magán-Fernández, A., Rasheed Al-Bakri, S. M., O'Valle, F., Benavides-Reyes, C., Abadía-Molina, F., & Mesa, F. (2020). Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis. *Cells*, 9(6), 1–11. <https://doi.org/10.3390/cells9061494>
- McCormick, A., Heesemann, L., Wagener, J., Marcos, V., Hartl, D., Loeffler, J., Heesemann, J., & Ebel, F. (2010). NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection*, 12(12–13), 928–936. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.06.009>
- Mesa, M. A., & Vasquez, G. (2013). NETosis. *Autoimmune Diseases*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/651497>
- Monastero, R. N., & Pentylala, S. (2017). Cytokines as Biomarkers and Their Respective Clinical Cutoff Levels. *International Journal of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4309485>
- Moussavi-Harami, S. F., Mladinich, K. M., Sackmann, E. K., Shelef, M. A., Starnes, T. W., Guckenberger, D. J., Huttenlocher, A., & Beebe, D. J. (2016). Microfluidic device for simultaneous analysis of neutrophil extracellular traps and production of reactive oxygen species. *Integrative*

Artículos

- Biology (United Kingdom), 8(2), 243–252.
<https://doi.org/10.1039/c5ib00225g>
- Mutua, V., & Gershwin, L. J. (2020). A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*.
<https://doi.org/10.1007/s12016-020-08804-7>
- Pan, L., Lu, M. P., Wang, J. H., Xu, M., & Yang, S. R. (2020). Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *World Journal of Pediatrics*, 16(1), 19–30.
<https://doi.org/10.1007/s12519-019-00229-3>
- Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 191(3), 677–691.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>
- Pillay, J., Den Braber, I., Vriskoop, N., Kwast, L. M., De Boer, R. J., Borghans, J. A. M., Tesselaar, K., & Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 116(4), 625–627. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-259028>
- Pinegin, B., Vorobjeva, N., & Pinegin, V. (2015). Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 14(7), 633–640.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.03.002>
- Poeta, V. M., Massara, M., Capucetti, A., & Bonocchi, R. (2019). Chemokines and chemokine receptors: New targets for cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00379>
- Pruenster, M., Mudde, L., Bombosi, P., Dimitrova, S., Zsak, M., Middleton, J., Richmond, A., Graham, G. J., Segerer, S., Nibbs, R. J. B., & Rot, A. (2009). The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nature Immunology*, 10(1), 101–108.
<https://doi.org/10.1038/ni.1675>
- Purvis, J. E., & Lahav, G. (2013). Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics. *Cell*, 152(5), 945–956.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.005>
- Ravindran, M., Khan, M. A., & Palaniyar, N. (2019). Neutrophil extracellular trap formation: Physiology, pathology, and pharmacology. *Biomolecules*, 9(8), 1–15.
<https://doi.org/10.3390/biom9080365>
- Remijnsen, Q., Kuijpers, T. W., Wirawan, E., Lippens, S., Vandenabeele, P., & Vanden Berghe, T. (2011). Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death and Differentiation*, 18(4), 581–588.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2011.1>
- Rosales, C. (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology*, 9(FEB), 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>
- Scapini, P., & Cassatella, M. A. (2014). Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*, 124(5), 710–719.
<https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-453217>
- Sheshachalam, A., Srivastava, N., Mitchell, T., Lacy, P., & Eitzen, G. (2014). Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 5(SEP), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00448>
- Sollberger, G., Tilley, D. O., & Zychlinsky, A. (2018). Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Developmental Cell*, 44(5), 542–553.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.019>
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., & Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*, 31(8), 318–324.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2010.05.006>
- Tatsiy, O., Mayer, T. Z., de Carvalho Oliveira, V., Sylvain-Prévost, S., Isabel, M., Dubois, C. M., & McDonald, P. P. (2020). Cytokine Production and NET Formation by Monosodium Urate- Activated Human Neutrophils Involves Early and Late

- Events, and Requires Upstream TAK1 and Syk. *Frontiers in Immunology*, 10(January),1–12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02996>
- Tecchio, C., Micheletti, A., & Cassatella, M. A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT),1–8.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00508>
- Thålin, C., Hisada, Y., Lundström, S., Mackman, N., & Wallén, H. (2019). Neutrophil Extracellular Traps: Villains and Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(9), 1724–1738.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312463>
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(11),2563–2582.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Zawrotniak, M., Kozik, A., & Rapala-Kozik, M. (2017). Neutrophil Extracellular Traps in Infectious Human Diseases. Role of Neutrophils in Disease Pathogenesis, 3–26.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.68443>
- Zawrotniak, M., & Rapala-Kozik, M. (2013). Neutrophil extracellular traps (NETs) - Formation and implications. *Acta Biochimica Polonica*, 60(3), 277–284.
https://doi.org/10.18388/abp.2013_1983
- Zhao, W., Fogg, D. K., & Kaplan, M. J. (2015). A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. *Journal of Immunological Methods*, 423, 104–110.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.027>
- Zhou, X., Fragala, M. S., McElhane, J. E., & Kuchel, G. A. (2010). Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 13(5),541–547.
<https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32833cf3bc>
- Zou, X., Chen, K., Zou, J., Han, P., Hao, J., & Han, Z. (2020). Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Frontiers of Medicine*, 14(2), 185–192.
<https://doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0>

Premio Alfredo Sánchez Marroquín 2021 **a las mejores tesis en Biotecnología y Bioingeniería**

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C. (SMBB), en conjunto con y *Yakult, S.A. de C.V.* han establecido este premio desde 1999 para reconocer a estudiantes sobresalientes que hayan realizado la mejor tesis en las áreas de Biotecnología y Bioingeniería. Las tesis debieron realizarse y debidamente registrado en instituciones de Educación Superior o de investigación nacionales en cada una de las categorías para la obtención del título de Licenciatura o de los grados de Maestro y de Doctor en Biotecnología y Bioingeniería. En esta ocasión participaron todos los miembros activos de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A. C. (SMBB) cuyas tesis fueron concluidas y cuyo examen de grado del nivel correspondiente se realizó entre el 1 de marzo de 2019 y el 28 de febrero de 2021. Los ganadores se comprometieron a la redacción de un artículo *in extenso* con los resultados obtenidos en su tesis. Las tesis ganadoras son:

Licenciatura

Andamios electrohilados de gelatina con potencial aplicación en ingeniería tisular dérmica

José Luis Quijano-Mendoza, Fernando Hernández-Sánchez, José Manuel Cervantes-Uc, Nayeli Rodríguez-Fuentes*

Centro de Investigación Científica de Yucatán, Unidad de Materiales.

Maestría

Cuencas y sistemas arrecifales del Golfo de México en el estado de Veracruz: Contaminación por hidrocarburos y biorremediación

Leticia Narciso-Ortiz, Karen A. Vargas-García, Ana L. Vázquez-Larios, Tannia A. Quiñones-Muñoz, Ricardo Hernández-Martínez, Manuel A. Lizardi-Jiménez *

Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca.

Doctorado

The classical secretion pathway during recombinant protein production in CHO cells: an omics perspective

Saumel Pérez-Rodríguez, Mauricio A. Trujillo-Roldán, Norma A. Valdez-Cruz*

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Andamios electrohilados de gelatina con potencial aplicación en ingeniería tisular dérmica

José Luis Quijano-Mendoza, Fernando Hernández-Sánchez, José Manuel Cervantes-Uc, Nayeli Rodríguez-Fuentes*

Centro de Investigación Científica de Yucatán, Unidad de Materiales, Mérida, Yucatán, C.P. 97205.

nayeli.rodriguez@cicy.mx

Resumen

La piel es el órgano sensorial más grande del cuerpo y sirve como barrera contra agentes patógenos y diversos daños fisicoquímicos provocados por el medio ambiente. Dada su importancia, se han desarrollado materiales capaces de regenerarlo estructural y funcionalmente. No obstante, los sustitutos dérmicos disponibles carecen de una adecuada biocompatibilidad y/o presentan problemas éticos y morales debido a las materias primas que los componen. En la actualidad, la ingeniería tisular representa una alternativa prometedora en la reconstrucción de órganos o tejidos. Para lograr este objetivo, es necesario el uso de unas estructuras denominadas andamios, las cuales imitan la matriz extracelular y, por lo tanto, inducen la proliferación celular, además de la reparación-regeneración del sitio lesionado. Un andamio debe ser biodegradable y biocompatible para que, una vez cumplida su función, pueda ser eliminado del sitio de acción. Debido a esto, es recomendable que dichas estructuras se elaboren a base de biopolímeros naturales, como la gelatina, ya que se encuentran presentes en la matriz extracelular. Actualmente, existen diversas técnicas para elaborar andamios de gelatina, sin embargo, los andamios obtenidos en muchas de ellas, no son aptos para aplicaciones dermatológicas o bien, la fabricación de éstos requiere el manejo de equipos costosos o poco disponibles. Afortunadamente, el electrohilado es una técnica sencilla y efectiva, que permite producir estructuras altamente porosas, idóneas para la regeneración dérmica.

Palabras clave: Andamios, Electrohilado, Gelatina, Ingeniería de tejidos, Piel.

Abstract

Skin is the body's largest sensory organ and serves as a barrier against pathogens and various physico-chemical damages caused by the environment. Given its importance, materials capable of regenerating it structurally and functionally have been developed. However, available dermal substitutes lack adequate biocompatibility and/or present ethical and moral problems due to their source of origin. Nowadays, tissue engineering represents a promising alternative in organ or tissue reconstruction. To achieve this goal, it is necessary to use structures called scaffolds, which mimic the extracellular matrix and, therefore, induce cell proliferation. A scaffold must be biodegradable and biocompatible so that, once it has fulfilled its function, it can be removed from the site of action. Because of this, it is recommended that such structures be made from natural biopolymers, such as gelatin, as they are present in the extracellular matrix. Currently, there are several techniques to develop gelatin scaffolds, however, scaffolds obtained in many of them, are not suitable for dermatological applications or, the manufacture of these requires the handling of expensive or little available equipment. Fortunately, electrospinning is a simple and effective technique, which allows producing highly porous structures, suitable for dermal regeneration.

Key words: Scaffolds, Electrospinning, Gelatin, Tissue engineering, Skin.

Introducción

La ingeniería de tejidos o ingeniería tisular es una disciplina que se enfoca en diseñar estructuras biológicas funcionales para sustituir, reparar o regenerar tejidos y órganos dañados, tales como cartílago, hueso, válvulas cardíacas, nervios, músculo, piel, entre otros (Rahmati *et al.*, 2021).

Los cimientos de la ingeniería tisular recaen en tres elementos básicos, también conocidos como la triada de la ingeniería de tejidos: las células, las moléculas bioactivas y los andamios (Hiles & Hodde, 2006).

Los andamios sirven como modelos tridimensionales que proporcionan el soporte necesario para que las células se adhieran, proliferen y mantengan sus funciones específicas por lo que, la composición fisicoquímica de los primeros resulta esencial en la viabilidad celular (Jammalamadaka & Tappa, 2018). En general, los materiales que se utilizan en la elaboración de los andamios, son los polímeros aceptados por la Food and Drug Administration (FDA). Estos polímeros destacan por su versatilidad estructural, así como por su biocompatibilidad y resorción. Estos materiales, son el principal tipo de biomaterial empleado en la ingeniería de tejidos y pueden ser obtenidos de diversas fuentes, ya sea de origen sintético o natural (Beltrán & González, 2016). Los primeros son los que se obtienen por una síntesis química, por ejemplo: la policaprolactona, el ácido poliláctico, etc. Los naturales son los que se encuentran en la naturaleza, y frecuentemente son componentes sintetizados por las células, por ejemplo: elastina, colágena, quitosano, etc.

En la investigación realizada por Ma *et al.*, (2005) se comprobó que es posible utilizar polímeros como andamios para cultivo celular, ya que éstos pueden simular una matriz extracelular. Dentro de dichos materiales, cuya principal aplicación ha sido orientada hacia la ingeniería de tejidos dérmicos, se encuentra la gelatina entrecruzada, la cual destaca por sus propiedades fisicoquímicas (Kang *et al.*, 1999). Posteriormente, Liu & Ma (2009) demostraron que los andamios tridimensionales de gelatina entrecruzada pueden propiciar las condiciones óptimas para la adhesión, proliferación y diferenciación

celular, ya que imitan tanto la arquitectura física como la composición química de la colágena natural. De igual manera, Zhang *et al.*, (2016) encontraron que la gelatina entrecruzada junto con el quitosano puede generar andamios con potenciales aplicaciones para la regeneración de riñones.

En otro estudio, Choi *et al.*, (2018), desarrollaron andamios de gelatina entrecruzada mediante impresión 3D acoplada a un sistema de enfriamiento, los cuales pueden promover el crecimiento de fibroblastos. No obstante, estas matrices carecen de propiedades mecánicas suficientemente estables para su desempeño en tejidos dérmicos. Recientemente, Etxabide *et al.*, (2019) demostraron que los andamios elaborados de esta clase de gelatina pueden servir como vehículo para transportar fármacos como la dexametasona.

En México, se han realizado diversos estudios en torno a las aplicaciones de la gelatina para la regeneración tisular. Por ejemplo, Arellano (2014) encontró que los andamios elaborados con gelatina combinada con ácido hialurónico, son candidatos potenciales para cultivar células mesenquimales. En la Península de Yucatán, también se han llevado a cabo investigaciones al respecto. En una de ellas, Martín (2015) elaboró andamios de gelatina porcina mezclada con policaprolactona (PCL) con posibles aplicaciones cardíacas.

Una de las técnicas de elaboración de andamios fibrosos mediante gelatina entrecruzada que ha dado buenos resultados es el electrohilado (Zhang *et al.*, 2006). El electrohilado (electrospinning, en inglés) es un método de fabricación que ha demostrado ser eficaz para producir andamios con dimensiones microscópicas controladas. Esto es importante para el crecimiento celular, ya que las células se aglomeran alrededor de poros con diámetros más pequeños que el de ellas mismas (Ma *et al.*, 2005).

Diversos estudios han reportado que el electrohilado es potencialmente aplicable en la reparación de tejidos dérmicos. Por ejemplo, Dias *et al.*, (2017) demostraron que los andamios a base de gelatina electrohilada, sometidos a un tratamiento entrecruzante, poseen características adecuadas para aplicaciones en la ingeniería tisular dérmica.

Artículos

Resultados similares se han obtenido con andamios electrohilados utilizando mezclas de gelatina con queratina (Yao *et al.*, 2017), quitosano (Pezeshki *et al.*, 2018), poliuretano (Sheikholeslam *et al.*, 2019) o *Aloe Vera* (Baghersad *et al.*, 2018).

Bajo este panorama, el presente artículo tiene como objetivo revisar la literatura pertinente a las características de los andamios de gelatina electrohilada y su posible aplicación en la ingeniería tisular dérmica.

¿Qué es la ingeniería de tejidos?

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias biológicas hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular (Holmes *et al.*, 2016). El objetivo principal de esta disciplina es generar construcciones *in vitro* de tejido vivo que sean morfológica y funcionalmente similares al tejido nativo (Abbott & Kaplan, 2015).

En la Figura 1 se muestran los pilares fundamentales de la ingeniería tisular, también conocidos como la triada de la ingeniería de tejidos. Esta triada está compuesta por las células, las moléculas bioactivas y los andamios. Dichos componentes se utilizan en conjunto para elaborar productos, tales como órganos y tejidos para mejorar la salud y calidad de vida humanas (Hiles & Hodde, 2006).

Sin embargo, las aplicaciones de las estructuras antes mencionadas pueden ser diversas, dependiendo el contexto, por lo que es necesario tomar en cuenta la relevancia fisiológica en cada caso, es decir, la característica correspondiente a un funcionamiento biológico normal o sano. Abbott & Kaplan (2015) mencionan que, para mejorar la relevancia fisiológica en la elaboración de tejidos, se deben emplear distintas estrategias tales como la recapitulación del contexto biológico (matriz extracelular, vascularización y tipos de células), así como las señales químicas y mecánicas (a través del uso de catalizadores y biorreactores) y la incorporación de señales espaciales (mediante el cultivo celular en 3D).

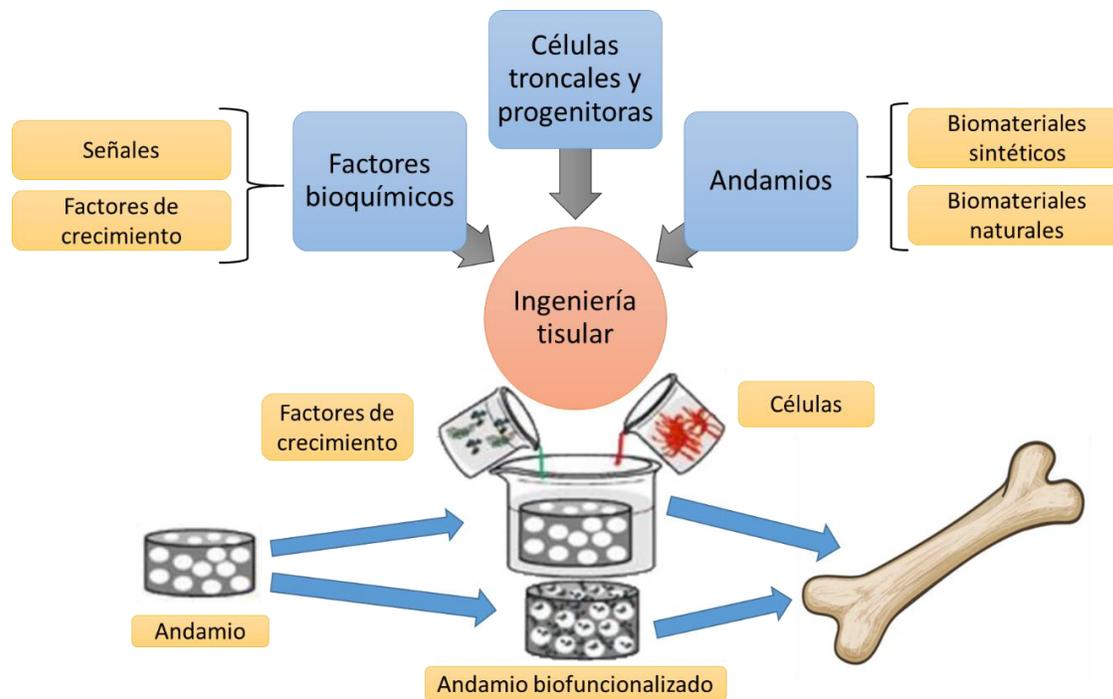


Figura 1. Triada de la ingeniería de tejidos (Quijano, 2020).

Andamios

Dhandayuthapani *et al.*, (2011) estipulan que para poder regenerar tejido o restaurar las funciones del mismo, es necesario un andamio, el cual es definido como un biomaterial tridimensional, poroso y sólido que actúa como una matriz temporal para proliferación celular.

Chen *et al.*, (2002) reportan que un andamio apto para ingeniería de tejidos debe cumplir con algunos de los criterios siguientes:

- La superficie debe permitir la adhesión celular y la retención de las funciones de células diferenciadas. De igual manera, debe promover el crecimiento celular.
- El andamio debe ser biocompatible, es decir, ni el material del que está hecho o sus productos de degradación deben provocar inflamación o toxicidad *in vivo*.
- El andamio debe ser biodegradable y eventualmente absorbido.
- El andamio debe contar con la porosidad adecuada para permitir la adhesión celular e iniciar la regeneración de la matriz extracelular. La estructura del poro debe permitir una distribución espacial celular a través del andamio para facilitar la formación homogénea de tejido.
- El material debe tener propiedades mecánicas similares a las del tejido que se quiere regenerar.

Los polímeros biodegradables son aquellos que se desintegran debido a degradaciones macromoleculares con dispersión *in vivo*. La biodegradación del polímero ocurre gracias a que éste se encuentra en presencia de elementos biológicos, tales como el agua y enzimas, de forma que la integridad del polímero (y/o de las macromoléculas del mismo) es afectada. Esto da como resultado fragmentos de las macromoléculas, los cuales quedan con grupos reactivos que reaccionan con elementos de la misma fragmentación o elementos del mismo individuo. Estas partículas pueden moverse del sitio de acción,

pero no necesariamente fuera del cuerpo (Quijano, 2020). Sin embargo, al paso del tiempo son absorbidos *in vivo*.

La tasa de degradación del andamio es crucial para el desarrollo de tejido funcional, por lo tanto, es muy importante controlar la rapidez de degradación del biopolímero. La tasa de degradación debe coincidir con la tasa de propagación y proliferación de las células implantadas del tejido específico, tal que, al crearse completamente este tejido nuevo, ya no debe existir el biopolímero dentro del cuerpo del individuo (Chung *et al.*, 2009).

La degradación de un material va acompañada de la liberación de subproductos ácidos. Si la capacidad del tejido para eliminar dichos subproductos es baja, debido a una pobre vascularización o a una actividad metabólica escasa, puede dar como resultado inflamaciones y otras perturbaciones temporales en el organismo (Hutmacher, 2000).

La rapidez de degradación puede ser regulada por parámetros tales como la naturaleza y cantidad de enlaces que pueden ser rotos mediante hidrólisis o acción enzimática, el grado de hidrofobicidad de la superficie, la presencia y cantidad de regiones tanto cristalinas como amorfas, entre otras (You & Wang, 2011).

Gelatina: una forma desnaturalizada de colágena

La colágena es la estructura proteica más abundante en los animales, tanto vertebrados como invertebrados, ya que constituye aproximadamente el 30 % de sus proteínas. Esta molécula consiste en tres cadenas α , cada una de las cuales contiene alrededor de 1000 aminoácidos y una masa molecular de 100 kDa (Liu *et al.*, 2015).

La gelatina es una proteína fibrosa compuesta de una secuencia única de aminoácidos. Es obtenida a partir de la colágena en un proceso denominado hidrólisis, durante el cual se rompen los enlaces intermoleculares de la colágena haciendo que pierda su estructura helicoidal (Aldana & Abraham, 2017). En este procedimiento, la colágena es desnaturalizada

y pierde su estructura original. La estructura de la gelatina cambia durante la solidificación, momento en el cual, forma un gel capturando agua en la red de cadenas. Dependiendo del estado del gel, estas cadenas adquieren distintos arreglos espaciales e interacciones. Estas características son determinadas por la concentración de gelatina, temperatura y energía requerida para la formación de la estructura secundaria (Ahmad *et al.*, 2017). La determinación de la resistencia física y viscosidad es un aspecto importante en la gelatina, ya que está vinculado al grado de calidad. Este grado de calidad se denomina grado Bloom de la gelatina, el cual es la medida de las propiedades de solidificación de esta proteína y está relacionado directamente al contenido de la triple hélice (Rose *et al.*, 2014). Ahmad *et al.*, (2017) mencionan que las propiedades de la gelatina dependen en gran medida del pH, temperatura, tiempo de extracción al momento de procesar la colágena, así como la fuente de donde se extrajo. Debido a que la gelatina es un biopolímero con fuerte polaridad, se necesitan solventes altamente polares para poder disolverla. Entre estos, resaltan el ácido acético glacial y solventes fluorados, como el 2,2,2-Trifluoroetanol (Huang *et al.*, 2004; Choktaweesap *et al.*, 2007). Una ventaja de la gelatina con respecto a la colágena, es que la gelatina no entra en un proceso de desnaturalización cuando interactúa con un campo eléctrico aplicado (Aldana & Abraham, 2017).

Otro factor importante es la sensibilidad al envejecimiento físico. La gelatina, como cualquier otro material vítreo, no es termodinámicamente estable por lo que, durante el almacenamiento por debajo de su temperatura de transición vítrea (T_g), su estructura tiende a convertirse líquida. El envejecimiento físico se caracteriza por la densificación y relajación de la entalpía. De igual manera, se ha comprobado que éste conduce a un aumento del módulo de Young, fragilidad y estrés en la fractura de los materiales (Yakimets *et al.*, 2005).

Como proteína, la gelatina presenta un comportamiento anfótero debido a la presencia de grupos funcionales ácidos y básicos, como resultado de la existencia de grupos terminales amino y carboxilo provenientes de los aminoácidos que la conforman (Su & Wang, 2015). En medios ácidos, es decir, en

presencia de alta concentración de iones H^+ , la gelatina se carga de manera positiva. Por otra parte, si ésta se encuentra en medios alcalinos, es decir, con alta presencia de iones OH^- , la gelatina adquiere carga negativa (Aldana & Abraham, 2017).

Su & Wang (2015) reportan que el método de producción de la gelatina puede ser ácido o alcalino y, dependiendo de cuál se utilice, se obtiene gelatina tipo A (cuyas propiedades principales se muestran en la tabla 1) o tipo B, respectivamente. En la Figura 2 puede observarse el proceso de obtención de ambas gelatinas a partir de la colágena.

Una diferencia entre ambos tipos de gelatina es su punto isoeléctrico (IEP). El punto isoeléctrico es el pH en el cual la molécula exhibe carga neta cero. La gelatina tipo A tiene un IEP entre 6 y 9.5, mientras que en la gelatina tipo B se encuentra entre 4.5 y 5.6. Algunas propiedades alcanzan valores extremos cerca del punto isoeléctrico, gracias a la atracción electrostática de grupos cargados opuestamente (Aldana & Abraham, 2017).

La gelatina es un biopolímero natural versátil que ha sido ampliamente utilizado en alimentos, cosméticos, la industria farmacéutica y las ciencias médicas debido a que se encuentra comercialmente disponible a bajo costo, es biodegradable y biocompatible, muestra baja antigenicidad y no genera subproductos peligrosos en una degradación enzimática (Hoque *et al.*, 2015). De igual manera, retiene secuencias informativas como la arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), la cual promueve la adhesión, diferenciación y proliferación celulares (Gautam *et al.*, 2013). Aunado a esto, la gelatina también posee un alto efecto hemostático y es rica en grupos hidrofílicos amino y carboxilo, lo cual permite el paso de nutrientes y oxígeno (Jafari *et al.*, 2011).

La gelatina es altamente soluble en medios acuosos y puede ser rápidamente digerida por las colagenasas producidas por distintos tipos de células, tanto *in vivo* como *in vitro*. Esto representa un reto al aplicarla en ingeniería tisular. Rose *et al.*, (2014) recomiendan la técnica de entrecruzamiento para obtener materiales de origen proteico que sean menos solubles en medios acuosos, menos antigénicos, más resistentes

mecánicamente y más estables contra la degradación enzimática.

Tabla 1. Propiedades de la gelatina tipo A (Chi, 2015).

Polímero	Temperatura de descomposición (°C)	Módulo de Young (GPa)	Elongación (%)
Gelatina tipo A	~269	0.2	20.7

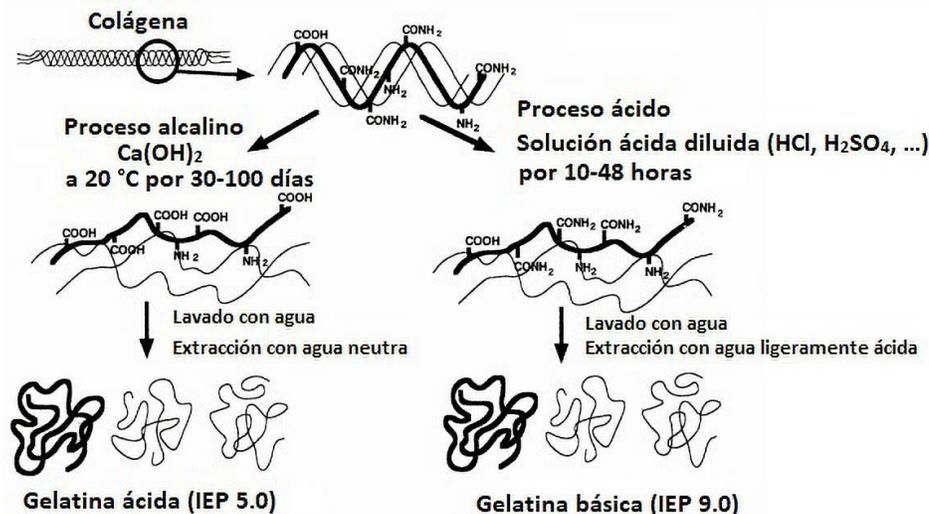


Figura 2. Obtención de gelatina a partir de la colágena (Gorgieva & Kokol, 2011).

Hoque *et al.*, (2015) reportan distintos métodos físicos y químicos para estabilizar estructuras hechas a base de gelatina. Entre los métodos físicos se encuentran el tratamiento deshidrotermal y la irradiación UV, pero son poco eficientes (Zhang *et al.*, 2006). Gracias al gran número de grupos funcionales que posee, la gelatina puede ser entrecruzada fácilmente de manera química utilizando diversos reactivos. Entre la variedad de agentes entrecruzantes químicos, destacan el glutaraldehído, el D,L-gliceraldehído y la genipina (Bigi *et al.*, 2002; Sisson *et al.*, 2009).

Técnicas de elaboración de andamios de gelatina

Debido a las características fisicoquímicas de la gelatina, es posible obtener andamios con aplicaciones en ingeniería tisular utilizando diversas técnicas, tales como liofilización (Lee *et al.*, 2005),

lixiviación de partículas (Hoque *et al.*, 2015), espumado (Poursamar *et al.*, 2015), estereolitografía (Schuster *et al.*, 2009), impresión 3D (Lewis *et al.*, 2018), separación de fases (Liu *et al.*, 2009) y electrohilado (Abreu, 2017).

En la tabla 2 se presenta una comparación de las técnicas antes mencionadas.

Electrohilado y sus características de operación

El electrohilado es un método simple y efectivo para producir fibras con diámetros cercanos a los 700 nm (Zhang *et al.*, 2004). Este método puede ser utilizado con metales, cerámicos, polímeros tanto naturales como sintéticos, así como con polímeros cargados con cromóforos, nanopartículas u otra clase de agentes activos, tales como virus y bacterias (Greiner & Wendorff, 2007).

Artículos

Tabla 2. Técnicas de elaboración para andamios de gelatina.

Técnica de elaboración	Principio de operación	Ventajas	Desventajas	Referencias
Liofilización	Deshidratación de solución polimérica por debajo de su Tg o de su punto de fusión. Remoción del solvente mediante sublimación.	Formación de estructuras porosas e interconectadas. No requiere solventes tóxicos. Permite mantener la actividad de biomoléculas.	Porosidad y tamaño de poro dependientes de características intrínsecas de la solución.	Loh & Choong, 2013; Ninan <i>et al.</i> , 2013
Lixiviación de partículas	Partículas hidrosolubles mezcladas en solución polimérica biodegradable. Remoción del solvente mediante secado al vacío o liofilización. Remoción de partículas con agua.	Fácil manejo. Formación de estructuras porosas. Control adecuado de porosidad y tamaño de poro.	Distribución no uniforme de partículas. Posible formación de capa externa sobre el andamio. Dificil remoción de partículas y restos del solvente en la estructura interna.	Liao <i>et al.</i> , 2001
Espumado	Formación de gas inerte (como N ₂ o CO ₂) dentro de solución precursora. Estabilización de matriz espumosa por medio de congelamiento.	Formación de estructuras porosas.	Excesiva rigidez irregular. Pobre resistencia mecánica.	Poursamar <i>et al.</i> , 2015
Stereolitografía	Polimerización de resina fotopolimérica mediante láser UV. La resolución de la matriz depende de la punta del láser.	Formación de matrices 3D. Fabricación de materiales con geometrías variadas.	Escasez de materiales aptos para aplicaciones biomédicas.	Loh & Choong, 2013
Impresión 3D (Bioplotter®)	Elaboración de CAD (diseño asistido por computadora) y posterior impresión mediante extrusión a través de un sistema neumático presurizado.	Colocación de materiales capa por capa. Uso posible de "biotintas" cargadas con factores de crecimiento.	La tensión cortante en la boquilla puede resultar perjudicial en la viabilidad celular. Elevado costo del proceso comparado con otros.	Do <i>et al.</i> , 2015
Separación de fases	Preparación y enfriamiento de solución polimérica. Remoción del solvente mediante liofilización.	Formación de estructuras porosas. No requiere lixiviación adicional.	Requiere solventes orgánicos que inhiben la incorporación de moléculas bioactivas o células durante la elaboración de andamios. Matrices con poros pequeños.	Loh & Choong, 2013
Electrohilado	Solución polimérica bajo efectos de campo eléctrico.	Matrices maleables con microestructura altamente porosa e interconectada. Relación área/volumen	Influencia de los parámetros ambientales en la elaboración de los andamios.	Li & Xia, 2004; Bhardwaj & Kundu, 2010; Aldana &

Artículos

Generalmente, las células cultivadas en andamios electrohilados se adhieren a la superficie con mínima penetración. Esto puede deberse a la combinación de factores como distancias estrechas entre las fibras, diámetro de la fibra, tamaño de las células y propiedades químicas de las fibras. A pesar de que las células no sean capaces de migrar al interior de un andamio bajo estas condiciones, el comportamiento celular observado dista del reportado en cultivos 2D (Nisbet *et al.*, 2008).

Entre las ventajas de los andamios producidos con esta técnica, se encuentran la microestructura altamente porosa con poros interconectados, una relación superficial/volumen relativamente grande y son maleables como para adoptar distintas formas (Chiu *et al.*, 2005). Dichas características son similares a las de la matriz extracelular, por lo que estos andamios son un soporte adecuado para que las células se adhieran, migren, proliferen y crezcan (Aldana & Abraham, 2017). Incluso, se ha descubierto que las células implantadas en este tipo de estructuras tienden a mantener su forma fenotípica y crecen acorde a la orientación de las nanofibras (Li *et al.*, 2002).

Típicamente, existen dos arreglos de electrohilado: horizontal y vertical (Bhardwaj & Kundu, 2010). En la Figura 3 se muestra el montaje típico para un electrohilado. Este consiste en 3 componentes principales: una fuente de alto voltaje, un hilador (usualmente una aguja metálica) y un colector conectado a tierra (Li & Xia, 2004).

Durante el proceso de electrohilado, una solución polimérica sostenida por su tensión superficial al final del tubo capilar es sometida a un campo eléctrico y, como consecuencia, es inducida una carga eléctrica en la superficie del líquido. Debido a esto, la gota del líquido es distorsionada en una estructura cónica denominada cono de Taylor. Cuando el campo eléctrico aplicado alcanza un valor crítico, las fuerzas electrostáticas (la repulsión electrostática entre las cargas superficiales y la fuerza coulombiana ejercida por el campo eléctrico) superan a las fuerzas de tensión superficial. Esto da como resultado que un chorro cargado de la solución sea expulsado de la punta del cono de Taylor. De igual manera, se genera un azote inestable y rápido entre la punta del capilar y el colector, por lo que el solvente se evapora a medida que el polímero es depositado en el colector (Li & Xia, 2004; Bhardwaj & Kundu, 2010).

El proceso de electrohilado está regido por diversos parámetros, los cuales se clasifican de manera general en propiedades de la solución, variables controlables y parámetros ambientales (Pham *et al.*, 2006). Esto se representa de manera esquemática en la Figura 4.

De acuerdo con Bhardwaj & Kundu (2010), las propiedades de la solución que influyen significativamente durante el proceso de electrohilado son la viscosidad, conductividad, peso molecular y la tensión superficial.

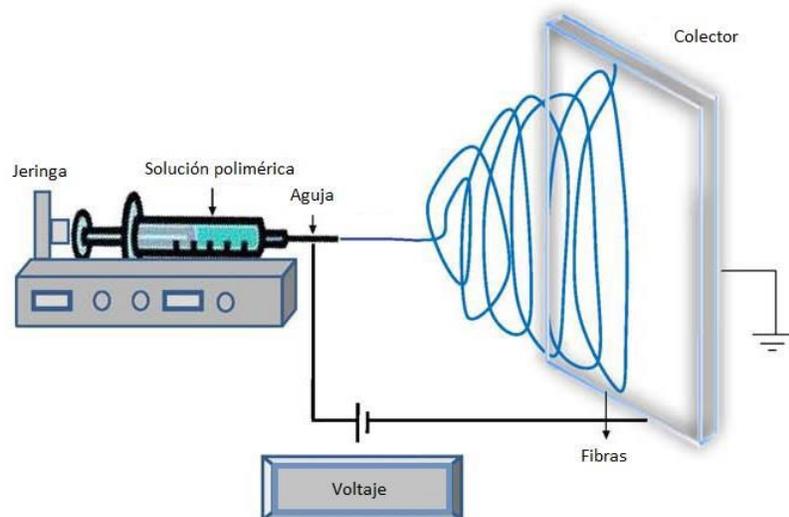


Figura 3. Diagrama esquemático de un equipo de electrohilado en montaje horizontal. (Bhardwaj & Kundu, 2010).

Artículos

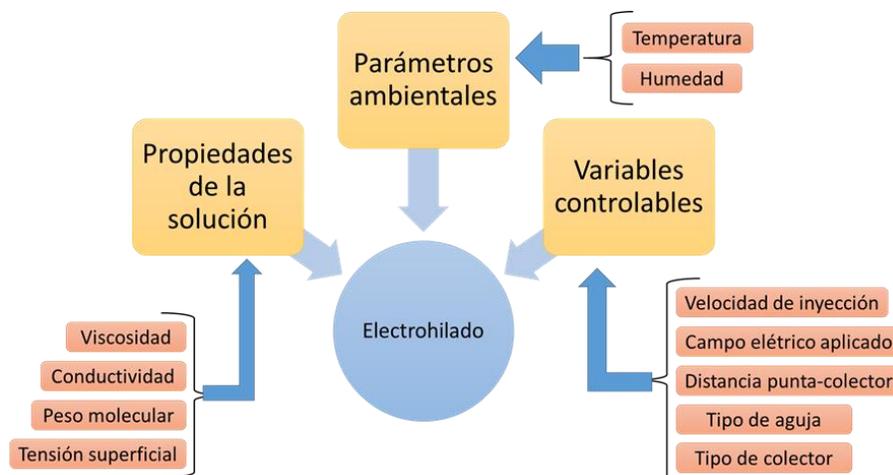


Figura 4. Parámetros que influyen durante el electrohilado.

La concentración de la solución está íntimamente relacionada a la viscosidad y tensión superficial de la misma (Subbiah *et al.*, 2005). Se ha encontrado que, a bajas concentraciones, se obtiene una mezcla de perlas y fibras al momento de electrohilar. A medida que la concentración aumenta, las perlas se van alargando hasta obtenerse fibras uniformes y, para polímeros como la gelatina, las fibras también incrementan de diámetro. A pesar de ello, no es posible obtener fibras continuas a concentraciones elevadas. Esto se debe a la incapacidad para mantener el flujo de la solución en la punta de la aguja.

El peso molecular del polímero tiene un efecto importante en las propiedades reológicas y eléctricas de la solución, tales como la viscosidad, tensión superficial, conductividad y rigidez dieléctrica. Esta característica también refleja el número de enlaces de la cadena polimérica en la solución y, por ende, la viscosidad en la misma. Las soluciones con elevado peso molecular polimérico aportan la viscosidad necesaria para la generación de fibras.

La viscosidad de la solución determina el tamaño y la morfología de las fibras. A viscosidades muy bajas, no ocurre la formación de fibras continuas. Un incremento en esta característica permite generar fibras con diámetros más grandes y uniformes (Bhardwaj & Kundu, 2010). Sin embargo, a viscosidades muy altas las gotas en la punta

de la aguja se secan antes de la expulsión del chorro, impidiendo el electrohilado (Pham *et al.*, 2006).

La tensión superficial está más relacionada con la composición del solvente de la solución. Si la solución tiene una tensión superficial alta, se inhibe el proceso de electrohilado debido a la inestabilidad de los chorros y la generación de gotas rociadas. Por otro lado, Si la tensión superficial es baja, el electrohilado ocurre a campos eléctricos menores. Básicamente, la tensión superficial establece las condiciones de frontera para el electrohilado si las otras variables permanecen constantes.

La conductividad de la solución es determinada por el tipo de polímero, el solvente utilizado y la disponibilidad de sales ionizables. Se ha observado que, al incrementar la conductividad eléctrica de la solución, existe una disminución significativa en el diámetro de las nanofibras electrohiladas. Mientras que, si la conductividad es baja, se generan perlas debido a que las fuerzas eléctricas no producen la elongación de chorro suficiente para generar fibras uniformes. En presencia de campos eléctricos elevados, las soluciones altamente conductivas son inestables (Bhardwaj & Kundu, 2010).

El tipo de solvente utilizado también es otro factor a tomar en cuenta, ya que la morfología y porosidad volumétrica de la superficie nanofibrosa varía según el solvente utilizado (Chew *et al.*, 2006). Subbiah *et al.*, (2005) mencionan que esto se debe a que la

volatilidad del solvente influye en el proceso de separación de fases durante el electrohilado. Con una volatilidad de solvente alta se obtienen morfologías micro y nanoestructurales. De igual forma, es necesario considerar la naturaleza electrolítica del solvente.

De acuerdo con Pham *et al.*, (2006), dentro de las variables controlables se encuentran la velocidad de inyección, el campo eléctrico aplicado, la distancia entre la punta y el colector, así como el diseño de la aguja y la composición y geometría del colector.

La formación de fibras sólo ocurre hasta que se alcanza el voltaje de umbral, ya que esto induce las cargas necesarias en la solución para iniciar el proceso de electrohilado. Diversos autores sugieren que, cuando se aplican altos voltajes hay más eyección de polímero y esto facilita la formación de fibras con diámetros mayores. No obstante, en muchos casos un voltaje elevado causa una elongación mayor de la solución debido a mayores fuerzas coulombianas en el chorro, así como a un campo eléctrico más fuerte. Estos efectos conducen a la reducción del diámetro de la fibra, así como a la evaporación rápida del solvente. Con voltajes elevados existe mayor probabilidad de generar perlas en el andamio.

La velocidad de inyección influye en la velocidad del chorro y, por ende, en la transferencia del material. Se desea una velocidad de inyección baja para que el solvente tenga tiempo suficiente para evaporarse. Los diámetros tanto del poro como de la fibra aumentan a medida que la velocidad de inyección lo hace. Si la velocidad de inyección es demasiado elevada, se obtienen fibras aperladas debido a la indisponibilidad de un tiempo adecuado de secado antes de alcanzar el colector (Bhardwaj & Kundu, 2010). Un método efectivo para incrementar, ya sea el grosor de un andamio electrohilado o la productividad durante el proceso de fabricación, es utilizar un arreglo de agujas como hilador. Una técnica similar puede ser aplicada si se desea obtener un andamio compuesto de distintos polímeros sólo que, en este caso, distintas soluciones poliméricas serían eyectadas al mismo tiempo (Li & Xia, 2004; Ma *et al.*, 2005).

En la literatura se reporta que, para que las fibras tengan suficiente tiempo para secarse antes de alcanzar el colector, se requiere una

distancia mínima entre éste y la punta. Si la distancia es muy cercana o muy lejana, se obtienen perlas. No obstante, este parámetro no es significativo en el proceso de electrohilar gelatina (Pham *et al.*, 2006; Quijano, 2020).

Un colector es utilizado como un sustrato conductor donde las nanofibras son colectadas. Los colectores metálicos permiten obtener fibras lisas y finas. Para obtener fibras alineadas de manera ordenada, puede usarse un rodillo giratorio o una estructura metálica (Pham *et al.*, 2006; Bhardwaj & Kundu, 2010).

Se ha comprobado que el electrohilado es susceptible a parámetros ambientales como la temperatura y la humedad del ambiente.

Al incrementar la temperatura, se obtienen fibras con diámetro reducido. Esto se debe a que la viscosidad de la solución polimérica disminuye con el aumento de temperatura.

Un aumento en la humedad genera pequeños poros circulares en la superficie de las fibras, los cuales pueden llegar a unirse si la humedad continúa incrementándose. La alta humedad provoca que las fibras electrohiladas se descargan eléctricamente. Si la humedad es demasiado baja, el solvente en la punta de la aguja puede evaporarse rápidamente provocando que el electrohilado dure sólo unos pocos minutos antes de que dicha punta se obstruya (Bhardwaj & Kundu, 2010).

Es importante mencionar que, dependiendo el lugar y la época del año, las condiciones atmosféricas son muy distintas, lo cual impacta en la estandarización del proceso. Por ejemplo, según Zhang *et al.*, (2006), para elaborar andamios de gelatina porcina tipo A, a 21.5 °C, mediante la técnica de electrohilado y utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante son necesarios los parámetros mostrados en la tabla 3.

Sin embargo, Pech (2018) realizó un estudio a nivel local donde menciona haber utilizado los valores reportados en la tabla 4 a 25°C. La diferencia de valores obtenidos entre ambas investigaciones puede deberse a que los experimentos fueron realizados a distintas condiciones atmosféricas.

Artículos

Tabla 3. Parámetros de electrohilado según Zhang et al., (2006).

Voltaje	Gasto o velocidad de flujo	Distancia de aplicación	Diámetro interno de la aguja
10 kV	0.8 ml/h	13 cm	0.84 mm

Tabla 4. Parámetros de electrohilado según Pech (2018).

Voltaje	Gasto o velocidad de flujo	Distancia de aplicación	Diámetro interno de la aguja
12.26 kV	0.6 ml/h	15 cm	0.90 mm

La piel: la capa protectora del cuerpo

La piel es el órgano más extenso del cuerpo. Ocupa aproximadamente el 15 % del peso corporal y cubre un área cercana a los 1.7 m² en el adulto promedio. Su espesor varía entre los 0.5 mm, ubicado en los párpados, hasta los 4 mm de los talones. La piel provee protección contra agentes patógenos, así como contra daños mecánicos, osmóticos, químicos, térmicos y provocados por la luz. Puede realizar funciones de absorción y excreción, y de igual manera, es permeable de manera selectiva a determinadas sustancias químicas. También posee una función sensitiva, una de comunicación y de expresión, una metabólica y de reserva, así como un sistema inmunológico complejo (Ramos et al., 2006; Chong et al., 2007; Colorado et al., 2013).

La piel tiene excelentes propiedades mecánicas, las cuales le ayudan en la locomoción y manipulación de objetos mediante la textura. Es un tejido suave y elástico que resiste esfuerzos cortantes relativamente elevados, por lo que puede ser estirada y comprimida (Chong et al., 2007).

La piel está conformada por 3 capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Vig et al., 2017). Estas capas se observan en la Figura 5.

La epidermis es la capa superior de la piel. Es translúcida, ya que permite el paso parcial de luz a través de ella. Esta capa consigue oxígeno y nutrientes de capas más profundas de la piel, ya que carece de vasos sanguíneos. El estrato córneo es la región más superficial e impermeable de esta capa, y su función principal es inhibir la entrada de patógenos y otras sustancias al cuerpo. La lámina basal es otro componente de esta capa. Contiene melanocitos, quienes se encargan de producir melanina, la cual ayuda a filtrar la radiación UV de la luz solar. De igual manera, contiene células destinadas a convertirse en queratinocitos, los cuales una vez maduros, se mueven hacia el estrato córneo. Una vez muertos, los queratinocitos otorgan a la piel una barrera protectora. La epidermis también contiene células de Langerhans, las cuales forman parte del sistema inmune de la piel (Ramos et al., 2006; Vig et al., 2017).

La segunda capa es denominada dermis y se encuentra a mayor profundidad. Está compuesta principalmente de colágena, elastina y glicosaminoglicanos, así como de fibroblastos. Esta capa le otorga a la piel la fuerza física, así como la elasticidad necesaria. Aunado a esto, contiene células vasculares, folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas (Ramos et al., 2006; Zhong et al., 2010; Vig et al., 2017).

Artículos

Bajo esta capa se encuentra la hipodermis, la cual se adhiere a la dermis mediante fibras de colágena. La hipodermis consiste en tejido adiposo que sirve como depósito de energía a la vez que suministra aislamiento térmico y almohadillas entre la piel y estructuras tales como huesos y músculos (Ramos *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2017).

Sustitutos de piel comerciales

De acuerdo con Ramos *et al.*, (2006) y Colorado *et al.*, (2013), un sustituto dérmico debe contar con las siguientes propiedades:

- Lograr una adhesión rápida y sostenida en el lugar de la herida. Esto es importante, ya que el éxito del injerto depende en gran medida de la adhesión.
- Ser impermeable a bacterias exógenas y prevenir la proliferación de patógenos en la herida.
- Tener una emisión de vapor de agua similar a la de la piel natural. Aunado a esto, debe controlar el intercambio de líquidos.
- Contar con una estructura superficial que permita la migración y proliferación celulares, así como el crecimiento de tejido nuevo.

- Poseer una flexibilidad que permita la conformación de una superficie irregular en la herida, así como una elasticidad que permita el movimiento de tejidos subyacentes.
- Tener una resistencia lineal a esfuerzos cortantes, así como una resistencia a fuerzas de tracción cuando estas son retiradas.
- Ser biodegradable y de bajo costo.
- Tener tiempo de caducidad indefinido, así como requisitos mínimos de almacenamiento.
- Ser compatible con los tejidos y apoyar la cicatrización de heridas, por lo cual, debe carecer de antigenicidad y de toxicidad a nivel local o sistémico.

Estos productos pueden ser celulares o acelulares. Estos últimos sólo contienen una matriz natural o sintética que permite hospedar células durante el proceso de curación de la herida. Los productos celulares con o sin el soporte matricial, incluyen láminas celulares epidérmicas, constructos epidérmicos, reemplazos dérmicos y equivalentes bicapa de piel (Zhong *et al.*, 2010).

En la tabla 5, se presentan algunos de los sustitutos dérmicos disponibles en el mercado (Vig *et al.*, 2017).

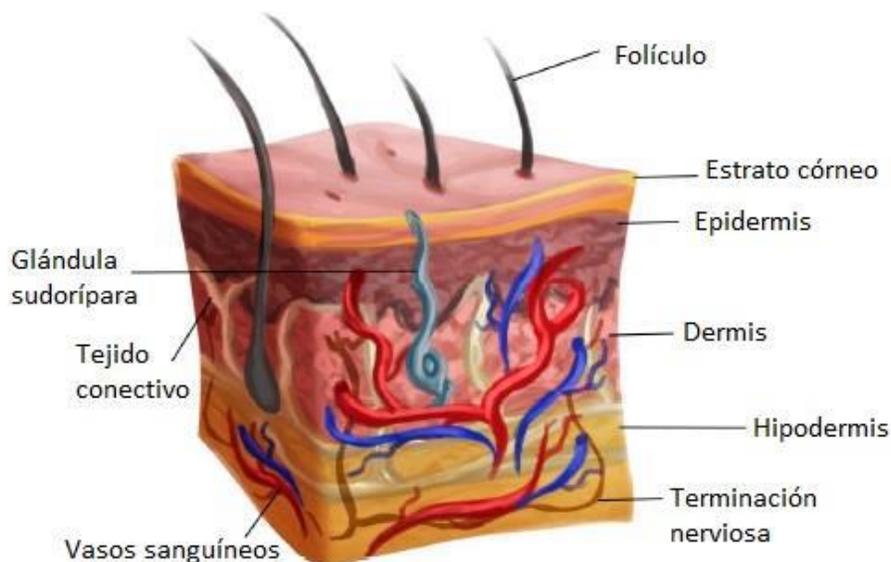


Figura 5. Estructura de la piel (Vig *et al.*, 2017).

Artículos

Tabla 5. Sustitutos dérmicos comerciales (Vig et al., 2017).

Nombre comercial	Composición y origen	Pros	Contras
Alloderm®	Dermis acelular de origen humano y liofilizada.	Inmunológicamente inerte. Posee una porosidad dérmica natural para la vascularización de las heridas.	Proceso de dos etapas. Existen riesgos de transmitir enfermedad. Es costoso.
Biobrane®	Película de silicón con una matriz 3D de nylon y cadenas de péptidos de colágena I.	Proceso de una sola etapa. Es bueno para cubrir heridas parciales.	Intolerante a la contaminación de heridas.
Integra® DRT	Matriz de colágena bovina inmersa en glicosaminoglicano y recubierta por una capa de silicón.	Resultados estéticos y funcionales a largo plazo.	Proceso de dos etapas. Altos costos. Mala adhesión. Vulnerabilidad a infecciones y pérdida del injerto.
CellSpray	Suspensión celular de queratinocitos.	Permite abarcar heridas periféricas.	Riesgo de infección o de rechazo.
Epicel	Lámina conformada por queratinocitos del paciente adherida a un soporte de petrolato.	Puede cubrir hasta un 30 % del área corporal. Se Puede aplicar a marcas de nacimiento. Riesgo de rechazo casi nulo.	Tiempo de elaboración largo.
TissueTech	Fibroblastos y Queratinocitos del paciente crecidos en membranas microperforadas de ácido hialurónico.	Tasas bajas de recurrencia.	Implica el injerto de 2 productos, por lo que puede ser difícil de usar en un entorno clínico.
TransCyte	Matriz de colágena y nylon incrustada con fibroblastos de prepucio neonatal.	Disponibilidad inmediata. Fácil almacenamiento.	Solución temporal. Debate ético sobre la fuente de los fibroblastos.
Dermagraft	Fibroblastos de prepucio neonatal inmersos en una matriz de poligalactina.	Fácil aplicación en heridas crónicas y úlceras diabéticas. No hay riesgo de rechazo.	Puede generar infecciones y celulitis. Debate ético sobre la fuente de los fibroblastos.
Permacol	Dermis acelular de cerdo.	Buenos resultados estético-funcionales.	Propensión a infecciones, seromas y hematomas.
Apligraf	Matriz de colágena bovina incrustada de fibroblastos de prepucio neonatal y queratinocitos.	Buenos resultados en tratamiento de úlceras venosas y de pie diabético. Gran mejoría a las 4 semanas.	Tiempo de vida corto (5-10 días). Costoso. Riesgo de infecciones mínimo. Debate ético sobre la fuente de los fibroblastos.

Conclusiones

En la actualidad, se encuentra disponible una amplia gama de sustitutos dérmicos en el mercado. Sin embargo, en muchos casos carecen de una adecuada biocompatibilidad con el ser humano y presentan problemas éticos y morales debido a su fuente de origen.

Por otra parte, la gelatina es un biopolímero natural que cuenta con las características fisicoquímicas adecuadas para aplicaciones en la ingeniería tisular. En tanto que el electrohilado, es una técnica que permite la obtención de andamios con porosidades apropiadas para el desarrollo de cultivos celulares.

Considerando lo antes mencionado, la gelatina electrohilada representa una alternativa valiosa para el desarrollo de tratamientos dérmicos.

Referencias

- Abbott R & Kaplan D (2015) Strategies for improving the physiological relevance of human engineered tissues. *Trends in Biotechnology*. 33(7):401-407.
- Abreu Rejón A (2017) Estudio del efecto del grado de entrecruzamiento de gelatina electrohilada en su resistencia a la degradación. Tesis Maestría en Materiales Poliméricos. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán. pp. 19-26.
- Ahmad T, Ismail A, Ahmad S, Khalil K, Kumar Y, Adeyemi K et al., (2017) Recent advances on the role of process variables affecting gelatin yield and characteristics with special reference to enzymatic extraction: A review. *Food Hydrocolloids*. 63:85-96.
- Aldana A & Abraham G (2017) Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 523(2):441-453.
- Arellano Olivares R (2014) Construcción de andamios de gelatina-ácido hialurónico entrecruzados con distintas concentraciones de EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida). Tesis Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de México. México D.F. pp. 29-50.
- Baghersad S, Hajir Bahrami S, Mohammadi M, Mojtahedi M & Milan P (2018) Development of biodegradable electrospun gelatin/aloe-vera/poly(ϵ -caprolactone) hybrid nanofibrous scaffold for application as skin substitutes. *Materials Science and Engineering: C*. 93:367-379.
- Beltrán Vargas N & González de la Rosa C (2016) Técnicas de cultivos celulares e Ingeniería de tejidos. Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México.
- Bhardwaj N & Kundu S (2010) Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 28(3):325-347.
- Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Roveri N & Rubini K (2002) Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*. 23(24):4827-4832.
- Chen G, Ushida T & Tateishi T (2002) Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience*. 2(2):67-77.
- Chew S, Wen Y, Dzenis Y & Leong K (2006) The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine. *Current Pharmaceutical Design*. 12(36):4751-4770.
- Chi Uluac L (2015) Obtención de un andamio bicapa mediante la técnica de electrohilamiento para su potencial aplicación en ingeniería de tejidos de la piel. Tesis Maestría en Materiales Poliméricos. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán. pp. 28-30.
- Chiu J, Luu Y, Fang D, Hsiao B, Chu B & Hadjiargyrou M (2005) Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Biomedical Applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 1(2):115-132.

- Choi D, Park S, Gu B, Kim Y, Chung S & Kim C (2018) Effect of the pore size in a 3D bioprinted gelatin scaffold on fibroblast proliferation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 67:388-395.
- Choktaweessap N, Arayanarakul K, Aht-ong D, Meechaisue C & Supaphol P (2007) Electrospun Gelatin Fibers: Effect of Solvent System on Morphology and Fiber Diameters. *Polymer Journal*. 39(6):622-631.
- Chong E, Phan T, Lim I, Zhang Y, Bay B, Ramakrishna S et al., (2007) Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution☆. *Acta Biomaterialia*. 3(3):321-330.
- Chung C, Beecham M, Mauck R & Burdick J (2009) The influence of degradation characteristics of hyaluronic acid hydrogels on in vitro neocartilage formation by mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 30(26):4287-4296.
- Colorado A, Agudelo C & Moncada AM (2013) Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: revisión. *Revista Ingeniería Biomédica*. 7(14):11-23.
- Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T & Kumar D (2011) Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*. 2011:1-19.
- Dias J, Baptista-Silva S, Oliveira C, Sousa A, Oliveira A, Bártolo P et al., (2017) In situ crosslinked electrospun gelatin nanofibers for skin regeneration. *European Polymer Journal*. 95:161-173.
- Do A, Khorsand B, Geary S & Salem A (2015) 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Advanced Healthcare Materials*. 4(12):1742-1762.
- Etxabide A, Long J, Guerrero P, de la Caba K & Seyfoddin A (2019) 3D printed lactose-crosslinked gelatin scaffolds as a drug delivery system for dexamethasone. *European Polymer Journal*. 114:90-97.
- Gautam S, Dinda A & Mishra N (2013) Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Materials Science and Engineering: C*. 33(3):1228-1235.
- Gorgieva S & Kokol V (2011) Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. In: Biomaterials Applications for Nanomedicine. Pignatello R (ed). IntechOpen. Rijeka, Croacia. pp. 23-25.
- Greiner A & Wendorff J (2007) Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angewandte Chemie International Edition*. 46(30):5670-5703.
- Hiles M & Hodde J (2006) Tissue engineering a clinically useful extracellular matrix biomaterial. *International Urogynecology Journal*. 17(S1):39-43.
- Holmes B, Webster T & Zhang L (2016) Nano/Microfabrication Techniques for Tissue and Organ Regeneration. In: Tissue and Organ Regeneration: Advances in Micro and Nanotechnology. Zhang L, Khademhosseini A & Webster T (ed). Pan Stanford Publishing. Boca Ratón, FL. pp. 3-5.
- Hoque M, Nuge T, Yeow T, Nordin N & Prasad R (2015) Gelatin-Based Scaffolds for Tissue Engineering- A Review. *Polymers Research Journal*. 9(1):15-32.
- Huang Z, Zhang Y, Ramakrishna S & Lim C (2004) Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer*. 45(15):5361-5368.
- Hutmacher D (2000) Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 21(24):2529-2543.
- Jafari J, Emami S, Samadikuchaksaraei A, Bahar M & Gorjipour F (2011) Electrospun chitosan-gelatin nanofibrous scaffold: Fabrication and in vitro evaluation. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 21(2):99-112.

- Jammalamadaka U & Tappa K (2018) Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering. *Journal of Functional Biomaterials*. 9(1):22.
- Kang H, Tabata Y & Ikada Y (1999) Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 20(14):1339-1344.
- Lee S, Kim Y, Chong M, Hong S & Lee Y (2005) Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. *Biomaterials*. 26(14):1961-1968.
- Lewis P, Green R & Shah R (2018) 3D-printed gelatin scaffolds of differing pore geometry modulate hepatocyte function and gene expression. *Acta Biomaterialia*. 69:63-70.
- Liao C, Chen C, Chen J, Chiang S, Lin Y & Chang K (2001) Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. *Journal of Biomedical Materials Research*. 59(4):676-681.
- Li D & Xia Y (2004) Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel?. *Advanced Materials*. 16(14):1151-1170.
- Li W, Laurencin C, Caterson E, Tuan R & Ko F (2002) Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. 60(4):613-621.
- Liu D, Nikoo M, Boran G, Zhou P & Regenstein J (2015) Collagen and Gelatin. Annual Review of *Food Science and Technology*. 6(1):527-557.
- Liu X & Ma P (2009) Phase separation, pore structure, and properties of nanofibrous gelatin scaffolds. *Biomaterials*. 30(25):4094-4103.
- Liu X, Smith L, Hu J & Ma P (2009) Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 30(12):2252-2258.
- Loh Q & Choong C (2013) Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 19(6):485-502.
- Ma Z, Kotaki M, Inai R & Ramakrishna S (2005) Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. *Tissue Engineering*. 11(1-2):101-109.
- Martín Pat G (2015) Obtención y caracterización de un andamio a base de poli (caprolactona) y gelatina tipo A como posible material en regeneración de miocardio. Tesis Maestría en Materiales Poliméricos. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán. pp. 75-76.
- Ninan N, Grohens Y, Elain A, Kalarikkal N & Thomas S (2013) Synthesis and characterisation of gelatin/zeolite porous scaffold. *European Polymer Journal*. 49(9):2433-2445.
- Nisbet D, Forsythe J, Shen W, Finkelstein D & Horne M (2008) Review Paper: A Review of the Cellular Response on Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering. *Journal of Biomaterials Applications*. 24(1):7-29.
- Pech Pool I (2018) Obtención de andamio bicapa, PLLA-Gelatina, con geometría hexagonal de poro para posible uso en quemaduras profundas. Tesis Maestría en Materiales Poliméricos. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán. pp. 43-64.
- Pezeshki-Modaress M, Zandi M & Rajabi S (2018) Tailoring the gelatin/chitosan electrospun scaffold for application in skin tissue engineering: an in vitro study. *Progress in Biomaterials*. 7(3):207-218.
- Pham Q, Sharma U & Mikos A (2006) Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Engineering*. 12(5):1197-1211.
- Poursamar S, Hatami J, Lehner A, da Silva C, Ferreira F & Antunes A (2015) Gelatin porous scaffolds fabricated using a modified gas foaming technique: Characterisation and cytotoxicity assessment. *Materials Science and Engineering: C*. 48:63-70.
- Quijano Mendoza J (2020) Elaboración de andamios electrohilados de gelatina para posible uso en ingeniería tisular para piel. Tesis Licenciatura en Ingeniería Física. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán. pp. 9-12.

Artículos

- Rahmati M, Mills D, Urbanska A, Saeb M, Venugopal J, Ramakrishna S et al., (2021) Electrospinning for tissue engineering applications. *Progress in Materials Science*. 117:100721.
- Ramos López H, Gan Acosta A & Díaz RJ (2006) Artificial Skin: Piel Artificial. *Revista Colombiana de Tecnologías de Avanzada*. 2(8):41-47.
- Rose J, Pacelli S, Haj A, Dua H, Hopkinson A, White L et al., (2014) Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering. *Materials*. 7(4):3106-3135.
- Schuster M, Turecek C, Weigel G, Saf R, Stampfl J, Varga F et al., (2009) Gelatin-based photopolymers for bone replacement materials. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 47(24):7078-7089.
- Sheikholeslam M, Wright M, Cheng N, Oh H, Wang Y, Datu A et al., (2019) Electrospun Polyurethane–Gelatin Composite: A New Tissue-Engineered Scaffold for Application in Skin Regeneration and Repair of Complex Wounds. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 6(1):505-516.
- Sisson K, Zhang C, Farach-Carson M, Chase D & Rabolt J (2009) Evaluation of Cross-Linking Methods for Electrospun Gelatin on Cell Growth and Viability. *Biomacromolecules*. 10(7):1675-1680.
- Subbiah T, Bhat G, Tock R, Parameswaran S & Ramkumar S (2005) Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 96(2):557-569.
- Su K & Wang C (2015) Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnology Letters*. 37(11):2139-2145.
- Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, Dixit S, Sahu R, Pillai S et al., (2017) Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(4):789.
- Yakimets I, Wellner N, Smith A, Wilson R, Farhat I & Mitchell J (2005) Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymer*. 46(26):12577-12585.
- Yao C, Lee C, Huang C, Chen Y & Chen K (2017) Novel bilayer wound dressing based on electrospun gelatin/keratin nanofibrous mats for skin wound repair. *Materials Science and Engineering: C*. 79:533-540.
- You Z & Wang Y (2011) Bioelastomers in Tissue Engineering. In: *Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A Review of the Past and Future Trends*. Burdick J & Mauck R (ed). Springer. Alemania. p. 80.
- Zhang Y, Ouyang H, Lim C, Ramakrishna S & Huang Z (2004) Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*. 72B(1):156-165.
- Zhang Y, Venugopal J, Huang Z, Lim C & Ramakrishna S (2006) Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer*. 47(8):2911-2917.
- Zhang Y, Wang Q, Yan K, Qi Y, Wang G & Cui Y (2016) Preparation, characterization, and evaluation of genipin crosslinked chitosan/gelatin three-dimensional scaffolds for liver tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 104(8):1863-1870.
- Zhong S, Zhang Y & Lim C (2010) Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2(5):510-525.

Cuencas y sistemas arrecifales del Golfo de México en el estado de Veracruz: Contaminación por hidrocarburos y biorremediación

Leticia Narciso-Ortiz¹, Karen A. Vargas-García², Ana L. Vázquez-Larios², Tannia A. Quiñones-Muñoz³, Ricardo Hernández-Martínez⁴, Manuel A. Lizardi-Jiménez^{5*}

¹Tecnológico Nacional de México Veracruz / Tierra Blanca, C.P. 91897.

²Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca, C.P. 95180.

³CONACYT- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., C.P. 42162.

⁴CONACYT- Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, C.P. 94946.

⁵CONACYT-Universidad Autónoma de San Luis Potosí, C.P. 78210.

chamarripas@yahoo.com.mx

Resumen

Las cuencas y los arrecifes son ecosistemas importantes en el mundo ya que proveen diferentes servicios. La contaminación por hidrocarburos está amenazando estos ecosistemas. Veracruz, tiene condiciones que lo hacen propenso a este tipo de contaminación. Es importante entonces, proponer estrategias de remediación, la remediación por medio de microorganismos es principalmente utilizada para tratar contaminación por hidrocarburos. El objetivo de esta investigación fue evaluar la contaminación por hidrocarburos en cuencas y arrecifes del Golfo de México en Veracruz y diseñar biorreactores para cada tipo de contaminación. Se encontró contaminación por hidrocarburos octano y nonano en de abril 2018, e hidrocarburos de cadena más larga y aromáticos en julio 2018, en concentraciones que incluso exceden el límite permitido de descarga de aguas congénitas. El consorcio microbiano compuesto por *Acinetobacter bouvetii*, *Defluviobacter lusatiensis*, *Xanthomonas sp* y *Shewanella sp* fue cultivado en biorreactores airlift con gasolina y diésel como fuente de carbono (20 gL⁻¹) en medios salino y mineral. En 14 días de cultivo, fue degradado 91.39 ± 1.32% de diésel en medio salino y 97.55 ± 0.74% en medio mineral. La gasolina fue degradada en 95.05 ± 4.75 % en medio salino y 98.79 ± 1.19% en medio mineral en el mismo tiempo. Todos los experimentos mostraron incremento de unidades de actividad emulsificante y disminución de diámetro de las gotas del hidrocarburo a lo largo del tiempo de cultivo. Es importante mencionar que parte de los resultados aquí presentados han sido publicados en revistas científicas, carteles y ponencias de diferentes congresos.

Palabras clave: Arrecifes, Cuencas, Contaminación por hidrocarburos, Biorremediación de hidrocarburos, Consorcio hidrocarbonoclasta.

Abstract

Coral reefs and watersheds are important ecosystems, due to provide many services. Hydrocarbon pollution threatens these ecosystems. Many sources of hydrocarbon pollution are in Veracruz Mexico. It is important to propose remediation strategies. Microbial remediation is mainly used to treat hydrocarbons pollution. The aim of this study was to evaluate hydrocarbon pollution in reefs and watersheds in the Gulf of Mexico along the coast of Veracruz and to design bioreactors for each kind of hydrocarbon pollution. We found hydrocarbon contamination, octane and nonane in April 2018; and longer-chain and aromatic hydrocarbons in July 2018. Hydrocarbons concentration in water bodies, even exceeded the limit for discharge of produced waters of the oil industry. A microbial consortium composed of *Acinetobacter bouvetii*, *Defluviobacter lusatiensis* (before *Aquamicrobium lusatiense*), *Xanthomonas* and *Shewanella* was cultivated in an airlift bioreactor with 20 gL⁻¹ gasoline

and diesel as only carbon source in sea water medium and mineral medium. The results show that $91.39 \pm 1.32\%$ of diesel was absorbed in a sea water medium and $97.55 \pm 0.74\%$ in a mineral medium in 14 days. Furthermore, $95.05 \pm 4.75\%$ of gasoline was degraded in a sea water medium and $98.79 \pm 1.19\%$ in a mineral medium over the same time period. All of the experiments, the consortium showed that emulsifier activity increased, and the diameter of hydrocarbon droplets decreased with time. It is important to mention that part of the results presented here have been published in scientific magazines, posters, and papers from different congresses.

Key words: Coral reefs, Watersheds, Hydrocarbon pollution, Hydrocarbon bioremediation, Hydrocarbonoclastic consortium.

Introducción

Nota: Parte de los resultados de este artículo han sido publicados en revistas científicas (García-Cruz et al., 2019; Narciso-Ortiz et al., 2020a; Narciso-Ortiz et al., 2020b), ponencias y carteles de congresos.

El Golfo de México es una cuenca marina donde drenan importantes sistemas fluviales y cuencas (INEGI, 2015). El Estado de Veracruz tiene 8 cuencas hidrográficas que desembocan en el Golfo de México (CONAGUA, 2018), y alberga al Parque Nacional del Sistema Arrecifal Veracruzano (PNSAV) (Salas-Pérez y Granados-Barba, 2008), declarado Área Marina Protegida desde 1992, Sitio Ramsar (Humedales de Importancia Internacional) en 2004 e integrado a la Red Mundial de Reservas de Biosfera de la UNESCO desde 2006 (Ortiz-Lozano et al., 2018).

Las cuencas y los arrecifes son ecosistemas altamente productivos en el mundo. Los arrecifes proveen servicios a través de la pesca, el turismo, y la protección costera (Lamb et al., 2018); tienen una variedad de mecanismos para ciclar energía y nutrientes y forman la base de la cadena alimenticia (Haas et al., 2016). Las cuencas por su parte albergan diversas formas de vida, proporcionan agua doméstica, agrícola e industrial y sustentan la producción de alimentos basados en pesca y acuicultura (Arthington et al., 2010).

Los hidrocarburos tienen efectos tóxicos cuando son liberados en los ecosistemas acuáticos. Cuando entran en contacto con el agua, se propagan y forman una capa delgada en la superficie, evitando el correcto intercambio de gases entre el aire y el agua, bloqueando el paso de la luz solar, lo que impide la respiración y el proceso de

fotosíntesis; impactando principalmente al fitoplancton y zooplancton, lo que causa una afectación en la cadena alimenticia (Silva et al., 2014; Liu et al., 2016).

Dos casos de importancia referentes a contaminación de hidrocarburos en el Golfo de México se presentaron en: Junio de 1979, la explosión del pozo de exploración Ixtoc-I de Petróleos Mexicanos (PEMEX) en la bahía de Campeche derramando aproximadamente 475,000 ton³ de petróleo (Sun et al., 2015) y en Abril del 2010, la explosión en la plataforma de perforación *Deepwater Horizon* a 66 km al suroeste de la costa de Louisiana, derramándose un aproximado de 500,000 m³ de petróleo (Beyer et al., 2016). Las consecuencias ecológicas en el Golfo de México derivadas de estos acontecimientos han sido severas, afectando ecosistemas como las cuencas y los arrecifes (García-Cruz y Aguirre-Macedo, 2014).

En el estado de Veracruz se ha incrementado la contaminación debida en gran parte a la actividad de la industria petroquímica de la región de Coatzacoalcos (García-Cruz et al., 2018). En el año 2004 aconteció un derrame de petróleo crudo en el municipio de Nanchital, hasta la desembocadura del Río Coatzacoalcos, dejando perturbaciones significativas en el ecosistema de la cuenca (Albert et al., 2005). Existen otros factores en el estado de Veracruz que podrían contribuir a la contaminación por hidrocarburos, por ejemplo, las actividades portuarias (Froehner et al., 2018), incluyendo las obras de ampliación del Puerto de Veracruz (SEMARNAT, 2018) que en parte se están llevando a cabo en una zona que antes pertenecía al Arrecife Punta Gorda (Ortiz-Lozano et al., 2018); los derrames en mar abierto como el ocurrido en Septiembre del 2016 frente a costas del Puerto de Veracruz al incendiarse el buque Burgos que transportaba 81 mil barriles de diésel y 23 mil de gasolina

aproximadamente (PROFEPA, 2016), los transportes marítimos pesados o de pesca (García-Cruz *et al.*, 2018) por medio de las aguas de sentina arrojadas al mar deliberadamente. La contaminación en el Golfo de México es una realidad y también los factores que podrían propiciarla en la zona del estado de Veracruz, una opción para contrarrestar estos contaminantes es la biorremediación.

La biorremediación es un proceso tecnológico que utiliza microorganismos para eliminar o reducir contaminantes (Adams *et al.*, 2015). Los biorreactores son una técnica de biorremediación *ex situ*, los cuales son contenedores en donde los contaminantes son reducidos o removidos por una serie de reacciones biológicas producidas por microorganismos (Chibueze-Azubiike *et al.*, 2016). El grupo de microorganismos que son capaces de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y energía. reciben el nombre de hidrocarbonoclastas (García-Cruz y Aguirre-Macedo, 2014). Las bacterias hidrocarbonoclastas se reportan como el organismo de degradación más activo y se ha demostrado que los consorcios bacterianos presentan mayor porcentaje de degradación que los cultivos individuales (Varjani, 2017). En general se han sugerido dos estrategias biológicas del contacto entre las bacterias y los hidrocarburos: mecanismos de adhesión y emulsificación del hidrocarburo (Ron y Rosenberg, 2014).

En general, la contaminación en el estado de Veracruz está documentada pero no existen estudios sobre contaminación en cuencas y sistemas arrecifales del Golfo de México en el estado de Veracruz por hidrocarburos y la información acerca de alternativas de remediación en esta zona es escasa.

El objetivo general de la presente investigación fue evaluar la contaminación por hidrocarburos en cuencas y arrecifes del Golfo de México y diseñar un biorreactor *ex profeso* para cada tipo de contaminación. Específicamente, evaluar la contaminación por hidrocarburos en 4 puntos de las cuencas hidrográficas del Río Jamapa y Río Papaloapan y 4 puntos del Sistema Arrecifal Veracruzano, Sacrificios, De en medio, Gallega y Punta Gorda; y diseñar un biorreactor *ex profeso* para la degradación de hidrocarburos

por cada condición de contaminación, por medio de un consorcio microbiano hidrocarbonoclasta.

Materiales y métodos

La estrategia experimental se llevó a cabo en 2 etapas y en cada una de ella se llevaron a cabo las siguientes actividades (Figura 1):

Etapa 1. Diagnóstico de contaminación en las cuencas y sistemas arrecifales del Golfo de México en el Estado de Veracruz:

- a. Selección de los puntos de muestreo
- b. Recolección de muestras (NMX-AA-014-1980; PROY-NMX-AA-121/1-SCFI-2008)
- c. Análisis de las muestras recolectadas por cromatografía de gases (Valdivia-Rivera *et al.*, 2018)

Etapa 2. Diseño de biorreactores *ex profeso* para la degradación de hidrocarburos por cada condición de contaminación

- a. Selección del sistema biológico
- b. Diseño del medio de cultivo
- c. Selección del tipo de biorreactor
- d. Cinéticas de degradación
 - i. Sólidos suspendidos (Denis *et al.*, 2016)
 - ii. Hidrocarburo residual (Lizardi-Jiménez *et al.*, 2012)
 - iii. Actividad emulsificante (Amaral *et al.*, 2006)
 - iv. Diámetro de gota de hidrocarburo (García-Cruz *et al.*, 2019)
 - v. Modelamiento matemático por Gompertz (Zwietering, 1990)

Resultados y discusión

Selección de los puntos de muestreo

En las tablas 1 y 2 se muestran todos los puntos de cuencas y arrecifes seleccionados para su muestreo:

Artículos

Tabla 1. Puntos de muestreo de Sistemas Arrecifales.

#	Nombre geográfico	Municipio	Latitud (N)	Longitud (O)	Justificación
1	Arrecife Sacrificios	Veracruz, Veracruz (frente a)	19°10'38.233"	96°5'32.507"	Cercanía al derrame de gasolinas y diésel provenientes del buque Burgos (PROFEPA, 2016). Se llevan a cabo recorridos turísticos al arrecife, en lanchas; el uso de las lanchas motorizadas puede generar contaminación por hidrocarburos (Davenport y Davenport, 2006). Recibe las descargas de los ríos: La Antigua, Jamapa y Papaloapan (Salas-Pérez y Granados-Barba, 2008).
2	Arrecife de Enmedio	Alvarado, Veracruz (frente a)	19°6'24.090"	95°56'17.574"	Recibe las descargas de los ríos: La Antigua, Jamapa y Papaloapan (Salas-Pérez y Granados-Barba, 2008). Clasificada como subzona de uso público de destino de recorridos turísticos en embarcaciones motorizadas (DOF, 2017).
3	Arrecife Gallega	Veracruz, Veracruz (frente a)	19°13'19.235"	96° 7' 37.558"	Cercanía al derrame de gasolinas y diésel provenientes del buque Burgos (PROFEPA, 2016). Recibe el desagüe de los sistemas de ríos más grandes y del puerto de Veracruz (Jordán-Dahlgreen y Rodríguez-Martínez, 2003).
4	Arrecife Punta Gorda	Veracruz, Veracruz (frente a)	19°14'41.970"	96°10'32.942"	La autorización del proyecto denominado "Ampliación del Puerto de Veracruz en la Zona Norte" (SEMARNAT, 2013). dicha ampliación se llevará a cabo cerca del área arrecifal (Ortiz-Lozano <i>et al.</i> , 2018). Debido a los trabajos de expansión portuaria en 2012 se desincorporó parte de este arrecife del PNSAV (DOF, 2012).

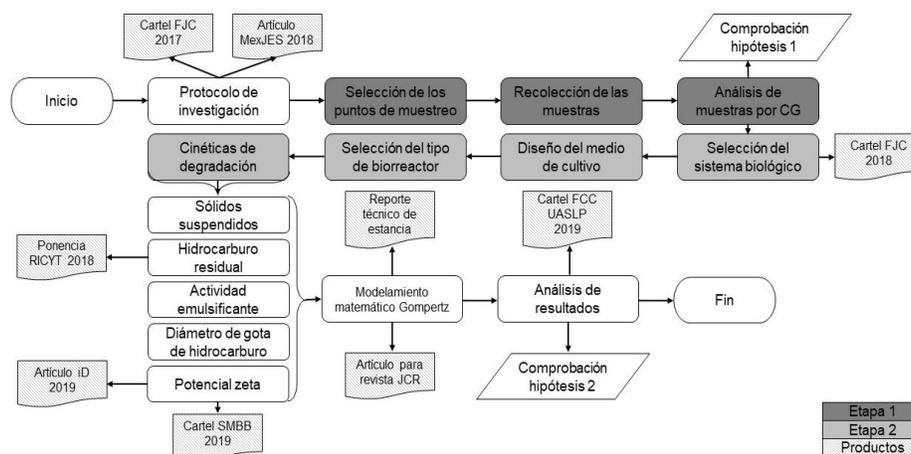


Figura 1. Diagrama de la estrategia experimental.

Tabla 2. Puntos de muestreo de Cuenca.

#	Región hidrológica	Cuenca hidrográfica	Subcuenca	Municipio	Latitud (N)	Longitud (O)
5	Papaloapan	Río Jamapa y otros	Río Jamapa	Boca del Río, Veracruz	19°05'39.0"	96°08'04.3"
6	Papaloapan	Río Jamapa y otros	Río La Antigua	La Antigua, Veracruz	19°19'08.4"	96°19'23.2"
7	Papaloapan	Río Jamapa y otros	Río Actopan-Barra de Chachalacas	Úrsulo Galván, Veracruz	19°25'02.3"	96°19'17.7"
8	Papaloapan	Río Papaloapan	Río Papaloapan	Tlacotalpan, Veracruz	18°36'47.2"	95°39'7.64"

Justificación

El río Jamapa descarga aproximadamente 2055 hm³ año⁻¹, el río La Antigua 2145 hm³ año⁻¹ y el río Papaloapan 42887 hm³ año⁻¹ (CONAGUA, 2016) directamente en el Sistema Arrecifal Veracruzano (Salas-Pérez y Granados-Barba, 2008; INEGI, 2010).

En La Antigua el transporte por medio de lancha se usa con fines turísticos y de movilidad de la población (Román-Jiménez *et al.*, 2011). En algunos estudios (Monroy-Dosta *et al.*, 2015) se ha detectado la presencia de bacterias del género *Pseudomonas* en el río Actopan lo que podría indicar contaminación.

El río Actopan desemboca en el Golfo de México por medio de la Barra de Chachalacas (INEGI, 2010), pudiendo arrastrar los contaminantes al océano.

Diagnóstico de la contaminación por hidrocarburos

La tabla 3 muestra los hidrocarburos encontrados en las muestras de los periodos abril y julio 2018, la concentración y el error estándar obtenido entre las repeticiones; es importante mencionar que los resultados mostrados solo contienen los hidrocarburos de los estándares, todas las muestras analizadas, tienen más picos detectados en los cromatogramas.

En todas las muestras de monitoreo del mes de abril se tuvo presencia de nonano y en 4 puntos de los 9 muestreados, también hubo presencia de octano. Después de una revisión bibliográfica, se realizó un análisis de una muestra de gasolina magna (PEMEX, 2015), en el cual se pudo identificar presencia de octano y nonano. De acuerdo a los resultados obtenidos es probable que los contaminantes de las muestras con presencia de octano y nonano sean derivados de gasolina.

En el muestreo realizado durante julio fueron identificados hidrocarburos de cadenas de entre 16 y 40 carbonos y fenantreno, además de octano y nonano, las concentraciones sobrepasan incluso el límite de concentración máxima de hidrocarburos de agua congénita antes de la descarga (15 ppm para descarga en agua dulce y 40 ppm para

descarga en zonas marinas) (NOM-143-SEMARNAT-2003). El arrecife Gallega y Punta Gorda presentaron más hidrocarburos y en mayor concentración en el segundo muestreo, siendo ambos puntos del PNSAV los más próximos a la actual construcción de la nueva zona del Puerto de Veracruz. Se analizó también una muestra de diésel (PEMEX, 2018) y una muestra de asfalto. Derivado del análisis y la revisión bibliográfica es probable que las otras fuentes de contaminación sean diésel y asfalto. El diésel podría provenir de las aguas de sentina de los transportes marítimos. Los hidrocarburos indicadores de presencia de asfalto fueron detectados, durante temporada de lluvias y turística (INEGI, 2017), lo que podría explicar, a mayor turismo, mayor tránsito por las carpetas asfálticas y la lluvia, podría estar arrastrando los contaminantes (León- Borges y Lizardi-Jiménez, 2017). En resumen, los 3 posibles contaminantes podrían ser: gasolina, diésel y asfalto, haciendo necesaria la propuesta de técnicas de biorremediación.

Selección del sistema biológico

En la tabla 4 se muestran los consorcios disponibles y los criterios de selección, los puntos en las casillas representan los criterios con los que cuenta el consorcio correspondiente.

Artículos

Tabla 3. Hidrocarburos identificados en muestras de monitoreo de cuencas y arrecifes en abril y julio 2018.

Arrecife o Cuenca	Abril 2018		Julio 2018	
	Hidrocarburo	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (ppm)	Hidrocarburo	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (ppm)
Arrecife Sacrificios	Octano	0.766 ± 0.127	Nonano	0.137 ± 0.002
	Nonano	2.866 ± 0.523		
SUMA		3.632 ± 0.65		0.137 ± 0.002
Arrecife de Enmedio	Octano	0.931 ± 0.186	Nonano	0.115 ± 0.006
	Nonano	2.37 ± 0.262		
SUMA		3.301 ± 0.448		0.115 ± 0.006
Arrecife Gallega	Nonano	3.567 ± 0.436	Fenantreno	0.078 ± 0.025
			Eicosano	0.041 ± 0.007
			Dotriacontano	67.914 ± 6.053
			Hexatriacontano	66.436 ± 21.562
SUMA		3.567 ± 0.436		134.469 ± 27.646
Arrecife Punta Gorda	Nonano	2.967 ± 0.302	Octano	0.028 ± 0.005
			Triacantano	0.038 ± 0.007
			Tetracontano	134.597 ± 9.578
SUMA		2.967 ± 0.302		134.663 ± 9.590
Río Jamapa	Nonano	2.328 ± 0.112	Nonano	0.037 ± 0.002
Río La Antigua	Nonano	2.033 ± 0.622	ND	--
Río Actopan-Barra de Chachalacas	Octano	1.882 ± 0.517	Hexadecano	0.035 ± 0.003
	Nonano	1.873 ± 0.244	Fenantreno	0.185 ± 0.019
			Dotriacontano	51.765 ± 13.811
			Tetracontano	18.511 ± 1.779
			Hexatriacontano	78.017 ± 9.787
			Octatriacontano	123.775 ± 31.709
			Tetracontano	155.032 ± 25.685
SUMA		3.755 ± 0.761		427.320 ± 82.794
Barra de Chachalacas zona mar	Octano	1.338 ± 0.233	Hexatriacontano	90.825 ± 17.653
	Nonano	2.308 ± 0.414	Tetracontano	183.752 ± 44.010
SUMA		3.646 ± 0.647		274.576 ± 61.664
Río Papaloapan	Nonano	2.545 ± 0.248	Nonano	0.141 ± 0.033
				ND - No detectado

Tabla 4. Selección del sistema biológico

Consorcio	Disponibilidad	Criterio					
		Hidrocarbonoclasta		Conocimiento de su origen	Mantenimiento sin perder su capacidad hidrocarbonoclasta	Identificado genéticamente	Capaz de crecer con residuos agro-industriales
Alifáticos	Aromáticos						
UAM-I	•	• a,b,h,i	• a,b,c,d,e,f,g,h,i	•a	•i	•d	•m
GOMEX 13	•	•j	•j	•j		•j	
Playa del Carmen	•	•k	•k	•k	•k		
Cancún	•	•l	•l	•l	•l		

a, Díaz-Ramírez *et al.*, 2003; b, Díaz-Ramírez *et al.*, 2007; c, Quijano *et al.*, 2010; d, Tzintzun-Camacho *et al.*, 2012; e, Lizardi-Jiménez *et al.*, 2012; f, Medina-Moreno *et al.*, 2013; g, Tec-Caamal *et al.*, 2018; h, Dutta *et al.*, 2018; i, Medina-Moreno *et al.*, 2005; j, García-Cruz *et al.*, 2018; k, Denis *et al.*, 2016; l, Lizardi-Jiménez *et al.*, 2013; m, Valdivia-Rivera *et al.*, 2019.

Artículos

El consorcio denominado "UAM-I" es el único que cumple con todos los criterios seleccionados, está integrado por: *Xanthomonas*, *Acinetobacter* *Bouvetti*, *Shewanella* y *Aquamicrobium lusatiense*.

El consorcio UAM-I fue aislado de la rizosfera de *Cyperus laxus* (Díaz-Ramírez *et al.*, 2003), una planta identificada en un pantano contaminado con hidrocarburos cercano a una refinería en el estado de Veracruz, que demostró poder crecer en presencia de estos contaminantes (Gallegos-Martínez *et al.*, 2000). El consorcio ha demostrado ser capaz de utilizar como única fuente de carbono: fracciones de hidrocarburo de petróleo maya (Díaz-Ramírez *et al.*, 2003; Medina-Moreno *et al.*, 2005), hexadecano (Lizardi-Jiménez *et al.*, 2012; Tzintzun-Camacho *et al.*, 2012; Medina-Moreno *et al.*, 2013; Nápoles-Álvarez, *et al.*, 2017) incluso a concentraciones altas (Tec-Caamal *et al.*, 2018), fenantreno, pireno (Nápoles-Álvarez, *et al.*, 2017) y diésel (Valdivia-Rivera *et al.*, 2019) también a altas concentraciones (Dutta *et al.*, 2018). Se ha demostrado que la principal forma de consumo del consorcio es mediante la emulsificación de los hidrocarburos (Medina-Moreno *et al.*, 2013; Dutta *et al.*, 2018), hasta en condiciones de alta salinidad (Nápoles-Álvarez *et al.*, 2017), en agua de mar y usando residuos agroindustriales (Valdivia-Rivera *et al.*, 2019).

Diseño del medio de cultivo

De acuerdo con el diagnóstico de presencia de hidrocarburos en los puntos de muestreo y a la posible fuente de ellos, se determinó utilizar

como fuente de carbono, diésel y gasolina (20 g L⁻¹), ambos se inocularon en la posible fuente de ellos, se determinó dos medios de cultivo: medio salino (MS) en agua de mar proveniente del Golfo de México (pH = 8.03 ± 0.04, [NaCl] = 32.90 ± 0.39 g L⁻¹) y medio mineral (MM) en agua destilada.

El inoculo inicial fue de 0.8 g L⁻¹ en peso seco del consorcio UAM-I, al sistema se le ajustó el pH al inicio de la operación a 6.5 con HCl 1 N (Lizardi-Jiménez *et al.*, 2012).

Selección del tipo de biorreactor

En la tabla 5 se muestra la selección del tipo de biorreactor de acuerdo con los criterios seleccionados.

Se seleccionó un biorreactor tipo *airlift* de vidrio con 0.9 L de volumen de trabajo (García-Cruz *et al.*, 2014) y aireación de 1.13 cm s⁻¹ introducido a través de un difusor de aire en forma de "L" con 7 orificios.

Cinéticas

Utilizando diésel como fuente de carbono

En la Figura 2 A, se muestra la concentración de sólidos suspendidos y diésel residual a lo largo del tiempo de cultivo, la Figura 3 A muestra las unidades de actividad emulsificante y el diámetro de gota del diésel a lo largo de tiempo de cultivo. En las Figuras 2 B y 3 B se observa el modelo de Gompertz para sólidos suspendidos, diésel residual, unidades de actividad emulsificante y diámetro de gota de diésel.

Tabla 5. Selección del tipo de biorreactor

Tipo de biorreactor	Criterio					
	Por lote	Aerobio	Menor esfuerzo cortante	Costo de energía bajo en comparación	Homogeneización eficiente	Mayor superficie de contacto
Tanque agitado	●a	●a				
Columna de burbujas	●a	●a	●b	●de		
Airlift	●a	●a	●bcd	●de	●cde	●cdef

a Van 't Riet y Van der Lans, 2011; b, Yusuf-Chisti y Jauregui-Haza, 2002; c, Lin y Chen, 2005; d, de Jesús *et al.*, 2017; e, Drandev *et al.*, 2016; f, Lizardi-Jiménez *et al.*, 2012

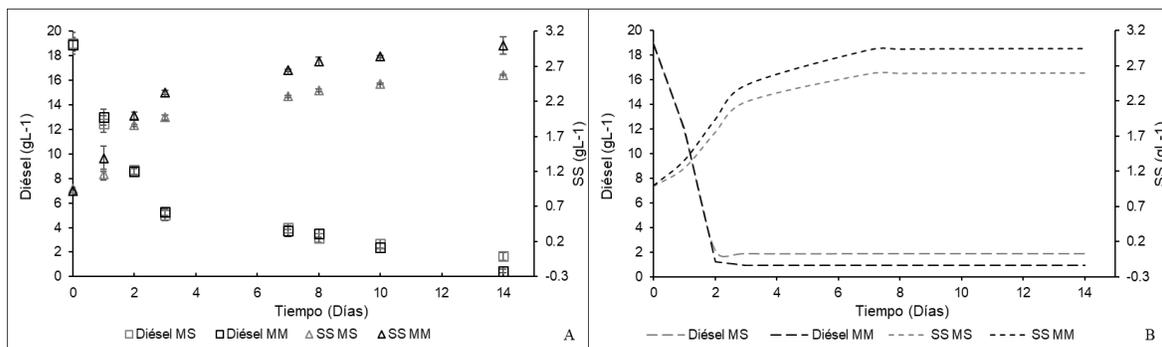


Figura 2. Producción de sólidos suspendidos (SS) y diésel residual a lo largo del tiempo de cultivo en medio salino (MS) y medio mineral (MM): A. Datos experimentales, B. Modelo de Gompertz

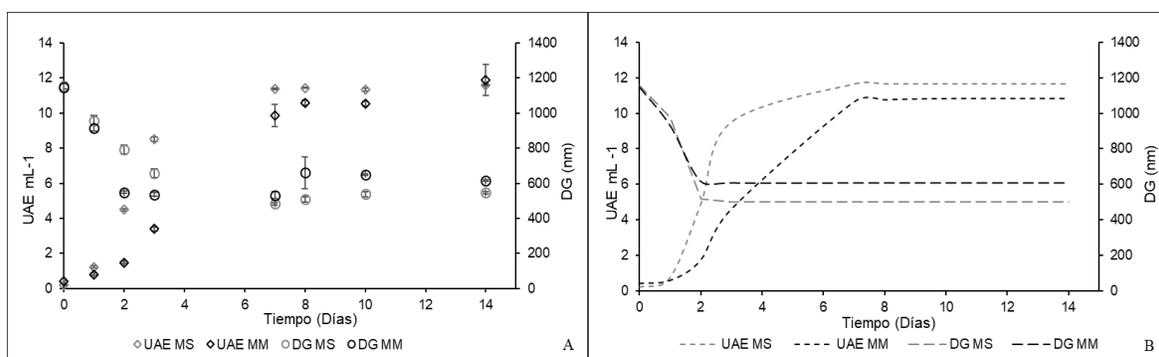


Figura 3. Unidades de actividad emulsificante (UAE) y diámetro de gota de diésel (DG) a lo largo del tiempo de cultivo en medio salino (MS) y medio mineral (MM): A. Datos experimentales, B. Modelo de Gompertz

Al final del tiempo de cultivo se obtuvo un $91.39 \pm 1.32\%$ de degradación de diésel en medio salino (Fig. 2 A) con un rendimiento de 0.094 ± 0.003 g SS g diésel⁻¹.

Este porcentaje de degradación y el rendimiento fue menor que en el estudio previo de Valdivia-Rivera *et al.*, 2019, donde se utilizó el mismo consorcio microbiano, pero en la presente investigación la concentración de diésel fue de 7 g L^{-1} arriba (Tabla 6).

Se muestra que el diámetro de las gotas de diésel disminuye a partir del primer día, e incrementan las unidades de actividad emulsificante. Una unidad de actividad emulsificante (UAE) es definida como "la absorbancia medida por 100 por el factor de dilución" (Patil y Chopade, 2001). Melgarejo-Torres *et al.* (2017) sugiere que la producción de bioemulsificantes probablemente estabiliza el tamaño de las gotas de hidrocarburo.

El diésel en medio mineral se degradó un $97.55 \pm 0.74\%$ al día 14. En el estudio realizado por Dutta *et al.*, 2018, el porcentaje de degradación fue menor (cerca del 80%), pero la concentración inicial fue de 130 g L^{-1} . En investigaciones donde se utilizó hexadecano a concentraciones de 13 g L^{-1} (Lizardi-Jiménez *et al.*, 2012; Medina-Moreno *et al.*, 2013) la degradación fue prácticamente total, esto puede deberse a que el hexadecano es más puro y por lo tanto más fácil de asimilar para el consorcio. Cuando la concentración inicial de hexadecano fue mayor (77 g L^{-1}) en la investigación de Tec-Caamal *et al.* (2018), el porcentaje de degradación fue menor (Tabla 7).

A partir de los parámetros cinéticos (Tabla 8), se puede deducir que la degradación de diésel en medio salino inició al 0.1 días, y la producción de biomasa al 0.3 días. Probablemente el consorcio comenzó a

Artículos

Tabla 6. Comparación de resultados de degradación de diésel con otras investigaciones en medio salino

Referencia	Fuente de carbono	Concentración inicial HC (g L ⁻¹)	Concentración final HC (g L ⁻¹)	Día de agotamiento	Porcentaje de degradación	Rendimiento g SS g diésel ⁻¹
Valdivia-Rivera <i>et al.</i> , 2019	Diésel	13	0	12	≈ 100	0.22 ± 0.03
Esta investigación	Diésel	20	1.649 ± 0.308	14	91.39 ± 1.32	0.094 ± 0.003

Tabla 7. Comparación de resultados de degradación de diésel con otras investigaciones en medio mineral

Referencia	Fuente de carbono	Concentración inicial HC (g L ⁻¹)	Concentración final HC (g L ⁻¹)	Día de agotamiento	Porcentaje de degradación	Rendimiento g SS g diésel ⁻¹
Lizardi-Jiménez <i>et al.</i> , 2012	Hexadecano	13	0	6	≈ 100	0.58 ± 0.02
Medina-Moreno <i>et al.</i> , 2013	Hexadecano	13	0	10	≈ 100	≈ 0.61
Tec-Caamal <i>et al.</i> , 2018	Hexadecano	77	≈ 24.64	14*	60.78	0.24 ± 0.001
Dutta <i>et al.</i> , 2018	Diésel	130	≈ 25	10*	≈ 81	≈ 0.36
Esta investigación	Diésel	20	1.649 ± 0.308	14	97.55 ± 0.74	0.112 ± 0.005

Tabla 8. Parámetros cinéticos de la degradación de diésel a partir del modelo Gompertz

Parámetro cinético	Medio salino				Medio mineral			
	SS	Diésel residual	UAE	DG	SS	Diésel residual	UAE	DG
Lag (d)	0.276	0.100	0.452	0.092	0.000	0.125	0.800	0.050
μ _m (d ⁻¹)	0.361	---	---	---	0.384	---	---	---
Q _m (d ⁻¹)	---	17.732	---	---	---	17.805	---	---
UAE _m (d ⁻¹)	---	---	2.280	---	---	---	1.214	---
DG _m (d ⁻¹)	---	---	---	21.948	---	---	---	22.809
Ti (d)	1.296	0.350	1.097	0.355	1.111	0.375	1.800	0.300

Lag (d), fase lag; μ_m(d⁻¹), tasa específica máxima de crecimiento; Q_m(d⁻¹), tasa específica máxima de consumo; UAE_m (d⁻¹), tasa específica máxima de unidades de actividad emulsificante; DG_m(d⁻¹), tasa específica máxima de disminución de diámetro de gota; Ti (d), tiempo de inflexión

consumir diésel a partir de las gotas emulsionadas que comenzaron su disminución de diámetro a los 0.092 días y se aceleró a los 0.355 días, prácticamente al mismo tiempo que se aceleró el consumo de diésel. Las unidades de actividad emulsificante tuvieron una fase lag de 0.4 días, más larga que la producción de sólidos suspendidos,

pero se aceleró su producción antes que la del consorcio microbiano, a los 1.097 días. Algunos trabajos asocian la producción de bioemulsificante con la producción de biomasa observándose una relación paralela entre la producción de biomasa y la actividad emulsificante (Gudiña *et al.*, 2015).

Los sólidos suspendidos en medio mineral no presentaron fase lag, pero las tasas

máximas de crecimiento y degradación de diésel fueron similares a las obtenidas en medio salino. Lo que sugiere que el consorcio UAM-I no necesita adaptarse al medio mineral, pero si le toma 0.276 días adaptarse al medio salino.

En trabajos donde se utiliza diésel como fuente de carbono el diámetro de la gota fue de 1600 nm a 600 nm aproximadamente (García-Cruz *et al.*, 2019) y Melgarejo-Torres *et al.*, (2017) obtuvo diámetros finales de gota de diésel de ≈ 560 nm, ambos similares a los resultados del presente trabajo. A pesar de que la fase lag de diámetro de gota de diésel fue menor en medio mineral y que la tasa específica máxima de disminución de diámetro de gota fue mayor en medio mineral, el tiempo de inflexión en ambos medios fue similar y el tamaño de gota fue menor al final del cultivo en medio salino. Es probable que en medio salino el consorcio tenga la necesidad de producir emulsificantes antes y con mayor tasa, debido a que la presencia de sal inhibe la formación de gotas. Se ha demostrado que la concentración de microgotas disminuye al aumentar la concentración salina (Silva *et al.*, 2017).

Utilizando gasolina como fuente de carbono

Está investigación es la primera evidencia de degradación de gasolina por medio del consorcio UAM-I. En medio salino el porcentaje de degradación fue de 95.05 ± 4.75 % con un rendimiento de 0.074 ± 0.008 g SS g gasolina⁻¹ y en medio mineral fue de 98.79 ± 1.19 % con un rendimiento de 0.104 ± 0.015 g SS g gasolina⁻¹.

Los porcentajes de degradación no presentan diferencia significativa, pero en cuanto al rendimiento, el mejor lo tiene el medio mineral, con un comportamiento similar que utilizando diésel como fuente de carbono.

En la tabla 9, podemos observar que la degradación de gasolina en medio salino tuvo una fase lag de 0, acelerando su consumo el 0.27 días. La fase lag de producción de sólidos suspendidos fue de 1.2 días y el crecimiento se aceleró hasta los 3.2 días, es decir, el consorcio inicio el consumo de gasolina antes de comenzar a crecer. Los diámetros de las gotas de gasolina disminuyeron conforme las unidades de actividad emulsificante aumentaron (Melgarejo-Torres *et al.*, 2017). En medio salino el consorcio presentó prácticamente el doble unidades de actividad emulsificante en comparación con el medio mineral al final del tiempo de cultivo. Esto puede deberse a que la concentración de microgotas tiende a disminuir al aumentar la concentración salina (Shi *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017). En el medio mineral, la producción de sólidos suspendidos presentó una menor fase lag (0.44 días) y una mayor tasa específica máxima de crecimiento que en medio salino, un comportamiento similar que, utilizando diésel como fuente de carbono, es decir, el consorcio necesitó más tiempo en adaptarse fisiológicamente al medio salino (Maier y Pepper, 2015).

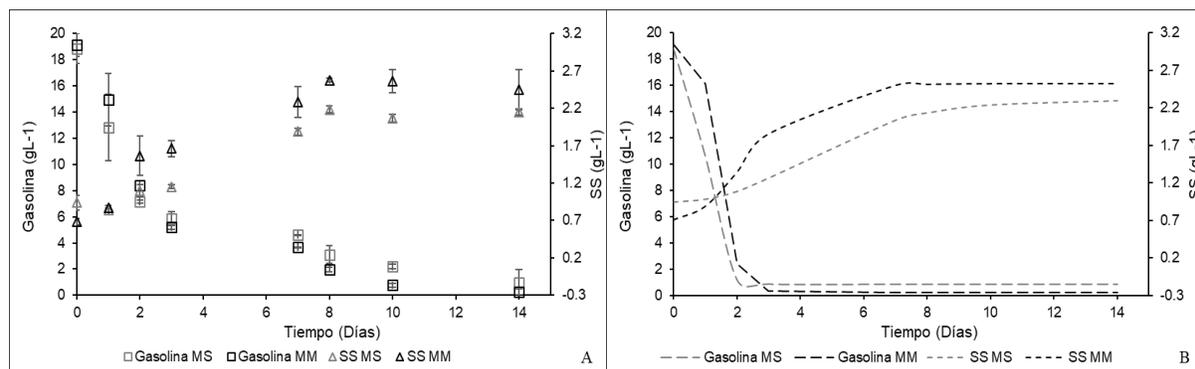


Figura 4. Producción de SS y gasolina residual a lo largo del tiempo de cultivo en medio salino MS y medio mineral (MM). A. Datos experimentales, B. Modelo de Gompertz

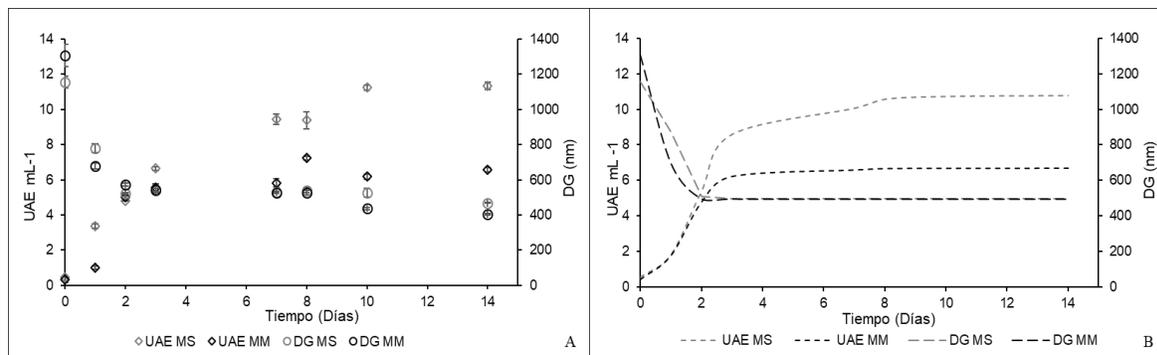


Figura 5. UAE y diámetro de gota de gasolina (DG) a lo largo del tiempo de cultivo en medio salino (MS) y medio mineral (MM). A. Datos experimentales, B. Modelo de Gompertz

Tabla 9. Parámetros cinéticos de la degradación de gasolina a partir del modelo Gompertz

Parámetro cinético	Medio salino				Medio mineral			
	SS	Gasolina residual	UAE	DG	SS	Gasolina residual	UAE	DG
Lag (d)	1.200	0.000	0.000	0.025	0.444	0.000	0.125	0.000
$\mu_m(d^{-1})$	0.166	---	---	---	0.430	---	---	---
$Q_m(d^{-1})$	---	16.470	---	---	---	12.515	---	---
$UAE_m(d^{-1})$	---	---	0.706	---	---	---	0.868	---
$DG_m(d^{-1})$	---	---	---	23.103	---	---	---	26.265
Ti (d)	3.200	0.270	1.667	0.275	1.556	0.357	1.375	0.200

Lag (d), fase lag; $\mu_m(d^{-1})$, tasa específica máxima de crecimiento; $Q_m(d^{-1})$, tasa específica máxima de consumo; $UAE_m(d^{-1})$, tasa específica máxima de unidades de actividad emulsificante; $DG_m(d^{-1})$, tasa específica máxima de disminución de diámetro de gota; Ti (d), tiempo de inflexión

Derecho a un medio ambiente sano

La Ley de Hidrocarburos (2016) Art. 95 declara de manera general que la industria de hidrocarburos deberá seguir criterios para la conservación de los ecosistemas, pero existen más industrias que pueden generar estos contaminantes. Las únicas concentraciones reguladas de hidrocarburos en cuerpos de agua, se encuentran en la NOM-143-SEMARNAT-2003 para aguas congénitas, es decir, en el punto de descarga, donde se declara que debe ser menor de 15 ppm para poder descargar en agua dulce y menor de 40 ppm para poder descargar en zonas marinas y la NOM-127-SSA1-1994 para agua de uso y consumo humano, que solo regula benceno, etilbenceno, tolueno y xileno con límites permisibles de 10, 300, 700 y 500 ppb respectivamente.

Anteriormente la NOM-015-SCT4-1994 también regulaba la concentración de HC en el agua de descarga de los sistemas separadores de agua e hidrocarburos instalados en las embarcaciones, pero esta norma fue cancelada en septiembre del 2010 (DOF, 2010). Actualmente la concentración límite de hidrocarburos en aguas de sentina (aguas de descarga de embarcaciones) está regulada por la Organización Marítima Internacional (OMI), la cual también es de 15 ppm (OMI, 1992; 2003). Actualmente en México no existe una norma que regule la concentración de HC en cuerpos de agua dulce y marinos aun cuando varios de ellos pueden afectar el ambiente y la salud humana. Los datos obtenidos en esta investigación podrían ser la base para la implementación del principio de precaución, es decir, medidas efectivas para prevenir el riesgo de daños graves e irreversibles al ambiente (Lizardi-Jiménez y Aguirre-García 2018).

Conclusiones

Existe contaminación por hidrocarburos en los puntos de las cuencas y los arrecifes muestreados en Golfo de México en el estado de Veracruz. Fue identificado octano y nonano en el mes de abril 2018 en más de 0.7 ppm e hidrocarburos de cadenas más largas y aromáticos, en julio 2018, como:

fenantreno (0.185 ± 0.019 ppm), dotriacontano (67.914 ± 6.053 ppm), tetratriacontano (18.511 ± 1.779 ppm), hexatriacontano (90.825 ± 17.653 ppm), octatriacontano (123.775 ± 31.709 ppm), tetracontano (183.752 ± 44.010 ppm), tetratriacontano (134.597 ± 9.578 ppm).

El 50% de ellos, incluso excediendo el límite de hidrocarburos permitidos en aguas congénitas a la descarga, de 15 ppm en agua dulce y 40 ppm en cuerpos marinos (NOM-143-SEMARNAT-2003).

Bajo los criterios de diseño del biorreactor, el consorcio microbiano UAM-I fue capaz de degradar gasolina y diésel en una concentración de 20 g L^{-1} . Fue degradado $91.39 \pm 1.32\%$ de diésel en medio salino y $97.55 \pm 0.74\%$ en medio mineral. La gasolina fue degradada en $95.05 \pm 4.75\%$ en medio salino y $98.79 \pm 1.19\%$ en medio mineral. La degradación en medio salino fue en menor porcentaje, probablemente debido a la concentración de sal en el medio ($32.36 \pm 0.45 \text{ gL}^{-1}$) (Nápoles-Álvarez *et al.*, 2017). En todos los experimentos se observó incremento en las unidades de actividad emulsificante.

Las leyes mexicanas protegen las aguas de contaminación de forma general, pero es necesario regular la concentración de HC en los cuerpos de agua para poder asegurar que la población goza de su derecho a un medio ambiente sano.

Referencias

- Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., y Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), 28-39.
- Albert, L. A., Bozada-Robles, L., Uribe-Juárez, J., López-Portillo, J., Méndez-Alonzo, R.,

Antonio-Soto, K., Torres-Nachón, C. J. (2005). Evaluación Instantánea de los Efectos del Derrame de Petróleo en el Área de Nanchital – Coatzacoalcos, Veracruz (22 de Diciembre de 2004). En A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot, y C. Agraz-Hernández, Golfo de México: Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias (págs. 665-680). Campeche: S y G editores.

Amaral, P. F. F., Da Silva, J. M., Lehocky, B. M., Barros-Timmons, A. M. V., Coelho, M. A. Z., Marrucho, I. M., y Coutinho, J. A. P. (2006). Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 41(8), 1894-1898.

Arthington, Á. H., Naiman, R. J., McClain, M. E., y Nilsson, C. (2010). Preserving the biodiversity and ecological services of rivers: new challenges and research opportunities. *Freshwater Biology*, 55(1), 1-16.

Beyer, J., Trannum, H. C., Bakke, T., Hodson, P. V., y Collier, T. K. (2016). Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 110(1), 28-51.

Chibueze-Azubuiké, C. C., Chikere, C. B., y Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 180.

CONAGUA (2018). Estadísticas del agua en México, 26-69. Disponible en: http://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM_2018.pdf

CONAGUA (2016). Atlas del agua en México 2016. Disponible en: http://201.116.60.25/publicaciones/AAM_2016.pdf

Davenport, J., y Davenport, J. L. (2006). The impact of tourism and personal leisure transport on coastal environments: A review. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 67(1-2), 280-292.

- De Jesús, S. S., Moreira Neto, J., y Maciel Filho, R. (2017). Hydrodynamics and mass transfer in bubble column, conventional airlift, stirred airlift and stirred tank bioreactors, using viscous fluid: A comparative study. *Biochemical Engineering Journal*, 118, 70–81.
- Denis, B., Pérez, O. A., Lizardi-Jiménez, M. A., y Dutta, A. (2016). Numerical evaluation of direct interfacial uptake by a microbial consortium in an airlift bioreactor. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 119, 542–551.
- Díaz-Ramírez, I. J., Ramírez-Saad, H., Gutiérrez-Rojas, M., y Favela-Torres, E. (2003). Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and a defined mixed culture isolated from *Cyperus laxus* rhizosphere soil in a contaminated site. *Canadian Journal of Microbiology*, 49: 755-761.
- Díaz-Ramírez, I.J.; Escalante-Espinosa, E.; Favela-Torres, E.; Gutiérrez-Rojas, M. y Ramírez-Saad, H. (2007). Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62 (1), 21–30.
- DOF (2010). AVISO de cancelación de la NOM-015-SCT4-1994. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5161176&fecha=29/09/2010
- DOF (2012). DECRETO que modifica al diverso por el que se declara Area Natural Protegida, con el carácter de Parque Marino Nacional, la zona conocida como Sistema Arrecifal Veracruzano. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5280548&fecha=29/11/2012
- DOF. (2017). ACUERDO por el que se dan a conocer los estudios técnicos de aguas nacionales superficiales de la Cuenca Hidrológica Río Actopan de la Región Hidrológica denominada Papaloapan. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5512819&fecha=12/02/2018.
- Drandev, S., Kalin, P., y Dimitre, K. (2016). Study of the hydrodynamics and mass transfer in a rectangular air-lift bioreactor, *Chemical Engineering Science*, 146, 180-188.
- Dutta, A., Valdivia-Rivera, S., y Lizardi-Jiménez, M. A. (2018). Simultaneous Diesel and Oxygen Transfer Rate on the Production of an Oil-degrading Consortium in an Airlift Bioreactor: High-dispersed Phase Concentration. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 16 (10).
- Froehner, S., Rizzi, J., Vieira, L. M., y Sanez, J. (2018). PAHs in Water, Sediment and Biota in an Area with Port Activities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 75(2), 236-246.
- Gallegos-Martínez, M., Gómez Santos, A., González Cruz, L., Montes de Oca García, M. A., Yáñez Trujillo, L., Zermeño Eguía Lis, J. A., y Gutiérrez-Rojas, M. (2000). Diagnostic and resulting approaches to restore petroleum-contaminated soil in a Mexican tropical swamp. *Water Science and Technology*, 42(5-6), 377-384.
- García-Cruz, N. U., Canul-Puc, R., Sanchez-Avila, J., Gold-Bouchot, G., y Aguirre-Macedo, M. L. (2014). Potential crude oil degradation by a microbial consortium isolated from the Gulf of Mexico. *En Environmental Biotechnology and Engineering* (684-692). Bonumedia .
- García-Cruz, N. U., Sánchez-Avila, J. I., Valdés-Lozano, D., Gold-Bouchot, G., y Aguirre-Macedo, L. (2018). Biodegradation of hexadecane using sediments from rivers and lagoons of the Southern Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 128(January), 202–207.
- García-Cruz, N. U., Valdivia-Rivera, S., Narciso-Ortiz, L., García-Maldonado, J. Q., Uribe-Flores, M. M., Aguirre-Macedo, M. L., y Lizardi-Jiménez, M. A. (2019). Diesel uptake by an indigenous microbial consortium isolated from sediments of the Southern Gulf of Mexico: Emulsion characterization. *Environmental Pollution*, 250, 849-855.

- García-Cruz, N. U., y Aguirre-Macedo, M. L. (2014). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. *Golfo de México: Contaminación e Impacto Ambiental, Diagnóstico y Tendencias*, (November), 641–652.
- Gudiña, E. J., Pereira, J. F., Costa, R., Evtuguin, D. V., Coutinho, J. A., Teixeira, J. A., y Rodrigues, L. R. (2015). Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. *Microbial cell factories*, 14(1), 14.
- Haas, A. F., Fairouz, M. F., Kelly, L. W., Nelson, C. E., Dinsdale, E. A., Edwards, R. A., y Lim, Y. W. (2016). Global microbialization of coral reefs. *Nature Microbiology*, 1(6), 16042.
- INEGI (2010). *HIDROLOGÍA*. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/temas/hidrologia/>
- INEGI. (2015). *Catálogo de Territorio Insular Mexicano*. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/reinat/territorioinsular/>
- INEGI. (2017). *Vehículos de motor registrados en circulación*. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/proyectos/bd/continuas/transporte/vehiculos.asp?s=est>
- Jordán-Dahlgreen, E., y Rodríguez-Martínez, R. E. (2003). En *The Atlantic coral reefs of Mexico*. Elsevier Science, 131-158.
- Lamb, J. B., Willis, B. L., Fiorenza, E. A., Couch, C. S., Howard, R., Rader, D. N., y Harvell, C. D. (2018). Plastic waste associated with disease on coral reefs. *Science*, 359(6374), 460-462.
- León-Borges, J. A., y Lizardi-Jiménez, M. A. (2017). Hydrocarbon pollution in underwater sinkholes of the Mexican Caribbean caused by tourism and asphalt: Historical data series and cluster analysis. *Tourism Management*, 63, 179-186.
- Ley de Hidrocarburos. Disponible en: http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LHidro_200521.pdf
- Lin, T. J., y Chen, P. C. (2005). Studies on hydrodynamics of an internal-loop airlift reactor in gas entrainment regime by particle image analyzer. *Chemical Engineering Journal*, 108(1–2), 69–79.
- Liu, Z., Liu, J., Gardner, W. S., Shank, G. C., y Ostrom, N. E. (2016). The impact of Deepwater Horizon oil spill on petroleum hydrocarbons in surface waters of the northern Gulf of Mexico. *Deep Sea Research Part II. Topical Studies in Oceanography*, 129, 292-300
- Lizardi-Jiménez, M. A., Saucedo-Castañeda, G., Thalasso, F., y Gutiérrez-Rojas, M. (2012). Simultaneous hexadecane and oxygen transfer rate on the production of an oil-degrading consortium in a three-phase airlift bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 160-165.
- Lizardi-Jiménez, M. A., Leal-Bautist, R. M., Ordaz, A., y Reyna-Velarde, R. (2013). Airlift bioreactors for hydrocarbon water pollution remediation in a tourism development pole. *Desalination and Water Treatment*, 1-6.
- Lizardi-Jiménez, M. A., y Aguirre-García, G. J. (2018). Carcinogenic Hydrocarbon Pollution in 8 Quintana Roo's Sinkholes: Biotechnology for Remediation and Social Participation for Prevention. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 16(10).
- Maier, R. M., y Pepper, I. L. (2015). Bacterial growth. En *Environmental microbiology* (37-56). Academic Press.
- Medina-Moreno, S. A., Jimenez-Gonzalez, A., Gutierrez-Rojas, M., y Lizardi-Jimenez, M. A. (2013). Hydrocarbon pollution studies of underwater sinkholes along Quintana Roo as a function of tourism development in the Mexican Caribbean. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 509-516.
- Medina-Moreno, S.A.; Huerta-Ochoa, S. y G.-R. (2005). Hydrocarbon biodegradation in oxygen-limited sequential batch reactors by consortium from weathered, oil-contaminated soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(186), 231–239.

- Melgarejo-Torres, R., De la Concha-Gómez, A. D., Calva-Hernández, R., y Lizardi-Jiménez, M. A. (2017). Study of variation in droplet size of an aqueous–diesel emulsion formed by an oil-degrading microbial consortium. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 157, 951-957.
- Monroy-Dosta, M. C., Castro-Mejía, G., Ciprés-Chávez, Hernández-Sánchez, A., Reyes-Ruiz, A. N., Castro-Mejía, J., y Ramírez-Tórres, J. A. (2007). Identificación de microorganismos heterótrofos en la desembocadura del Río Actopan Chachalacas, Veracruz. *Revista digital E-BIOS*, 38-44.
- Nápoles-Álvarez, J., Ábalos-Rodríguez, A., Rodríguez-Pérez, S., Sánchez-Vázquez, V., y Gutiérrez-Rojas, M. (2017) "Airlift bioreactor using a bacterial mixed culture improves hydrocarbon degradation in contaminated salty water.", *Desalination and Water Treatment*, 86 (2017), pp. 28-34.
- NMX-AA-014-1980. CUERPOS RECEPTORES. - MUESTREO. Disponible en: http://legismex.mty.itesm.mx/normas/aa/aa014-1980_09.pdf
- Narciso-Ortiz, L., Coreño-Alonso, A., Mendoza-Olivares, D., Lucho-Constantino, C. A., y Lizardi-Jiménez, M. A. (2020). Baseline for plastic and hydrocarbon pollution of rivers, reefs, and sediment on beaches in Veracruz State, México, and a proposal for bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(18), 23035-23047.
- Narciso-Ortiz, L., Vargas-García, K. A., Vázquez-Larios, A. L., Quiñones-Muñoz, T. A., Hernández-Martínez, R., y Lizardi-Jiménez, M. A. (2020b). Coral reefs and watersheds of the Gulf of Mexico in Veracruz: Hydrocarbon pollution data and bioremediation proposal. *Regional Studies in Marine Science*, 35, 101155.
- NOM-015-SCT4-1994. (1994). Sistema de separadores de agua e hidrocarburos. Requisitos y especificaciones. Disponible en: <https://catalogonacional.gob.mx/FichaRegulacion?regulacionId=10120>
- NOM-127-SSA1-1994. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=2063863&fecha=22/11/2000
- NOM-143-SEMARNAT-2003. (2003). Que establece las especificaciones ambientales para el manejo de agua congénita asociada a hidrocarburos. Disponible en: <http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/1337/1/nom-143-semarnat-2003.pdf>
- OMI (1992). Guidelines and specifications for pollution prevention equipment for machinery space bilges of ships. Disponible: https://puc.overheid.nl/doc/PUC_2583_14/1/
- OMI (2003). Revised guidelines and specifications for pollution prevention equipment for machinery space bilges of ships. Disponible en: https://www.liscr.com/sites/default/files/liscr_imo_resolutions/MEPC%20Resolution%20107_49%2C%20as%20amended.pdf
- Ortiz-Lozano, L., Colmenares-Campos, C., y Gutiérrez-Velázquez, A. (2018). Submerged Coral Reefs in the Veracruz Reef System, Mexico, and its implications for marine protected area management. *Ocean & Coastal Management*, 158, 11-23.
- Patil, J. R., y Chopade, B. A. (2001). Studies on bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. *Journal of Applied Microbiology*, 91(2), 290-298.
- PEMEX (2015). Gasolina con contenido mínimo 87 octanos Hoja de datos de seguridad. Disponible en: <https://www.distribuidorariopanuco.com/pdfs/magna.pdf>
- PEMEX (2018). Diésel Hoja de Datos de Seguridad. Disponible en: <https://distribuidorariopanuco.com/pdfs/diesel.pdf>

- PROFEPA (2016). SEMAR, ASEA, PROFEPA y PEMEX realizan sobrevuelo donde se localiza el buque tanque Burgos. Disponible en: <https://www.gob.mx/profepa/videos/semar-asea-profepa-y-pemex-realizan-sobrevuelo-donde-se-localiza-el-buquetanque-burgos>
- PROY-NMX-AA-121/1-SCFI-2008. (2008). ANÁLISIS DE AGUA - AGUAS NATURALES EPICONTINENTALES, COSTERAS Y MARINAS. Disponible en: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/AA/proy0909/proy-nmx-aa-121-1-scfi08.pdf>
- Quijano, G., Huerta-ochoa, S., y Gutie, M. (2010). Assessment of the limiting step of mass transfer in n -hexadecane biodegradation in a bubble column reactor. *Water Science & Technology*, 62.4, 906–914.
- Román-Jiménez, A. R., Mendoza-Briseño, M. A., Velázquez Martínez, A., Martínez-Méneez, M. R., Torres-Rojo, J. M., y Ramírez-Maldonado, H. (2011). Usos y riesgos del agua de la cuenca La Antigua, Veracruz, México. *Madera y Bosques*, 29-48.
- Ron, E. Z., y Rosenberg, E. (2014). Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in biotechnology*, 27, 191-194.
- Salas-Pérez, J. J., y Granados-Barba, A. (2008). Oceanographic characterization of the Veracruz reefs system. *Atmósfera*, 281-301.
- SEMARNAT (2018). Nuevo Puerto de Veracruz, ejemplo de sustentabilidad. Disponible en: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/nuevo-puerto-de-veracruz-ejemplo-de-sustentabilidad>
- SEMARNAT (2013). Cuencas hidrográficas. Fundamentos y perspectivas para su manejo y gestión. Disponible en: https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2013/Cuencas_fi_nal_2014.pdf
- Shi, C., Zhang, L., Xie, L., Lu, X., Liu, Q., Mantilla, C. A., y Zeng, H. (2016). Interaction mechanism of oil-in-water emulsions with asphaltenes determined using droplet probe AFM. *Langmuir*, 32(10), 2302-2310.
- Silva, P. S., Zhdanov, S., Starov, V. M., y Holdich, R. G. (2017). Spontaneous emulsification of water in oil at appreciable interfacial tensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 521, 141-146.
- Silva, R., Almeida, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., y Sarubbo, L. (2014). Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 12523-12542.
- Sun, S., Hu, C., y Tunnell Jr, J. W. (2015). Surface oil footprint and trajectory of the Ixtoc-I oil spill determined from Landsat/MSS and CZCS observations. *Marine pollution bulletin*, 101(2), 632-641.
- Tec-Caamal, E. N., Jiménez-González, A., Ramírez-Vargas, R., Medina-Moreno, S. A., y Lizardi-Jiménez, M. A. (2018). Hydrodynamic effect of dispersed phase fraction on the mass transfer and uptake rate of hexadecane by an oil-degrading microbial consortium in an airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 130, 47–54.
- Tzintzun-Camacho, O., Loera, O., Ramírez-Saad, H., y Gutiérrez-Rojas, M. (2012). Comparison of mechanisms of hexadecane uptake among pure and mixed cultures derived from a bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation* 70, 1-7
- Valdivia-Rivera, S., Martínez-Cano, A. K., Aguirre-García, G., y Lizardi-Jiménez, M. A. (2018). Hydrocarbon water-pollution related to chronic kidney disease in Tierra Blanca, a perfect storm. *Environment international*, 121, 1204-1209
- Valdivia-Rivera, S., Varela-Santos, E del C., Quiñones-Muñoz, T. A., Hernández-Martínez, R., y Lizardi-Jiménez, M. A. (2019). Production of hydrocarbon-degrading microorganisms using agricultural residues of *Mangifera indica* L. and *Carica papaya* as carbon source. *3 Biotech*, 9(2), 43.

Artículos

Van 't Riet, K., y Van der Lans, R. (2011). Mixing in Bioreactor Vessels. En M. Moo-Young, *Comprehensive Biotechnology* (64-77). Barcelona, España: Elsevier.

Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277-286.

Yusuf Chisti, Y., y Jauregui-Haza, U. J. (2002). Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 10(2), 143–153.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. y Van'T Riet K. (1990) "Modeling of the bacterial growth curve", *Applied and environmental microbiology*, 56, pp. 1875-1881.

The classical secretion pathway during recombinant protein production in CHO cells: an omics perspective

Saumel Pérez-Rodríguez, Mauricio A. Trujillo-Roldán, Norma A. Valdez-Cruz*

Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas, Unidad de Bioprocesos,
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones
Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México,
Ciudad de México, México, CP 04510.

adri@iibiomedicas.unam.mx

Resumen

El desarrollo y la producción de proteínas recombinantes terapéuticas son primordiales para el tratamiento de diversas enfermedades. A pesar de que muchas de estas proteínas son producidas en células de ovario de hámster chino (CHO), aún se buscan estrategias para mejorar sus productividades. Las tecnologías ómicas han permitido identificar de forma profunda varios procesos que impactan en la expresión de estas proteínas. Sin embargo, dado que estos estudios se han realizado usando células completas, los resultados se encuentran sesgados hacia aquellas proteínas más abundantes. Por consiguiente, nuestro grupo de investigación ha empleado la proteómica subcelular como una alternativa viable para identificar proteínas de menor abundancia que participan en procesos asociados a la productividad celular, con énfasis en la vía clásica de secreción, pues esta ha sido descrita como un cuello de botella durante la síntesis y secreción de proteínas. Como resultado, el fraccionamiento subcelular permitió la identificación de 386 nuevos blancos, de los cuales alrededor del 30% son proteínas relacionadas con la vía clásica de secreción, revelando mecanismos moleculares poco explorados que podrán ser un punto de partida para la ingeniería de células CHO. En esta revisión discutimos sobre la intensificación de la búsqueda de datos asociados a la producción de proteínas recombinantes en células CHO, con particularidad en la vía de secreción clásica. Nuestro grupo se enfocó en esta vía mediante el uso de la proteómica subcelular, lo que nos permitió comprender la variación de mecanismos asociados al aumento de la productividad específica.

Palabras clave: Células CHO, proteínas recombinantes, fraccionamiento subcelular, ómicas, proteómica.

Abstract

The development and production of therapeutic recombinant proteins is essential for the treatment of several diseases. Despite the fact that many of these proteins are produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells, strategies are still being sought to improve their productivity. Omics technologies have made it possible to deeply identify several processes that impact on the expression of these proteins. However, since these studies have been carried out using whole cells, the results are biased towards those higher abundance proteins. Consequently, our research group has used subcellular proteomics as a viable alternative to identify lower abundance proteins that participate in processes associated with cellular productivity, with emphasis on the classical secretion pathway, since this has been described as a bottleneck during the synthesis and secretion of proteins. As a result, subcellular fractionation allowed the identification of 386 new targets, of which around 30% are proteins related to the classical secretion pathway, revealing little-explored molecular mechanisms that could be a

starting point for CHO cell engineering. In this review we discuss the intensification of the search for data associated with recombinant protein production in CHO cells, particularly in the classical secretion pathway. Our group focused on this pathway through the use of subcellular proteomics, which allowed us to understand the variation in mechanisms associated with increased specific productivity.

Key words: CHO cells, recombinant proteins, subcellular fractionation, omics, proteomics.

Introducción

Recombinant proteins (RP) have become a crucial tool during last decades in academic research, biopharmaceutical industry and healthcare systems (Puetz & Wurm, 2019). Approved biopharmaceuticals have been increasingly marketed in US and EU, reaching a total of 155 products during the 2014-2018 period. Most of these biologics are monoclonal antibodies (mAbs), and the rest corresponds to hormones, blood related proteins, enzymes and vaccines (Walsh, 2018).

Biopharmaceuticals can be obtained from different hosts like bacteria, yeasts, insect and mammalian cells, where *Escherichia coli*, Chinese hamster Ovary (CHO) cells, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* are the preferred options (Tripathi & Shrivastava, 2019; Walsh, 2018). These RP are subjected to a wide range of post-translational modifications (PTM), according to protein properties and the selected host (Bandyopadhyay, 2008; Hajba et al., 2018; Qiu et al., 2019). As these PTM can modify the structural conformation and biological behavior of therapeutic proteins, mammalian cells are frequently chosen to perform modifications on biopharmaceuticals similar to those occurring in humans (Walsh, 2018).

Some advantages of mammalian expression systems are the secretion of RP to the extracellular medium (G. Zhang et al., 2017), performing complex PTM, successful expression of multi-subunit protein complexes (Baser & van den Heuvel, 2016) and high bioprocesses yields (Huang et al., 2010). Of these platforms, CHO, mouse myeloma (NS0), baby hamster kidney (BHK), human embryo kidney (HEK) and human retinal cells have gained regulatory approval (Dumont et al., 2016).

Despite their success, biologics prices limit the global access to this market. These high costs come partly by regulatory approval

for intended use, and long-term treatment and/or high doses needed to achieve clinical efficacy (Deleuran et al., 2020; Puetz & Wurm, 2019). In this scenario, novel strategies to increase product titer are strongly encouraged, aiding to alleviate this hard panorama.

Many approaches have been developed to increase product yield, like optimizing protein and gene design (Cho et al., 2019), genetic vectors (Lin et al., 2017), delivery methods (Steger et al., 2015), selection procedures (Chin et al., 2015), cell line engineering (Shen et al., 2020) and bioprocess performance (Stepper et al., 2020). Among these, cell engineering has been noticed as a very promising approach, even though it has not been explored enough yet (Fischer & Otte, 2019). However, a prior understanding of cellular mechanisms behind protein production by omics is necessary for a systematic knowledge. Omics applied to clonal populations producing the same protein but differing in their specific productivity (q_p) have exposed several cellular processes contributing to protein production (Carlage et al., 2009; Hausmann et al., 2018; Kang et al., 2014; Ley et al., 2015; Orellana et al., 2015; Sommeregger et al., 2016). Nevertheless, a lower coverage of the classical secretory pathway (CSP) in comparison to other cell compartments has been achieved by these previous omics. This pathway plays a crucial role in several cellular processes such as lipid metabolism (Funato et al., 2020), autophagy (Morel, 2020) and apoptosis (Kara & Oztas, 2020), and of course, synthesis, modification and transport of secreted proteins (Barlowe & Miller, 2013).

Therefore, in this review we integrate a summary of previous transcriptomic and proteomic studies among CHO cell clones that differ in their q_p and their association with the CSP. Then, we describe our subcellular proteomics results (Pérez-Rodríguez et al.,

2021), which highlights molecular mechanisms associated with changes in q_p that operate in the CSP. Furthermore, we compare our recent findings with the literature. Accordingly, our data revealed that combining subcellular fractionation and compartmentalized proteomics allows a deep understanding of the secretory pathway and its relationship with the productivity level in CHO cell clones. The proposed targets are tools for future development that will have a positive impact on the performance of bioprocesses.

Differential transcriptomic and proteomic studies of CHO cells differing in q_p

Omics have shed light on some molecular processes sustaining a higher protein producer phenotype in mammalian cells. By studying CHO cells through transcriptomics and proteomics, it has been predicted that a higher protein synthesis supported by an active cell energy production (Ho, 2013; Nissom et al., 2006; Yusufi et al., 2017), DNA protection mechanisms (Kang et al., 2014; Yusufi et al., 2017), cell defenses against Reactive Oxygen Species (ROS) (Orellana et al., 2015; Yusufi et al., 2017), and modification of carbohydrates, lipids and aminoacids metabolism (Doolan et al., 2008; Ho, 2013; Kang et al., 2014; Ley et al., 2015; Meleady et al., 2008; Nissom et al., 2006; Orellana et al., 2015; Sommeregger et al., 2016; Yusufi et al., 2017), as well as an increased protein secretion to the extracellular medium (Orellana et al., 2015; Sommeregger et al., 2016), regularly take place in higher producer cells. Also, the cytoskeleton is rearranged most of the time during protein production, where differential abundance of many cytoskeletal proteins could lead to a deep restructuring of the filaments and microtubules (Carlage et al., 2009; Clarke et al., 2011; Hausmann et al., 2018; Kang et al., 2014; Meleady et al., 2008; Orellana et al., 2015; Sommeregger et al., 2016; Yusufi et al., 2017).

Occasionally, proteins participating in cell proliferation have lowered their abundance, which could redirect cell resources towards protein production (Ho, 2013; Meleady et al., 2008; Nissom et al., 2006; Orellana et al., 2015). However, since q_p and growth rate do not correlate in all cases

(Chusainow et al., 2009; Ley et al., 2015), these proliferation-related targets should be evaluated carefully before any modification. Apoptosis inhibition, which prolongs cell viability and increases the RP titer, is another Gene Ontology (GO) category enriched in higher producer cells (Doolan et al., 2008; Meleady et al., 2008; Sommeregger et al., 2016). Regarding secreted host cell proteins, the most common GO annotations among those differentially accumulated are cell signaling, cytoskeleton, intracellular transport, metabolism and apoptosis (Zhu et al., 2016), in agreement with the functions of secreted proteins in CHO cells (Kumar et al., 2015).

The impact of different signaling events on cell productivity in recombinant CHO cells has not been explored enough yet. In this sense, the regulation of calcium-dependent (Doolan et al., 2008; Kang et al., 2014; Sommeregger et al., 2016) and annexin-dependent responses (Nissom et al., 2006), and signaling from MAP kinases (Clarke et al., 2011; Doolan et al., 2008; Kang et al., 2014), Ras (Clarke et al., 2011), insulin (Edros et al., 2014), Toll-like receptors (Doolan et al., 2008), G proteins, GTPases of the Rho family, phosphatases and nuclear receptors (Sommeregger et al., 2016), have emerged as possible relevant pathways operating in these cells. A more in-depth study of these pathways in a RP production context is necessary to elucidate their role in the regulation of cellular productivity.

An augmented access of transcription machinery to DNA (chromatin remodeling), transcription and translation, coupled to an active protein catabolism (Bedoya-López et al., 2016; Carlage et al., 2009; Clarke et al., 2011; Hausmann et al., 2018; Kang et al., 2014; Meleady et al., 2008; Nissom et al., 2006; Sommeregger et al., 2016; Yusufi et al., 2017) have been other GO categories tightly linked to protein production. To distribute and secrete the protein overload, the CSP have shown a rearrangement of its intracellular traffic, where the increment of adapter subunits (AP2, AP3), proteins related to the formation and recruitment of vesicles (PDCD6), membrane fusion (tethering factors, NSF, SNAREs) and vesicle structure (COPA, COG2, COPI1), molecular motors (kinesin, myosin) and small GTPases (Rabs, Sar1a,

Arfs), could promote the formation, transport, recognition and fusion of vesicles (Clarke et al., 2011; Doolan et al., 2008; Ho, 2013; Kang et al., 2014; Orellana et al., 2015; Sommeregger et al., 2016). As to chaperones, different sets have been uncovered depending on the RP expressed, which could be explained by the fact that each protein would require particular chaperones to avoid an incorrect folding within the endoplasmic reticulum (ER) and the further activation of stress responses (Carlage et al., 2009; Clarke et al., 2011; Doolan et al., 2008; Hausmann et al., 2018; Ho, 2013; Meleady et al., 2008; Nissom et al., 2006). Interestingly, although Unfolded Protein Response (UPR) and stress responses were significantly affected canonical pathways in rhBMP2 producer cells co-expressing PACE enzyme, by a transcriptomic study (Doolan et al., 2008), they were not differentially represented at the proteomic level (Meleady et al., 2008), probably indicating a limited capacity of whole cell proteomics to detect differences in low abundant proteins.

Discovering novel targets and cellular processes associated to changes in q_p in mAb producing CHO cells by a subcellular proteomics approach

One big disadvantage of this aforementioned proteomic reports is their use of whole cell homogenates. That kind of analysis is not representative of the entire proteome, because the relative abundance between cellular proteins may differ by up to 7-8 orders of magnitude, where ubiquitous and structural proteins can mask the detection of less abundant ones (Stasyk & Huber, 2004), such as those belonging to the CSP. However, subcellular fractionation prior to proteomics can bypass this limitation and eliminate this bias. Coupling of fractionation and proteomics represents an area called subcellular proteomics, which allows the identification of a greater number of proteins and the study of previously overlooked cellular processes (Michelsen & von Hagen, 2009; Paulo et al., 2013).

Given the benefits of subcellular proteomics and with the goal of a deeper insight into the CSP in mind, we carried out a proteomic comparison of ten subcellular compartments between two recombinant CHO cell lines. CRL-

12444 (lower producer) and CRL-12445 (higher producer) anti hIL-8 mAb secreting cell lines, showing a 27-fold difference in their q_p , were chosen as cell models for subcellular proteomics. To resembling industrial cell culture conditions, cells were expanded in chemically defined medium in agitated Erlenmeyer flasks, at constant temperature (37°C) and atmosphere (5% CO₂), and sampled during exponential growth phase (Pérez-Rodríguez et al., 2021).

Prior proteomics, different cell fractionation protocols (Pérez-Rodríguez, de Jesús Ramírez-Lira, et al., 2020) and protein precipitation techniques (Pérez-Rodríguez, Ramírez, et al., 2020) were evaluated in order to isolate cell fractions enriched in organelles belonging to the CSP, namely ER, ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC), Golgi Apparatus and vesicles, and to quantitatively precipitate their proteins before proteomic analysis. The fractionation protocol and composition of resulting compartments are delineated in Figure 1. After mechanical disruption, differential and isopycnic centrifugation, and acetone precipitation, samples were trypsin-digested and their peptides identified and quantified by label-free LC-MS/MS. As a result, 4952 total protein groups were identified and reliably quantified, from which 493 were differentially accumulated between both cell lines. In agreement with antecedent proteomics, metabolism of carbohydrates, lipids and aminoacids, cell signaling, proliferation, DNA repair, transcription, translation, synthesis and folding of proteins, intracellular transport, cytoskeleton organization and cellular mechanisms against ROS, were GO categories enriched among the differentially accumulated proteins (DAP) (Pérez-Rodríguez et al., 2021). Other categories recognized in our study with a lower representation in previous reports were nucleotide metabolism, autophagy, RNA splicing, protein degradation, cell adhesion, extracellular matrix (ECM) organization and ER stress-dependent responses. Among all DAP, 46 ones (21 upregulated and 25 downregulated) were consistently highlighted by both employed algorithms, SAM and ROTS, indicating that these targets should be explored first in future engineering strategies for recombinant CHO cells.

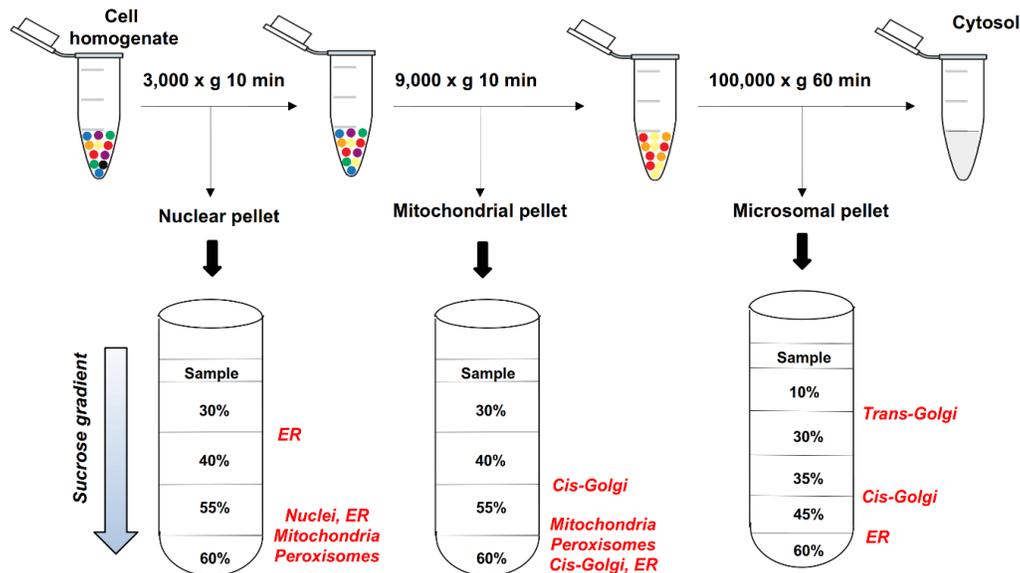


Figure 1. Subcellular fractionation protocol of CHO cells by combining mechanical disruption, and differential and isopycnic centrifugation.

By obtaining enriched fractions of subcellular organelles before proteomics characterization, we identified that near the third part of all proteins correlating with q_p changes were from the CSP, mainly from the ER (74% upregulated and 67% downregulated) and Golgi Apparatus (59% upregulated and 54% downregulated) (Figure 2A). Additionally, about half of all DAP came from sucrose fractions enriched in CSP compartments, especially *trans*-Golgi and *cis*-Golgi (Figure 2B), which indicates an overrepresentation of this pathway in relevant q_p associated processes.

With the aim of uncover those molecular mechanisms taking place in the CSP that are related to q_p differences, 21 upregulated and 13 downregulated proteins, with known functions and identified by both comparison algorithms (SAM and ROTS), were classified into different biological categories. As a result, the synthesis and translocation of proteins to the ER, ER stress and UPR, homeostasis of ER and Golgi Apparatus, proteasomal degradation, antegrade and retrograde transport,

production of ECM components and other secreted proteins, glycosylation and autophagy, seemed to play an important role during mAb production in CHO cells.

Protein translation and their import into the ER were enhanced in the high producing clone, probably associated with the increase in formation, stability and function of SRP through SRP72 (Becker et al., 2017), and with the SRP receptor (Mandon et al., 2003) and Sec62 translocon, which mediated protein internalization. Interestingly, most targets causing ER stress or involved in UPR (CLCC1, DNAJC3, EMC7, OS9, MINPP1, TMED4, UFC1, PRKCD, PITPNM1, SURF4) were decreased in the higher producer cells (Figure 3). The loss of CLCC1 (Jia et al., 2015) and SURF4 (Fujii et al., 2012) could trigger a stress signal and initiate UPR by blocking the entering of ions into the ER, which affect its homeostasis. Others have demonstrated to be required for a successful UPR by aiding in the folding, management and disposal of proteins in the overcrowded ER, and its homeostasis reestablishment, through their chaperone and ERAD-related (DNAJC3, ECM7, OS9)

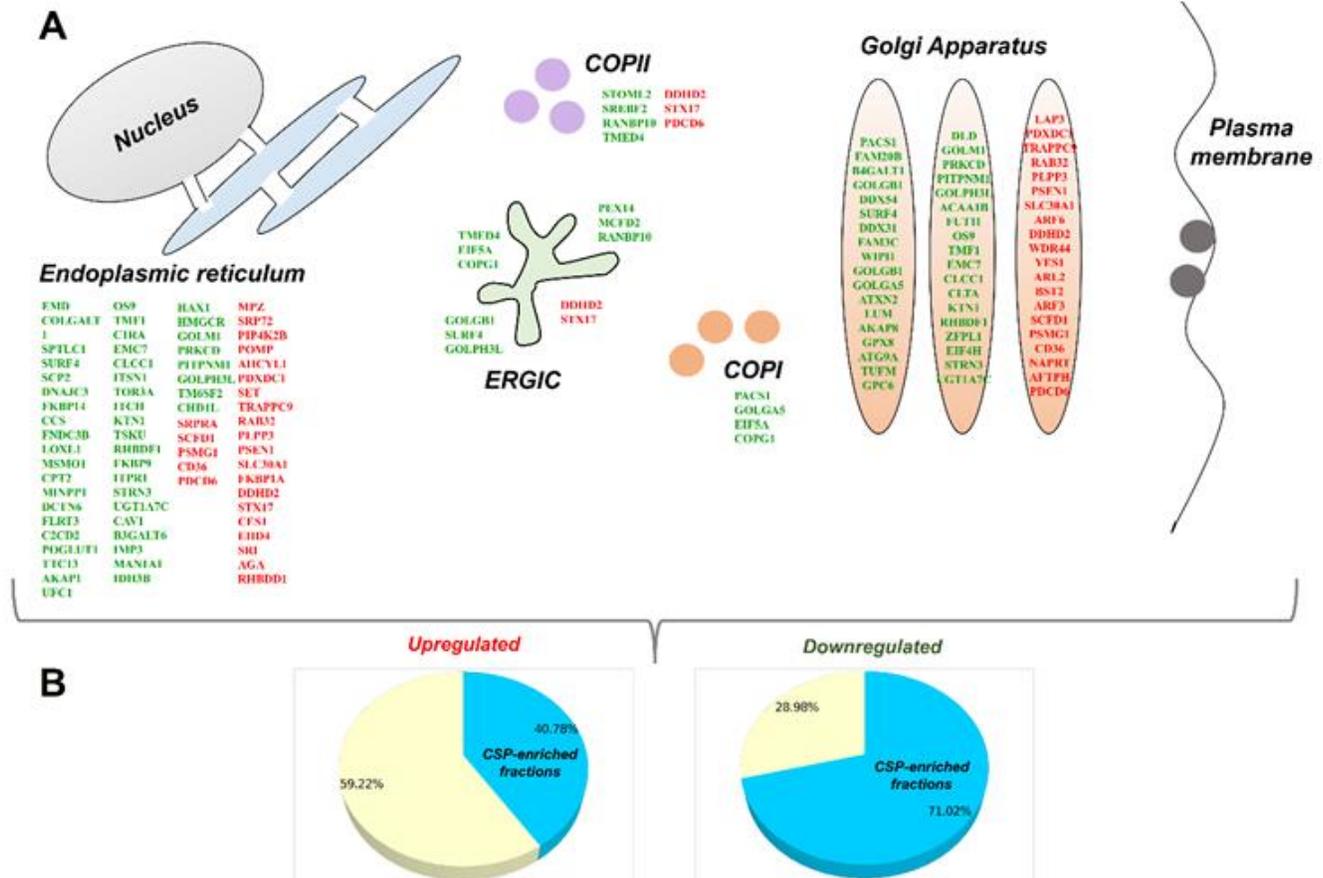


Figure 2. Differentially accumulated proteins (DAP) belonging to the classical secretory pathway (CSP). (A) Upregulated (red) and downregulated (green) proteins mapped to organelles from the secretion pathway. (B) Percentage of DAP coming from sucrose fractions enriched in secretory organelles.

(Christianson et al., 2012; A.-H. Lee et al., 2003; Melville et al., 1999; Satoh et al., 2015; van der Goot et al., 2018), PTM (UFC1) (Komatsu et al., 2004; Y. Zhang et al., 2012), kinase (PRKCD) (Lai et al., 2017), apoptosis (MINPP1, TMED4) (Hwang et al., 2008; Kilaparty et al., 2016) and signaling (PITPNM1) (Lev et al., 1999) activities. Downregulation of these proteins suggests that the higher producer cells could manage a high RP production without develop an ER stress nor UPR, in line with earlier omics research (Carlage et al., 2009; Meleady et al., 2008; Nissom et al., 2006).

Other proteins necessary for a proper functioning and homeostasis of the CSP were also differentially accumulated between both cell populations. The morphology, compaction level, relative position and functioning of ER, ERGIC, Golgi Apparatus and COPI vesicles, were probably disturbed by TMF1 (Yamane et al., 2007), GOLPH3L (Ng et al., 2013), GOLGA5 (Sohda et al., 2010), DDHD2 (Inoue et al., 2012), SCFD1 (Laufman et al., 2009) and STX17 (Muppirala et al., 2011), probably as a side effect of their functions in vesicle transport, while the disposal of incorrectly folded transmembrane proteins was enhanced

by RHBD1 (Paschowsky et al., 2016), together with a higher accumulation of proteasome chaperones (PSMG1 and POMP) (Fricke et al., 2007). ER calcium concentration

appeared to be crucial, and it was maintained through stabilization of RyR and IP3R receptors by FKBP1A (Vervliet et al., 2015) (Figure 3).

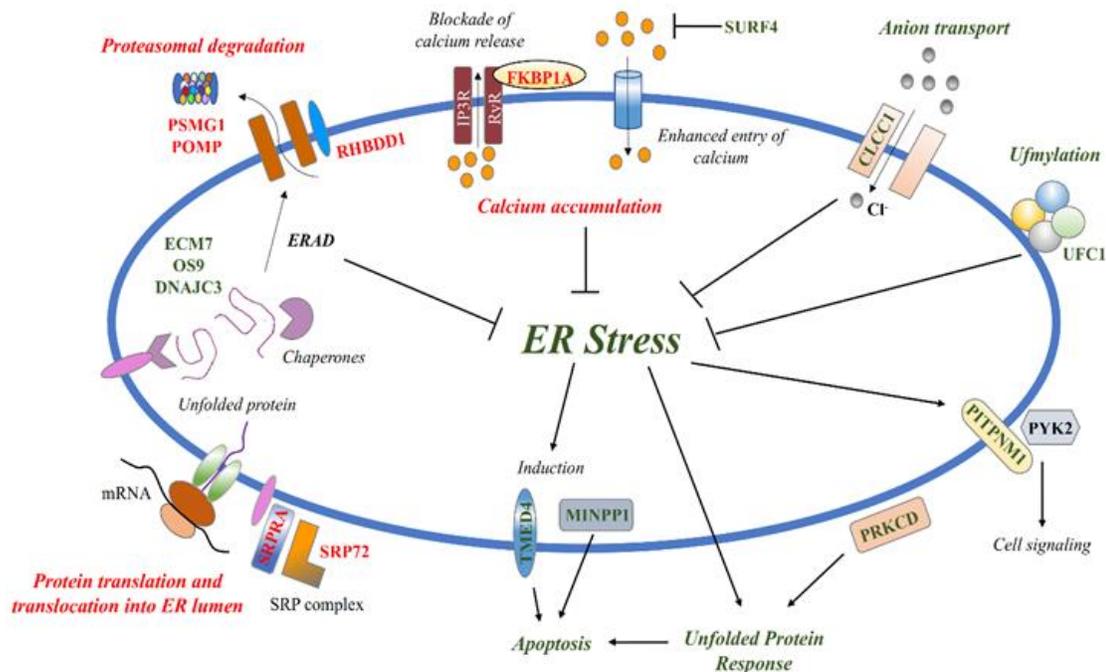


Figure 3. Classification of differentially accumulated proteins (DAP) into molecular processes in the endoplasmic reticulum (ER), and their inter-relationship. Red: upregulated, green: downregulated.

Vesicle trafficking was profoundly modified in the higher producer cells. Protein traffic in the early (ER, ERGIC, Golgi Apparatus) and late (*trans*-Golgi, plasma membrane (PM)) secretory, and endocytic pathways was favored, whereas the intra-Golgi transport was remodeled. Anterograde transport from ER to Golgi Apparatus seemed to be very active by a higher abundance of PDCD6, TRAPPC9, SCFD1 and ARF3 (Figure 4A), while retrograde traffic was supported by SCFD1, STX17 and ARF3 (Figure 4B). The calcium-binding protein PDCD6 and the small GTPase ARF3 aided in vesicle formation by facilitating the outer coat assembly, cargo loading of COPII (Kanadome et al., 2017; la Cour et al., 2013) and coatomer recruiting (Kuai et al., 2000; Volpicelli-Daley et al., 2005). Tethering, disassembling and fusion of

vesicles was improved by TRAPPC9 (Zong et al., 2012), the SM protein SCFD1 (Demircioglu et al., 2014; Kosodo et al., 2003; Li et al., 2005) and the SNARE STX17 (Gordon et al., 2010). Vesicle traffic seems to be tight regulated given that protein secretion was not increased for all cargoes, such as those mediated by ZFPL1 (Chiu et al., 2008).

While some cargoes could be benefited from SCFD1 during intra-Golgi transport, others may be affected by downregulation of the tethering factors GOLGB1, GOLGA5 and TMF1, and the structural COPI component COPG1 (Figure 4C). Golgi resident proteins (Sohda et al., 2010), glycosylation enzymes (Stevenson et al., 2017), ECM components (Katayama et al., 2018) and PM proteins (Alvarez et al., 2001) are some of these cargoes, which suggests that a lower production of certain host biomolecules

Artículos

saves limited cellular resources that could be used instead for RP expression (Kol et al., 2020).

In the endocytic and late secretory pathways, despite PACS1 downregulation, the significant augment of RAB32 and ARF3 could positively impact on endosome - *trans*-Golgi network (TGN) - PM traffic. RAB32

mediates in this context the biogenesis and trafficking of vesicles by interacting with adaptor proteins, LRRK2 and retromer complex (Waschbüsch et al., 2014, 2019) (Figure 4D). The activation of these transports has not been reported before and could be coupled with other cell activities like growth, signaling, survival and autophagy (di Fiore & von Zastrow, 2014).

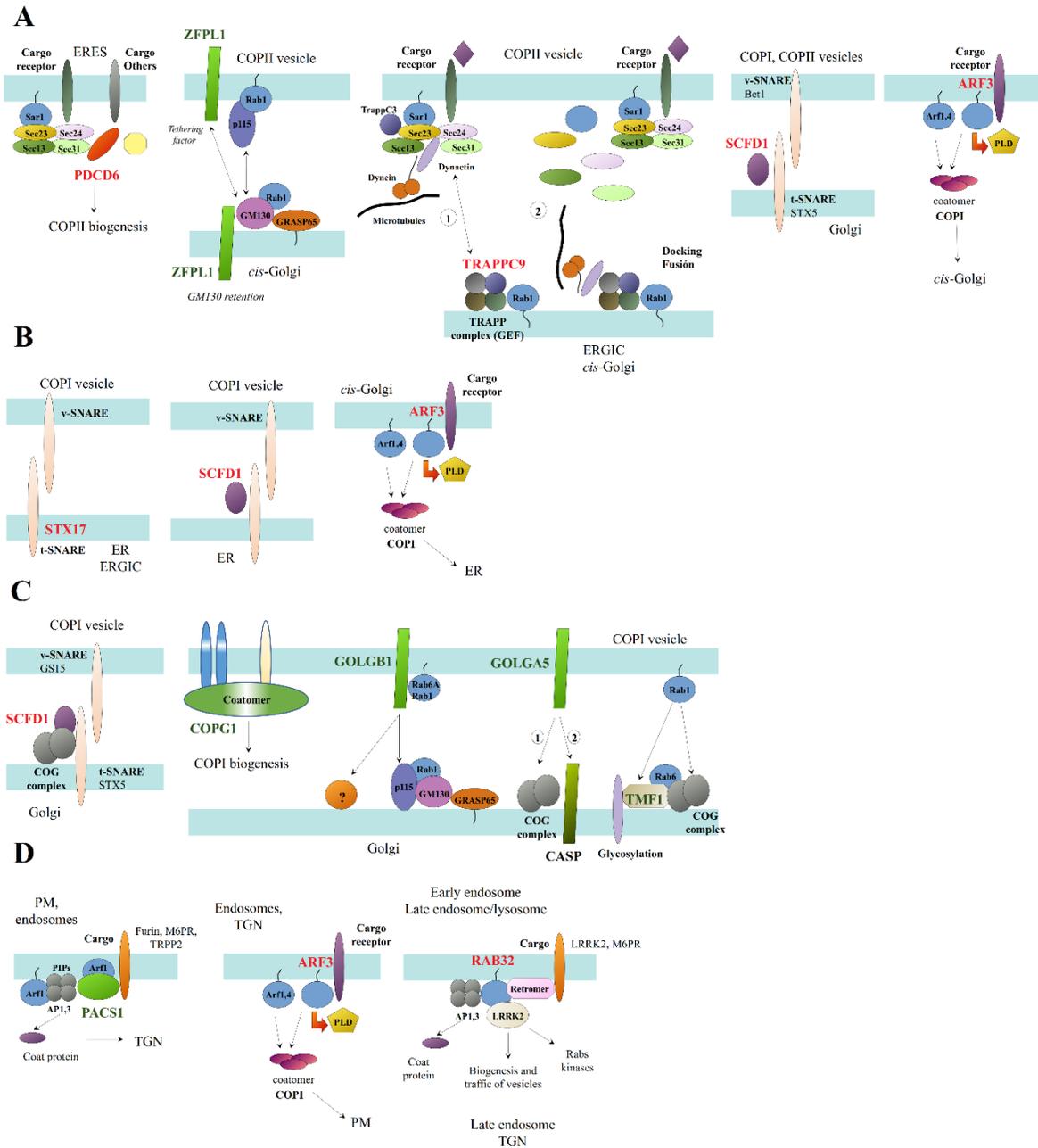


Figure 4. Vesicle trafficking processes disturbed along the secretory pathway by differentially accumulated proteins. Red: upregulated, green: downregulated.

Autophagy is a survival mechanism of eukaryotic cells to protect themselves from stressful conditions, by obtaining energy and biomolecule precursors, and the removal of damaged organelles (Kim et al., 2013). Given that only a handful of papers have studied its effect on recombinant CHO cells (Baek et al., 2016; Jardon et al., 2012; J. S. Lee et al., 2013; Nasserri et al., 2014; X. Zhang et al., 2018), the autophagy-related DAP found in our subcellular proteomic study are of great relevance (Figure 5). Autophagy could become activated in our mAb producing cells by loss of PRKCD (D. Zhang et al., 2017) and ZFPL1 (Xie et al., 2017), and the increase of RAB32, SCFD1 and STX17. While PRKCD and ZFPL1 trigger some stimuli, the other targets promote autophagosome formation (Hirota & Tanaka, 2009), lysosome maturation (Renna et al., 2011) and autophagosome-lysosome fusion (Vats & Manjithaya, 2019).

Most q_p associated targets uncovered by subcellular proteomics have not been reported before in whole cell proteomics

The DAP identified in our subcellular proteomic study were compared with those identified in earlier whole cell proteomics (Carlage et al., 2009; Hausmann et al., 2018; Ho, 2013; Kang et al., 2014; Nissom et al., 2006; Orellana et al., 2015; Sommeregger et al., 2016), to assess the overlapping degree between both strategies. As shown in Table 1, only 33% of upregulated and 17% of downregulated ones matched with at least one report, indicating that 67% and 83% of upregulated and downregulated proteins from our strategy, respectively, constitute new targets to be modified. Only a portion of the proteins shared with earlier reports followed the same direction (up or down) in all cases, suggesting that targets from CHO cells could be RP, subline, clone, culture conditions or q_p -dependent.

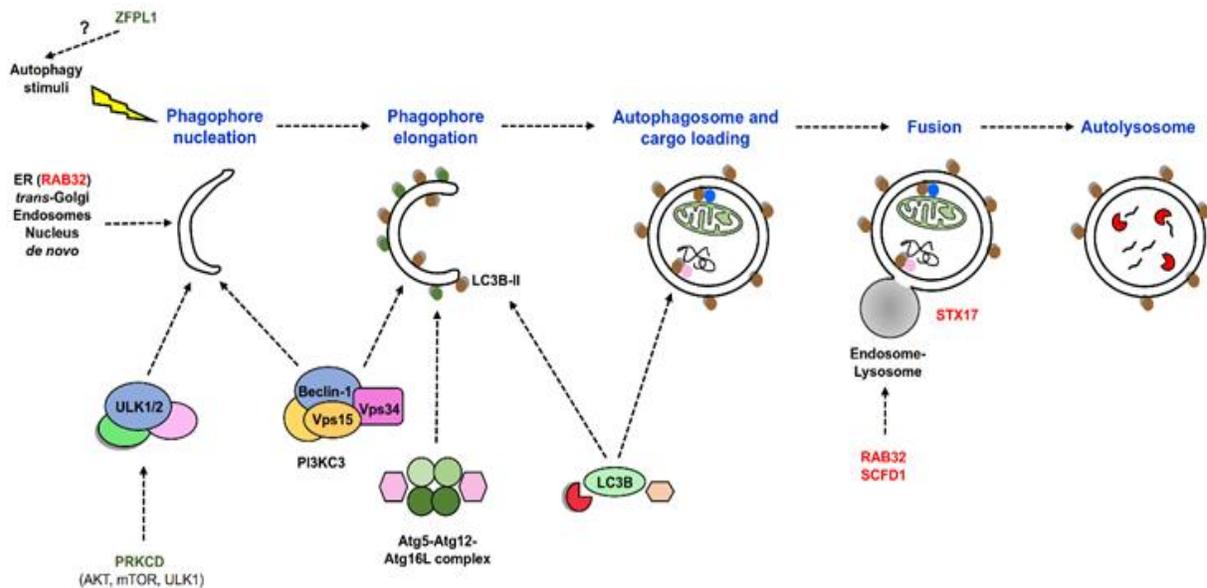


Figure 5. Differentially accumulated proteins functioning on autophagy. ER: endoplasmic reticulum. Red: upregulated, green: downregulated.

Table 1. Comparison of differentially accumulated proteins (DAP) between subcellular proteomics and whole cell proteomics. CSP: classical secretion pathway.

DAP	Matched proteins		New targets
	Same direction	Different directions	
All upregulated	34 (20%)	21 (23%)	111 (67%)
All downregulated	18 (6%)	35 (11%)	275 (83%)
Upregulated from CSP		11 (32%)	23 (68%)
Downregulated from CSP		10 (13%)	68 (87%)

A closer inspection to the secretory pathway revealed that 68% upregulated and 87% downregulated proteins from this pathway did not match with previous studies, exposing new molecules and mechanisms that can be harnessed to augment protein yields.

Conclusions

Omics technologies have been used to elucidate the molecular mechanisms involved in RP expression. Previous omics have tagged several proteins related to metabolism, proliferation, apoptosis, cell organization and cell signaling, as interesting targets from whole cell analysis. However, this approach has been biased towards higher abundance proteins, masking the importance of other less explored elements such as those from the secretory pathway. To examine this essential pathway, we applied subcellular proteomics to mAb producing CHO cell clones differing 26 times in their q_p . About 78% of all DAP between both cell populations were not found in earlier proteomics, being classified as new targets for CHO cell engineering. Interestingly, about one third of all DAP belonged to the CSP, revealing a tight relationship between processes taking place in these organelles and q_p . Among these previously overlooked mechanisms, stress responses, protein metabolism, vesicle traffic, ECM organization and autophagy can be cited.

These new targets and mechanisms together with the prior knowledge should be validated in many different industrial cell clones and culture conditions in order to obtain meaningful conclusions from all available data. Our work has unveiled subcellular proteomics as a viable alternative to whole cell proteomics for a closer look into the cellular mechanisms linked to protein production, and to develop new sublines with higher productivity.

Acknowledgments

S.P.R. thanks to Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the support provided through the scholarship 396822. S.P.R. also thanks to the scholarship by the Bioprocesses Unit of the Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM. This project was developed under the Institutional Program of the Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM: "La producción de biomoléculas de interés biomédico en microorganismos". This work was founded by "Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México" (PAPIIT- UNAM IN-210419, PAPIIT- UNAM IV-201220, PAPIIT- UNAM IT-200719).

Referencias

- Alvarez C, Garcia-Mata R, Hauri HP & Sztul E (2001) The p115-interactive Proteins GM130 and Giantin Participate in Endoplasmic Reticulum-Golgi Traffic. *J. Biol. Chem.* 276: 2693–2700.
- Baek E, Kim CL, Kim MG, Lee JS & Lee GM (2016) Chemical inhibition of autophagy: Examining its potential to increase the specific productivity of recombinant CHO cell lines. *Biotechnol. Bioeng.* 113: 1953–1961.
- Bandyopadhyay PK (2008) Vitamin K-Dependent γ -Glutamylcarboxylation: An Ancient Posttranslational Modification. In: Vitamins K. Litwack G (ed). Academic Press, San Diego, CA. pp. 157–184.
- Barlowe CK & Miller EA (2013) Secretory Protein Biogenesis and Traffic in the Early Secretory Pathway. *Genetics* 193: 383–410.
- Baser B & van den Heuvel J (2016) Assembling Multi-subunit Complexes Using Mammalian Expression. In: Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization. Vega MC (ed). Springer International Publishing, Cham, CH. pp. 225–238.
- Becker MMM, Lapouge K, Segnitz B, Wild K & Sinning I (2017) Structures of human SRP72 complexes provide insights into SRP RNA remodeling and ribosome interaction. *Nucleic Acids Res.* 45: 470–481.
- Bedoya-López A, Estrada K, Sanchez-Flores A, Ramírez OT, Altamirano C, Segovia L, Miranda-Ríos J, Trujillo-Roldán MA & Valdez-Cruz NA (2016) Effect of Temperature Downshift on the Transcriptomic Responses of Chinese Hamster Ovary Cells Using Recombinant Human Tissue Plasminogen Activator Production Culture. *PLoS ONE* 11: e0151529.
- Carlage T, Hincapie M, Zang L, Lyubarskaya Y, Madden H, Mhatre R & Hancock WS (2009) Proteomic Profiling of a High-Producing Chinese Hamster Ovary Cell Culture. *Anal. Chem.* 81: 7357–7362.
- Chin CL, Chin HK, Chin CSH, Lai ET & Ng SK (2015) Engineering selection stringency on expression vector for the production of recombinant human alpha1-antitrypsin using Chinese Hamster ovary cells. *BMC Biotechnol.* 15: 44.
- Chiu CF, Ghanekar Y, Frost L, Diao A, Morrison D, McKenzie E & Lowe M (2008) ZFPL1, a novel ring finger protein required for cis-Golgi integrity and efficient ER-to-Golgi transport. *EMBO J.* 27: 934–947.
- Cho HJ, Oh BM, Kim JT, Lim J, Park SY, Hwang YS, Baek KE, Kim BY, Choi I & Lee HG (2019) Efficient Interleukin-21 Production by Optimization of Codon and Signal Peptide in Chinese Hamster Ovarian Cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 304–310.
- Christianson JC, Olzmann JA, Shaler TA, Sowa ME, Bennett EJ, Richter CM, Tyler RE, Greenblatt EJ, Wade Harper J & Kopito RR (2012) Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nat. Cell Biol.* 14: 93–105.
- Chusainow J, Yang YS, Yeo JHM, Toh PC, Asvadi P, Wong NSC & Yap MGS (2009) A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: What makes a stable high producer? *Biotechnol. Bioeng.* 102: 1182–1196.
- Clarke C, Doolan P, Barron N, Meleady P, O'Sullivan F, Gammell P, Melville M, Leonard M & Clynes M (2011) Predicting cell-specific productivity from CHO gene expression. *J. Biotechnol.* 151: 159–165.
- Deleuran M, Thaçi D, Beck LA, de Bruin-Weller M, Blauvelt A, Forman S, Bissonnette R, Reich K, Soong W, Hussain I, Foley P, Hide M, Bouaziz JD, Gelfand JM, Sher L, Schuttelaar MLA, Wang C, Chen Z, Akinlade B, ... Ardeleanu M (2020) Dupilumab shows long-term safety and efficacy in patients with moderate to severe atopic dermatitis enrolled in a phase 3 open-label extension study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 82: 377–388.

- Demircioglu FE, Burkhardt P & Fasshauer D (2014) The SM protein Sly1 accelerates assembly of the ER-Golgi SNARE complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111: 13828–13833.
- di Fiore PP & von Zastrow M (2014) Endocytosis, Signaling, and Beyond. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6: a016865.
- Doolan P, Melville M, Gammell P, Sinacore M, Meleady P, McCarthy K, Francullo L, Leonard M, Charlebois T & Clynes M (2008) Transcriptional Profiling of Gene Expression Changes in a PACE-Transfected CHO DUKX Cell Line Secreting High Levels of rhBMP-2. *Mol. Biotechnol.* 39: 187–199.
- Dumont J, Ewart D, Mei B, Estes S & Kshirsagar R (2016) Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36: 1110–1122.
- Edros R, McDonnell S & Al-Rubeai M (2014) The relationship between mTOR signalling pathway and recombinant antibody productivity in CHO cell lines. *BMC Biotechnol.* 14: 15.
- Fischer S & Otte K (2019) CHO Cell Engineering for Improved Process Performance and Product Quality. In: *Cell Culture Engineering*. Lee GM, Kildegaard HF, Lee SY, Nielsen J & Stephanopoulos G (eds). Wiley-VCH, Weinheim, DE. pp. 207–250.
- Fricke B, Heink S, Steffen J, Kloetzel P & Krüger E (2007) The proteasome maturation protein POMP facilitates major steps of 20S proteasome formation at the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 8: 1170–1175.
- Fujii Y, Shiota M, Ohkawa Y, Baba A, Wanibuchi H, Kinashi T, Kurosaki T & Baba Y (2012) Surf4 modulates STIM1-dependent calcium entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422: 615–620.
- Funato K, Riezman H & Muñoz M (2020) Vesicular and non-vesicular lipid export from the ER to the secretory pathway. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1865: 158453.
- Gordon DE, Bond LM, Sahlender DA & Peden AA (2010) A Targeted siRNA Screen to Identify SNAREs Required for Constitutive Secretion in Mammalian Cells. *Traffic* 11: 1191–1204.
- Hajba L, Szekrényes Á, Borza B & Guttman A (2018) On the glycosylation aspects of biosimilarity. *Drug Discov. Today* 23: 616–625.
- Hausmann R, Chudobová I, Spiegel H & Schillberg S (2018) Proteomic analysis of CHO cell lines producing high and low quantities of a recombinant antibody before and after selection with methotrexate. *J. Biotechnol.* 265: 65–69.
- Hirota Y & Tanaka Y (2009) A small GTPase, human Rab32, is required for the formation of autophagic vacuoles under basal conditions. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 2913–2932.
- Ho R (2013) Proteomic Analysis of Chinese Hamster Ovary Cells Producing Glycosylated Monoclonal Antibodies. Master's Thesis in Biology. University of Waterloo. Ontario. pp. 1-156.
- Huang YM, Hu W, Rustandi E, Chang K, Yusuf-Makagiansar H & Ryll T (2010) Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol. Prog.* 26: 1400–1410.
- Hwang SO, Boswell SA, Seo JS & Lee SW (2008) Novel Oxidative Stress-responsive Gene ERS25 Functions as a Regulator of the Heat-shock and Cell Death Response. *J. Biol. Chem.* 283: 13063–13069.
- Inoue H, Baba T, Sato S, Ohtsuki R, Takemori A, Watanabe T, Tagaya M & Tani K (2012) Roles of SAM and DDHD domains in mammalian intracellular phospholipase A1 KIAA0725p. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1823: 930–939.
- Jardon MA, Sathya B, Braasch K, Leung AO, Côté HCF, Butler M, Gorski SM & Piret JM (2012) Inhibition of glutamine-dependent

- autophagy increases t-PA production in CHO Cell fed-batch processes. *Biotechnol. Bioeng.* 109: 1228–1238.
- Jia Y, Jucius TJ, Cook SA & Ackerman SL (2015) Loss of Clcc1 Results in ER Stress, Misfolded Protein Accumulation, and Neurodegeneration. *J. Neurosci.* 35: 3001–3009.
- Kanadome T, Shibata H, Kuwata K, Takahara T & Maki M (2017) The calcium-binding protein ALG-2 promotes endoplasmic reticulum exit site localization and polymerization of Trk-fused gene (TFG) protein. *FEBS J.* 284: 56–76.
- Kang S, Ren D, Xiao G, Daris K, Buck L, Enyenihi AA, Zubarev R, Bondarenko PV & Deshpande R (2014) Cell line profiling to improve monoclonal antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* 111: 748–760.
- Kara M & Oztas E (2020) Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Cell Death. In: Programmed Cell Death. Gali-Muhtasib H & Rahal ON (eds). IntechOpen, London, UK. pp. 1–14.
- Katayama K, Kuriki M, Kamiya T, Tochigi Y & Suzuki H (2018) Giantin is required for coordinated production of aggrecan, link protein and type XI collagen during chondrogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 499: 459–465.
- Kilaparty SP, Agarwal R, Singh P, Kannan K & Ali N (2016) Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis accompanies enhanced expression of multiple inositol polyphosphate phosphatase 1 (Minpp1): a possible role for Minpp1 in cellular stress response. *Cell Stress Chaperones* 21: 593–608.
- Kim YJ, Baek E, Lee JS & Lee GM (2013) Autophagy and its implication in Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol. Lett.* 35: 1753–1763.
- Kol S, Ley D, Wulff T, Decker M, Arnsdorf J, Schoffelen S, Hansen AH, Jensen TL, Gutierrez JM, Chiang AWT, Masson HO, Palsson BO, Voldborg BG, Pedersen LE, Kildegaard HF, Lee GM & Lewis NE (2020) Multiplex secretome engineering enhances recombinant protein production and purity. *Nat. Commun.* 11: 1908.
- Komatsu M, Chiba T, Tatsumi K, Lemura S, Tanida I, Okazaki N, Ueno T, Kominami E, Natsume T & Tanaka K (2004) A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *EMBO J.* 23: 1977–1986.
- Kosodo Y, Noda Y, Adachi H & Yoda K (2003) Cooperation of Sly1/SM-Family Protein and Sec18/NSF of *Saccharomyces cerevisiae* in Disassembly of cis-SNARE Membrane-Protein Complexes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 448–450.
- Kuai J, Boman AL, Arnold RS, Zhu X & Kahn RA (2000) Effects of Activated ADP-ribosylation Factors on Golgi Morphology Require neither Activation of Phospholipase D1 nor Recruitment of Coatmer. *J. Biol. Chem.* 275: 4022–4032.
- Kumar A, Baycin-Hizal D, Wolozny D, Pedersen LE, Lewis NE, Heffner K, Chaerkady R, Cole RN, Shiloach J, Zhang H, Bowen MA & Betenbaugh MJ (2015). Elucidation of the CHO Super-Ome (CHO-SO) by Proteoinformatics. *J. Proteome Res.* 14: 4687–4703.
- la Cour JM, Schindler AJ, Berchtold MW & Schekman R (2013) ALG-2 Attenuates COPII Budding In Vitro and Stabilizes the Sec23/Sec31A Complex. *PLoS ONE* 8: e75309.
- Lai S, Li Y, Kuang Y, Cui H, Yang Y, Sun W, Liu K, Chen D, Yan Q & Wen L (2017) PKC δ silencing alleviates saturated fatty acid induced ER stress by enhancing SERCA activity. *Biosci. Rep.* 37: BSR20170869.
- Laufman O, Kedan A, Hong W & Lev S (2009) Direct interaction between the COG complex and the SM protein, Sly1, is required for Golgi SNARE pairing. *EMBO J.* 28: 2006–2017.
- Lee AH, Iwakoshi NN & Glimcher LH (2003) XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Mol. Cell. Biol.* 23: 7448–7459.

- Lee JS, Ha TK, Park JH & Lee GM (2013) Anti-cell death engineering of CHO cells: Co-overexpression of Bcl-2 for apoptosis inhibition, Beclin-1 for autophagy induction. *Biotechnol. Bioeng.* 110: 2195–2207.
- Lev S, Hernandez J, Martinez R, Chen A, Plowman G & Schlessinger J (1999) Identification of a Novel Family of Targets of PYK2 Related to *Drosophila* Retinal Degeneration B (rdgB) Protein. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2278–2288.
- Ley D, Seresht AK, Engmark M, Magdenoska O, Nielsen KF, Kildegaard HF & Andersen MR (2015) Multi-omic profiling of EPO-producing Chinese hamster ovary cell panel reveals metabolic adaptation to heterologous protein production. *Biotechnol. Bioeng.* 112: 2373–2387.
- Li Y, Gallwitz D & Peng R (2005) Structure-based Functional Analysis Reveals a Role for the SM Protein Sly1p in Retrograde Transport to the Endoplasmic Reticulum. *Mol. Biol. Cell* 16: 3951–3962.
- Lin J, Neo SH, Ho SCL, Yeo JHM, Wang T, Zhang W, Bi X, Chao SH & Yang Y (2017) Impact of Signal Peptides on Furin-2A Mediated Monoclonal Antibody Secretion in CHO Cells. *Biotechnol. J.* 12: 1700268.
- Mandon EC, Jiang Y & Gilmore R (2003) Dual recognition of the ribosome and the signal recognition particle by the SRP receptor during protein targeting to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 162: 575–585.
- Meleady P, Henry M, Gammell P, Doolan P, Sinacore M, Melville M, Francullo L, Leonard M, Charlebois T & Clynes M (2008) Proteomic profiling of CHO cells with enhanced rhBMP-2 productivity following co-expression of PACEsol. *Proteomics* 8: 2611–2624.
- Melville MW, Tan SL, Wambach M, Song J, Morimoto RI & Katze MG (1999) The Cellular Inhibitor of the PKR Protein Kinase, P58IPK, Is an Influenza Virus-activated Co-chaperone That Modulates Heat Shock Protein 70 Activity. *J. Biol. Chem.* 274: 3797–3803.
- Michelsen U & von Hagen J (2009) Isolation of Subcellular Organelles and Structures. In: Guide to Protein Purification. Burgess RR & Deutscher MP (eds). Academic Press, San Diego, CA. pp. 305–328.
- Morel E (2020) Endoplasmic Reticulum Membrane and Contact Site Dynamics in Autophagy Regulation and Stress Response. *Front. Cell Dev. Biol.* 8: 343.
- Muppirla M, Gupta V & Swarup G (2011) Syntaxin 17 cycles between the ER and ERGIC and is required to maintain the architecture of ERGIC and Golgi. *Biol. Cell* 103: 333–350.
- Nasseri SS, Ghaffari N, Braasch K, Jardon MA, Butler M, Kennard M, Gopaluni B & Piret JM (2014) Increased CHO cell fed-batch monoclonal antibody production using the autophagy inhibitor 3-MA or gradually increasing osmolality. *Biochem. Eng. J.* 91: 37–45.
- Ng MM, Dippold HC, Buschman MD, Noakes CJ & Field SJ (2013) GOLPH3L antagonizes GOLPH3 to determine Golgi morphology. *Mol. Biol. Cell* 24: 796–808.
- Nissom PM, Sanny A, Kok YJ, Hiang YT, Chuah SH, Shing TK, Lee YY, Wong KTK, Hu W, Sim MYG & Philp R (2006) Transcriptome and Proteome Profiling to Understanding the Biology of High Productivity CHO Cells. *Mol. Biotechnol.* 34: 125–140.
- Orellana CA, Marcellin E, Schulz BL, Nouwens AS, Gray PP & Nielsen LK (2015) High-Antibody-Producing Chinese Hamster Ovary Cells Up-Regulate Intracellular Protein Transport and Glutathione Synthesis. *J. Proteome Res.* 14: 609–618.
- Paschkowsky S, Hamzé M, Oestereich F & Munter LM (2016) Alternative Processing of the Amyloid Precursor Protein Family by Rhomboid Protease RHBDL4. *J. Biol. Chem.* 291: 21903–21912.
- Paulo JA, Gaun A, Kadiyala V, Ghouli A, Banks PA, Conwell DL & Steen H (2013) Subcellular fractionation enhances proteome coverage of pancreatic duct cells. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 1834: 791–797.

- Pérez-Rodríguez S, de Jesús Ramírez-Lira M, Wulff T, Voldbor BG, Ramírez OT, Trujillo-Roldán MA & Valdez-Cruz NA (2020) Enrichment of microsomes from Chinese hamster ovary cells by subcellular fractionation for its use in proteomic analysis. *PLoS ONE* 15: e0237930.
- Pérez-Rodríguez S, Ramírez OT, Trujillo-Roldán MA & Valdez-Cruz NA (2020) Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis of Chinese hamster ovary cell homogenates. *Electron. J. Biotechnol.* 48: 86–94.
- Pérez-Rodríguez S, Wulff T, Voldborg BG, Altamirano C, Trujillo-Roldán MA & Valdez-Cruz NA (2021) Compartmentalized Proteomic Profiling Outlines the Crucial Role of the Classical Secretory Pathway during Recombinant Protein Production in Chinese Hamster Ovary Cells. *ACS Omega* 6: 12439–12458.
- Puetz J & Wurm FM (2019) Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. *Processes* 7: 476.
- Qiu H, Wei R, Jaworski J, Boudanova E, Hughes H, VanPatten S, Lund A, Day J, Zhou Y, McSherry T, Pan CQ & Sendak R (2019) Engineering an anti-CD52 antibody for enhanced deamidation stability. *MAbs* 11: 1266–1275.
- Renna M, Schaffner C, Winslow AR, Menzies FM, Peden AA, Floto RA & Rubinsztein DC (2011) Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex. *J. Cell Sci.* 124: 469–482.
- Satoh T, Ohba A, Liu Z, Inagaki T & Satoh AK (2015) dPob/EMC is essential for biosynthesis of rhodopsin and other multipass membrane proteins in *Drosophila* photoreceptors. *ELife* 4: e06306.
- Shen CC, Lin MW, Nguyen BKT, Chang CW, Shih JR, Nguyen MTT, Chang YH & Hu YC (2020) CRISPR-Cas13d for Gene Knockdown and Engineering of CHO Cells. *ACS Synth. Biol.* 9: 2808–2818.
- Sohda M, Misumi Y, Yamamoto A, Nakamura N, Ogata S, Sakisaka S, Hirose S, Ikehara Y & Oda K (2010) Interaction of Golgin-84 with the COG Complex Mediates the Intra-Golgi Retrograde Transport. *Traffic* 11: 1552–1566.
- Sommeregger W, Mayrhofer P, Steinfellner W, Reinhart D, Henry M, Clynes M, Meleady P & Kunert R (2016) Proteomic differences in recombinant CHO cells producing two similar antibody fragments. *Biotechnol. Bioeng.* 113: 1902–1912.
- Stasyk T & Huber LA (2004) Zooming in: Fractionation strategies in proteomics. *Proteomics* 4: 3704–3716.
- Steger K, Brady J, Wang W, Duskin M, Donato K & Peshwa M (2015) CHO-S Antibody Titers >1 Gram/Liter Using Flow Electroporation-Mediated Transient Gene Expression followed by Rapid Migration to High-Yield Stable Cell Lines. *J. Biomol. Screen.* 20: 545–551.
- Stepper L, Filser FA, Fischer S, Schaub J, Gorr I & Voges R (2020) Pre-stage perfusion and ultra-high seeding cell density in CHO fed-batch culture: a case study for process intensification guided by systems biotechnology. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 43: 1431–1443.
- Stevenson NL, Bergen DJM, Skinner REH, Kague E, Martin-Silverstone E, Robson Brown KA, Hammond CL & Stephens DJ (2017) Giantin knockout models reveal a feedback loop between Golgi function and glycosyltransferase expression. *J. Cell Sci.* 130: 4132–4143.
- Tripathi NK & Shrivastava A (2019) Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7: 420.
- van der Goot AT, Pearce MMP, Leto DE, Shaler TA & Kopito RR (2018) Redundant and Antagonistic Roles of XTP3B and OS9 in Decoding Glycan and Non-glycan Degrons in ER-Associated Degradation. *Mol. Cell* 70: 516-530.e6.

- Vats S & Manjithaya R (2019) A reversible autophagy inhibitor blocks autophagosome–lysosome fusion by preventing Stx17 loading onto autophagosomes. *Mol. Biol. Cell* 30: 2283–2295.
- Vervliet T, Parys JB & Bultynck G (2015) Bcl-2 and FKBP12 bind to IP3 and ryanodine receptors at overlapping sites: the complexity of protein–protein interactions for channel regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 43: 396–404.
- Volpicelli-Daley LA, Li Y, Zhang CJ & Kahn RA (2005) Isoform-selective Effects of the Depletion of ADP-Ribosylation Factors 1–5 on Membrane Traffic. *Mol. Biol. Cell* 16: 4495–4508.
- Walsh G (2018) Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* 36: 1136–1145.
- Waschbüsch D, Hübel N, Ossendorf E, Lobbestael E, Baekelandt V, Lindsay AJ, McCaffrey MW, Khan AR & Barnekow A (2019) Rab32 interacts with SNX6 and affects retromer-dependent Golgi trafficking. *PLoS ONE* 14: e0208889.
- Waschbüsch D, Michels H, Strassheim S, Ossendorf E, Kessler D, Gloeckner CJ & Barnekow A (2014) LRRK2 Transport Is Regulated by Its Novel Interacting Partner Rab32. *PLoS ONE* 9: e111632.
- Xie YZ, Ma WL, Meng JM & Ren XQ (2017) Knockdown of ZFPL1 results in increased autophagy and autophagy-related cell death in NCI-N87 and BGC-823 human gastric carcinoma cell lines. *Mol. Med. Rep.* 15: 2633–2642.
- Yamane J, Kubo A, Nakayama K, Yuba-Kubo A, Katsuno T, Tsukita S & Tsukita S (2007) Functional involvement of TMF/ARA160 in Rab6-dependent retrograde membrane traffic. *Exp. Cell Res.* 313: 3472–3485.
- Yusufi FNK, Lakshmanan M, Ho YS, Loo BLW, Ariyaratne P, Yang Y, Ng SK, Tan TRM, Yeo HC, Lim HL, Ng SW, Hiu AP, Chow CP, Wan C, Chen S, Teo G, Song G, Chin JX, Ruan X, ... Lee DY (2017) Mammalian Systems Biotechnology Reveals Global Cellular Adaptations in a Recombinant CHO Cell Line. *Cell Syst.* 4: 530–542.e6.
- Zhang D, Pan J, Xiang X, Liu Y, Dong G, Livingston MJ, Chen JK, Yin XM & Dong Z (2017) Protein Kinase C δ Suppresses Autophagy to Induce Kidney Cell Apoptosis in Cisplatin Nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* 28: 1131–1144.
- Zhang G, Liu J, Fan W, Chen Q & Shi B (2017) An Efficient Transient Expression System for Enhancing the Generation of Monoclonal Antibodies in 293 Suspension Cells. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 18: 351–357.
- Zhang X, Han L, Zong H, Ding K, Yuan Y, Bai J, Zhou Y, Zhang B & Zhu J (2018) Enhanced production of anti-PD1 antibody in CHO cells through transient co-transfection with anti-apoptotic genes Bcl-x L and Mcl-1. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 41: 633–640.
- Zhang Y, Zhang M, Wu J, Lei G & Li H (2012) Transcriptional Regulation of the Ufm1 Conjugation System in Response to Disturbance of the Endoplasmic Reticulum Homeostasis and Inhibition of Vesicle Trafficking. *PLoS ONE* 7: e48587.
- Zhu G, Sun L, Albanetti T, Linkous T, Larkin C, Schoner R, McGivney JB & Dovichi NJ (2016) Quantitative analysis of the supernatant from host and transfected CHO cells using iTRAQ 8-plex technique. *Biotechnol. Bioeng.* 113: 2140–2148.
- Zong M, Satoh A, Yu MK, Siu KY, Ng WY, Chan HC, Tanner JA & Yu S (2012) TRAPPC9 Mediates the Interaction between p150Glued and COPII Vesicles at the Target Membrane. *PLoS ONE* 7: e29995.



www.smbb.com.mx