

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

Año 2023 Volumen 27, Número 5
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotechnología y Bioingeniería



MESA DIRECTIVA

2022 – 2024

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Presidenta

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
Vicepresidente

Dra. Beatriz Ruiz Villafán
Secretaria

Dra. María Dolores Reyes Duarte
Tesorero

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez
Subsecretario

M. en C. Karina Adames Beas
Vocal Profesional

Biol. Teresa Elizabeth Martínez Oropeza
Vocal Estudiante

COMISIÓN DE PREMIOS

Dra. Andrea Sabido Ramos
*Departamento de Alimentos y Biotecnología
Facultad de Química, UNAM*

Dr. Cuauhtémoc Licona Cassani
*ITESM/Centro de Biotecnología FEMSA,
Campus Monterrey*

Dra. Josefina Barrera Cortés
*Departamento de Biotecnología y
Bioingeniería
CINVESTAV-IPN*

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
*Centro de Investigación en Biotecnología
Universidad Autónoma del Estado de
Morelos*

EDITORA

Dra. María Soledad Córdova Aguilar
UNAM

Co-editor
Dr. Jorge Gracida Rodríguez
UAQ

Formación y edición
Pas. QA Mariana Espinoza Tapia

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	5
Editorial	9
Premio Alfredo Sánchez Marroquín 2023	
Mejores tesis en Biotecnología y Bioingeniería	11
Artículos	
Uso de péptidos cariofílicos en el desarrollo de vectores no virales a base de quitosán para terapia génica	
Karen Donají Olivo-Escalante, María Eugenia Aranda-Barradas	12
Potencial biológico de péptidos obtenidos del amaranto mediante fermentación con bacterias ácido lácticas	
Dora Elisa Cruz-Casas, Cristóbal N. Aguilar, Juan A. Ascacio-Valdés, Raúl Rodríguez-Herrera, Mónica L. Chávez-González, Adriana C. Flores-Gallegos	23
Enfoque multidisciplinario para el estudio de un alimento fermentado tradicional a base de maíz	
Jocelin Rizo, Teresa Martínez, Brenda Cruz, Aidé Martínez, Daniel Guillén, Sergio Encarnación, Carmen Wachter, Romina Rodríguez-Sanoja	33
Premio Sergio Sánchez Esquivel 2023	
Mejores protocolos de tesis en Biotecnología y Bioingeniería	51
Artículos	
Virus adeno-asociado y su uso en virotecnología	
Arturo Liñan-Torres, Roberto C. García-Torres, Laura A. Palomares	53
Desarrollo de vacunas nasales como estrategia para disminuir la infección de SARS-CoV-2	
Mónica Márquez, Daniel Guillén, Romina Rodríguez-Sanoja	67
Descubrimiento de lantipeptidos por minería genómica: un nuevo enfoque en la búsqueda de nuevos fármacos	
Carlos García-Ausencio, Fernando Guzmán-Chávez, Andrea Aguilar-Cabrera, Sergio Sánchez	74

Índice

Coproducción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos por *Enterobacter soli* en cultivo sumergido

Ana Patricia Gayosso, José Andrés Herrera, Neith Aracely Pacheco,
Ricardo Hernández

89

Descifrando la comunicación celular en *Bacillus*: Influencia del pH en la esporulación y la heterogeneidad celular

Lorena Yamileth Balón Rosas, Agustín Luna Bulbarela, Leobardo Serrano Carreón,
Enrique Galindo Fentanes

98

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

Instrucciones para los autores

mostrado...”

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 2023

En este número especial de la Revista BioTecnología, de nuestra querida Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB) el lector podrá encontrar distinguidos trabajos que dan cuenta de la potencia y vigor de la Biotecnología a nivel nacional reflejando en la consecución de los premios “**Alfredo Sánchez Marroquín**” patrocinado por *Yakult de México S.A.* a las mejores tesis en licenciatura, maestría y doctorado y los protocolos ganadores del premio “**Sergio Sánchez Esquivel**” con patrocinio de *Biotekno*. Se da cuenta de la diversidad que el estado del arte tiene en nuestra interdisciplina con trabajos desde distintos puntos de nuestra geografía, desde El sur en Veracruz hasta el norte en Saltillo. Por supuesto que nuestra máxima casa de estudios, la UNAM, exhibe su capacidad y poderío en Biotecnología. No solo la diversidad geográfica si no también la grata y reconfortante presencia de las mujeres en la mayoría de los trabajos ganadores es evidente.

Dentro del Premio Alfredo Sánchez Marroquín se nos presenta la “Caracterización microbiológica, bioquímica y proteómica del pozol” (doctorado) y el “Potencial biológico de péptidos obtenidos del amaranto mediante fermentación con bacterias ácido-lácticas” (maestría) y “Evaluación del efecto de dos péptidos cariográficos en el ensamblaje y funcionalidad de nanopartículas para terapia génica a base de quitosán utilizando el plásmido pEGFP-N1” (licenciatura). Por otro lado, en el marco del Premio Sergio Sánchez Esquivel se presenta “Expresión y caracterización de un RiPP detectado por minería genómica” (doctorado), “Sistema DFAtag-almidón fusionado a la proteína Spikemut del SARS-CoV-2 como posible candidato vacunal” (maestría) y “Evaluación in vitro e in vivo de la eficacia de cápsidas modificadas de virus adeno-asociado (VAA) de los serotipos 2 y 8 como vectores virales” (licenciatura). Con dos menciones honoríficas: “Análisis transcripcional de la red regulatoria de Quorum Sensing que determina la esporulación y la heterogeneidad celular en *Bacillus*, en función del pH del cultivo y la concentración celular” (doctorado) y “Efectos de las condiciones nutricionales para la acumulación de polihidroxialcanoatos en bacterias aisladas de la industria azucarera” (maestría). Los trabajos ganadores se distinguieron de entre más de 40 trabajos de gran calidad sometidos.

Editorial

Felicidades, de nuevo, a Jocelin Marari, Dora Elisa, Karen Donaji, Mónica, Lorena, Ana Patricia, Carlos Adrián y Roberto Carlos.

Muchas gracias a la H. Comisión de Premios de la SMBB: Dra. Andrea Sabido Ramos, Dra. Josefina Barrera Cortés, Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa y Dr. Cuauhtémoc Licon Cassani, su trabajo y profesionalismo se reflejó en la difícil tarea de seleccionar los trabajos ganadores. Gracias especiales a nuestros patrocinadores para estos premios: *Yakult de México S.A.* y *Biotekno*.

Finalmente, querido lector, disfrute este viaje a lo más distinguido que la SMBB puede ofrecer: el trabajo esforzado, inteligencia y capacidad de sus jóvenes investigadoras e investigadores. Nuestra interdisciplina goza de cabal salud.

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez

Subsecretario y Presidente de la Comisión de Premios de la SMBB

manuel.lizardi@uaslp.mx

Premio Alfredo Sánchez Marroquín 2023 a las mejores tesis en Biotecnología y Bioingeniería

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C. (SMBB), en conjunto con 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 2021 y el 28 de febrero de 2023. Los reconocimientos fueron entregados durante el XX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería celebrado en Ixtapa , Gro.



Las tesis ganadoras fueron:

Licenciatura

Evaluación del efecto de dos péptidos cariofílicos en el ensamblaje y funcionalidad de nanopartículas para terapia génica a base de quitosán utilizando el plásmido pEGFP-N1

Karen Donaji Olivo Escalante

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

Dirección: Dra. María Eugenia Aranda Barradas

Maestría

Potencial biológico de péptidos obtenidos del amaranto mediante fermentación con bacterias ácido lácticas

Dora Elisa Cruz Casas

Universidad Autónoma de Coahuila

Dirección: Dra. Adriana Carolina Flores Gallegos

Doctorado

Caracterización microbiológica, bioquímica y proteómica del pozol

Jocelin Marari Rizo Villagrana

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dirección: Dra. Romina Rodríguez Sanoja

Uso de péptidos cariofílicos en el desarrollo de vectores no virales a base de quitosán para terapia génica

Karen Donají Olivo-Escalante, María Eugenia Aranda-Barradas*

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. C.P.: 54740

* mariaeugeniaarandab@comunidad.unam.mx

Resumen

La terapia génica es una estrategia que involucra a un conjunto de técnicas biotecnológicas y moleculares que llevan al tratamiento de enfermedades a través de la transferencia de material genético terapéutico que puede realizar las funciones de un gen sano o, silenciar un gen defectuoso, o bien, dar instrucciones de muerte a la célula, como en el tratamiento contra cáncer. Todo esto mediante el uso de vectores con capacidad de penetrar las membranas celulares (como hacen, por ejemplo, los virus). En este escenario donde los vectores poseen tal importancia para el desarrollo de la terapia génica, el presente trabajo se centra en la optimización de la capacidad del quitosán (un biopolímero biodegradable y no tóxico) para transferir genes, es decir, como vector no viral, por medio del acoplamiento de dos péptidos cariofílicos, los cuales consisten en secuencias diferentes de aminoácidos que actúan como señales de localización nuclear (NLS) y favorecen la entrada del DNA terapéutico al núcleo de la célula a través de receptores denominados *importinas*. Se encontró que los péptidos cariofílicos ejercen efectos positivos en las características físicas de nanopartículas de quitosán utilizadas como vector y además aumentan su eficiencia para transferir genes cuando sus secuencias tienen una composición de pocos aminoácidos neutros y varios aminoácidos con carga positiva. La eficiencia del quitosán como vector puede aún incrementarse a futuro por medio del acoplamiento de ligandos específicos para lograr terapias dirigidas, con la intención de desarrollar un vector que pueda ser incluso más eficiente que un virus sin las desventajas que eso conlleva.

Palabras Claves: nanopartículas, terapia génica, plásmido, péptido cariofílico, señal de localización nuclear.

Abstract

Gene therapy is a strategy that involves a cluster of biotechnological and molecular techniques that lead to the treatment of diseases through the transference of genetic material that can perform the functions of a healthy gene, silence a defective one, or give death instructions to a cell, such as a cancer treatment. These goals only can be achieved by using vectors that are capable to get into the cell and, if applied, to the cell nucleus (just like viruses do, for example). In this scenario in which vectors have such an importance for the development of gene therapy, the present work focuses on the optimization of the capability of chitosan (a biodegradable and non toxic biopolymer) to transfer genes, meaning as a nonviral vector, by the coupling of two karyophilic peptides, which consist on different amino acid sequences that act as nuclear localization signals (NLS) and promote the therapeutic DNA entrance to the nucleus through receptors called *importins*. It was found that karyophilic peptides have positive effects on the physical characteristics of chitosan nanoparticles used as vectors and, furthermore, they increase their efficiency to transfer genes when their sequences have less neutral amino acids and several ones positively charged. Chitosan efficiency as a vector can even further increase by coupling specific ligands to develop a vector almost as efficient as viruses without the disadvantages that they imply.

Key Words: nanoparticles, gene therapy, plasmid, karyophilic peptide, nuclear localization signal

Introducción

La terapia génica es una herramienta potencial en el combate de diversas enfermedades para las cuales no hay aún una cura definitiva o bien, la que hay compromete de manera importante la calidad de vida de los pacientes. Entre 1998 y 2010, se aprobaron cuatro medicamentos basados en terapia génica (Vitravene, Gendicine, Oncorine y Rixin-G), y tres de ellos obtuvieron autorización para tratar algunos tipos de cáncer en Asia. Desde entonces, ha habido un incremento año con año en el número de protocolos clínicos de terapia génica en todo el mundo, y por lo tanto, más medicamentos basados en terapia génica han obtenido las licencias de comercialización en Europa y Estados Unidos. Del 2011 al 2019 se aprobaron un total de 18 productos basados en terapia génica por agencias reguladoras de Estados Unidos, Europa, China, Corea, Japón, Canadá, Rusia y Filipinas (Ma et al., 2020).

¿En qué consiste la terapia génica?

El mecanismo de acción de la terapia génica consiste en conferir al organismo la capacidad de generar, o bien, detener la producción de alguna proteína que sea clave para combatir determinada enfermedad mediante el envío de DNA o RNA terapéutico(s) a las células (Patil et al., 2019). Es una terapia que tiene muy pocos efectos adversos. Sin embargo, todavía tiene varios retos. Para empezar, debido a que hay muchas enzimas en circulación que pueden degradar rápidamente al DNA o RNA circulante, su administración requiere del uso de vectores que los protejan del entorno para que lleguen íntegros a las células donde se requiere de su acción terapéutica. De manera general, hay dos tipos de vectores: los virales y los no virales (Figura 1); ambos tienen ventajas y desventajas.

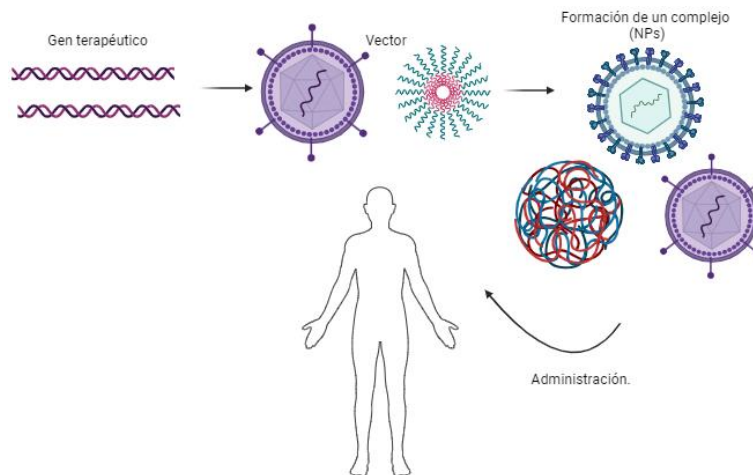


Figura 1. Terapia génica. El gen (DNA) o RNA terapéutico se acoplan a vectores virales o no virales para poder llegar a las células y ejercer su efecto terapéutico.

Los vectores virales, como su nombre indica, son virus, comúnmente adenoasociados (AAV), retrovirus, lentivirus o adenovirus (Ads), que son modificados mediante ingeniería genética para restringir la expresión de genes patogénicos e insertar el material genético terapéutico, lo que permitirá la entrega segura y eficiente de este material a las células objetivo. Una de las principales ventajas de los vectores virales es que, al ser virus en sí mismos, poseen la maquinaria molecular necesaria para la internalización del material genético en la célula huésped y su

expresión. Esto asegura que el gen terapéutico o la secuencia de interés sean transferidos de manera eficiente y puedan ser utilizados por la célula para producir la proteína terapéutica; este proceso se denomina *transfección*. Esta capacidad de los vectores virales para entrar a las células y entregar genes es su principal fortaleza en el ámbito de la terapia génica. Sin embargo, los vectores virales también presentan desafíos significativos. Uno de ellos es su alto costo de producción y purificación, lo que limita su disponibilidad y aplicación en un contexto

clínico más amplio. Además, estos vectores tienen limitaciones en cuanto al tamaño del material genético que pueden empaquetar, lo que puede restringir el tipo de genes que se pueden entregar, tienen un tropismo muy variado (lo que dificulta lograr una terapia dirigida) y finalmente, al ser virus pueden inducir una respuesta inmunológica, en muchos casos, exacerbada, a pesar de estar genéticamente modificados (Yin et al., 2014).

Este tipo de desafíos ha llevado al desarrollo de otro tipo de vectores, los vectores no virales. Estos se forman a partir de diversos materiales, en general biocompatibles, como los lípidos, polímeros catiónicos, péptidos catiónicos y algunas moléculas inorgánicas con propiedades especiales para el envío de genes, tales como el fosfato de calcio. El material genético terapéutico se acopla a estos vectores; cuando se trata de un gen terapéutico, este se encuentra insertado en una molécula de DNA conocida como plásmido (pDNA). A los complejos pDNA-lípidos se les conoce como *lipoplexes* y los complejos pDNA-polímeros catiónicos son conocidos como *polioplexes*. Estos vectores ofrecen ventajas en términos de seguridad, capacidad de carga genética y facilidad de producción a gran escala, así como una posibilidad más amplia para el diseño de terapias génicas dirigidas. A pesar de todas estas ventajas, este tipo de vectores tampoco son una solución completa a la problemática, pues aquí también se presentan retos, el principal de ellos: la baja eficiencia de transfección (Patil et al., 2019).

Retos y estrategias para la optimización de vectores no virales

Los vectores no virales deben superar varios retos para lograr el envío de genes de manera exitosa. Una vez que el vector ha interactuado con la célula, el siguiente paso es la internalización que se lleva a cabo mediante endocitosis e involucra la invaginación de la membrana celular y la formación de vesículas; dicho proceso puede clasificarse como macropinocitosis, fagocitosis y endocitosis mediada por receptor que, a su vez, se clasifica en dependiente e independiente de clatrina. La vía más común de internalización de los complejos es la endocitosis y esta depende de la estructura, composición, tamaño del vector, así como el tipo celular (Oliveira et al., 2017). Una vez dentro de la

célula, debe ocurrir el escape del endosoma para que la nanopartícula pueda continuar hacia su destino, ya sea el citoplasma o el núcleo, evitando su llegada al lisosoma, organelo con el que se fusiona el endosoma y en el que, debido a su pH ácido y riqueza en enzimas hidrolíticas, se degradaría el vector y el material genético terapéutico. Logrando el escape endosomal y una vez en el citoplasma, el DNA requiere ser transportado hacia el núcleo; en este paso, la afinidad del polímero utilizado como vector con el pDNA puede ser una limitante para la disociación del complejo, por lo que deben optimizarse sus características fisicoquímicas, o elegir biopolímeros que puedan degradarse fácilmente en el ambiente intracelular (Perez Ruiz de Garibay, 2016). Posteriormente, es necesaria la entrada del pDNA al núcleo, que es donde se procesará para obtener el efecto terapéutico deseado. De manera general, la entrada de cualquier molécula al núcleo puede ocurrir de manera pasiva durante la reintegración de la envoltura nuclear cuando la célula se encuentra en mitosis, lo que en este caso reduce de manera muy importante las probabilidades de que ingrese una cantidad importante del gen terapéutico al núcleo, o bien, de manera más eficiente e independiente del estadio celular, el ingreso activo al núcleo puede ser mediante el complejo de poro nuclear (NPC). Sin embargo, mediante este mecanismo sólo pueden ingresar las moléculas que cuentan con una señal de localización nuclear (NLS), que consiste en diversas secuencias de aminoácidos que son reconocidas por proteínas en el citoplasma llamadas *importinas* que tienen alta afinidad por el NPC y pueden gestionar la entrada de las moléculas que contengan la NLS al núcleo (Yao et al., 2013).

Todos estos retos han llevado al desarrollo de diferentes estrategias para optimizar los vectores no virales. Entre ellos se encuentran: la modificación química de los lípidos o polímeros catiónicos utilizados como vector (Yao et al., 2013), el uso de diversos pesos moleculares en función del polímero, la optimización de relaciones molares pDNA:polímero (Aranda-Barradas et al., 2022), o la integración de ligandos específicos para receptores celulares que lograrían tanto una endocitosis más eficiente como una terapia dirigida y específica (Katas et al.,

2012), o la incorporación de moléculas que tengan NLS para facilitar la llegada del pDNA al núcleo (Cartier & Reszka, 2002). Asimismo, pueden utilizarse promotores tejido-específicos (secuencias de DNA que regulan específicamente la transcripción del gen) durante la inserción del gen terapéutico en el plásmido utilizado, con la finalidad de que solo sea expresado en las células que puedan promover su transcripción y procesamiento de manera específica (Saukkonen & Hemminki, 2004).

¿Qué es el quitosán?

Dentro de los grupos de materiales utilizados en el desarrollo de vectores no virales

mencionados previamente, y perteneciendo al grupo de los polímeros catiónicos, se encuentra el quitosán. Este es un biopolímero compuesto de β -D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (Figura 2), producido por desacetilación alcalina de la quitina, la cual es un biopolímero presente en las cáscaras de camarón, algunos hongos y algunos insectos, que además es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza (Pellis et al., 2022). Debido a sus grupos amino, el quitosán se comporta como una base débil con un pH entre 6.2 - 7.2, es únicamente soluble en un pH de entre 1 y 6, intervalo en el que también se encuentran protonados estos grupos funcionales (Liu & De Yao, 2002).

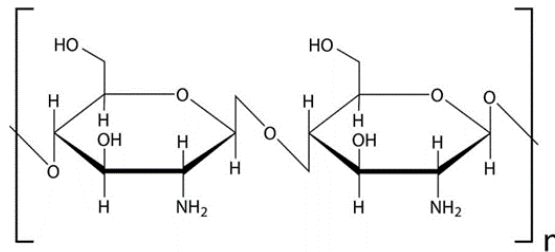


Figura 2. Unidad repetitiva del polímero quitosán

El quitosán es biocompatible, biodegradable y no tóxico; por lo tanto, se ha propuesto como una alternativa más segura a otros vectores no virales en el transporte de pDNA (Aranda-Barradas et al., 2022), RNA (Soliman et al., 2020) y la regulación por siRNA (RNA de silenciamiento, que será capaz de evitar la traducción de un RNA mensajero diana) (Holzerny et al., 2012). Además de estas características favorables para considerarlo en el desarrollo de vectores no virales, al quitosán se le ha vinculado con la hipótesis del efecto esponja de protones, la cual se basa en que, a pH fisiológico, solo algunos átomos de nitrógeno de las aminas presentes en el polímero son protonadas. En el endosoma, el pH desciende y la cantidad de aminas protonadas aumenta, lo que provoca un gradiente de carga que desencadena un flujo de iones Cl^- y la concentración de iones Cl^- incrementa, lo que induce un flujo de agua que eventualmente provocará la lisis del endosoma, evitando así la llegada al lisosoma donde se degradará el material genético terapéutico que transporta (Santos-Carballal et al., 2018).

Otra ventaja del quitosán es que una vez que las nanopartículas a base de quitosán pueden

escapar del endosoma y ser liberadas al citoplasma, es que en este medio se encuentran lisozimas y quitinasas que lo degradan (Islam et al., 2019), lo que permite que el pDNA quede libre y tenga mayores probabilidades de ingresar al núcleo.

¿Qué son los plásmidos y los genes reporteros y por qué juegan un papel tan importante en la terapia génica?

Los plásmidos (pDNA), son secuencias de DNA circular bicatenario y se encuentran separados del genoma bacteriano principal, en el citoplasma de la célula. Estos plásmidos se caracterizan por tener una replicación independiente del cromosoma y por no portar genes esenciales para el crecimiento y reproducción de la célula, pero pueden llevar genes que codifican para algunas proteínas que confieren resistencia a algún antibiótico, lo que permite seleccionar bacterias que lo portan, además de propagarlo fácilmente mediante cultivo bacteriano (generalmente de *Escherichia coli*). Su aislamiento es sencillo y puede realizarse utilizando ciertas soluciones o utilizando kits comerciales. Gracias a estas características, los plásmidos se utilizan ampliamente como soporte para transportar algún fragmento de DNA de interés, ya que

también cuentan con una estructura muy estable (a diferencia de un fragmento más pequeño y lineal de DNA). La secuencia de interés (en este caso, un gen terapéutico o bien, un gen reportero), se inserta en un plásmido específico mediante técnicas de biología molecular y este plásmido ya se encuentra listo para acoplarse a algún vector no viral no solo para el envío efectivo de este DNA a la célula, sino también para proveer los elementos necesarios para que se procese correctamente este DNA en el núcleo, como secuencias que actúan como promotores para la transcripción, y/o señales dentro de la secuencia de nucleótidos para que se lleve a cabo correctamente la traducción, etc.

Durante el desarrollo de vectores no virales, en las primeras etapas es recomendable trabajar con genes reporteros, es decir, genes cuya expresión se hace evidente muy fácilmente, con el fin de establecer si las condiciones a prueba son ideales para la transferencia de genes. De manera comercial, hay plásmidos que contienen genes reporteros, como el plásmido pEGFP-N1, que tiene el gen que codifica una variante silvestre de la proteína verde fluorescente, lo que permite la localización de dicha proteína *in vivo* e *in vitro* y puede utilizarse como un marcador para determinar la eficiencia de

transfección de algún vector no viral (o viral) en desarrollo en cualquier línea celular de manera sencilla mediante microscopía de epifluorescencia o citometría de flujo.

Ensamblaje de nanopartículas a base de quitosán como vectores no virales

La *coacervación compleja* es el método de auto-ensamblaje más utilizado para la formación de nanopartículas, basado en su formación a partir de las interacciones electrostáticas entre moléculas cargadas en solución. Dentro de las ventajas que presenta este método está la obtención de complejos a través de interacciones sencillas que no afectan la funcionalidad de lo que se desea transportar (Olivo-Escalante, 2022). Inicialmente el quitosán reacciona electrostáticamente con los nucleótidos, saturando todas las cargas negativas hasta neutralizar la carga total; posteriormente, se da una condensación de los ácidos nucleicos dentro del polímero formando el poliplex, que provee de protección contra la degradación por endonucleasas y a su vez permite la internalización celular. El proceso de condensación del pDNA es impulsado entrópicamente, por lo que al mezclarse un polímero catiónico y el pDNA forman de manera espontánea poliplexes (Raik et al., 2018) (Figura 3).

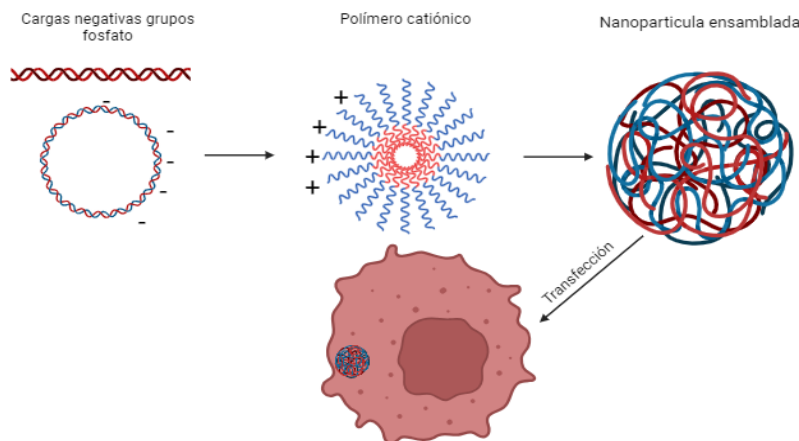


Figura 3. Interacción de cargas para la formación de nanopartículas.

Los coacervados o en este caso, los poliplexes, son formados con cargas opuestas entre sí interaccionando y en algunas ocasiones también pueden intervenir otro tipo de fuerzas como hidrofóbicas, Van der Waals y puentes de hidrógeno que estabilizan los complejos polisacárido – DNA (Köping-Höggård et al., 2004).

Las interacciones electrostáticas se dan según las cargas netas de las moléculas en las condiciones en las que se producen las mezclas, en el caso de la formación de los poliplexes DNA - quitosán, la interacción se da entre los grupos fosfato del DNA que le proporcionan una carga neta negativa con los grupos amino cargados positivamente del

quitosán, que lo convierten en un polielectrolito que se disuelve fácilmente en soluciones ácidas. Estas interacciones de carga generan cambios en la conformación del DNA hasta una forma condensada, inducida por el polielectrolito, así como por las cargas iónicas en el medio de disolución (Köping-Höggård et al., 2004). En función de estas interacciones (concentración de los componentes, condiciones de agitación, etc), se formarán estructuras esféricas (que son las más adecuadas para la endocitosis), o bien, estructuras alargadas o toroidales de diferentes tamaños (Golan et al., 1999).

¿Qué son los péptidos cariofílicos y por qué usarlos en el desarrollo de vectores no virales para terapia génica?

A lo largo de la evolución, las células han desarrollado diferentes mecanismos que protegen al DNA propio y a la célula de DNA exógeno que pueda resultar perjudicial como el de los virus, mientras que a su vez estos patógenos han desarrollado mecanismos de evasión. Es por esto que el conocer este tipo de relaciones entre la evasión y la defensa puede contribuir en el desarrollo de vectores para la entrega de genes terapéuticos. Los péptidos que contienen señales de localización nuclear, o también llamados comúnmente *péptidos cariofílicos*, son secuencias de 5 - 20 aminoácidos, formados principalmente por aminoácidos básicos como la lisina (K) y la arginina (R), derivadas de proteínas nucleares eucariotas y de proteínas virales, las cuales contienen una señal de localización nuclear (NLS) que es reconocida por proteínas receptoras intracelulares específicas (importinas) que interactúan con los poros nucleares y facilitan el ingreso al núcleo (Yao et al., 2013).

Los sistemas de transferencia de genes no virales todavía adolecen de una eficiencia de transfección relativamente baja en comparación con los vectores virales, lo que dificulta su amplia aplicación clínica, pues tras el escape del endosoma y la degradación del polímero en el citoplasma, el pDNA es liberado, pero no internalizado al núcleo, por lo que la expresión del material genético terapéutico no se realiza. Los péptidos que contienen una señal de localización nuclear (NLS) pueden unirse al pDNA de modo que se forma un complejo pDNA-NLS, mismo que

puede ser reconocido como un sustrato de importación nuclear (Cartier & Reszka, 2002).

Si bien la incorporación de péptidos con secuencias NLS aprovecha la maquinaria de importación nuclear, el diseño de vectores no virales requiere tener en consideración diferentes factores que influyen en la capacidad de los péptidos cariofílicos para mejorar la entrega de genes terapéuticos, como la secuencia y concentración del péptido, el método de incorporación con el pDNA, y la proporción pDNA:péptido cariofílico:quitosán (Olivo-Escalante, 2022). Estos factores pueden tener un efecto en las características físicas de las nanopartículas, las cuales a su vez definen su eficiencia de transfección. Entre los parámetros más importantes a determinar para predecir esto se encuentran la morfología, el tamaño, el índice de polidispersión (el cual determina qué tan homogéneo es el tamaño de las partículas en suspensión) y la carga de superficie. Las características buscadas para cada uno respectivamente son: forma esférica, tamaño de 100 a 300 nm, índice de polidispersión <0.5 y carga de superficie de entre 10 y 50 mV, ya que se ha reportado que estas características facilitan la internalización de las nanopartículas a la célula, lo cual repercute positivamente en la eficiencia de transfección (Aranda-Barradas et al., 2022).

¿Qué es lo que se ha realizado y qué se ha obtenido?

Bremner et al (2004), reportaron la incorporación covalente de péptidos cariofílicos a determinada secuencia de DNA lineal y pDNA (sin el uso de otro polímero como vector), donde se encontró un incremento en la transfección en comparación con poliplexes a base de polilisina. También se evaluó la capacidad de estos péptidos cariofílicos para compactar al pDNA por interacciones electrostáticas, encontrando que la compactación del pDNA es directamente proporcional al contenido de aminoácidos catiónicos; sin embargo, no es suficiente para lograr una transfección adecuada, aunque no se reportaron datos de morfología o tamaño de los complejos.

Por otro lado, Opanasopit et al. (2009), reportaron el uso de un péptido cariofílico en nanopartículas a base de quitosán, incorporando electrostáticamente

concentraciones crecientes de péptido una vez formado el complejo pDNA-quitosán. Encontraron que a medida que aumenta la concentración de péptido, aumenta la eficiencia de transfección; sin embargo, también se presenta cierta toxicidad celular a mayor concentración de péptido cariofílico.

No sería posible señalar con exactitud la cantidad de un péptido que debe utilizarse, sin embargo, se debe tener en cuenta que el complejo debe presentar las cargas positivas de la lisina y arginina para la interacción con los receptores de transporte, y su neutralización al unirse electrostáticamente al DNA impediría el reconocimiento, además de que, si se desea formar un poliplex por coacervación compleja, también se debe buscar un balance de cargas para formar la nanopartícula. Los péptidos no conjugados al ser introducidos a la célula pueden competir por los sitios de internalización nuclear con los complejos formados, por lo que es muy importante determinar su concentración óptima para asegurar que no exista competencia en los receptores que pueda afectar la transfección (Bremner et al., 2004).

Entonces, por un lado, es más conveniente la incorporación de péptidos mediante interacción electrostática, ya que de este modo se evita la modificación de los ácidos nucleicos dada por el enlace covalente con el péptido. Y, por otro lado, esta interacción electrostática con el pDNA debe ser utilizando la concentración adecuada de cariofílico y que se lleve a cabo previamente a la adición del quitosán, el cual es necesario para que se lleve a cabo completamente la compactación del pDNA y puedan obtenerse nanopartículas con forma y tamaño capaces tanto de proteger adecuadamente al pDNA como de ingresar a la célula de manera más eficiente. De este modo, al saber la concentración adecuada de péptido cariofílico, y al no quedar expuesto gracias a la interacción posterior con el quitosán, podría aminorarse el efecto citotóxico reportado al aumentar la concentración de péptido cariofílico utilizado.

Con base en esto, se evaluaron las características y funcionalidad de nanopartículas a base de quitosán de bajo peso molecular, a las que se les incorporaron electrostáticamente péptidos cariofílicos de diferentes secuencias y tamaños mediante interacción electrostática con el pDNA, con el fin de evaluar el efecto de estos péptidos, su secuencia y longitud, en las características físicas y funcionalidad biológica de estas nanopartículas a base de quitosán y pDNA como vectores no virales para terapia génica.

En primer lugar, se determinaron las concentraciones óptimas de los péptidos cariofílicos a utilizar (Péptido 1 (P1): CGGGPKKKRKVED; Péptido 2 (P2): PAAKRVKLD) con el plásmido pEGFP-N1. Esto se realizó mediante ensayos de retardo, los cuales se basaron en una electroforesis en gel de agarosa donde se analizó, con base en parámetros conocidos (Hernandez-Baltazar et al., 2012), qué tanto se retrasa la migración del pDNA a una concentración constante (64 nM) en función de la concentración de péptido. Posteriormente, se determinó la concentración óptima de quitosán a utilizar con los complejos pDNA/cariofílico mediante ensayos de retención. En estos ensayos, los complejos pDNA/cariofílico se sometieron a interacción electrostática con concentraciones crecientes de quitosán, y de igual forma, mediante una electroforesis, se determinó su concentración óptima, la cual corresponde a la primera que es capaz de generar la ausencia de migración electroforética del pDNA (Aranda-Barradas et al., 2022). Una vez definidas las concentraciones y relaciones molares óptimas pDNA:péptido cariofílico:quitosán, se ensamblaron nanopartículas por coacervación compleja, y se realizó su caracterización física y la evaluación de su funcionalidad biológica mediante ensayos de transfección *in vitro*, utilizando la línea celular HeLa, de cáncer cervicouterino (Figura 4).

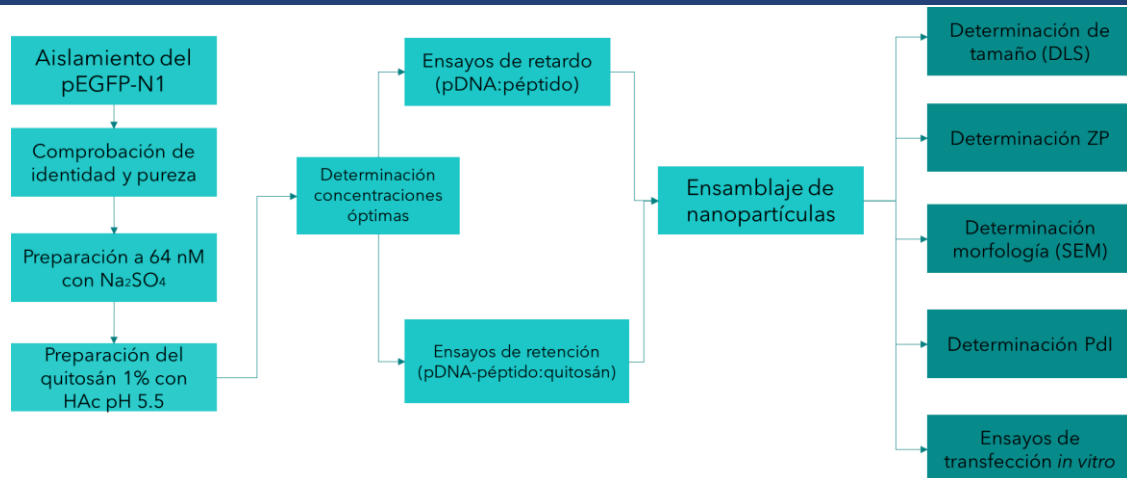


Figura 4. Metodología general utilizada. HAc: ácido acético; DLS: Dispersión dinámica de luz; ZP: Potencial zeta (determinado por movilidad electroforética acoplada a láser Doppler); SEM: Microscopía Electrónica de Barrido; Pdl: Índice de polidispersión (determinado por DLS).

Se encontró que las características físicas (tamaño, potencial zeta e índice de polidispersión) de las nanopartículas ensambladas con el péptido 2 se mantuvieron

constantes o bien, mejoraron en comparación con el control al adicionar dicho péptido, en contraste con lo ocurrido usando el péptido 1 (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización de nanopartículas. Valores obtenidos a partir de las mediciones de tamaño de partícula (nm), potencial Z e índice de polidispersión en cada uno de los grupos de nanopartículas y análisis estadístico prueba T de Student, de color verde se encuentran señalados los grupos que presentaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$). NPs: nanopartículas

	Tamaño (nm)	P dos colas	ZP (mV)	P dos colas	Pdl	P dos colas
NPs Control	218 ± 18	0.007	19.69 ± 1.3	0.621	0.105 ± 0.038	0.044
NPS P1	300 ± 20		19.64 ± 1.2		0.213 ± 0.03	
NPs Control	218 ± 18	0.837	19.69 ± 1.3	0.192	0.105 ± 0.038	0.0003
NPS P2	221 ± 19		20.76 ± 1.4		0.078 ± 0.018	
NPS P1	300 ± 20	0.008	19.64 ± 1.2	0.234	0.213 ± 0.03	0.049
NPS P2	221 ± 19		20.76 ± 1.4		0.078 ± 0.018	

Se analizó la morfología de las nanopartículas con P1 o con P2 mediante microscopía electrónica de barrido, donde se confirmó que la incorporación de estos péptidos no alteró la forma esférica que se había reportado

previamente de las nanopartículas (Aranda-Barradas et al., 2022), y no se perciben diferencias en este parámetro entre el uso de P1 o P2 (Figura 5).

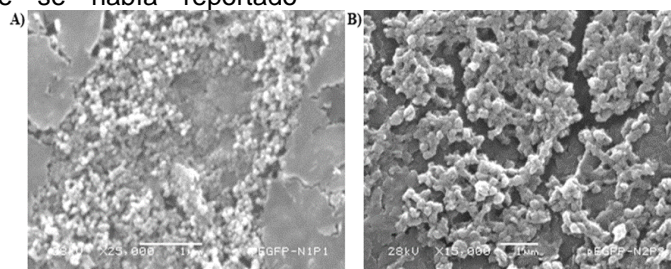


Figura 5. Morfología de las nanopartículas evaluada por Microscopía Electrónica de Barrido. A) Nanopartículas P1; B) Nanopartículas P2. Fotografías obtenidas por: M. en C.: Alicia Del Real López (CFATA-UNAM)

De igual manera, las nanopartículas con P2 mostraron una eficiencia de transfección

cualitativamente mayor en comparación con las nanopartículas control y las que contienen

P1 (Figura 6), lo cual correlaciona con las características fisicoquímicas reportadas.

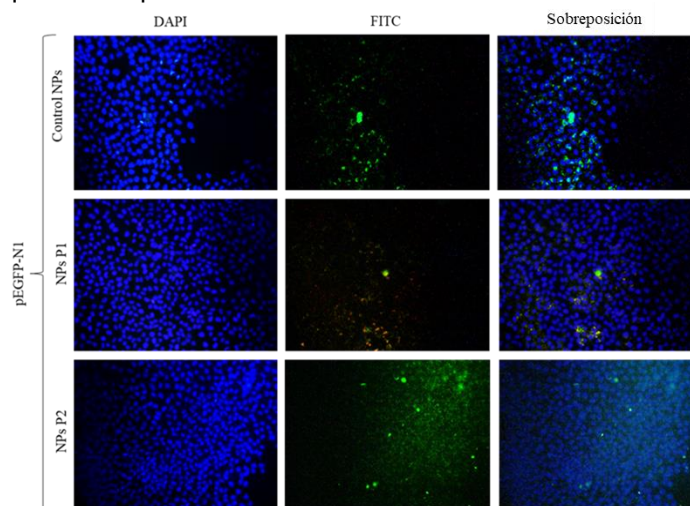


Figura 6. Ensayos de transfección en células HeLa. Tinción DAPI utilizada para los núcleos, se observa en el filtro FITC la presencia de la proteína verde fluorescente propia del plásmido pEGFP – N1. Micrografías de fluorescencia; aumento: 20X. NPs: nanopartículas

Estos resultados demuestran que, si bien los péptidos cariofílicos pueden mejorar las características físicas de los vectores no virales y a su vez favorecer la transfección, las secuencias de aminoácidos son determinantes para obtener buenos resultados, pues a mayor cantidad de residuos con carga neta positiva la condensación del DNA será mejor, y una gran cantidad de aminoácidos con carga neta negativa o neutra, no podrán interactuar con ningún componente del complejo, afectando directamente las propiedades de la nanopartícula final y por lo tanto su transfección (Olivo-Escalante, 2022).

Conclusiones

Teniendo en cuenta que las células no permiten la entrada a cualquier tipo de complejos, aunado a la serie de mecanismos que protegen a la célula de material genético externo y las propias características del vector, el desarrollo de vectores no virales para terapia génica es un trabajo complejo, ya que las características requeridas para que actúen como vectores óptimos son bastante específicas.

Es importante buscar la forma de aprovechar todas las características del quitosán como vector mejorando su capacidad de entregar genes terapéuticos con la adición de péptidos.

Pero es importante considerar que, si bien la adición de péptidos cariofílicos aumenta la eficiencia de la transfección en vectores no virales como el quitosán (como el ejemplo de P2), este aumento también es dependiente de una buena elección de péptido, del uso de la concentración adecuada, del método de acoplamiento y de las propiedades físicas resultantes de la interacción péptido – DNA - quitosán.

Referencias

- Aranda-Barradas, M. E., Trejo-López, S. E., Real, A. Del, Álvarez-Almazán, S., Méndez-Albores, A., García-Tovar, C. G., González-Díaz, F. R., & Miranda-Castro, S. P. (2022). Effect of molecular weight of chitosan on the physicochemical, morphological, and biological properties of polyplex nanoparticles intended for gene delivery. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100228>
- Bremner, K. H., Seymour, L. W., Logan, A., & Read, M. L. (2004). Factors Influencing the Ability of Nuclear Localization Sequence Peptides to Enhance Nonviral Gene Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 15(1), 152–161. <https://doi.org/10.1021/bc034140k>
- Cartier, R., & Reszka, R. (2002). Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer

systems. *Gene Therapy*, 9, 157–167.
<https://doi.org/10.1038/sj/gt/3301635>

Golan, R., Pietrasanta, L. I., Hsieh, W., & Hansma, H. G. (1999). DNA toroids: Stages in condensation. *Biochemistry*, 38(42), 14069–14076. <https://doi.org/10.1021/bi990901o>

Hernandez-Baltazar, D., Martinez-Fong, D., & Trudeau, L. E. (2012). Optimizing NTS-Polyplex as a Tool for Gene Transfer to Cultured Dopamine Neurons. *PLoS ONE*, 7(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051341>

Holzerny, P., Ajdini, B., Heusermann, W., Bruno, K., Schuleit, M., Meinel, L., & Keller, M. (2012). Biophysical properties of chitosan/siRNA polyplexes: Profiling the polymer/siRNA interactions and bioactivity. *Journal of Controlled Release*, 157(2), 297–304.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.023>

Islam, N., Dmour, I., & Taha, M. O. (2019). Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery. In *Heliyon* (Vol. 5, Issue 5). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01684>

Katas, H., Nik Dzulkefli, N. N. S., & Sahudin, S. (2012). Synthesis of a new potential conjugated TAT-peptide-chitosan nanoparticles carrier via disulphide linkage. *Journal of Nanomaterials*, 2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/134607>

Köping-Höggård, M., Vårum, K. M., Issa, M., Danielsen, S., Christensen, B. E., Stokke, B. T., & Artursson, P. (2004). Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Therapy*, 11(19), 1441–1452.
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302312>

Liu, W. G., & De Yao, K. (2002). C hitosan and its derivatives-a promising non-viral vector for gene transfection. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 83).
www.elsevier.com/locate/jconrel

Ma, C. C., Wang, Z. L., Xu, T., He, Z. Y., & Wei, Y. Q. (2020). The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. In *Biotechnology Advances* (Vol. 40). Elsevier

Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107502>

Oliveira, A. V., Rosa da Costa, A. M., & Silva, G. A. (2017). Non-viral strategies for ocular gene delivery. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 77, pp. 1275–1289). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.068>

Olivo-Escalante, K. D. (2022). *Evaluación del efecto de dos péptidos cariográficos en el ensamblaje y funcionalidad de nanopartículas para terapia génica a base de quitosán utilizando el plásmido pEGFP-N1*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.

Opanasopit, P., Rojanarata, T., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., & Ruktanonchai, U. (2009). Nuclear localization signal peptides enhance transfection efficiency of chitosan/DNA complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 382(1–2), 291–295.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.029>

Patil, S., Gao, Y. G., Lin, X., Li, Y., Dang, K., Tian, Y., Zhang, W. J., Jiang, S. F., Qadir, A., & Qian, A. R. (2019). The development of functional non-viral vectors for gene delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215491>

Pellis, A., Guebitz, G. M., & Nyanhongo, G. S. (2022). Chitosan: Sources, Processing and Modification Techniques. In *Gels* (Vol. 8, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/gels8070393>

Perez Ruiz de Garibay, A. (2016). Endozytose in der Gentherapie mit nichtviralen Vektoren. In *Wiener Medizinische Wochenschrift* (Vol. 166, Issues 7–8, pp. 227–235). Springer-Verlag Wien.
<https://doi.org/10.1007/s10354-016-0450-5>

Raik, S. V., Andranovitš, S., Petrova, V. A., Xu, Y., Ka-Wing Lam, J., Morris, G. A., Brodskaja, A. V., Casettari, L., Kritchenkov, A. S., & Skorik, Y. A. (2018). Comparative Study of Diethylaminoethyl-Chitosan and Methylglycol-Chitosan as Potential Non-Viral Vectors for Gene Therapy. *Polymers*, 10, 0.
<https://doi.org/10.3390/polym10040000>

Artículos

Santos-Carballal, B., Fernández, E. F., & Goycoolea, F. M. (2018). Chitosan in non-viral gene delivery: Role of structure, characterization methods, and insights in cancer and rare diseases therapies. *Polymers*, 10(4), 1–51.

<https://doi.org/10.3390/polym10040444>

Saukkonen, K., & Hemminki, A. (2004). Tissue-specific promoters for cancer gene therapy. In *Expert Opinion on Biological Therapy* (Vol. 4, Issue 5, pp. 683–696).

<https://doi.org/10.1517/14712598.4.5.683>

Soliman, O. Y., Alameh, M. G., De Cresenzo, G., Buschmann, M. D., & Lavertu, M. (2020). Efficiency of Chitosan/Hyaluronan-Based mRNA Delivery Systems In Vitro: Influence of Composition and Structure. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(4).

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.12.020>

Yao, J., Fan, Y., Li, Y., & Huang, L. (2013). Strategies on the nuclear-targeted delivery of genes. In *Journal of Drug Targeting* (Vol. 21, Issue 10, pp. 926–939).

<https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.830310>

Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy.

Nature Reviews Genetics, 15(8), 541–555.

<https://doi.org/10.1038/nrg3763>

Potencial biológico de péptidos obtenidos del amaranto mediante fermentación con bacterias ácido lácticas

Dora Elisa Cruz-Casas, Cristóbal N. Aguilar, Juan A. Ascacio-Valdés, Raúl Rodríguez-Herrera, Mónica L. Chávez-González, Adriana C. Flores-Gallegos*

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Boulevard Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas Valdés s/n Col. República 25280 Saltillo, Coahuila, México.

*carolinaflores@uadec.edu.mx

Resumen

La fermentación es una estrategia para obtener péptidos bioactivos que ha sido poco explorada en el amaranto. En este trabajo, se utilizaron 123 cepas aisladas de leche de cabra, aguamiel, brócoli y amaranto. Se determinó el porcentaje total de degradación de proteínas del amaranto (%TPD) demostrado por las cepas. Los resultados oscilaron entre 0 y 95.95% y se seleccionaron e identificaron las cepas que produjeron un mayor %TPD, las cuales correspondían a los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Bacillus*. La fermentación semisólida se realizó con dichas cepas y se procedió a obtener los extractos de agua/sal (WSE) que contenían los péptidos liberados. Mediante la técnica Tricine SDS-PAGE se lograron visualizar bandas de entre 26.6 y 1.4 kD; la concentración de péptidos se midió por el método OPA y se evaluó la actividad antioxidante, antihipertensiva y antimicrobiana de los WSE. En el ensayo FRAP, el mejor WSE fue LR9 con una concentración de $1.99 \mu\text{MTE/L} \pm 0.07$, mientras que en ABTS, 18C6 obtuvo la mayor concentración con $19.18 \mu\text{MTE/L} \pm 0.96$. En cuanto a la actividad antihipertensiva, se obtuvieron porcentajes de inhibición entre 0 y 80.65%. También se comprobó que algunos WSE tienen propiedades antimicrobianas contra *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes*. Al realizar la ultrafiltración con membranas de 10 y 3 kD de los WSE seleccionados, se determinó que las fracciones > 10 kD y 3 – 10 kD resultaban tener mejor actividad antioxidante y antimicrobiana. Por lo tanto, la fermentación del amaranto con BAL permitió la liberación de péptidos con actividad antioxidante, antihipertensiva y antimicrobiana.

Palabras Claves: Péptidos bioactivos, fermentación, bacterias ácido lácticas, potencial bioactivo, amaranto

Abstract

Fermentation is a strategy to obtain bioactive peptides that has been little explored in amaranth. In this work, 123 strains isolated from goat milk, mead, broccoli and amaranth were used. The total percentage of amaranth protein degradation (%TPD) demonstrated by the strains was determined. The results ranged from 0 to 95.95% and the strains that produced a higher %TPD were selected and identified, which corresponded to the genera *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Bacillus*. Semi-solid fermentation was carried out with these strains and the water/salt extracts (WSE) containing the released peptides were obtained. Using the Tricine SDS-PAGE technique, bands between 26.6 and 1.4 kD were visualized; the peptide concentration was measured by the OPA method and the antioxidant, antihypertensive and antimicrobial activity of the WSEs was evaluated. In the FRAP assay, the best WSE was LR9 with a concentration of $1.99 \mu\text{MTE/L} \pm 0.07$, while in ABTS, 18C6 obtained the highest concentration with $19.18 \mu\text{MTE/L} \pm 0.96$. Regarding antihypertensive activity, inhibition percentages between 0 and 80.65% were obtained. Some WSE were also found to have antimicrobial properties against *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*. Upon ultrafiltration with 10 and 3 kD membranes of the selected WSEs, it was determined that the fractions > 10 kD and 3 - 10 kD were found to have better antioxidant and antimicrobial activity. Therefore, amaranth fermentation with BAL allowed the release of peptides with antioxidant, antihypertensive and antimicrobial activity.

Key Words: Bioactive peptides, fermentation, lactic acid bacteria, bioactive potential, amaranth

Nota: Parte de los resultados de este artículo han sido publicados en revistas científicas (Cruz-Casas et al., 2021, 2023) ponencias y carteles de congresos.

Introducción

En la actualidad muchas enfermedades afectan a la calidad de vida de las personas, por ejemplo, el cáncer, los trastornos inmunitarios o las enfermedades cardiovasculares (OMS, 2018). Aunque ya existen tratamientos para estas afecciones, es común que produzcan efectos secundarios adversos (Udenigwe et al., 2021) por lo que se busca encontrar alternativas que no sean perjudiciales para la salud del consumidor y que puedan tratar o prevenir la enfermedad. Los péptidos bioactivos son moléculas capaces de tener efectos benéficos para la salud del consumidor, porque se asocian a diversas bioactividades, como la antioxidante, antiinflamatoria, antihipertensiva, antimicrobiana e inmunomoduladora (Ulug et al., 2021). Están compuestos por 2 a 20 residuos de aminoácidos y tienen un peso molecular inferior a 6 kD (Domínguez-Pérez et al., 2020). Estas características les permiten mantener una alta especificidad y baja toxicidad, lo que las convierte en moléculas farmacológicamente atractivas (Datta & Roy, 2021).

Los péptidos bioactivos pueden obtenerse a partir de proteínas alimentarias tanto animales como vegetales, aunque en los últimos años ha aumentado la preferencia por las fuentes vegetales (Rizzello et al., 2017). En México, existe una gran variedad de alimentos de origen vegetal ricos en proteínas, por ejemplo, el amaranto. De acuerdo con el SIAP (2018) se producen 6,804 toneladas de amaranto y se consumen 4.5 g per cápita. Se ha demostrado que es un alimento con múltiples beneficios, a partir del cual se pueden producir péptidos bioactivos debido a que tiene una alta concentración proteica de entre 13.2 y 18.4% y está compuesto por aminoácidos esenciales como lisina y triptófano (Oronata-mayo et al., 2018; Singh et al., 2019).

Un factor importante durante la producción de péptidos bioactivos es el método de liberación ya que estas moléculas se encuentran codificadas e inactivas en la proteína parental, por lo que es necesario escindir la proteína (Daliri et al., 2017). El método seleccionado influye en la secuencia de aminoácidos del péptido obtenido, por lo tanto, también influye en su bioactividad; los métodos más utilizados

son la hidrólisis enzimática y la fermentación microbiana (Ulug et al., 2021).

La hidrólisis enzimática es un método ampliamente utilizado en la producción de péptidos bioactivos del amaranto, con este método se han obtenido péptidos con actividad antihipertensiva, antidiabética, antioxidante, antitrombótica, anticancerígena, inmunomoduladora, entre otras actividades biológicas (Montoya-Rodríguez et al., 2015). Sin embargo, también es importante analizar los péptidos que se pueden generar mediante otras estrategias como la fermentación microbiana ya que este método tiene ciertas ventajas sobre la hidrólisis enzimática como, la diversidad de proteasas microbianas y los altos niveles de actividad proteasa que poseen algunos microorganismos como las bacterias ácido lácticas (BAL), así como bajos costos de producción (Leblanc & Perdigon, 2002). Además, se pueden obtener péptidos con secuencias de aminoácidos no reportadas y potenciales actividades biológicas.

El objetivo de este trabajo fue obtener péptidos bioactivos del amaranto por fermentación con BAL y caracterizar sus actividades biológicas.

Materiales y Métodos

La metodología se realizó en tres etapas experimentales en donde se llevaron a cabo las actividades correspondientes.

Etapa 1: Liberación de péptidos de amaranto mediante fermentación con BAL

a) Análisis proximal del amaranto

Se compró el grano de amaranto en una tienda de la localidad de Saltillo, Coahuila, México. Fue molido y tamizado hasta obtener una harina. Se determinó la proteína, lípidos, humedad, fibra total y cenizas mediante los métodos establecidos de la AACC (46-11th, 30-10.01, 08-01 y 44-15th) y AOAC 962.09. Los carbohidratos se determinaron por diferencia.

b) Determinación de la degradación de la proteína total

Se reactivaron 123 cepas, las cuales fueron previamente aisladas de la leche de cabra, brócoli, aguamiel y harina de amaranto. Se

realizo un caldo de amaranto-maltosa, en el cual se inocularon dichas cepas. Se utilizaron las condiciones descritas por Pepe et al., (2003). La degradación de proteína total (TPD) se determinó utilizando el método de Bradford. Siguiendo la fórmula descrita por Cruz-Casas et al., (2023).

c) Identificación molecular de las cepas

Las cepas que demostraron tener mayor porcentaje de degradación de la proteína total del amaranto de acuerdo con el análisis estadístico realizado fueron identificadas. Para esto se realizó una extracción del ADN. Utilizando los primers 27f y 1512R se amplificó el ARNr 16S. Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5 %. Utilizando la base de datos NCBI con el algoritmo BLAST se llevó a cabo la identificación molecular.

d) Fermentación semisólida del amaranto

Las células de las cepas seleccionadas fueron recuperadas y lavadas. Se añadió la concentración establecida por Cruz-Casas et al., (2023) a 30 g de amaranto con 70 mL de agua. La fermentación se realizó en reactores de charolas de aluminio por 24 h a 37 °C. Se tomaron controles a las 0 h y 24 h. Se prepararon extractos agua/sales (WSE) a partir de los productos de fermentación utilizando la metodología descrita por Rizzello et al., (2017).

Etapa 2: Determinación de la actividad antioxidante, antihipertensiva y antimicrobiana de péptidos de amaranto

a) Concentración peptídica

La concentración peptídica se determinó por el método de o-ftaldialdehído (OPA) (Church et al., 1983) con algunas modificaciones realizadas por Muhialdin et al., (2020). Se empleó una curva de triptona como referencia.

b) Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó por medio de los métodos de ABTS, FRAP y DPPH usando la curva de calibración correspondiente (Delgado-Andrade et al., 2005).

c) Actividad antihipertensiva

La actividad antihipertensiva se realizó mediante una técnica colorimétrica utilizando el

kit-WST ACE (Dojindo, Japan). De acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante.

d) Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó utilizando el método descrito por Avaiyarasi et al., (2016) y modificado por (Venegas-Ortega et al., 2020). Se evaluó la actividad antimicrobiana de los WSE en contra de las bacterias patógenas de *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes*. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (UA).

Etapa 3: Caracterización de los péptidos de amaranto

a) Electroforesis

La electroforesis se realizó mediante la técnica de Tricine-SDS-PAGE (Haider et al., 2011). El peso molecular se determinó utilizando el marcador Page-Ruler® (Thermo Scientific™) (3,4-100 kD).

b) Purificación de péptidos

Los WSE se fraccionaron mediante ultrafiltración utilizando dos tamaños de membrana: 30 y 10 kD. A los productos obtenidos se les evaluó nuevamente la actividad antioxidante y antimicrobiana.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de todas las pruebas se realizó mediante un ANOVA de una vía; la comparación por pares de las medias mediante Tukey $P < 0.05$ utilizando el programa estadístico Statistica (Statistica7.0 para Windows).

Resultados

Análisis proximal del amaranto

La composición proximal de la harina de amaranto utilizada en este estudio fue la siguiente: lípidos 7.08 ± 0.2 (%), proteína 15.3 ± 0.4 (%), ceniza 2.90 ± 0.1 (%), fibra total 1.05 ± 0.1 (%), humedad 8.61 ± 0.4 (%) y carbohidratos 65.06 ± 0.9 (%). Estos valores coinciden con los reportados por Rodríguez et al., (2020), excepto la fibra total. Esto puede ser debido a la variedad de amaranto utilizado y a las condiciones ambientales de crecimiento (D'Amico & Schoenlechner, 2017).

Determinación de la degradación de la proteína total

Se evaluó el porcentaje de TPD de las 123 cepas previamente aisladas de la leche de cabra, brócoli, aguamiel y harina de amaranto. Se obtuvo un %TPD de entre el 0% y el 95.95%, del total de cepas evaluadas, como se muestra en la figura 1. Estos valores son similares a lo encontrado en otros reportes, por ejemplo, Valerio et al., (2020) obtuvo un %TPD del 73.7%. Sin embargo, en este trabajo se obtuvo un %TPD máximo de 95.95 ± 5.73 , lo cual es superior a lo obtenido por Valerio et al., (2020); esto es debido a la diferencia de cepas utilizadas.

Las cepas con mayor porcentaje de TPD de acuerdo con el estadístico realizado resultaron ser: LS15, LS19, LR9, 4A4, 3A2, 2M2, AE13, AE7, 9C4, 11C4 y 18C6 (Figuras 1A, 1B, 1C y 1D). Estas cepas fueron seleccionadas para los análisis posteriores puesto que lograron degradar eficazmente la proteína de amaranto encontrada en el caldo amaranto-maltosa, por lo que se puede asumir que estas cepas tienen las enzimas necesarias para poder liberar a los péptidos bioactivos encriptados en la proteína parental de amaranto.

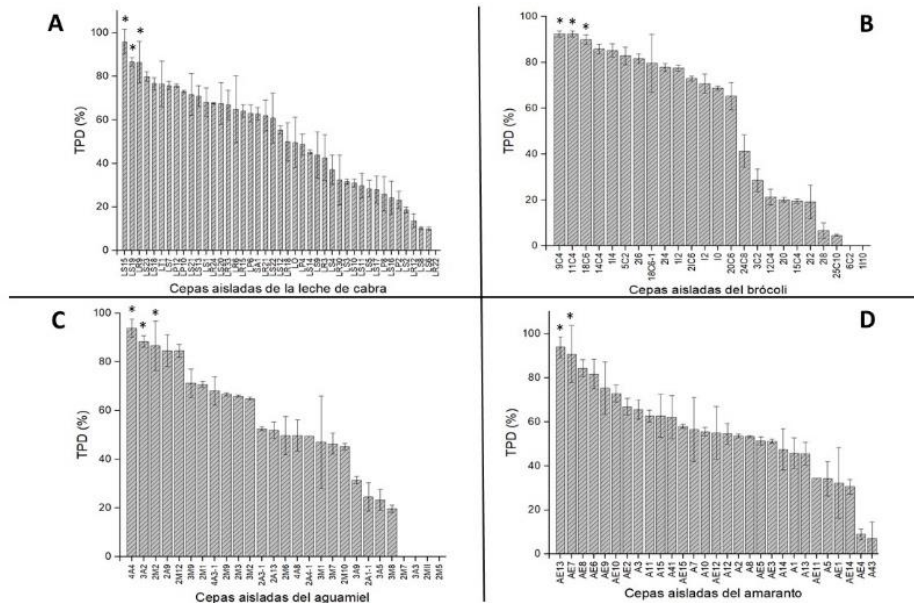


Figura 1. Degradación de la proteína total del amaranto (TPD) por la acción de cepas aisladas de: A) leche de cabra, B) brócoli, C) aguamiel y D) amaranto. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Identificación molecular de las cepas

Las cepas LS15, 9C4 y LR9 se identificaron como *Enterococcus faecium*, dichas cepas fueron aisladas de la leche de cabra y el brócoli. La cepa LS19 aislada de la leche de cabra correspondió a *Enterococcus durans*. Mientras la cepa AE13 aislada de la harina de amaranto se identificó como *Enterococcus casseliflavus*. La cepa 11C4 aislada del brócoli correspondió a *Lactiplatibacillus plantarum*. Las cepas AE7 y 18C6 se identificaron como *Leuconostoc mesenteroides*, estas fueron aisladas de la harina de amaranto y del brócoli. Las cepas 4A4, 3A2 y 2M2 pertenecen al género *Bacillus*. Identificándolos como *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus proteolyticus* y *Bacillus megaterium* respectivamente. Este género no es una BAL pero también fue analizado con el objetivo de realizar comparaciones con las BAL.

Los géneros de *Enterococcus*, *Bacillus* y *Lactiplatibacillus plantarum* son reconocidos por liberar péptidos bioactivos en varias proteínas (Algoory & Muhiadin, 2021; Gútez et al., 2013; Mhina et al., 2020). Hasta el momento, no se habían utilizado para la obtención de péptidos del amaranto. En cuanto a *Leuconostoc mesenteroides* es una BAL con una actividad proteolítica pobre (Ballesteros et al., 2006); sin embargo, en este trabajo se encontró que tiene una alta degradación de la proteína de amaranto. Así mismo, no hay reportes de su uso para la liberación de péptidos bioactivos del amaranto.

Concentración peptídica

Se obtuvieron concentraciones de péptidos que oscilaban entre 1.74 y 1.52 mg/mL a partir de las WSE evaluadas. Existe variación en la

concentración de péptidos de las diferentes WSE, incluso de los WSE producidos con la misma especie de BAL. Esto se debe a que las enzimas proteolíticas de cada especie de BAL son muy variables a nivel inter e intraespecífico, principalmente para los genes que codifican las proteinasas de la envoltura celular (CEP) que son las encargadas de hidrolizar a la proteína (Alcántara et al., 2016).

La fermentación semisólida utilizada en este trabajo generó concentraciones de péptidos similares a las reportadas por Ayala-Niño et al., (2019), quien evaluó péptidos de amaranto generados por fermentación con *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los 11 WSE evaluados se muestran en la figura 2. En la prueba de DPPH (figura 1B) no se observaron diferencias significativas entre los WSE, pero la mayoría de los WSE obtuvieron una mayor concentración en comparación al control a las 0 h, excepto por el WSE AE7. Esto puede ser debido a que este WSE no contiene la secuencia de aminoácidos (hidrófobos y aromáticos) adecuados para demostrar esta

bioactividad (Udenigwe et al., 2021). Esto también se confirma con las pruebas de ABTS y FRAP realizadas.

En la prueba de ABTS el mejor WSE fue 18C6 como se observa en la figura 1A. Por lo que este extracto puede contener aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, los cuales son donantes de electrones o átomos de hidrogeno, que se encargan de capturar radicales libres (Park et al., 2020). Los resultados obtenidos son superiores a lo reportado por Ayala-Niño et al., (2019), quien fermenta el amaranto para la obtención de péptidos bioactivos, pero utiliza otras BAL: *Lactocaseibacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*.

El WSE LR9 fue el mejor en la prueba de FRAP como se muestra en la figura 1C. Se obtuvieron concentraciones inferiores en comparación con la prueba de ABTS, esto debido a que FRAP es realizado a pH ácidos, provocando el aumento del potencial redox y que los valores disminuyan (Prior et al., 2005). Los resultados obtenidos son inferiores a lo reportado por Ayala-Niño et al., (2019), esto debido a la diferencia de cepas utilizadas.

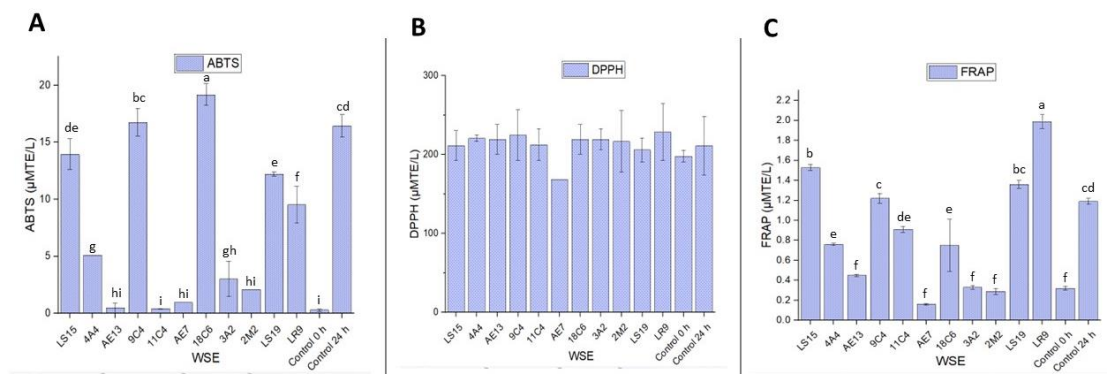


Figura 2. Actividad antioxidante de los WSE obtenidos de la fermentación del amaranto, mediante las pruebas de: A) ABTS, B) DPPH y C) FRAP. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Actividad antihipertensiva

La actividad antihipertensiva de los WSE se muestra en la tabla 1. Los valores obtenidos fueron de entre 56.76 y 80.67 % y no hubo diferencias significativas entre los WSE. Los péptidos bioactivos que contienen los WSE evaluados pueden tener esta bioactividad al unirse de forma competitiva o no al sitio activo de la ECA-I (Chai et al., 2020). Los porcentajes de inhibición de la ECA-I más bajos fueron los obtenidos por los controles a

las 0 h y a las 24 h. Los WSE AE7 y 11C9 no mostraron inhibir a la ECA-I. Estos resultados son superiores a lo reportado por Ayala-Niño et al., (2019). Puesto que este autor obtiene porcentajes de inhibición de la ECA-I de entre 36.14 y 45.22 %, lo cual puede deberse a la diferencia de cepas utilizadas para fermentar el amaranto.

Tabla 1. Actividad antihipertensiva de los WSE obtenidos de la fermentación del amaranto

WSE	Actividad inhibitoria de la ECA-I (%)
LS15	78.99 ± 8.32 ^a
4A4	78.99 ± 13.07 ^a
AE13	66.81 ± 1.78 ^a
9C4	64.71 ± 14.26 ^a
18C6	59.24 ± 8.91 ^a
3A2	80.67 ± 2.38 ^a
2M2	80.25 ± 2.97 ^a
LS19	69.33 ± 24.36 ^a
LR9	77.73 ± 1.78 ^a
Control 0 h	56.76 ± 8.11 ^b
Control 24 h	58.40 ± 5.46 ^b

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Actividad antimicrobiana

Algunos WSE demostraron tener actividad antimicrobiana en contra de *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes* como se muestra en la figura 3A y 3B respectivamente; esta bioactividad podría relacionarse con la secuencia de aminoácidos de los péptidos generados por lo que no todos los extractos demostraron el efecto. Los péptidos deben tener aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos

para demostrar tener actividad antimicrobiana, ya que esto les permite permeabilizar la membrana, dirigirse a la pared celular extra e intracelular e inducir la apoptosis (Datta & Roy, 2021). Estos resultados son superiores a lo reportado por Banihashemi et al., (2020), aunque ellos estudiaron péptidos del queso Koopeh fermentado con las BAL autóctonas de este alimento.

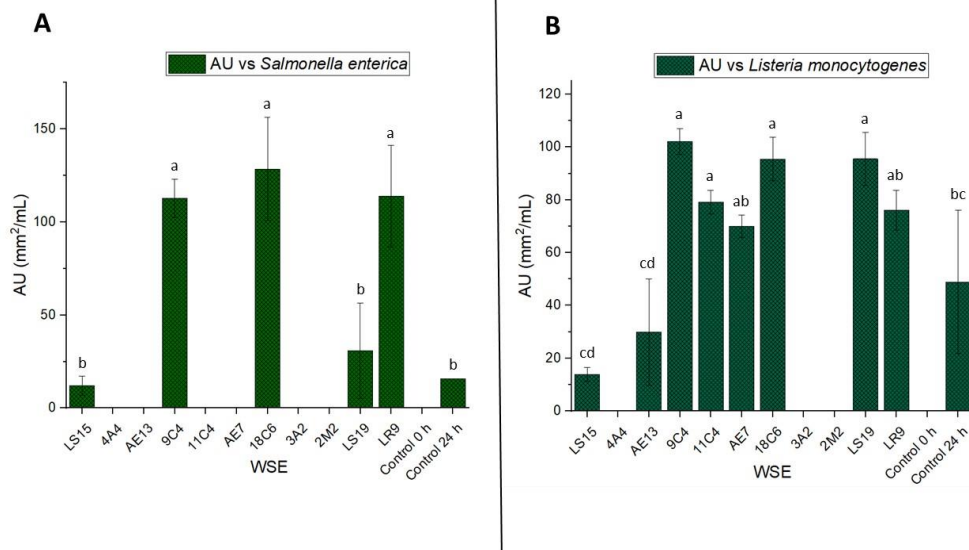


Figura 3. Actividad antimicrobiana de los WSE obtenidos de la fermentación del amaranto. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Electroforesis

En la figura 4 se puede observar el patrón de bandeado obtenido de los WSE. Se pueden visualizar bandas de entre 26.6 y 1.4 kD. Los patrones de bandeado son diferentes en cada WSE, esto es debido a que las BAL tienen un sistema proteolítico cepa-dependiente, lo que provoca el que se puedan obtener péptidos y proteínas hidrolizables de distintos tamaños

dependiendo de la cepa utilizado. Es incluso distinto el sistema proteolítico entre cepas de la misma especie (Cruz-Casas et al., 2023). En el control a las 24 h se observa una banda de alto peso molecular, lo que indica que se llevo a cabo una fermentación espontanea con los microorganismos autóctonos del amaranto.

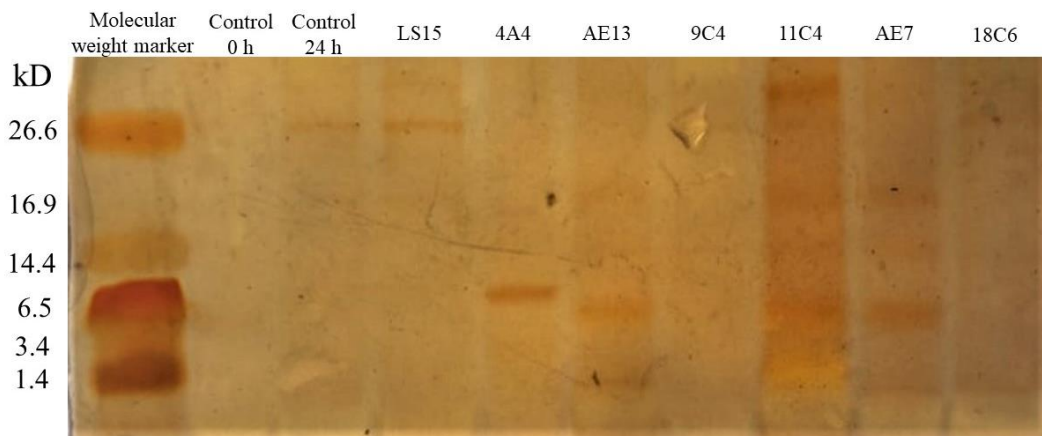


Figura 4. Electroforesis realizada mediante la técnica de Tricine-SDS-PAGE con los WSE obtenidos de la fermentación

Ultrafiltración

WSE LR9 y WSE 18C6 fueron los mejores en las bioactividades mencionadas. Las fracciones >10 kD y 3-10 kD fueron las mejores para el WSE LR9 en el ensayo FRAP, y para el WSE 18C6, fue la fracción >10 kD. En el ensayo ABTS, la fracción >10 kD fue la mejor para el WSE LR9 mientras que para el WSE 18C6, fueron las fracciones >10 kD y 3-10 kD. Estos resultados se atribuyen a los péptidos de mayor longitud de cadena, los cuales muestran efectos sinérgicos (Banihashemi et al., 2020). Con respecto a la actividad antimicrobiana, la fracción >10 kD fue la mejor contra *S. enterica* y *L. monocytogenes*, en ambos WSE. Esto se debe a que las secuencias peptídicas deben contener un número de aminoácidos suficientemente largo (entre 6 y 20 aminoácidos) para abarcar o insertarse en la capa hidrofóbica de la membrana.

Conclusiones

La fermentación del amaranto con BAL demostró ser un método capaz de degradar la proteína de este pseudocereal. Mediante el cual se pueden obtener péptidos con

importantes bioactividades, como la actividad antioxidante, antihipertensiva y antimicrobiana. Sin embargo, este proceso es cepa-dependiente. *Enterococcus faecium*-LR9 y *Leuconostoc mesenteroides*-18C6 son cepas que demostraron producir péptidos con interesantes bioactividades no reportadas previamente.

Referencias

- Alcántara, C., Bäuerl, C., Revilla-Guarinos, A., Pérez-Martínez, G., Monedero, V., & Zúñiga, M. (2016). Peptide and amino acid metabolism is controlled by an OmpR-family response regulator in *Lactobacillus casei*. *Molecular Microbiology*, *100*(1), 25–41. <https://doi.org/10.1111/mmi.13299>
- Algoory, H. L., & Muhialdin, B. J. (2021). Novel peptides contribute to the antimicrobial activity of camel milk fermented with *Lactobacillus plantarum* IS10. *Food Control*, *135*907. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108057>

Avaiyarasi, N. D., David Ravindran, A., Venkatesh, P., & Arul, V. (2016). In vitro selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. *Food Control*, 69, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.036>

Ayala-Niño, A., Rodríguez-Serrano, G. M., Jiménez-Alvarado, R., Bautista-Avila, M., Sánchez-Franco, J. A., González-Olivares, L. G., & Cepeda-Saez, A. (2019). *Bioactivity of Peptides Released During Lactic Fermentation of Amaranth Proteins with Potential Cardiovascular Protective Effect: An In Vitro Study*. 00(0), 1–6. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0039>

Ballesteros, C., Poveda, J. M., González-Viñas, M. A., & Cabezas, L. (2006). Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, 17(4), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.008>

Banihashemi, S. A., Nikoo, M., Ghasempour, Z., & Ehsani, A. (2020). Bioactive peptides fractions from traditional Iranian Koopeh cheese; lactic fermentation products. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29(April), 101798. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101798>

Chai, K. F., Voo, A. Y. H., & Chen, W. N. (2020). Bioactive peptides from food fermentation: A comprehensive review of their sources, bioactivities, applications, and future development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3825–3885. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12651>

Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(6), 1219–1227. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2)

Cruz-Casas, D. E., Aguilar, C. N., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-

González, M. L., & Flores-Gallegos, A. C. (2021). Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3, 100047. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047>

Cruz-Casas, D. E., Aguilar, C. N., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-González, M. L., & Flores-Gallegos, A. C. (2023). Bioactive protein hydrolysates obtained from amaranth by fermentation with lactic acid bacteria and *Bacillus* species. *Heliyon*, 9(e13491). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13491>

D'Amico, S., & Schoenlechner, R. (2017). Amaranth: Its Unique Nutritional and Health-Promoting Attributes. In *Gluten-Free Ancient Grains: Cereals, Pseudocereals, and Legumes: Sustainable, Nutritious, and Health-Promoting Foods for the 21st Century*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100866-9.00006-6>

Daliri, E., Oh, D., & Lee, B. (2017). *Bioactive Peptides*. 1–21. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>

Datta, S., & Roy, A. (2021). Antimicrobial Peptides as Potential Therapeutic Agents: A Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 555–577. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10110-x>

Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A., & Morales, F. J. (2005). Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7832–7836. <https://doi.org/10.1021/jf0512353>

Domínguez-Pérez, L. A., Beltrán-Barrientos, L. M., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2020). Artisanal cocoa bean fermentation: From cocoa bean proteins to bioactive peptides with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 73(July), 104134. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104134>

Gútiérrez, L., Gómez-Sala, B., Recio, I., del Campo, R., Cintas, L. M., Herranz, C., &

- Hernández, P. E. (2013). Enterococcus faecalis strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.019>
- Haider, S. R., Reid, H. J., & Sharp, B. L. (2011). Tricine-SDS-PAGE. In *Protein electrophoresis: Methods and protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 869). <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4>
- Leblanc, J., & Perdigon, G. (2002). Immunomodulating Effects of Peptidic Fractions Issued from Milk Fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 85, 2733–2742. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-302\(02\)74360-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-302(02)74360-9)
- Mhina, C. F., Jung, H. Y., & Kim, J. K. (2020). Recovery of antioxidant and antimicrobial peptides through the reutilization of Nile perch wastewater by biodegradation using two *Bacillus* species. *Chemosphere*, 253, 126728. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126728>
- Montoya-Rodríguez, A., Gómez-Favela, M., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., & González, E. (2015). Identification of Bioactive Peptide Sequences from *Amaranthus hypochondriacus* Seed Proteins and Their Potential Role in the Prevention of Chronic Diseases. 1–20. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12125>
- Muhialdin, B. J., Abdul Rani, N. F., & Meor Hussin, A. S. (2020). Identification of antioxidant and antibacterial activities for the bioactive peptides generated from bitter beans (*Parkia speciosa*) via boiling and fermentation processes. *LWT - Food Science and Technology*, 131, 109776. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109776>
- Orona-tamayo, D., Valverde, M. E., Paredes-lópez, O., & Orona-tamayo, D. (2018). Bioactive peptides from selected latin american food crops – A nutraceutical and molecular approach. 8398. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.14344>
- 80
- Park, S. J., Sharma, A., & Lee, H. J. (2020). A review of recent studies on the antioxidant activities of a third-millennium food: *Amaranthus* spp. *Antioxidants*, 9(12), 1–22. <https://doi.org/10.3390/antiox9121236>
- Pepe, O., Villani, F., Oliviero, D., Greco, T., & Coppola, S. (2003). Effect of proteolytic starter cultures as leavening agents of pizza dough. *International Journal of Food Microbiology*, 84(3), 319–326. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00473-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00473-7)
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Rizzello, C., Lorusso, A., Russo, V., Pinto, D., Marzani, B., & Gobbetti, M. (2017). Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.035>
- Rodríguez, M., García Fillería, S. F., & Tironi, V. A. (2020). Simulated gastrointestinal digestion of amaranth flour and protein isolate: Comparison of methodologies and release of antioxidant peptides. *Food Research International*, 138, 109735. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109735>
- Singh, N., Singh, P., Shevkani, K., & Virdi, A. S. (2019). Amaranth : Potential Source for Flour Enrichment. In *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention* (2nd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814639-2.00010-1>
- Udenigwe, C. C., Abioye, R. O., Okagu, I. U., & Obeme-Nmom, J. I. (2021). Bioaccessibility of bioactive peptides: recent advances and perspectives. *Current Opinion in Food Science*, 39, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.005>

Artículos

Ulug, S. K., Jahandideh, F., & Wu, J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 108(November 2020), 27–39.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.002>

Valerio, F., Bavaro, A. R., Di Biase, M., Lonigro, S. L., Logrieco, A. F., & Lavermicocca, P. (2020). Effect of Amaranth and Quinoa Flours on Exopolysaccharide Production and Protein Profile of Liquid Sourdough Fermented by *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Frontiers in Microbiology*, 11(May), 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00967>

Venegas-Ortega, M. G., Flores-Gallegos, A. C., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R., Martínez-Hernández, J. L., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2020). Multi-functional potential of presumptive lactic acid bacteria isolated from Chihuahua cheese. *Foods*, 9(3).
<https://doi.org/10.3390/foods9030276>

Enfoque multidisciplinario para el estudio de un alimento fermentado tradicional a base de maíz

Jocelin Rizo¹, Teresa Martínez², Brenda Cruz², Aidé Martínez², Daniel Guillén², Sergio Encarnación¹, Carmen Wachter³, Romina Rodríguez-Sanoja^{2*}.

¹Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Cuernavaca, Morelos.

²Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México.

³Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México.

*romina@iibiomedicas.unam.mx

Resumen

El pozol es una bebida de origen maya, ácida, y no alcohólica, elaborada con masa de maíz nixtamalizado y fermentada de forma natural. Es consumido en la región sureste del país como alimento esencial en la dieta de la población indígena o como bebida refrescante por el resto de la población.

Debido a su importancia dentro de las poblaciones que lo consumen, son varios los estudios microbiológicos que se han llevado para tratar de entender el proceso de fermentación. Se ha demostrado que en este alimento se desarrolla una microbiota muy diversa y abundante, compuestas por bacterias, principalmente ácido lácticas, hongos y levaduras. Sin embargo, se ha dejado de lado el papel que estos tienen desde el punto de vista ecológico y funcional en el alimento.

En este trabajo, se realizó el estudio de la fermentación del pozol a través de un enfoque multidisciplinario que involucró el análisis microbiológico, químico, bioquímico y metaproteómico. Se estudiaron los cambios que se generan durante la fermentación del pozol, se determinaron cuáles son las fuentes de carbono y nitrógeno que se utilizan, y finalmente, se generó un mapa metabólico del sistema de manera integral que permitió elucidar el potencial metabólico de la microbiota.

Palabras Claves: Pozol, alimentos fermentados tradicionales, metaproteómica, fijación de nitrógeno

Abstract

Pozol is a Mayan acidic, refreshing and nonalcoholic acidic beverage made of nixtamalized maize dough naturally fermented. It is consumed in the country's southeastern region as an essential food in the diet of the indigenous population or as a refreshing drink at any time of the day by the rest of the population.

Due to its importance within the populations that consume it, several microbiological studies have been carried out to try to understand the fermentation process. It has been shown that a very diverse and abundant microbiota develops in this food, composed of bacteria, mainly lactic acid, fungi, and yeasts. However, these microorganisms' role from an ecological and functional point of view has not been determined.

In this work, pozol fermentation was studied through a multidisciplinary approach that involved microbiological, chemical, biochemical and metaproteomic analysis. The changes generated during the fermentation of pozol were studied, the carbon and nitrogen sources used were determined and finally, a comprehensive metabolic map of the system was generated that allowed the metabolic potential of the microbiota to be elucidated.

Key Words: Pozol, traditional fermented foods, metaproteomics, nitrogen fixation

Introducción

En México, existen más de 200 alimentos y bebidas fermentadas tradicionales, los cuales no solo son parte esencial en la dieta de quienes los consumen, sino también tienen usos en la medicina tradicional y poseen relevancia a nivel cultural. Dentro de estos, el pozol es uno de los más estudiados en el país. Su origen data de la época prehispánica y por los escritos que se tienen de la época colonial se sabe que su consumo era exclusivo de los indígenas de Tabasco, Quintana Roo y Chiapas (Cañas et al., 1993).

El pozol se describe como una bebida fermentada de origen maya, ácida, y no alcohólica hecha a base de maíz nixtamalizado (Ulloa, 1987; Cañas et al., 1993). Es consumido como alimento esencial en la dieta o como bebida refrescante a cualquier hora del día. Además, tiene un importante uso en la medicina tradicional para el tratamiento de heridas superficiales o padecimientos gastrointestinales y como ofrenda en las ceremonias relacionadas con el cultivo y cosecha del maíz (Cañas et al., 1993).

La fermentación del pozol es llevada a cabo por una microbiota natural constituida por bacterias, hongos filamentosos y levaduras, que resulta de la inoculación del nixtamal durante el remojo y la molienda (Wacher et al., 1993). Dentro de las bacterias, las ácido lácticas (BAL) son el grupo predominante durante la fermentación y entre ellas, los géneros más abundantes son: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Weissella* (Ampe et al., 1999; Escalante et al., 2001; Ben & Ampe, 2000).

Dado que durante la nixtamalización (cocción de los granos en hidróxido de calcio), se reduce la concentración de mono- y disacáridos, dejando al almidón como la principal fuente de carbono fermentable, diferentes estudios se han enfocado en la búsqueda e identificación de microorganismos amilolíticos y sus enzimas (Nuraida et al., 1995; Díaz-Ruiz et al., 2003). Se ha demostrado que la actividad amilolítica de las BAL encontradas es menor a la reportada para otras bacterias lácticas aisladas de fermentaciones vegetales, mientras que para los hongos y levaduras los resultados no han sido reproducibles (Díaz-Ruiz et al., 2003; Ampe et al., 1999). En consecuencia, se ha planteado que además del almidón, la hidrólisis de otras fuentes de carbono, como la

celulosa y hemicelulosa, puede proveer de azúcares solubles a la microbiota para su crecimiento.

Así, se ha demostrado que *Streptococcus infantarius* ssp. *infantarius*, microorganismo predominante durante la fermentación, es capaz de crecer en xilano como única fuente de carbono gracias a su actividad xilanolítica y que varias cepas de *Weissella* solo pueden utilizar xilo-oligosacáridos como fuente de carbono, lo que indica que su crecimiento depende de la capacidad de otros microorganismos para degradar la hemicelulosa (Cooper-Bribiesca et al., 2018; López-Hernández et al., 2018).

Por otro lado, se ha reportado que la fermentación de la masa de maíz provoca un aumento en la concentración de nitrógeno total, proteína cruda, aminoácidos esenciales (lisina y triptófano) y vitaminas (niacina y riboflavina), cambios que resultan relevantes desde el punto de vista nutricional (Cravioto et al., 1955; Ulloa et al., 1971; Ramírez, 1987; Loaeza, 1991; Giles, 1995; Rizo, 2015). Algunos de estos cambios se han reportado en otros alimentos fermentados y se asocian al metabolismo de los microorganismos que se desarrollan durante la fermentación (Di Cagno et al., 2002; Leroy & Vuyst, 2004), sin embargo, este es el único alimento en el que se ha observado un incremento en el contenido de nitrógeno. Ulloa y colaboradores (1971) sugirieron que estos cambios son producto de la fijación de nitrógeno atmosférico y aunque en diferentes estudios se han reportados incrementos del 10% al 69%, hasta la fecha no ha sido posible demostrar la fijación biológica de nitrógeno en el pozol. Así, el objetivo de este trabajo fue realizar el estudio integral de la fermentación del pozol, para determinar la estructura y los cambios de las comunidades microbianas, cómo estas modifican y utilizan el sustrato y así poder determinar su papel funcional durante la fermentación.

Materiales y métodos

1. Muestreo

Se adquirió masa de maíz nixtamalizada de dos productores diferentes en el mercado de Pino Suárez en la ciudad de Villahermosa, Tabasco. Las muestras se mezclaron para formar bolas de 300g, las cuales se envolvieron en hojas de plátano previamente sanitizadas y se incubaron a 37°C. Las fermentaciones fueron independientes y por

triplicado, y se tomaron muestras a las 0, 9, 24 y 48 h. Las muestras recolectadas se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2. Análisis microbiológico

Se realizó en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM.

Se realizó el conteo por triplicado de mesófilos aerobios, bacterias lácticas, lácticas amilolíticas, enterobacterias, mohos y levaduras (Wacher et al., 2000; Nuraida et al., 1995; Ben Omar & Ampe, 2000).

3. Análisis químicos

3.1 pH

Se suspendieron 2 g de la masa de maíz macerada con CO_2 en 5 mL de agua destilada. La medición de pH se hizo a temperatura ambiente con un potenciómetro de electrodo de vidrio (Corning 130) previamente calibrado. Cada determinación se realizó por triplicado

3.2. Análisis proximal

Se realizó en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM) y consistió en la cuantificación del contenido de ceniza, nitrógeno, proteína cruda ($\text{Nx}6.25$) (Mariotti et al., 2008), lípidos, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno según el método oficial 992.23 de la AOAC (2000).

4. Análisis bioquímico

La actividad nitrogenasa se midió mediante el método de reducción de acetileno a etileno (ARA por sus siglas en inglés). Los ensayos se realizaron en viales de 10 mL que contenían 5 mL de medio semisólido libre de nitrógeno MMK (2,2 g/L de $\text{N}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,425 g/L de $\text{N}_2\text{H}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,435 g/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1,0 g/L sacarosa) o medio MMp/299 (3,8 g/L K_2HPO_4 , 3 g/L KH_2PO_4 , 0,1 g/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g/L $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$, 0,1 g/L CaCl_2 y 1,0 g/L sacarosa). Los tubos de vidrio se sellaron con goma hermética y se inyectaron 0.6 mL de acetileno retirando un volumen igual de aire del tubo. La producción de etileno se detectó a las 24 h inyectando 0.4 mL del gas en un cromatógrafo de gases Bruker modelo GC 450 con un detector de ionización de llama (FID) y una columna Porapak-N. Los cromatogramas se utilizaron para integrar las áreas de las curvas de acetileno (C_2H_2) y etileno (C_2H_4) para estimar la producción de C_2H_4 (Rogel et al., 2001).

Se realizó el ensayo ARA directamente en las muestras de pozol, para ello se pesaron 150 g de masa, se homogenizaron en 100 mL de NaCl al 0.9% (p/v) y se inocularon 100 μL de la solución en medio semisólido MMK y MMp/299. Como control negativo se usaron viales con volúmenes similares de medio de cultivo sin inocular y como control positivo se utilizó a *Klebsiella varicola* sp. nov. ATCC® BAA-830™, de la colección del Centro de Ciencias Genómicas (CCG, UNAM).

5. Aislamiento de bacterias

Se realizó el aislamiento de bacterias de los viales donde se observó actividad nitrogenasa. Las muestras de pozol se homogenizaron en NaCl al 0.9% (p/v), se realizaron diluciones seriadas con la misma disolución y el homogenizado (100 μL) se sembró en placas MMK y MMp/299. Las placas se incubaron a 29°C hasta que se observó crecimiento de colonias. Se seleccionaron colonias con características morfológicas distintas y se inocularon en el medio semisólido correspondiente para realizar el ensayo ARA. Las colonias positivas se caracterizaron mediante tinción de Gram y morfología. Los cultivos puros se almacenaron en glicerol al 20% como crioprotector a -80°C .

6. Identificación molecular

6.1. Amplificación del gen 16S rRNA y del gen *nifH*

Se hizo la amplificación de la región V1 a la V6 del gen 16S rRNA y del gen *nifH* que codifica para la dinitrogenasa reductasa. La amplificación del fragmento del gen 16S rRNA se realizó con los primers universales pA (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) forward y 16R1093 (GTTGCGCTCGTTGCGGGACT) reverse (Ramírez-Chavarín et al., 2010). La PCR se realizó utilizando las siguientes condiciones: precalentamiento (94°C , 2 min), seguido de 30 ciclos de desnaturalización (94°C , 1 min), hibridación (65°C , 1 min), extensión (72°C , 1 min) y un paso de extensión final (72°C , 7 min).

Para la amplificación de gene gen *nifH* se usaron los primers Polf (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) forward y Polr (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) (Rosenblueth et al., 2003) reverse. La mezcla de reacción se incubó durante 2 min a 94°C y luego se sometió a 30 ciclos de desnaturalización (94°C , 4 min), hibridación

(65°C, 1 min), extensión (72°C, 1 min) y un paso de extensión final (72°C, 5 min).

6.2. Análisis de las secuencias

Los fragmentos del gen 16S rRNA y *nifH* se purificaron con el sistema de purificación de ADN Wizard PCR Preps (Promega). Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, UNAM. La calidad de las secuencias se verificó con el programa Chromas 2.6.6 y se corrigieron manualmente. Para la identificación de las bacterias, las secuencias curadas fueron analizadas con el programa online Blastn usando la base de datos de secuencias de 16S rRNA para bacterias y arqueas depositada en NCBI y con la base de datos de colección de nucleótidos (nr/nt).

7. Experimento de inoculación del pozol

Se seleccionó la bacteria con mayor actividad nitrogenasa y se inoculó en la masa de pozol. Para ello, la bacteria se creció toda la noche en agar Luria-Bertani a 29°C y se inoculó asépticamente en 1 g de pozol a una concentración de 10⁷ UFC. El pozol inoculado se agregó a viales que contenían agar semisólido.

En este experimento se usaron dos controles. En el primer control, el pozol sin inocular se agregó a los viales con agar semisólido. En el segundo control, la bacteria aislada se inoculó directamente a la misma concentración en medio semisólido MMK y agar semisólido. Finalmente se realizó el ensayo ARA.

8. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron con una ANOVA (Análisis de Varianza Unidireccional) utilizando el software GraphPad Prism, versión 4 y las diferencias significativas se estimaron con una prueba post-hoc de Tukey.

9. Análisis metaproteómico

9.1. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó por triplicado para cada tiempo de fermentación utilizando un método que combina dos enfoques metodológicos previamente reportados (Ampe et al., 1999; Cárdenas et al., 2014; Leyva, 2018). Brevemente, una muestra representativa de pozol se pulverizó con CO₂ sólido y se pesó 1 g de muestra, esta se mezcló mecánicamente a temperatura

ambiente durante dos horas con 10 mL de buffer citrato-fosfato 0.1 M, pH 5 con inhibidor de proteasa 1:100 (Sigma P2714). Las muestras se centrifugaron (800 x g, 10 min) y se recuperó el sobrenadante. Se realizaron dos extracciones más con 10 mL de buffer y agitación mecánica durante 30 min. Se colectaron los sobrenadantes y se centrifugaron (13.200 x g, 10 min). El pellet obtenido se utilizó para la extracción de proteínas como se describió anteriormente (Cárdenas et al., 2014).

La concentración de proteína se cuantificó con el kit Bio-Rad Protein Assay. Para evitar interferencias relacionadas con el buffer de extracción, las muestras se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v), se solubilizaron en 50 µl de urea 6 M y finalmente se ajustaron a un volumen de 750 µl con agua destilada.

9.2. Secuenciación de proteínas

Los extractos obtenidos se analizaron en geles SDS-PAGE al 10% para la separación de las proteínas, el gel se tiñó con azul de coomassie y se escindieron las bandas del gel en cortes de 5 mm. Los triplicados de cada fracción se enviaron a la unidad de proteómica del Instituto de Ciencias Clínicas de Montreal (Institut de Recherches Cliniques de Montreal (IRCM), en donde fueron procesados para la identificación de péptidos y proteínas por cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS) (Havliš et al., 2003, Cárdenas et al., 2014; Rizo et al., 2021).

9.3. Identificación de proteínas

Los archivos MS sin procesar fueron analizados en Mascot versión 2.5.1 (Matrix Science, Londres, Reino Unido; versión 2.5.1) y X! Tandem (The GPM, thegpm.org; versión 2007.01.01.1) o con el programa MaxQuant (versión 1.6.2.10) con los parámetros predeterminados (Cox, 2008).

Mascot se configuró para buscar en la base de datos UniProt sprot (bacterias329683 entradas, hongos31499 entradas), la base de datos UniProt_Maize_txid4577_20160927 (160789 entradas) y la base de datos UniProt_Archaea_txid2157_20160921 (135190entradas) con tripsina como enzima de digestión. Se especificó O+18 de pirrolisina y carbamidometilo de cisteína como modificaciones fijas. La oxidación de la metionina se especificó como una modificación variable.

Para el análisis en el software MaxQuant, la identificación de péptidos individuales se realizó en grupos de proteínas. Las búsquedas en MaxQuant se ejecutaron en la base de datos CAZy (CAZyDB.07312019.fa) con los siguientes parámetros: carbamidometilación en cisteína como modificación fija, acetilación N-terminal de la proteína y la oxidación de metionina como modificaciones variables. Todas las entradas se filtraron utilizando una tasa de falsos positivos del 1% y se eliminaron todos los falsos positivos.

Para todos los análisis, la tolerancia del primer péptido de búsqueda fue de 20 ppm y la tolerancia del péptido de búsqueda principal fue de 4.5 ppm. Se estableció una tolerancia de masa de iones de fragmentos de 0.60 Da y una tolerancia de iones originales de 10 ppm.

9.4. Criterios de identificación de proteínas

Se utilizó Scaffold_4.8.6 (Proteome Software Inc., Portland, OR) para validar las identificaciones de péptidos y proteínas basadas en MS/MS para Mascot y X! tandem. Para la validación de las proteínas identificadas, se ajustó el FDR para obtener probabilidades >95% para los péptidos y 99% para las proteínas. Ambas probabilidades fueron asignadas mediante el algoritmo Protein Prophet (Nesvizhskii et al., 2003). Las proteínas que contenían péptidos similares y que no podían diferenciarse basándose únicamente en el análisis MS/MS se agruparon para satisfacer los principios de parsimonia (Institut de Recherches Cliniques de Montreal, IRCM, Quebec, Canadá). Para la descripción de la diversidad microbiana se

consideraron proteínas que contenían al menos dos péptidos únicos identificados, mientras que para la clasificación funcional se aceptaron proteínas que contenían al menos un péptido único. En ambos casos, solo se consideraron las proteínas que se identificaron en al menos dos de las tres réplicas experimentales y los falsos positivos se eliminaron manualmente.

Resultados y discusión

1. Fijación de nitrógeno en el pozol

El pozol es una fermentación extraordinariamente compleja, en la que una amplia variedad de microorganismos se desarrolla en gran abundancia. Para comprender la dinámica de fermentación del sistema y cómo los microorganismos utilizan y modifican el sustrato, se realizó el análisis proximal (Tabla 1) de las muestras fermentadas por 0, 9, 24 y 48 h, considerando que estos tiempos representan el periodo en el que la mayoría de la gente lo consume. En general, se observó que no hay cambios significativos en la concentración de carbohidratos totales, pero si un aumento en el contenido de lípidos y disminución en la concentración de fibra cruda. Estos cambios pueden ser explicados en términos de metabolismo del carbono durante la fermentación. Respecto al contenido de nitrógeno, se observó un aumento de 11.4 a 12.5 mg/g de masa seca en las primeras 9 h de fermentación. Este incremento no ha sido reportado en otros alimentos fermentados y puede atribuirse a la fijación de nitrógeno (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis aproximado del pozol a diferentes tiempos de fermentación

Tiempo de fermentación (h)	Contenido en el pozol (mg/g de masa seca) ^a						Nitrógeno fijado (mg)	Relación nitrógeno/ceniza (mg/mg)
	Carbohidratos totales	Fibra cruda	Lípidos	Ceniza	Nitrógeno	Proteína		
0	845 ± 9.9	24 ± 4.1	46 ± 4.2	13 ± 0.2	11.47 ± 0.2A	71.73 ± 1.2A	---	0.882
9	839 ± 8	12 ± 0.5	57 ± 1.2	13 ± 4	12.56 ± 0.0 B	78.52 ± 0.3B	0.99	0.96
24	841 ± 3	9 ± 1	64 ± 0.3	13 ± 0.9	12.44 ± 0.1 B	77.75 ± 0.5B	0.96	0.95
48	832 ± 7	8 ± 1	68 ± 0.3	13 ± 0.2	12.52 ± 0.0 B	78.28 ± 0.0B	0.96	0.96

^aLos resultados se expresan como medias ± DE. Las diferencias se evaluaron mediante ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey (P <0,001). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre muestras.

Considerando que durante la fermentación pueden darse pérdidas de materia orgánica, principalmente por metabolismo aerobio, se propuso un marco matemático simple que acopla las entradas de nitrógeno con las salidas de carbono a través de la respiración para eliminar el sesgo que esta pérdida podría tener sobre el aumento de nitrógeno observado. Así, la cantidad de nitrógeno fijado (Nfx) se calculó con la siguiente ecuación:

$$Nf_x = N_f - N_i (C_i/C_f)$$

Donde:

Nf: es la concentración final de nitrógeno en un tiempo de fermentación determinado x

Ni: es la concentración de nitrógeno inicial en la masa no fermentada

Ci/Cf: es la relación de concentración de carbono entre la masa no fermentadas y la masa fermentada en un tiempo determinado x
Adicionalmente, se determinó la relación nitrógeno/ceniza, considerando que los microorganismos emplean en mínima proporción residuos inorgánico. Con ambas aproximaciones se observó un incremento de 8 a 9% a las 9 h de fermentación (Tabla 1). Estudios previos han reportado incrementos mayores en el contenido de nitrógeno (21-

65%) a los observados en este trabajo (Cravioto et al., 1955; Ulloa et al., 1971; Ramírez, 1987; Giles, 1995; Rizo, 2015), sin embargo, se debe considerar que en algunos de ellos no se reportan duplicados biológicos o los respectivos análisis estadísticos, por lo que los incrementos observados pueden deberse a errores en las técnicas utilizadas. Además, estos aumentos se dan en etapas tardías de la fermentación, a partir de las 120 h, mientras que aquí se encontró en las primeras 9 h, lo que podría explicar las diferencias.

Para corroborar que el aumento de nitrógeno es producto de la fijación biológica, se midió la actividad nitrogenasa directamente en las muestras de pozol inoculadas en medio libre de nitrógeno MMK y MMp/299. En todos los casos se encontró producción de etileno, lo que indica la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno aun después de la nixtamalización de la masa. Independientemente del medio usado, la máxima actividad nitrogenasa se cuantificó en la muestra fermentada por 24 h, mientras que para la muestra fermentada por 48 h la actividad se redujo drásticamente (Figura 1A).

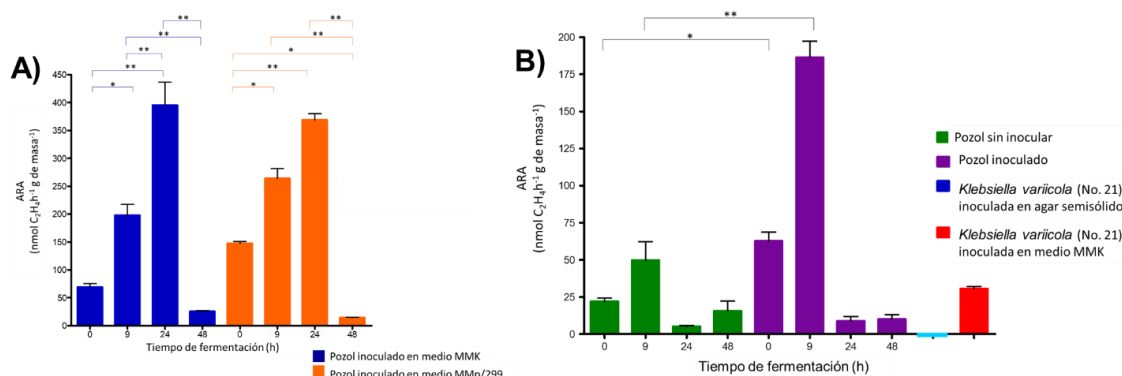


Figura 1. (A) Actividad nitrogenasa en las distintas muestras de pozol. Azul: pozol inoculado en medio semisólido MMK; Naranja: pozol inoculado en medio semisólido MMp/299. (B). Actividad nitrogenasa en muestras de pozol con diferentes tratamientos. Para las muestras inoculadas se usó *K. variicola* (10^7 UFC/g muestra). Imagen tomada de Rizo et al., 2020

1.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno

1.1.1. Aislamiento de bacterias

De todos los tiempos de fermentación se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno y con base a las características coloniales, se seleccionaron veintiocho UFC (aislados bacterianos) para determinar la actividad nitrogenasa mediante el ensayo ARA.

Si bien algunas cepas una vez aisladas tuvieron baja actividad, por ejemplo, la cepa No. 16 solo produjo 0.16 nmol C₂H₄ h⁻¹, se consideraron positivas ya que hubo formación

del pico de etileno característico, mientras que en los controles negativos y en dos aislados bacterianos no se observó producción de etileno (datos no mostrados). Curiosamente, casi todos los aislados tuvieron una alta capacidad para fijar nitrógeno, ya que mostraron una mayor actividad reductora de acetileno que la del control positivo. Específicamente, los aislados No. 2, 3, 4, 8, 10 y 21, mostraron una actividad 10 veces mayor (Tabla 2). De todas estas veinticinco presentaron características microscópicas

Artículos

similares (bacilos gramnegativos y presencia de exopolisacáridos) y sólo un aislado fue

diferente (bacilos gramnegativos que no formaron exopolisacáridos).

Tabla 2. Ensayo ARA en las bacterias aisladas del pozol

Número de identificación de la colonia	ARA (nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹)	Número de identificación de la colonia	ARA (nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹)	Número de identificación de la colonia	ARA (nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹)
No. 1 (MMp/299)	10.44±1.01	No. 11 (MMp/299)	20.46±2.38	No. 21 (MMK)	52.82±1.93
No. 2 (MMp/299)	48.16±2.33	No. 12 (MMp/299)	20.21±1.66	No. 22 (MMK)	16.13±3.98
No. 3 (MMp/299)	48.07±1.84	No. 13 (MMp/299)	16.62±2.61	No. 23 (MMK)	15.25±0.05
No. 4 (MMp/299)	40.81±3.55	No. 14 (MMp/299)	15.35±1.52	No. 24 (MMK)	18.02±1.05
No. 5 (MMp/299)	35.79±7.20	No. 15 (MMp/299)	21.99±6.68	No. 25 (MMK)	18.41±5.73
No. 6 (MMp/299)	37.83±3.49	No. 16 (MMK)	0.16±0.09	No. 26 (MMK)	21.83±4.07
No. 7 (MMp/299)	2.64±1.76	No. 17 (MMK)	23.72±2.58	<i>Klebsiella varicola</i> sp. nov. ATCC® BAA-830™ ^a	4.34±0.311
No. 8 (MMp/299)	41.56±1.80	No. 18 (MMK)	14.95±0.81	<i>Klebsiella varicola</i> sp. nov. ATCC® BAA-830™ ^b	4.21±0.98
No. 9 (MMp/299)	3.67±0.28	No. 19 (MMK)	19.15±7.40		

Los medios de crecimiento indicados fueron donde las bacterias aisladas mostraron mayor actividad. ^aInoculado en medio semisólido MMp/299. ^bInoculado en medio MMK semisólido.

1.1.2. Identificación molecular

Los resultados de secuenciación demostraron que las bacterias tienen similitudes con tres miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. La bacteria con características coloniales diferentes a las demás presentó la mayor identidad con *Kosakonia oryzendophytica*

(99.90%) y una identidad menor con *Enterobacter* sp. (99.88%). Dos de las colonias se identificaron como *Kosakonia* con 99.80% y 99.70% de identidad, respectivamente. El resto de los aislados tuvo una identidad de más del 99% con miembros del género *Klebsiella* (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación molecular de las bacterias aisladas del pozol

Número de identificación	Condiciones de aislamiento ^a	Identificación basada en el gen 16S rRNA		Identificación basada en el gen <i>nifH</i>	
No. 2	0h MMp/299	<i>Kosakonia radicinicans</i> DSM 16656	1495 (TS) 99.63% (I)	<i>Kosakonia oryzae</i> R5-395	553 (TS) 98.11% (I)
		<i>Kosakonia oryzae</i> OIa51	1489 (TS) 99.51% (I)		
No. 3	0h MMp/299	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104,	1500 (TS) 99.76% (I)	<i>Klebsiella</i> sp. CRPV0611a	571 (TS) 98.47% (I)
No. 5	9h MMp/299	<i>Klebsiella varicola</i> F2R9	1513(TS) 99.88% (I)		
No. 7	24h MMp/299	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104	1465 (TS) 99.02% (I)		
		<i>Klebsiella varicola</i> strain F2R9	1454 (TS) 98.78% (I)		
No. 9	48h MMp/299	<i>Klebsiella varicola</i> F2R9	1495 (TS) 99.63% (I)		
No. 10	48h MMp/299	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104	1498 (TS) 99.76% (I)	<i>Klebsiella</i> sp. CRLIQ728	569 (TS) 99.37% (I)
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> strain R-70	1836 (TS) 99.80% (I)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NG14	564 (TS) 99.36% (I)
No. 11	48h MMp/299	<i>Kosakonia oryzendophytica</i> REICA 082	1500 (TS) 99.76% (I)	<i>Enterobacter</i> sp. strain BKA4	510(TS) 95.62%(I)
		<i>Enterobacter cloacae</i> DSM30054, NBRC 13535, 279-56 and subsp. <i>dissolvens</i> LMG2683	1469 (TS) 99.02 (I)	<i>Enterobacter oryzendophyticus</i> REICA 082	462(TS) 94.95%(I)
No. 12	48h MMp/299	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> 07A044	1480 (TS) 99.75% (I)		
No. 13	48h MMp/299	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> strain 07A044	1504 (TS) 99.76% (I)	1) <i>Klebsiella</i> sp. CRPV0611a	569 (TS) 99.37% (I)
No. 17	0h MMK	<i>Kosakonia radicinicans</i> DSM 16656	1506 (TS) 98.8% (I)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	468 (TS) 100% (I)
				<i>Kosakonia radicinicans</i> DSM 16656	468 (TS) 98.08% (I)
				<i>Kosakonia oryzae</i> R5-395	446 (TS) 98.80% (I)
No. 21	24h MMK	<i>Klebsiella varicola</i> F2R9	1463(TS) 99.50% (I)	<i>Klebsiella varicola</i> AJ29, E57-7, WCHKP19, GJ3, GJ2, GJ1, DX120E	490 (TS) 100% (I)
No. 22	24h MMK	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> strain 07A044	1506 (TS) 99.76% (I)	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> strain ATCC 700603	490 (TS) 100% (I)

No. 23	24h MMK	<i>Klebsiella variicola</i> F2R9	1511 (TS) 100% (I)	<i>Klebsiella variicola</i> gene for dinitrogenase reductase, partial cds, strain NGB-FR96	490 (TS) 100% (I)
No. 24	48h MMK	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104	1498 (TS) 99.76% (I)		
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> strain R-70	1820 (TS) 99.31% (I)		
No. 25	48h MMK	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> strain 07A044	1827 (TS) 98.46% (I)	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> strain ATCC 700603	499 (TS) 100% (I)
No. 26	48h MMK	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> strain 07A044	1493 (TS) 99.51% (I)		

^aIndica el tiempo de fermentación y medio de cultivo del que se aislaron las bacterias.

TS (Score total)

I (Porcentaje de identidad)

Dado que el análisis del gen 16S rRNA no proporciona suficiente poder de resolución en especies estrechamente relacionadas como es el caso de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, se hizo la identificación de algunas cepas utilizando el gen housekeeping *nifH*. Nuevamente se identificaron los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Kosakonia* (Tabla 3).

Aunque no se evaluaron los cambios en la composición de las bacterias fijadoras de nitrógeno durante la fermentación del pozol, observamos que las bacterias aisladas variaron en función del tiempo. *Kosakonia*, género no reportado previamente en la fermentación, solo se aisló en la masa no fermentada, *Enterobacter* solo se aisló a las 48 h de fermentación y las cepas de *Klebsiella* se aislaron en todos los tiempos de fermentación. La prevalencia de enterobacterias en la fermentación del pozol ha sido estudiada por Giles (2012), demostrando que *Klebsiella pneumoniae* aislada del pozol es capaz de sobrevivir en condiciones ácidas y con una concentración de ácido láctico de 2.1 g/100 g, en contraste con el aislado clínico *Klebsiella pneumoniae* que, en las mismas condiciones, es indetectable.

1.2. Capacidad de fijación de nitrógeno en el pozol

Para corroborar que el aumento de nitrógeno es producto de la fijación biológica, se midió la actividad nitrogenasa directamente en las muestras de pozol disueltas en agar semisólido. En todos los casos se encontró producción de etileno, con un máximo en la muestra fermentada por 24 h (Figura 1B).

Además, para demostrar definitivamente si los diazotrofos aislados pueden fijar nitrógeno en el pozol, la bacteria con la mayor actividad nitrogenasa aparente, *Klebsiella variicola* (No. 21), se inoculó directamente en la masa homogeneizada y la masa inoculada se

transfirió a agar semisólido. Al mismo tiempo, una concentración igual del aislado se inoculó en agar semisólido y en medio semisólido MMK (Figura 1B). Los datos mostraron que la inoculación de *K. variicola* resultó en un aumento en la concentración de etileno en la muestra sin fermentar y con 9 h de fermentación, alcanzando la actividad máxima en este periodo. Como era de esperarse, la inoculación de la bacteria en el medio MMK también resultó en una actividad positiva, mientras que cuando se inoculó en agar semisólido no se observó reducción de acetileno (Figura 1B). Estos resultados indican que la fijación de nitrógeno en el pozol es un proceso activo, lo que representa la primera demostración de este fenómeno en un alimento fermentado. La fijación en el pozol fue respaldada por el ensayo ARA directamente en la masa, así como por el aislamiento de bacterias con esta actividad, y por la detección del gen *nifH* en las cepas analizadas. La importancia de este fenómeno en los alimentos se acentúa si consideramos que es un proceso simple y económico que podría permitir la mejora del valor nutricional en bebidas y alimentos fermentados a base de cereal.

2. Estudio metaproteómico del pozol

2.1. Estructura y cambios de la microbiota en la fermentación del pozol

En los alimentos fermentados tradicionales la presencia y desarrollo de los diferentes microorganismos está determinada por el tipo de sustrato utilizado para su elaboración y por su capacidad de adaptarse a las condiciones que se generan a lo largo de la fermentación. En algunos alimentos, alteraciones menores en la diversidad o el número de especies pueden dar como resultado productos alimenticios significativamente diferentes y variaciones en la calidad y características de este (Labib et al., 2018). Por lo tanto, resulta importante establecer la composición y los

cambios de los microorganismos durante la fermentación.

Para el pozol, diversos estudios microbiológicos han demostrado los cambios y la distribución espacial de los principales grupos microbianos durante la fermentación y se han aislado e identificado un gran número de microorganismos (Nuraida et al., 1995; Ampe, Ben Omar & Guyot, 1999; Ampe et al., 1999; Wachter et al., 2000; Ben Omar & Ampe, 2000; Escalante et al., 2001; Díaz-Ruiz et al., 2003; Sainz et al., 2005; Wachter-Rodarte et al., 2015; Olvera et al., 2017; López-Hernández et al., 2018; Cooper-Bribiesca et al., 2019; Rizo et al., 2020; Domínguez-Ramírez et al., 2020). Sin embargo, los pocos estudios que han determinado la dinámica de la comunidad microbiana durante la fermentación se enfocaron en las bacterias, principalmente en las lácticas. En este trabajo se realizó el estudio metaproteómico del pozol en diferentes etapas de la fermentación para determinar los principales cambios en las comunidades microbianas.

Previo al análisis metaproteómico, se realizó la cuantificación de los principales grupos microbianos para corroborar si la fermentación se estaba llevando a cabo como ha sido ampliamente descrita.

En general, se observó que justo después de la nixtamalización, los recuentos bacterianos para todos los grupos analizados fueron del orden de 10^6 UFC, excepto para el grupo de enterobacterias que estuvieron en una concentración de 10^4 UFC. Los mesófilos aeróbicos iniciaron la fermentación con una concentración de 10^6 UFC/g de masa, incrementándose después de 24 h de fermentación a 10^9 UFC/g. Entre ellas, las BAL, el grupo predominante durante la fermentación (Nuraida et al., 1995; Wachter et al., 2000; Ampe et al., 1999; Escalante et al., 2000), comenzaron con un recuento de 10^6 UFC/g y aumentaron después de 24 h de fermentación a 10^{10} UFC/g. Este aumento coincidió con la caída del pH de casi 3 unidades, de 7.75 a 4.83.

Respecto a las bacterias lácticas amilolíticas, se observó el mismo comportamiento, una cuenta inicial alta (10^6 UFC/g muestra seca) y un aumento a las 24 h de fermentación (10^9 UFC/g de masa seca). La presencia de estas bacterias al inicio de la fermentación es importante, considerando que el almidón el principal sustrato para la fermentación láctica. Otro grupo importante fue el de las

enterobacterias, que presentó un recuento inicial de 10^4 UFC/g y un aumento durante las primeras 9 h a 10^6 UFC /g, momento a partir del cual detuvieron su crecimiento y comenzaron a disminuir lentamente a 10^5 UFC/g después de 48 h. Por otro lado, a medida que el valor del pH del pozol se volvió más ácido, la concentración de los hongos aumentó, con un máximo de 10^6 UFC/g a las 48 h. Estos resultados concuerdan con todos los estudios microbiológicos descritos hasta la fecha.

Por otro lado, el estudio metaproteómico del pozol mostró que este alimento fermentado es un ecosistema complejo, donde no solo encontramos proteínas del sustrato, sino también proteínas de bacterias, hongos y arqueas. Evidentemente, las proteínas identificadas en mayor proporción fueron del sustrato, 69.9% del metaproteoma corresponde a maíz, con un importante número de proteínas de bacterias y hongos, las cuales representaron el 28.5% del metaproteoma y un menor porcentaje (1.6%) asociado a arqueas.

El estudio por tiempo de fermentación mostró que la masa no fermentada está compuesta por una microbiota heterogénea, representada por proteínas de bacterias relacionadas con el medio ambiente, el sustrato o el material utilizado para la elaboración del pozol. Sin embargo, estas proteínas se redujeron o eliminaron durante la fermentación, por lo que estas especies pueden no ser necesarias para el proceso. A medida que la masa se fermenta, la microbiota se hace más homogénea y se establece un núcleo de microorganismos, compuesto principalmente por BAL (Figura 2A). La presencia de BAL en los alimentos fermentados está asociada a la producción de ácidos orgánicos responsables de los sabores y olores característicos de cada alimento (Blandino *et al.* 2003; Oyewole, 1997; Nout y Rombouts, 1992). Durante la fermentación del pozol, la drástica disminución de pH correlacionó con el aumento en la concentración de BAL y con el número de proteínas identificadas para este grupo.

Dentro de las BAL el género predominante fue *Streptococcus*, que al final de la fermentación representó el 56% del metaproteoma bacteriano total (Figura 2A). Estudios previos demostraron que *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* tiene características únicas, como una alta velocidad específica de

crecimiento, una conversión eficiente de sustrato a biomasa, tiene actividad amilolítica, es capaz de crecer en arabinosilano de maíz y sobrevive en condiciones extremas de pH (ácidos y alcalinas), lo que le da ventajas competitivas sobre otras bacterias y explica su abundancia durante la fermentación (Díaz-Ruiz et al., 2003; Cooper-Bribiesca et al., 2018; Domínguez-Ramírez et al., 2020).

Otras proteínas identificadas de BAL corresponden a los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*, géneros previamente descritos en el pozol (Figura 2A) (Wacher, 1995; Nuraida et al., 1995; Ampe et al., 1999; Ampe et al., 1999; Ben Omar & Ampe, 2002; Escalante et al., 2001; Díaz-Ruiz et al., 2003). Su presencia en la fermentación está determinada por su capacidad para degradar algunos de los polisacáridos presentes en la masa. La baja abundancia de proteínas identificadas para *Enterococcus* en comparación con los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, podría estar relacionada con su baja actividad amilolítica (Díaz, 2003) y a que algunas especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* pueden utilizar almidón y xilano como única fuente de carbono para crecer (Nuraida et al., 2001; Flores, 1995; Flores, 2007).

Otros cambios importantes en la composición microbiana corresponden al grupo de las enterobacterias. Tanto la cuenta en placa como el análisis metaproteómico, mostraron que están presentes desde el inicio de la fermentación y que a medida que la masa se va acidificando, su concentración disminuye considerablemente y, al final, las proteínas identificadas para este grupo representaron <3% del metaproteoma (Figura 2A). Diferentes estudios han reportado la presencia de enterobacterias en diferentes etapas del proceso de fermentación (Wacher, 1995; Ampe et al., 1999; Ampe et al., 1999;

Wacher et al., 2000; Morales, 2011), su caracterización ha permitido identificar varias especies, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella sp.*, *Klebsiella variicola* y *Kosakonia sp.* (Ulloa et al., 1987; Sainz, 1998; Sainz et al., 2001; Rizo et al., 2020). Su presencia a pesar de la alta concentración de ácidos orgánicos puede deberse a la generación de microambientes dentro de la masa, a la tolerancia de algunas cepas o porque otros microorganismos utilizan los ácidos orgánicos para su crecimiento, disminuyendo localmente su concentración (Ampe et al., 1999; Ben Omar & Ampe, 2000; Giles, 2012).

Para los hongos los resultados de la cuenta en placa y el análisis metaproteómico mostraron que estos están presentes desde el inicio de la fermentación. Se encontró que en la masa no fermentada hay proteínas de hongos filamentosos asociados a suelo y plantas como *Ajellomyces*, *Cercospora* y *Fusarium*. Mientras que los géneros predominantes a las 9 h de fermentación fueron *Schizosaccharomyces* y *Saccharomyces*. La muestra fermentada por 48 h consistió principalmente de proteínas del género *Neurospora* que represento el 44%, mientras que la abundancia de los géneros *Schizosaccharomyces* y *Saccharomyces* se redujo a menos del 10% (Figura 2B). El desarrollo de este grupo coincidió con la disminución de pH asociada a la producción de ácidos orgánicos. Se ha sugerido que la proliferación de hongos en los alimentos es estimulada por las BAL y a su vez los hongos favorecen el crecimiento de otras bacterias, aportando factores de crecimiento como vitaminas y compuestos nitrogenados solubles (Nout, 1991).

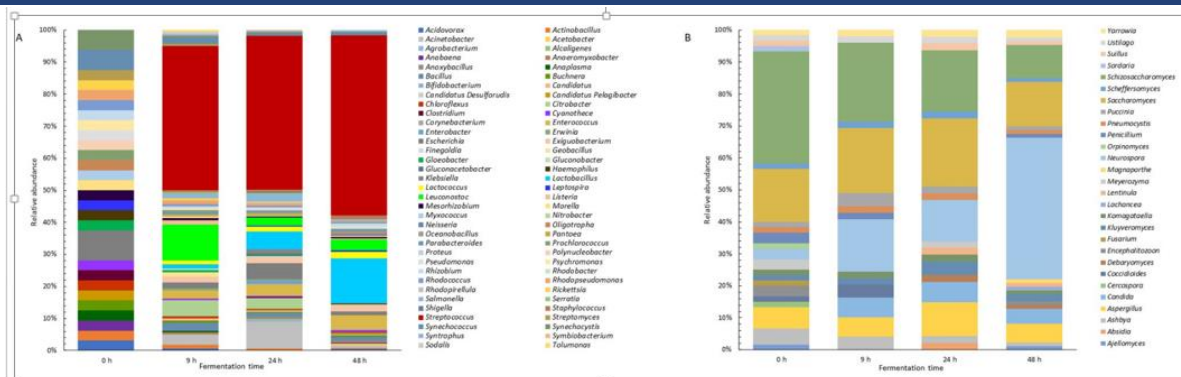


Figura 2. Abundancia relativa de las proteínas identificadas en el análisis MS/MS. Las proteínas se identificaron a partir de 2 péptidos únicos y se agruparon por género. (A). Proteínas identificadas para bacterias. (B): Proteínas identificada para hongos. Imagen tomada de Rizo et al., 2021.

2.2. Meta-análisis del metaproteoma

Para la construcción de las rutas metabólicas se utilizaron los datos metaproteómicos de bacterias, hongos y plantas, para cada proteína se buscó asignar su identificador KO (KEGG Orthology) para su posterior

integración en la respectiva vía metabólica. Se analizaron un total de 3246 identificadores, los cuales resultaron en la reconstrucción parcial o total de diferentes rutas metabólicas (Figura 3).

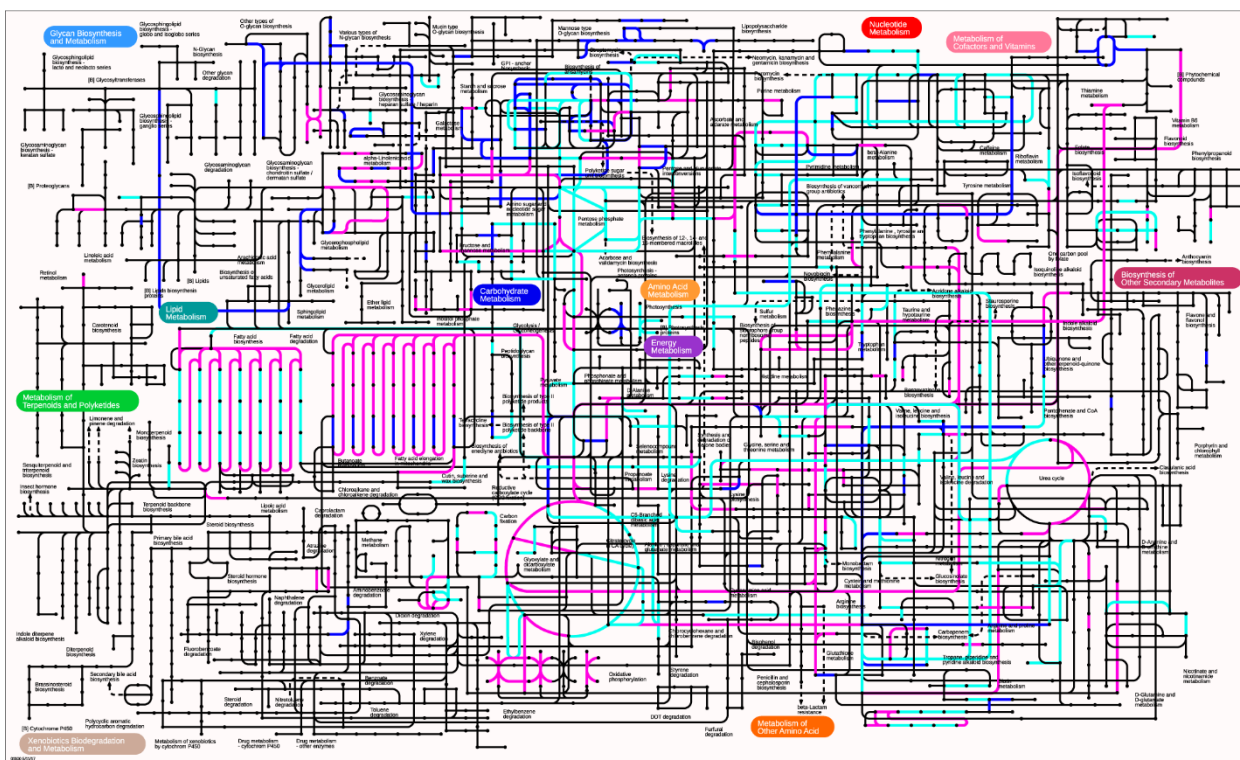


Figura 3. Atlas KEGG de las vías metabólicas que se encuentran en el metaproteoma del pozol. Las proteínas identificadas únicamente en bacterias y hongos se muestran en azul. Las proteínas identificadas únicamente en plantas se muestran en rosa. Las líneas cian indican proteínas en común. Imagen tomada de Rizo et al., 2021.

En las vías metabólicas relacionadas con el metabolismo central de carbohidratos, se lograron detectar todas las proteínas que participan en la glucólisis, gluconeogénesis, oxidación del piruvato, ciclo de Krebs y la ruta de la pentosa fosfato. Mientras que para la

ruta del catabolismo de glucosa a piruvato (ruta Entner-Doudoroff) solo algunas proteínas fueron identificadas. Además, se encontraron proteínas para el metabolismo de carbohidratos complejos.

En el metabolismo de aminoácidos se agruparon diferentes proteínas tanto para su biosíntesis como para su degradación. Sin embargo, el análisis demostró que solo en algunos casos se pudo hacer una reconstrucción total de las vías.

Para el metabolismo de lípidos se encontraron todas las proteínas para la biosíntesis y degradación de ácidos grasos y algunas proteínas para la biosíntesis de otros lípidos como lactosilceramida, triacilglicerol y ácido jasmónico.

Con relación al metabolismo energético, todas las proteínas se relacionaron con la fijación de carbono, en donde podemos encontrar procesos exclusivos de plantas como la fotosíntesis para la producción de energía en forma de ATP y NADPH. Otras vías de fijación de carbono encontradas corresponden al ciclo reductivo del ácido cítrico y a la vía reductiva de acetil-CoA.

Otra ruta metabólica importante encontrada en la fermentación del pozol corresponde al metabolismo de vitaminas y cofactores, para las cuales se encontraron un menor número de proteínas asociadas a la biosíntesis de vitaminas como piridoxina, tiamina, riboflavina, biotina y ácido pantoténico, sin embargo, en ninguno de los casos se encontraron todas las enzimas para completar las respectivas vías.

Finalmente, se observó que dentro del sistema puede haber complementación metabólica ya que las proteínas de los microorganismos y el sustrato pueden contribuir a la misma vía biosintética o catabólica. Otros procesos metabólicos se relacionaron exclusivamente a plantas, bacterias u hongos.

2.2.1. Metabolismo de carbohidratos

El pozol se caracteriza por tener una baja concentración de carbohidratos solubles, un alto contenido de almidón y presencia de celulosa y hemicelulosa del pericarpio, por lo que estos polisacáridos representan las principales fuentes de carbono, que en conjunto deben sostener una abundante y compleja microbiota.

En los datos metaproteómicos se identificaron diferentes enzimas implicadas en la hidrólisis de almidón, celulosa y hemicelulosa, fuentes de carbono presentes en la masa nixtamalizada. Para el almidón, se identificaron dos proteínas en la base de datos de plantas, una β -amilasa que produce

maltosa y una α -glucosidasa que produce glucosa a partir de almidón y maltosa. Estas enzimas podrían jugar un papel importante, principalmente en la primera etapa de fermentación, liberando azúcares simples que pueden ser utilizados para el crecimiento de microorganismos que se encuentran en la materia prima. En bacterias, se identificaron múltiples enzimas amilolíticas, α -amilasas, α -glucosidasas y enzimas desramificantes (pululanasas), juntas pueden despolimerizar al almidón en oligosacáridos y azúcares más pequeños (glucosa y maltosa) (Figura 4A). Trabajos previos han reportado la presencia de bacterias lácticas capaces de crecer e hidrolizar almidón en distintas etapas de la fermentación (Nuraida et al., 1995; Ampe et al., 2000; Díaz-Ruiz et al., 2003). La caracterización de algunas bacterias resultó en la identificación de *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus sulfureus* y *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, siendo esta última la especie predominante durante la fermentación. Se sabe que la actividad de estas bacterias está asociada a la célula y que sus amilasas son de alto peso molecular (Díaz, 2003). Específicamente, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* produce dos amilasas, una amilopululanasa con capacidad desramificante y una α -amilasa (Díaz-Ruiz et al., 2003; Rodríguez et al., 2021). Con relación a los hongos y levaduras, los estudios han resultado variables en cuanto a si este grupo es capaz de degradar el almidón.

Para la hidrólisis de celulosa, se identificaron endoglucanasas en la base de datos de bacterias y plantas para la hidrólisis inicial de la celulosa. Además, de enzimas necesarias para la producción de celobiosa, glucosa y celo-oligómeros a partir de este sustrato (Figura 4B). De manera inexplicable no se identificaron enzimas celulolíticas de hongos. Por otro lado, la degradación de la hemicelulosa imponer varios retos, ya que es un polímero de alto peso molecular y es muy variable en su estructura, por lo que su degradación requiere la acción de varias enzimas que deben actuar de forma sinérgica para una eficiente degradación del polímero (van den Brink y de Vries, 2011). Además, la completa degradación de la hemicelulosa requiere la presencia de enzimas que actúen sobre los distintos tipos de decoraciones, para finalmente liberar azúcares simples y xilooligosacáridos. En los datos

metaproteómicos se identificaron proteínas de bacterias y hongos que actúan sobre el esqueleto principal de la cadena y las diferentes sustituciones, lo que permite la

completa hidrólisis de este polisacárido y la liberación de xilosa, xilobiosa y xilooligosacáridos (Figura 4C).

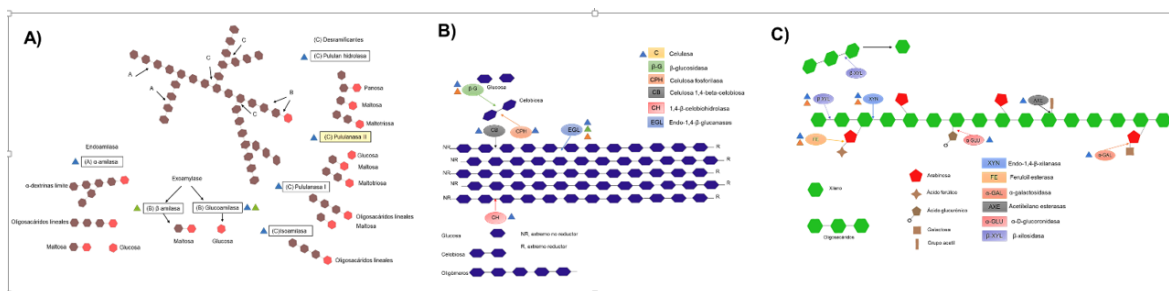


Figura 4. Representación esquemática de los diferentes polisacáridos presentes en la masa de maíz y las enzimas implicadas en su degradación. (A) Proteínas identificadas en el metaproteoma para la hidrólisis del almidón; (B) celulosa y (C) arabinoxilano. Imagen tomada de Rizo et al., 2021.

Se ha demostrado que algunas bacterias aisladas de este alimento pueden degradar xilano y recientemente se demostró que *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* es capaz de degradar xilano de maíz o madera y que varias cepas de *Weissella* solo pueden utilizar xilooligosacáridos como fuente de carbono para su crecimiento (Cooper-Bribiesca et al. 2018; López-Hernández et al. 2018).

En correlación con los resultados anteriores, el análisis químico mostró una disminución importante en el contenido de fibra, carbohidratos que se puede asociar a las actividades enzimáticas de las proteínas identificadas en el estudio metaproteómico. Con estos datos se puede sugerir que durante las primeras 9 h de fermentación la microbiota consume además del almidón, polisacáridos como la celulosa y hemicelulosa, lo que libera azúcares solubles, que de hecho aumentaron significativamente. Después de este periodo se observó una disminución importante de estos carbohidratos, lo que implica su utilización y explicaría el aumento en las cuentas de microorganismos.

Finalmente, el análisis de las proteínas sugiere un posible sinergismo entre bacterias, hongos y maíz para la degradación de los diferentes sustratos.

2.2.2. Metabolismo de aminoácidos

La biosíntesis de aminoácidos se puede producir a partir de precursores metabólicos, por el metabolismo de alguno de ellos o por la acción de diferentes proteasas para el reciclado de proteínas.

En el análisis metaproteómico se logró identificar la enzima necesaria para la condensación de α -cetoglutarato y amoníaco a glutamato, este

aminoácido puede ser posteriormente metabolizado a glutamina y a prolina. En el primer caso se identificaron las proteínas involucradas en su biosíntesis y aunque para la prolina la vía quedó incompleta, se identificó una proteasa específica (prolina iminopeptidasa) para su producción.

También se identificaron las proteínas involucradas en el metabolismo de oxalacetato a aspartato y asparagina. A pesar de que la metionina y treonina también son sintetizadas a partir de este precursor, el análisis mostró que estos aminoácidos se producen a partir de homocisteína y homoserina, respectivamente. Para la arginina se identificaron dos posibles rutas para su síntesis, mediante la vía ornitina para la cual se encontraron las enzimas necesarias para su producción y mediante el ciclo de la urea.

Para los aminoácidos histidina, serina, leucina, isoleucina y valina se observó lo mismo, presencia de los precursores y la identificación de algunas de las enzimas para su producción, sin embargo, en todos los casos la vía quedó trunca en el paso final.

Respecto a la degradación de aminoácidos se identificaron las proteínas aminotransferasas para la reacción de transaminación, sin embargo, no se encontraron proteínas para la posterior conversión de los α -cetoácidos, lo que indica que la degradación de aminoácidos para la producción de sabores no es una vía metabólica clave durante la fermentación del pozol.

Para la degradación de proteínas, se identificaron diferentes proteasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas, lo que indica que esta puede ser una vía alterna para la

producción de distintos aminoácidos, así como para la posible liberación de péptidos.

2.4. Análisis funcional de la microbiota

Por ser un intermediario importante para la producción de sabores se analizó el metabolismo del piruvato. Se encontró que este puede ser producido a través de la glucólisis y que puede ser metabolizado por cinco mecanismos diferentes. En primer lugar, se identificaron enzimas relacionadas con la producción de acetil-CoA, que luego puede ser metabolizado hasta acetato y etanol. En segundo lugar, se evidenció la reducción de piruvato a lactato por la lactato deshidrogenasa. En tercer lugar, se encontró la piruvato descarboxilasa para la producción de acetaldehído. En cuarto lugar, el análisis mostró la presencia de la enzima formiato acetiltransferasa, que cataliza la conversión reversible de piruvato y coenzima A en formiato y acetil-CoA. Finalmente, se encontró que el piruvato se puede metabolizar a acetoína, diacetilo y butano-2,3-diol mediante el metabolismo del butanoato. La producción de lactato, acetato y etanol en el pozol implica que en la fermentación se desarrollan especies de BAL homo y heterofermentativas. La actividad de estas bacterias da como resultado la producción de lactato como principal producto de fermentación, acetato y etanol en menor concentración (Ampe et al., 1999). Aunque en pozol no se ha estudiado la producción de acetoína y butanodiol, en otros alimentos fermentados, la síntesis de estos dos compuestos está asociada principalmente al metabolismo de las BAL y, aunque no representan un producto principal de la fermentación, son importantes para la mejorar de las características organolépticas (Güzel-Seydim et al., 1999; Jung et al., 2011; Wu et al., 2015).

Conclusiones

El análisis microbiológico, bioquímico y metaproteómico del pozol permitió la construcción de una imagen integral del sistema de fermentación. Se logró determinar que además de los sistemas enzimáticos del propio sustrato, bacterias, hongos, levaduras y arqueas también participan durante el proceso, siendo las bacterias el grupo más representado durante los tiempos estudiados.

Los principales cambios tanto en el sustrato como en la microbiota se dan en las primeras 9 horas de fermentación y se correlaciona con el aumento logarítmico de los microorganismos,

con la caída del pH, con la disminución del contenido de carbohidratos y fibra, lo que muestra esta etapa como la de mayor actividad metabólica.

Se encontraron por primera vez muchos microorganismos ambientales, relacionados con el maíz y con el agua, sin embargo, la mayor parte de ellos desaparecen o disminuyen drásticamente, por lo que se puede considerar que su presencia no determina las características del alimento. Las bacterias se encuentran representadas en su mayoría por bacterias lácticas y dentro de estas el género *Streptococcus* es de manera contundente el más abundante, todas estas bacterias pueden encontrarse en el medio ambiente pero su hábitat más importante son los mamíferos, lo que indica que si bien se trata de una fermentación espontánea, la participación humana a nivel del proceso de nixtamalización y de inoculación es determinante en la microbiota que se desarrolla. Con relación a las levaduras, se observó que están presentes en todas las muestras analizadas, con un incremento de hongos filamentosos al final de la fermentación.

El enfoque metaproteómico permitió encontrar diversos complejos enzimáticos desconocidos hasta el momento en el sistema. Se encontraron también las enzimas necesarias para la hidrólisis del almidón, la hemicelulosa y la celulosa por lo que todos estos sustratos pueden ser utilizados como fuente de carbono por la microbiota. Resulta interesante que en la degradación del almidón no se encontraron sistemas enzimáticos de hongos y sean las enzimas propias del maíz y de las bacterias las que se encarguen de la hidrólisis del sustrato. En el caso de hemicelulosa y celulosa intervienen tanto bacterias como hongos, con predominancia siempre de las enzimas bacterianas. Este diverso repertorio de enzimas encontradas permitirá nuevos estudios bioquímicos y estructurales.

El metabolismo encontrado permite la síntesis de diversos productos de fermentación como ácidos orgánicos, acetoina, butanediol e intermediarios importantes involucrados en la síntesis de ácidos grasos y aminoácidos. Compuestos que contribuyen con las características organolépticas y nutricionales del pozol.

Otra característica distintiva e importante de esta fermentación fue la presencia de enterobacterias diazótroficas capaces de fijar nitrógeno atmosférico en la masa. La fijación biológica de nitrógeno permite el incremento del valor nutricional del pozol, lo que demuestra que la

fermentación del pozol puede transformar un alimento relativamente pobre, en un mejor alimento. Resultados que abre la posibilidad de estudiar este proceso como un método viable para ser utilizado en otros alimentos bajos en contenido proteínico.

Referencias

Ampe F, Ben ON, Guyton JP (1999) Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough. *Journal of Applied Microbiology* 87:131-140. <https://doi.org/10.1091/Rodriguez46/j.1365-2672.1999.00803.x>

Ampe F, Ben ON, Moizan C, Wachter CM, Guyton JP (1999) Polyphasic study of the spatial distribution of microorganism in Mexican Pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 65:5464-5473. doi: 10.1128/AEM.65.12.5464-5473.1999.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2000) Official method 992.23: crude protein in cereal grains and oil seeds. In *Official methods of analysis of AOAC International*. Horwitz W(ed) 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

Ben Omar N, Ampe F (2000) Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3664-3673. doi: 10.1128/aem.66.9.3664-3673.2000.

Berger B, Baldermann S, Ruppel S (2017) The plant growth-promoting bacterium *Kosakonia radicincitans* improves fruit yield and quality of *Solanum lycopersicum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97:4865-4871. doi: 10.1002/jsfa.8357.

Blandino A, Al-Aseeri ME, Pandiella SS, Cantero D, Webb C (2003) Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* 36:527-543. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00009-7).

Cañas A, Barzana E, Owens JD, Wachter C (1993) La elaboración de pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia* 4:219-229.

Cárdenas C, Barkla B.J, Wachter C, Delgado-Olivares L, Rodríguez-Sanoja R (2014) Protein extraction method for the proteomic study of a Mexican traditional fermented starchy food. *Journal of Proteomics* 111:139-147. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.028>.

Cooper-Bribiesca B, Navarro A, Díaz-Ruiz G, Aguilar G, Rodríguez-Sanoja R, Wachter C (2018) Lactic acid fermentation of arabinoxylan from nejayote by *Streptococcus infantarius* ssp. *infantarius* 25124 isolated from pozol. *Frontiers in Microbiology* 9:3061. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03061>.

Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology* 26:367-372. doi: 10.1038/nbt.1511.

Cravioto O, Cravioto G, Massieu H, Guzman J (1955) El pozol, forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. *Ciencia* 15:27-30.

Di Cagno R, De Angelis M, Lavermicocca P, De Vincenzi M, Giovannini C, Faccia M, Gobbetti M (2002) Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Applied and environmental microbiology* 68(2):623-633. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.623-633.2002>.

Díaz RG (2003) Fermentación del almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Díaz-Ruiz G, Guyot J, Ruiz-Teran F, Morlon-Guyot J, Wachter C (2003) Microbial and physiological characterization of weakly amyolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Applied and Environmental Microbiology* 69(8):4367-4374. doi: 10.1128/AEM.69.8.4367-4374.2003.

Domínguez-Ramírez LL, Rodríguez-Sanoja R, García-Garibay M, Sainz T, Wachter C (2020) Tolerance to acid and alkali by *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* strain 25124

isolated from fermented nixtamal dough: pozol. studies in apt broth. Food Microbiology 90:103458.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103458>.

Escalante A, Wachter CM, Farrés A (2001) Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. International Journal of Food Microbiology 64:21-31. doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00428-1.

Flores AG (2007) Estudio de bacterias lácticas xilanolíticas aisladas del pozol. Identificación por medio de ARDRA. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Giles GM (1995) Estudio sobre las interacciones microbianas importantes para el incremento de proteína durante la fermentación de pozol. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Giles GM (2012) Estudio de la sobrevivencia de enterobacterias aisladas del pozol durante la fermentación láctica de masas y suspensiones de harina de maíz nixtamalizadas. Tesis de Maestría. UNAM, México, CDMX.

Havliš J, Thomas H, Šebela M, Shevchenko A (2003) Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. Analytical chemistry 75(6):1300-1306.

<https://doi.org/10.1021/ac026136s>.

Jung JY, Lee SH, Kim JM, Park MS, Bae JW, Hahn Y, Madsen EL, Jeon CO (2011) Metagenomic analysis of kimchi, a traditional korean fermented food. Applied Microbiology and Biotechnology 77(7):2264-2274. doi: [10.1128/AEM.02157-10](https://doi.org/10.1128/AEM.02157-10).

Labib E, Blaut M, Hussein L, Gound M, Kramer DL, Paly O, Ganesh B, Schumann P, Pukall R, Wotting A, Fouad MT (2018) Molecular diversity of gut microbiota and short chain fatty acids in egyptian adults following dietary intervention with fermented sobya. Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene 3(2):1-11. DOI: 10.4172/2476-2059.1000139.

Leroy F, De Vuyst L (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science &

Technology 15(2):67-78.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>.

Leyva Cynthia (2018) Aproximación proteómica a la fermentación del pozol. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Lin L, Li Z, Hu C, Zhang X, Chang S, Yang L, Li Y, An Q (2012) Plant growth-promoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China. Microbes and Environments 27:391-398. doi: 10.1264/jsme2.me11275.

Loeza NM (1991) Efecto de la nixtamalización en la fermentación del pozol. Tesis de licenciatura.

Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

López-Hernández M, Rodríguez-Alegría ME, López-Munguía A, Wachter C (2018) Evaluation of xylan as carbon source for *Weissella* spp., a predominant strain in pozol fermentation. LWT-Food Science and Technology 89:192-197. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.030>.

Mariotti F, Tomé D, Mirand PP (2008) Converting nitrogen into protein—beyond 6.25 and Jones' factors. Critical reviews in food science and nutrition 48(2), 177-184.

<https://doi.org/10.1080/10408390701279749>.

Morales EC (2011) Estudio de la presencia y sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* en el pozol. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R (2003) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Analytical Chemistry 75(17):4646-58.

<https://doi.org/10.1021/ac0341261>.

Nout MJR (1991) Ecology of accelerated natural lactic fermentation of sorghum-based infant food formulas.

International Journal of Food Microbiology. 12:217-224.

Nout MJR, Rombouts FM (1992) Fermentative preservation of plant foods. Journal of Applied Bacteriology 73:136s-147s.

Nuraida L, Wacher C, Owens JD (1995) Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11:567-571.
doi: 10.1007/BF00286375.

Olvera C, Santamaría RI, Bustos P, Vallejo C, Montor JJ, Wacher C, Lopez-Munguia A (2017) Draft genome sequence of *Leuconostoc citreum* CW28 isolated from pozol, a pre-hispanic fermented corn beverage. *Genome Announcements* 5(48):e01283-17.
doi: 10.1128/genomeA.01283-17.

Ramírez JF (1987) Biochemical studies on a Mexican fermented food pozol. Tesis de Doctorado. Cornell University, Ithaca, NY.

Ramírez-Chavarín N, Wacher-Rodarte C, Pérez-Chabela ML (2010) Characterization and identification of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked sausages as bioprotective cultures. *Journal of Muscle Foods* 21:585-596.
doi.org/10.1111/j.1745-4573.2009.00206.x.

Rizo J (2015) Estudio proteómico de las hidrolasas del pozol. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Rizo J, Rogel MA, Guillén D, Wacher C, Martínez-Romero E, Encarnación S, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R (2020) Nitrogen fixation in pozol, a traditional fermented beverage. *Applied and Environmental Microbiology* 86(16): e00588-20. DOI: 10.1128/AEM.00588-20.

Rodríguez-Saavedra C, Rodríguez-Sanoja R, Guillén D, Wacher C, Díaz-Ruiz G (2021) *Streptococcus infantarius* 25124 isolated from pozol produces a high molecular weight amylopullulanase, a key enzyme for niche colonization. *Amylase* 5(1):1-12.
<https://doi.org/10.1515/amyase-2021-0001>.

Rogel MA, Hernández-Lucas I, Kuykendall LD, Balkwill DL, Martínez-Romero E (2001) Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* 67(7):3264-3268.
DOI:<https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3264-3268.2001>.

Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romer E (2003) *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Systematic and Applied Microbiology* 27:27-25.
doi.org/10.1078/0723-2020-00261.

Sainz T, Wacher C, Espinoza J, Centurión D, Navarro A, Molina J, Inzunza A, Eslava C (2001) Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *International Journal of Food Microbiology* 71:169-176.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00617-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00617-1).

Sun S, Chen Y, Chen J, Li Q, Zhang Z, Lan Z (2018) Isolation, characterization, genomic sequencing, and GFP-marked insertional mutagenesis of a high-performance nitrogen-fixing bacterium, *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A and visualization of bacterial colonization on cucumber roots. *Folia Microbiologica* 63:789-802.
doi: 10.1007/s12223-018-0608-1.

Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:11030-5 USA. doi:101:11030-11035.

Ulloa M, Herrera T, Lappe P (1987) Fermentaciones tradicionales indígenas de México. Instituto Nacional Indigenista, México.

Ulloa M, Teófilo H, de la Lanza G (1971) Fijación de nitrógeno atmosférico por microorganismos el pozol. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 13:113-124.

van den Brink J, de Vries RP (2011) Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(6):1477-1492.

Wacher C, Canas A, Cook PE, Bárzana E, Owens JD (1993) Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 269-274.
<https://doi.org/10.1007/BF00327853>.

Wacher C, Cañas A, Bárzana E, Lappe P, Ulloa M, Owens JD (2000) Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*

Artículos

17:251–256.

<https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0310>.

Wacher RC (1995) Estudio sobre la microbiología del pozol. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Wacher-Rodarte M, Trejo-Muñúzuri TP, Montiel-Aguirre JF, Drago-Serrano ME, Gutiérrez-Lucas RL, Castañeda-Sánchez JI, Sainz-Espuñes, T (2015) Antibiotic resistance and multidrug-resistant efflux pumps expression in lactic acid bacteria isolated from pozol, a nonalcoholic Mayan maize fermented beverage. *Food Science and Nutrition* 4(3):423-430. doi: 10.1002/fsn3.304.

Wu Z, Zhuang B, Weng P, Zhang X (2015)

Fermentation quality characteristics and flavor formation changes during the process of pickled wax gourd in Eastern Zhejiang. *International Journal of Food Properties* 19:409:419.

<https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1027775>

Zhu B, Zhou Q, Lin L, Hu C, Shen P, Yang L, An Q, Xie G, Li Y (2013). *Enterobacter sacchari* sp. novo a nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane (*Saccharum officinarum* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:2577–2582. doi: 10.1099/ijs.0.045500-0.

Premio Sergio Sánchez Esquivel 2023
a los mejores protocolos de tesis en Biotecnología y Bioingeniería

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C. (SMBB), en conjunto con *Biotekno* 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 miembros de la Comisión de Premios 2022-2024 de la SMBB de acuerdo con las bases de la convocatoria y la evaluación correspondiente otorgaron el Premio Sergio Sánchez Esquivel 2023 a los siguientes protocolos:

Categoría	Autor e institución	Título del protocolo	Director
Licenciatura	Roberto Carlos García Torres Instituto Tecnológico de Tehuacán/IBT, UNAM	Evaluación in vitro e in vivo de la eficacia de cápsides modificadas de virus adeno-asociado (VAA) de los serotipos 2 y 8 como vectores virales	M. en C. Arturo Liñán Torres
Maestría	Mónica Márquez López Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM	Sistema DFAtag-almidón fusionado a la proteína Spikemut del SARS-CoV-2 como posible candidato vacunal	Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Doctorado	Carlos Adrián García Ausencio Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM	Expresión y caracterización de un RiPP detectado por minería genómica	Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Premio Sergio Sánchez Esquivel 2023 a los mejores protocolos de tesis en Biotecnología y Bioingeniería

Dado la calidad de los protocolos sometidos se otorgaron dos menciones honoríficas:

Categoría	Autor e institución	Título del protocolo	Director
Maestría	Ana Patricia Gayosso Sánchez Colegio de Postgraduados campus Córdoba	Efectos de las condiciones nutricionales para la acumulación de polihidroxicanoatos en bacterias aisladas de la industria azucarera	Dr. Ricardo Hernández Martínez
Doctorado	Lorena Yamileth Balón Rosas Instituto de Biotecnología, UNAM	Análisis transcripcional de la red regulatoria de Quorum Sensing que determina la esporulación y la heterogeneidad celular en <i>Bacillus</i> , en función del pH del cultivo y la concentración celular	Dr. Enrique Galindo Fentanes

Los reconocimientos se entregaron en el marco del XX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería realizado en Ixtapa, Gro.



Virus adeno-asociado y su uso en virotecnología

Arturo Liñan-Torres*, Roberto C. García-Torres y Laura A. Palomares

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ave. Universidad 2001 Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, 62210, México

*Autor para correspondencia: arturo.linan@ibt.unam.mx

Resumen

Actualmente, existen siete terapias génicas aprobadas para su uso en humanos que se basan en virus adeno-asociado (VAA). Este virus ha adquirido un rol importante en la virotecnología aplicada en salud, la cual se define como toda aplicación tecnológica que use al menos un componente de origen viral. Se han descrito más de 100 serotipos de VAA, y de estos, el serotipo 2 ha sido el mejor caracterizado. Este virus destaca en virotecnología como vector viral y/o andamio viral, debido a que no es patógeno para humanos, transduce diversos tipos celulares, las proteínas que conforman su cápside son poco inmunogénicas (baja probabilidad de rechazo), es estable en un intervalo amplio de pH y temperatura, es de construcción recombinante simple, otorga polivalencia (60 proteínas estructurales forman la cápside) cuando se despliegan moléculas en su superficie, y aumenta la estabilidad estructural e inmunogenicidad de las moléculas desplegadas. En esta revisión se presenta información actualizada sobre la biología de VAA y su uso en virotecnología.

Palabras Claves: *virotecnología, virus adeno-asociado, vector viral, andamio viral*

Abstract

Currently, seven gene therapies approved for use in humans are based on adeno-associated virus (AAV). This virus has acquired an important role in virotechnology applied to health, defined as any technological application that uses at least one component of viral origin. More than 100 AAV serotypes have been described; of these, serotype 2 has been the best characterized. This virus stands out in virotechnology as a viral vector and/or viral scaffold, because it is not pathogenic for humans, it transduces various cell types, proteins that make up the capsid are poorly immunogenic (low probability of rejection), it is stable over a wide range of pH and temperature, its recombinant construction is simple, it provides polyvalence (60 structural proteins make up the capsid) when molecules are displayed on its surface, and increases the structural stability and immunogenicity of displayed molecules. In this review, updated information on the biology of AAV and its use in virotechnology is presented.

Key Words: *virotechnology, adeno-associated virus, viral vector, viral scaffold*

Introducción

Los virus son conocidos por causar enfermedades, pero ellos también pueden ser materiales para el desarrollo de tecnologías que pueden ser aplicadas en diversas áreas (Wen & Steinmetz, 2016; Reguera *et al.*, 2023). A la tecnología basada en virus también se le puede denominar virotecnología o biotecnología viral. Estos términos no son ampliamente utilizados en la comunidad científica, y actualmente, no se le atribuye la introducción (acuñar) de virotecnología o biotecnología viral a alguien en particular. En México, la Dra. Laura A. Palomares del Instituto de Biotecnología (IBt) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) usa y difunde con frecuencia el término virotecnología. Asimismo, el M. en C. Arturo Liñan del IBt-UNAM difunde este término en Perú. Podemos definir a virotecnología como “toda aplicación tecnológica que use al menos un componente de origen viral”. La virotecnología se relaciona con la nanotecnología, la cual se centra en el desarrollo de nanomateriales. Según la FDA, un nanomaterial se define como aquel generado mediante ingeniería (manipulación deliberada, fabricación o selección) que tiene al menos una dimensión en el intervalo de tamaño de 1 a 100 nm (Lizarazo-Salcedo *et al.*, 2018).

Algunas ventajas de los virus empleados en virotecnología, en comparación con los materiales sintéticos usados a la misma escala nano, incluyen la disposición espacial altamente precisa de sus subunidades en una amplia gama de formas y tamaños, muchas vías disponibles para una modificación fácil y reproducible, en su mayoría se pueden autoensamblar, suelen ser más seguros al administrarse a humanos debido a que son biodegradables y no biopersistentes (Wen & Steinmetz, 2016; Lizarazo-Salcedo *et al.*, 2018).

Entre las aplicaciones o desarrollos más destacados de la virotecnología se encuentra la terapia génica, el desarrollo de vacunas, sistemas de expresión recombinante mediada por vectores virales y el desarrollo de sistemas

de despliegues (andamio viral) (Wen & Steinmetz, 2016; Cuevas-Juárez *et al.*, 2023). Otros desarrollos del área de la virotecnología incluyen a los nanobiorreactores, nanomotores, nanocatalizadores, uso en imagenología en salud, nanoconductores, entre otros (Plascencia-Villa *et al.*, 2009; Wen & Steinmetz, 2016; Tejeda-Rodríguez *et al.*, 2019; McNeale *et al.*, 2023).

Algunos de los virus más empleados en virotecnología son bacteriófagos, baculovirus, lentivirus, virus adeno-asociado (VAA), adenovirus, retrovirus, virus vaccinia Ankara modificado, virus del moteado clorótico del caupí y virus del mosaico del tabaco (Wen & Steinmetz, 2016; Travieso *et al.*, 2022).

En el área de la terapia génica, VAA es el vector viral o herramienta virotecnológica más empleada (Zhao *et al.*, 2022). De igual manera, este virus ha sido empleado para el despliegue de péptidos o proteínas con diversos fines (Cuevas-Juárez *et al.*, 2023). En este artículo se describe el uso de VAA en la virotecnología.

Virus adeno-asociado

VAA pertenece a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus* (Mena-Enriquez *et al.*, 2012). VAA presenta replicación defectuosa, ya que requiere de la co-infección con virus “auxiliares” para llevar a cabo su ciclo de replicación; por ello se considera un virus con riesgo de bioseguridad bajo a nulo. Es un virus sin envoltura, posee un diámetro de ~18 a 26 nm y está compuesto por tres proteínas estructurales, VP1, VP2 y VP3 en proporciones 1:1:10, respectivamente. La cápside está formada por 60 monómeros de VPs. Su genoma es de ADN de cadena sencilla, tiene una longitud de ~ 4.7 kb y codifica para 10 proteínas, las cuales son Rep40, Rep52, Rep68, Rep78, VP1, VP2, VP3, proteína accesoria asociada a membrana (MAAP, por sus siglas en inglés), proteína activadora del ensamblaje (AAP, por sus siglas en inglés), y proteína X, (Dubielzig *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2020; Asaad *et al.*, 2023). La longitud y peso molecular de las proteínas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Longitud y peso molecular de las proteínas de virus adeno-asociado.

Proteína	Longitud (aa)	Peso molecular (kDa)
Rep78	621	78
Rep68	536	68
Rep52	397	52
Rep40	312	40
VP1	735	87
VP2	598	72
VP3	533	62
MAAP	119	13*
AAP	204	23*
X	155	18*

*Los pesos de MAAP, AAP y X fueron calculados con la herramienta ProtParam de ExPASy (web.expasy.org/protparam/).

Organización y expresión del genoma

El genoma (Figura 1) está flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 145 b que forman horquillas dando origen a una estructura en forma de T. Las ITR contienen el origen de replicación y un auto-iniciador,

son necesarias para la regulación de la transcripción y proporcionan la señal para el empaquetamiento viral (Xiao *et al.*, 1998). Además, las secuencias ITR pueden mediar la integración de VAA en secuencias diana dentro del genoma del huésped o plásmidos (Berns, 2020).

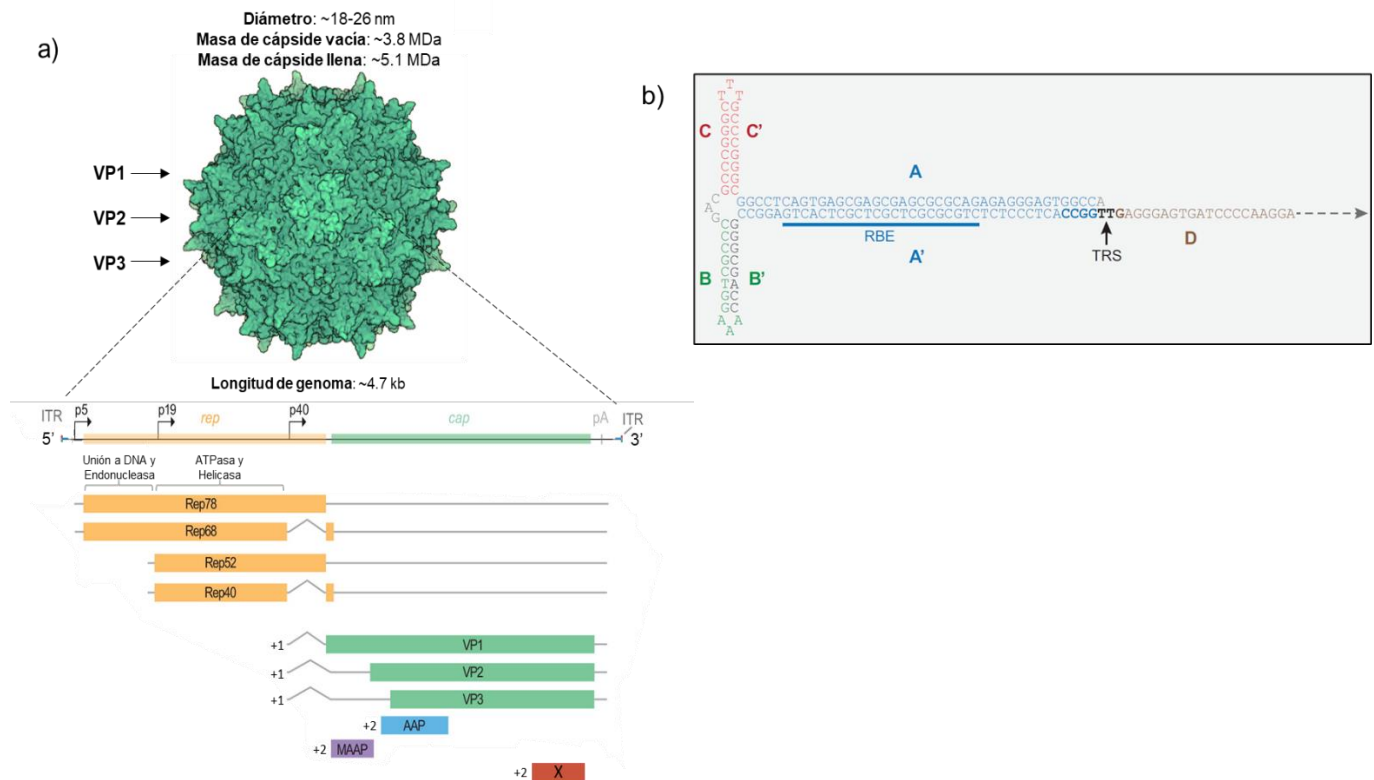


Figura 1. Virus adeno-asociado. a) Estructura, genoma y proteínas de Virus adeno-asociado. b) Estructura del ITR del extremo 5'. Los datos de la masa de la cápside corresponden al serotipo 8 de VAA (VAA-8) y fueron tomados de Pierson *et al.* (2016). RBE y TRS constituyen el origen de replicación de VAA. Abreviaturas: RBE, elemento de unión a Rep; TRS, sitio de resolución terminal (Modificado de Maurer & Weitzman, 2020).

El genoma de VAA consta de dos genes denominados *rep* y *cap*, y de los promotores p5, p19 y p40 que se encuentran en las posiciones 287, 872 y 1853 del genoma, respectivamente (Berns, 2007). Las proteínas Rep se encuentran bajo el mismo marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés), las VPs bajo otro ORF y las proteínas restantes bajo un tercer ORF (Elmore *et al.*, 2021).

Las proteínas Rep78 y Rep68 se expresan bajo el promotor p5, pero difieren entre sí en el extremo C-terminal. El transcrito que codifica para Rep68 pasa por un proceso de empalme. Como consecuencia, en la proteína Rep68 no están incluidos los 92 aminoácidos (aa) del extremo C-terminal de Rep78, pero sí, 7 aa que no están en Rep78. Las proteínas Rep52 y Rep40 se expresan bajo el promotor p19. Los procesos de transcripción y traducción correspondientes a estas Rep son como los descritos para las Rep de mayor peso molecular (Chiorini *et al.*, 1996; Berns, 2007).

La transcripción del gen *cap* es regulada por un solo promotor, p40. Mediante empalme alternativo se generan dos ARNm, a partir del ARNm más grande se produce VP1, y a partir del segundo ARNm se producen VP2 y VP3. Las VPs se encuentran codificadas bajo el mismo marco de lectura (+1). El gen *cap* también codifica para las proteínas MAAP, AAP y X, pero éstas están codificadas en el siguiente marco de lectura (+2) con respecto a las VPs (ORF anidado). A diferencia del codón de inicio estándar (AUG), VP2 inicia con el codón ACG, mientras que MAAP y AAP inician con CUG (Maurer & Weitzman, 2020; Asaad *et al.*, 2023).

Función de las proteínas

Rep52 y Rep40 poseen actividad helicasa y ATPasa, interactúan con el ADN de cadena sencilla y las cápsides preformadas para llevar a cabo el empaquetamiento mediante la introducción de ADN viral de cadena sencilla a través del poro formado por el eje de simetría de orden cinco. Rep78 y Rep68 promueven el rescate del genoma viral integrado en el genoma del huésped, son

indispensables para la replicación del ADN viral, poseen actividad endonucleasa, helicasa y ATPasa, presentan funciones de unión al ADN e integración sitio específico en el locus AAVS1 del cromosoma humano 19 (específicamente 19q13.4) (fase de latencia). Las VPs luego de ser sintetizadas en el citoplasma son transportadas al núcleo para su autoensamblaje apoyado por AAP, según se requiera (dependiente del serotipo de VAA). AAP previene la degradación de VPs al brindarles estabilidad (Aponte-Ubillus *et al.*, 2018; Maurer *et al.*, 2018; Maurer & Weitzman, 2020; Asaad *et al.*, 2023). Las tres VPs contribuyen a la estructura de la cápside y al tropismo viral. Luego de que el virión de VAA ingresa a una célula, este escapa del endosoma que lo contiene debido a que el pH disminuye dentro de la vesícula, lo que permite que el dominio oculto de fosfolipasa A2 (PLA2, por sus siglas en inglés) en el extremo N-terminal único de VP1 sea expuesto y degrade la membrana del endosoma. Por otra parte, VP3 es la proteína estructural más abundante en la cápside de VAA y se ha reportado que VP3 es suficiente para formar cápsides (Maurer *et al.*, 2018). Se ha reportado que MAAP afecta la estabilidad de las VPs y favorece la degradación de la cápside, su ausencia conduce al incremento de expresión de proteínas Rep y AAP; además, es un factor de salida del virus durante su ciclo de replicación, y participa en el empaquetamiento y producción de viriones. Se ha reportado que la proteína X participa en el ciclo de replicación en queratinocitos, las células blanco naturales del serotipo 2 de VAA (Asaad *et al.*, 2023).

Serotipos

Se han reportado más de 100 serotipos de VAA; de los cuales 12, han sido mejor caracterizados (VAA-1 a VAA-12) y se han descrito sus receptores, tropismos específicos por distintos tipos celulares o tejidos (tabla 2) (Daya & Berns, 2008). Las posiciones en el genoma, tamaños o longitudes en este artículo con respecto a VAA son referidas al serotipo 2, el más estudiado hasta ahora, a menos que se especifique lo contrario (NCBI Reference Sequence: NC_001401.2).

Artículos

Tabla 2. Receptores y tropismo tisular de los serotipos de virus adeno-asociado (Adaptado de Nonnenmacher & Weber, 2012; Pupo et al., 2022; Issa et al., 2023).

Serotipo	Receptor primario (glicano)	Receptor secundario (co-receptor)	Tropismo tisular
VAA-1	Ácido siálico ligado a N	AAVR, GPR108, TM9SF2	ME ^{m,c,pnh,h} , SNC ^{m,c,pnh} , pulmón ^{m,pnh,h} , retina ^{m,r} , páncreas ^m , corazón ^{m,p} , hígado ^{m,pnh} , MLEV ^{r,h}
VAA-2	HSPG	AAVR, GPR108, TM9SF2, LamR, integrina αVβ5, integrina α5β1, FGFR1, CD9, HGFR	ME ^{m,c,h} , SNC ^{m,c,pnh,h} , hígado ^{m,c,pnh,h} , riñón ^m , retina ^{m,c,pnh,h} , pulmón ^{pnh,h} , articulación ^h , cartilago en estado de artritis ^m , MLEV ^{co}
VAA-3	HSPG	AAVR, GPR108, LamR, FGFR1, HGFR	Hígado ^{pnh,h} , ME ^m , SNC ^{pnh} , CCIC ^m
VAA-4	Ácido siálico ligado a O	GPR108	SNC ^{m,c,pnh} , retina ^{m,c} , pulmón ^{m,pnh} , riñón ^m , corazón ^m
VAA-5	Ácido siálico ligado a N	AAVR, PDGFR, TM9SF2	ME ^m , SNC ^{m,c,pnh,r} , pulmón ^m , retina ^m , hígado ^{pnh,h,m} , MLEV ^m
VAA-6	Ácido siálico ligado a N, HSPG	AAVR, GPR108, TM9SF2, EGFR	ME ^{m,c} , corazón ^{m,o,p,c} , pulmón ^{c,m,pnh} , EVR ^{m,c,p} , hígado ^{c,m} , SNC ^{pnh} , retina ^r
VAA-7	Desconocido	GPR108, TM9SF2	ME ^m , retina ^m , SNC ^{m,pnh} , hígado ^{m,h} , corazón ^m , MLEV ^{m,h}
VAA-8	Desconocido	AAVR, GPR108, TM9SF2, LamR	Hígado ^{m,c,pnh,h} , ME ^{m,c} , SNC ^{m,c,pnh} , retina ^{m,c,p} , páncreas ^m , corazón ^{m,c,p} , riñón ^m , tejido adiposo ^m
VAA-9	Galactosa ligada a N	AAVR, GPR108, TM9SF2, LamR	Hígado ^m , corazón ^{m,p,c,pnh} , ME ^{m,c,pnh,h} , pulmón ^m , páncreas ^m , SNC ^{m,c,pnh,r} , retina ^{m,pnh} , testículos ^m , riñón ^m , EVR ^m
VAA-10	Desconocido	Desconocido	Corazón ^m , pulmón ^m , SNC ^m , páncreas ^m , hígado ^{m,pnh} , riñón ^{m,pnh} , útero ^m , intestino ^{pnh,m} , ganglio linfático ^{pnh} , glándulas suprarrenales ^{pnh} , retina ^m
VAA-11	Desconocido	Desconocido	ME ^m , riñón ^{m,pnh} , SNC ^{pnh,m} , hígado ^{pnh} , bazo ^m , pulmón ^m , corazón ^m , estómago ^m , intestino ^{pnh,m} , ganglio linfático ^{pnh} , glándulas suprarrenales ^{pnh}
VAA-12	Desconocido	Desconocido	ME ^m , glándulas salivales ^m , EVR ^m

Abreviaturas: N, nitrógeno; HSPG, proteoglicano de heparán sulfato; O, oxígeno; AAVR, receptor de VAA; GPR108, receptor 108 acoplado a proteína G; TM9SF2, Miembro 2 de la superfamilia transmembrana 9; LamR, receptor de laminina; FGFR1, receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos; HGFR (c-MET), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; PDGFR, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; ME, músculo esquelético; SNC, sistema nervioso central; CCIC, células ciliadas internas de la cóclea; MLEV, músculo liso y endotelio vasculares; EVR, epitelio de las vías respiratorias.

Abreviaturas de superíndices: h, humano; c, canino; p, porcino; m, murino; pnh, primate no humano; r, rata; o, oveja; co, conejo; f, felino.

Virus adeno-asociado en virotecnología

Como se mencionó antes, VAA es uno de los virus más empleados en virotecnología, esto es debido a sus características genómicas,

inmunológicas y estructurales (Travieso *et al.*, 2022). Podemos dividir a esta herramienta virotecnológica con base en su función de vector viral, andamio viral, y vector y andamio viral al mismo tiempo (Figura 2).

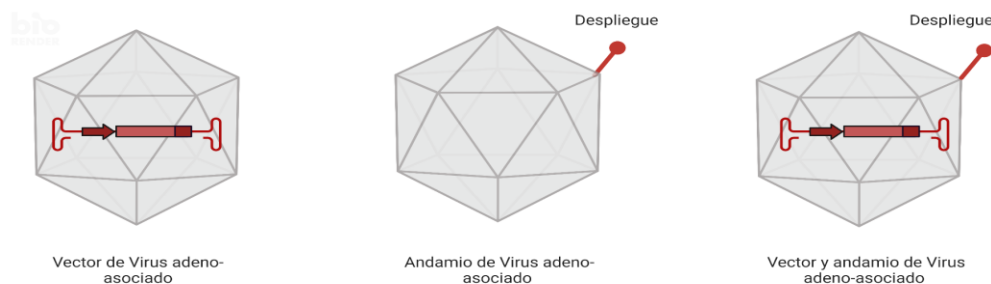


Figura 2. Vector, andamio, y vector y andamio de virus adeno-asociado. Con respecto al genoma, los extremos en forma de T representan los ITR. La flecha color vino indica un promotor seguido de un transgén de interés en color rojo, y luego, se muestra la cola poli A en color vino. Con respecto a la función de andamio viral, el apéndice en tono rojo indica el despliegue de uno de los 60 posibles despliegues si se considera un despliegue por cada monómero en la cápside de VAA (Generado por Biorender, <https://app.biorender.com/>).

Vector de virus adeno-asociado

A medida que avanza el campo de la terapia génica mediada por vectores de VAA (vVAA), se requiere una mayor caracterización sobre este tipo de vectores, incluyendo mejores procesos de producción, conocer la inmunogenicidad intrínseca, entre otros.

Producción

Para la replicación y producción natural de VAA, se requiere de la co-infección celular con adenovirus o virus de herpes simple (Sierra-Delgado *et al.*, 2019). Para la producción de un vVAA, es decir un virus recombinante, se requieren tres componentes principales (Mena-Enriquez *et al.*, 2012; Aponte-Ubillus *et al.*, 2018):

1. El genoma del vVAA que contiene el transgén de interés, elementos reguladores (promotor y cola poli A) y los ITR.
2. Los genes *rep* y *cap* de VAA silvestre.
3. Un plásmido auxiliar que contenga genes E2A, E4, y ARN VA de adenovirus si es que la producción se realiza mediante transfección en células de mamífero como HeLa y HEK-293 o del uso de baculovirus para la entrega del genoma del vVAA, y de los genes *rep* y *cap* si se usa el sistema de producción en células de insecto.

Existen variantes en el sistema de producción en células de mamífero y de insecto, y otros sistemas propuestos en levaduras y otros tipos de células (Aponte-Ubillus *et al.*, 2018).

Regularmente, un vVAA se define por tres componentes:

1. La cápside o envoltura proteica que encapsida la carga genética, define el tropismo tisular o celular y la inmunogenicidad hacia el vector.
2. El transgén de interés, que cuando se expresa en células, sirve para conferir un efecto deseado.
3. El "casete regulador", los elementos potenciadores/promotores/auxiliares combinados que controlan la expresión somática estable o transitoria del transgén como un episoma o como un integrante cromosómico.

Inmunogenicidad contra vectores de VAA

Los diferentes serotipos de VAA están presentes en nuestro ambiente, lo que significa que tanto los seres humanos como los animales podrían haber estado expuestos previamente a algunos serotipos de estos virus y esto puede haber inducido una respuesta inmune tanto a nivel celular como humoral (Jungmann *et al.*, 2017; Mingozi & Buning, 2015). Desde una perspectiva inmunológica, la estructura de la cápside del vVAA es muy similar a la del virión que se encuentra en la naturaleza. Cuando se administra este vector, se activa la respuesta inmune contra las proteínas de la cápside del virus, ya sea en pacientes que han estado expuestos previamente (memoria inmunológica) a VAA o en aquellos que no han tenido esa exposición (Daya & Berns, 2008; Mingozi & Buning, 2015). Esta respuesta inmune contra la cápside puede impedir que el vVAA entregue el material genético a las células dadas, lo que representa una de las principales barreras tanto para el tratamiento inicial como para la re-administración del vector (Mingozi & High, 2011). A pesar de la similitud entre la cápside de los vVAA y los VAA presentes en la naturaleza, la administración del vector difiere de la infección natural en tres aspectos: se introduce un mayor número de partículas virales en el cuerpo, la ruta de administración es diferente (la exposición natural a VAA generalmente ocurre por inhalación) y, por último, el vVAA no se replica activamente debido a la falta de elementos auxiliares, lo que disminuye la respuesta inmune que se genera (Calcedo & Wilson, 2013). El efecto de la inmunogenicidad preexistente se puede superar al usar serotipos con menos prevalencia de inmunogenicidad en humanos, la búsqueda de nuevos serotipos o la generación de vVAA con cápsides mutantes que eviten esa respuesta inmune preexistente (Issa *et al.*, 2023).

Comparación y ventajas de usar VAA con respecto a otros sistemas de vectores

A lo largo de los años se han utilizado diferentes tipos de vectores en biotecnología en salud. Estos se pueden clasificar en: vectores no virales y vectores virales (tabla 3).

Artículos

Tabla 3. Vectores no virales y virales (adaptado de Flores et al., 2006).

Vector no viral		Vector viral
Físicos	Químicos	
Biobalística	Fosfato cálcico	Retrovirus
Electroporación	Liposomas	Adenovirus
Microinyección	Receptores	Virus adeno-asociado
		Virus de herpes simple

En general, los vectores virales presentan mayor eficacia de transferencia en comparación a los vectores no virales, y la posibilidad, en algunos casos, de integrar el transgén de interés en el genoma de la célula huésped (Fominaya et al., 2007).

Con respecto a los vectores virales más usados, en la tabla 4 se muestran sus ventajas y desventajas.

Tabla 4. Principales vectores virales (adaptado de Rozalén et al., 2003).

Vector	Ventajas	Desventajas
Virus adeno-asociado	<ul style="list-style-type: none"> • Transducen células en reposo o replicación • Posible integración específica (mayor duración de la expresión génica) • La expresión del gen (episoma) puede persistir varios años • Baja inmunogenicidad hacia la cápside • Títulos altos • No son patógenos en humanos 	<ul style="list-style-type: none"> • Poca longitud del transgen • Dificiles de producir en gran cantidad • No parecen transducir a todo tipo de células <i>in vivo</i> • Posible mutación insercional
Adenovirus	<ul style="list-style-type: none"> • Transducen células en reposo o replicación • Episomales • Estables <i>in vivo</i> • Títulos altos 	<ul style="list-style-type: none"> • Induce potente respuesta inmune e inflamatoria • Direccionalidad difícil • Difícil manejo
Retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> • Integración estable (mayor duración de la expresión génica) • Fácil manejo • No provocan respuesta inmune • Transducción eficiente 	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo título • Posible mutación insercional • Extinción del transgen <i>in vivo</i> • Requieren proliferación celular
Virus de herpes simple	<ul style="list-style-type: none"> • Transducen células en reposo • Episomales • Adecuados para el sistema nervioso 	<ul style="list-style-type: none"> • Patogenicidad • Difícil manejo

La elección del vector viral depende del uso y la eficiencia de la expresión del transgén, también se considera que su producción sea fácil, segura y estable.

Aplicaciones de vectores de VAA en terapia génica

En la actualidad, se cuenta con la aprobación de terapias génica para humanos basadas en vVAA. A la fecha, hay siete productos basados vVAA (tabla 5).

Artículos

Tabla 5. Terapias génicas aprobadas que emplean vectores de virus adeno-asociado (modificado de Mitra et al., 2023).

Vector	Producto (nombre comercial)	Desarrollado por	Fecha de aprobación	Indicación
VAA-1	Glybera [§]	UniQure Biopharma	2012	Deficiencia de lipoproteína lipasa (LPLD)
VAA-2	Luxturna	Spark Therapeutics	2017	Distrofia de retina
VAA-9	Zolgensma	Novartis	2019	Atrofia muscular en la columna
VAA-5	Hemgenix	CSL Behring	2022	Hemofilia B
VAA-5	Roctavian	Biomarin	2022	Hemofilia A
VAA-2	Upstaza	PTC Therapeutics	2022	Deficiencia de L-Aminoácido aromático descarboxilasa (AADC)
VAA-rh74*	Elevidys	Sarepta Therapeutics	2023	Distrofia muscular de Duchenne

*Serotipo aislado de mono Rhesus, [§]Retirado del mercado

Aplicaciones de vectores de VAA en vacunología

Actualmente, no hay vacunas aprobadas para su uso en humanos que se basen en un vVAA, sin embargo, hay desarrollos propuestos contra enfermedades infecciosas como las inducidas por virus del herpes simple, coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV), virus dengue, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus del papiloma humano (VPH) (Liñan-Torres, 2021).

Andamio de virus adeno-asociado

La cápside de VAA ha sido empleada para el despliegue de péptidos y proteínas con la finalidad de estudiar la biología de VAA, modificación del tropismo de vectores virales y el desarrollo de candidatos vacunales (Rojas-Gómez, 2009; Büning & Srivastava, 2019).

Producción

La producción de un andamio de VAA (aVAA) depende de lo que se requiere desplegar. Para el despliegue de un péptido o proteína se puede emplear ingeniería genética o bioconjugación (Becker et al., 2022). La

generación de un aVAA requiere solo del gen *cap* de VAA, el cual al expresarse en un sistema recombinante (células de insecto, células de mamífero, entre otros) puede formar una partícula pseudoviral (VLP, por sus siglas en inglés). Una VLP es un complejo autoensamblado de proteínas estructurales virales sin contener un material genético (Charlton et al., 2019).

La producción de un aVAA mediante ingeniería genética puede realizarse mediante la fusión de la secuencia correspondiente a un péptido o a una proteína al N-terminal de VP2, o mediante la inserción de la secuencia de un péptido pequeño en sitios específicos en la región común entre las tres VPs (tabla 6) (Büning & Srivastava, 2019). Para la producción de un aVAA mediante bioconjugación se suele obtener la VLP de VAA sin modificaciones genéticas y posteriormente mediante un *linker* se une un péptido o una proteína a la superficie de la VLP a través de las cadenas laterales de sus aa expuestos (Zhang et al., 2016; Muik et al., 2017; Lam et al., 2021). Al igual que para los vVAA, pueden existir otros sistemas de producción para los aVAA.

Artículos

Tabla 6. Sitios específicos de inserción genética en las VPs de los serotipos mejor caracterizados de virus adeno-asociado (tomado de Büning & Srivastava, 2019; Börner et al., 2020).

Serotipo	Sitios de inserción (Referentes a VP1)
VAA-1	588, 590
VAA-2	453, 520, 584, 585, 587, 588
VAA-3	586, 588
VAA-4	584, 586
VAA-5	575, 577
VAA-6	585, 588, 590
VAA-7	589
VAA-8	585, 590
VAA-9	588, 589
VAA-12	592, 594

Comparación y ventajas de usar VAA con respecto a otros sistemas de andamios

En general, los andamios basados en proteínas como los aVAA se degradan rápido, sus productos de degradación no suelen ser tóxicos y su producción suele ser rentable. En contraste, por lo general, los andamios basados en polímeros sintéticos o basados en metales poseen una tasa de degradación baja, sus productos de degradación pueden inducir inflamación o necrosis y pueden resultar costosos para su ingreso en la industria farmacéutica. El andamio viral al ser producto del autoensamblaje (VLP) resulta en una estructura perfectamente definida, estable y homogénea (Martínez-Flores, 2020; Klimek & Ginalska, 2020). Los andamios sintéticos se diseñan imitando la distribución homogénea de despliegues en las partículas virales (Villanueva-Flores et al., 2020).

En comparación a otros andamios virales, los aVAA se destacan por ser de construcción simple, y ser estables en un intervalo amplio de pH y de temperatura. Además, se debe destacar la posibilidad de despliegue en cada monómero de la cápside (polivalencia) y la

confirmación de brindar estabilidad estructural de péptidos pequeños, así como también, incrementar la inmunogenicidad de péptidos vacunales (Liñan-Torres, 2021; Cuevas-Juárez et al., 2023).

Aplicaciones de andamios de VAA

Actualmente, algunos productos que usan andamios virales cuentan con aprobación para su administración en humanos. Un ejemplo de estos productos son las vacunas RTS,S (Mosquirix) y R21 contra la malaria, las cuales emplean andamios de virus de la hepatitis B (Dattoo et al., 2021; Naddaf, 2023). También existen vacunas aprobadas para su uso en humanos contra la hepatitis A que emplean andamios virales, también llamados virosomas basados en virus de la influenza (Bovier, 2008). Hasta ahora no existen desarrollos aprobados para su administración en humanos que se basen en aVAA; sin embargo, en la literatura se describen algunas propuestas con referencia a candidatos vacunales (tabla 7).

Tabla 7. Candidatos vacunales basados en el uso de virus adeno-asociado como andamio (adaptado de Liñan-Torres, 2021; Cuevas-Juárez et al., 2023).

Serotipo	Péptido desplegado correspondiente a	Enfermedad
VAA-2	Proteína L2	Papiloma humano
VAA-2	Ovoalbúmina	Alergia
VAA-2	Proteína L2	Papiloma humano
VAA-2	HER-2	Cáncer de mama
VAA-2	Proteína E	Dengue y Zika
VAA-8	Proteína E	Dengue y Zika

Abreviatura: HER-2, receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. Todos los candidatos mostrados se construyeron mediante la inserción de péptidos entre las VPs.

Función dual: vector y andamio de virus adeno-asociado

La función dual de vector y andamio viral se puede considerar en vacunas aprobadas para administración en humanos contra los virus dengue y del Ébola. Por ejemplo, el diseño de una de las vacunas contra dengue, Dengvaxia, está basado en virus de la fiebre amarilla, pero con el reemplazo, a nivel estructural (cápside) y genómico, de sus proteínas prM y E por las correspondientes de virus dengue. El diseño de la segunda vacuna aprobada contra dengue, Qdenga, es similar al descrito para Dengvaxia (Thomas, 2023). Por otro lado, la vacuna contra virus del Ébola, ERVEBO, se basa en virus de la estomatitis vesicular, pero con el reemplazo, a nivel estructural y genómico, de su glicoproteína de superficie (Malik *et al.*, 2023). Estas vacunas contra dengue y Ébola también se pueden denominar de tipo virus vivo atenuado, vector viral o pseudotipado (Emanuel *et al.*, 2018).

En el caso de VAA, no existe ningún producto aprobado para su aplicación en humanos que presente esta función dual. Por otra parte, se puede considerar esta función dual en muchas de las propuestas de vVAA que se les inserta o acopla algún péptido o proteína en la superficie para modificar su tropismo (Büning & Srivastava, 2019). Una propuesta que no se enfoca en la modificación del tropismo de VAA es la desarrollada por Rybniker *et al.* (2012),

ellos proponen un candidato a vacuna contra *Mycobacterium tuberculosis* basado en el despliegue del antígeno Ag85A en la superficie de la cápside de VAA-2 mediante fusión genética al N-terminal de VP2 y la encapsidación de un genoma que codifica para el mismo antígeno Ag85A. Otra propuesta es la que se desarrolla en el protocolo de tesis de licenciatura de Roberto C. García reconocido con el “Premio Sergio Sánchez Esquivel 2023” por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB, 2023). Roberto está evaluando la función de vector viral de andamios de VAA-2 y VAA-8 que despliegan un péptido inmunogénico correspondiente a los virus dengue y Zika en la superficie; a diferencia de Rybniker *et al.* (2012), este péptido está insertado en la tres VPs. En la figura 3, se muestran estructuras de VAA-8 que poseen un genoma que codifica para la proteína fluorescente verde mejorada (eGFP, por sus siglas en inglés) y despliegan el péptido inmunogénico. Algo para tener en cuenta es caracterizar si la función de andamio (fusión genética o conjugación) afecta la función de vector viral.

El proceso producción y las ventajas de la función dual de vector y andamio viral de VAA son los mismos que se describen en las secciones de vVAA y aVAA.

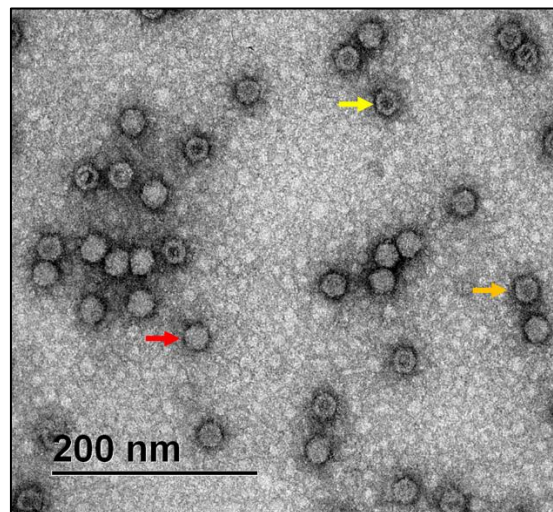


Figura 3. Virus adeno-asociado del serotipo 8 que despliega un péptido de 24 aa y contiene un genoma que codifica para eGFP. Se muestra una micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa y a un aumento de 31500X. El péptido corresponde a un inmunógeno de los virus dengue y Zika, y secuencias linker. La flecha roja señala un andamio viral con genoma encapsidado, la flecha naranja señala un andamio viral parcialmente lleno (encapsida un genoma parcial) y la flecha amarilla señala un andamio viral vacío (no hay genoma encapsidado) (Imagen propia).

Conclusión

VAA es una de las herramientas virotecnológicas más importantes que se emplean actualmente en el área de salud. En el mercado, ya existen terapias génicas aprobadas para su uso en humanos que se basan en VAA. Las características intrínsecas, el descubrimiento de nuevos serotipos y la posibilidad de alterar su tropismo brindan un sinfín de alternativas para la aplicación de este virus como vector y/o como andamio principalmente en las áreas de terapia génica y vacunología. En el futuro es probable que VAA también se aplique a otras áreas de investigación y desarrollo como nanobiorreactores, nanomotores, nanocatalizadores, uso en imagenología en salud, nanoconductores, entre otros.

Agradecimientos

ALT es alumno del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y recibe beca del CONAHCYT. RCGT desarrolla su tesis de licenciatura en el IBT-UNAM y recibe beca por parte del proyecto PAPIIT UNAM IV200420. Se agradece la asistencia técnica de la M. C. Ana Ruth Pastor, del L. I. Jesús Omar Arriaga y de la B.A. Dip.Lib. A. L. A. Shirley Elizabeth Ainsworth del IBT-UNAM.

Referencias

Aponte-Ubillus, J. J., Barajas, D., Peltier, J., Bardliving, C., Shamlou, P., & Gold, D. (2018). Molecular design for recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector production. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 1045-1054.

Asaad, W., Volos, P., Maksimov, D., Khavina, E., Deviatkin, A., Mityaeva, O., & Volchkov, P. (2023). AAV genome modification for efficient AAV production. *Heliyon*.

Becker, J., Fakhiri, J., & Grimm, D. (2022). Fantastic AAV gene therapy vectors and how to find them—random diversification, rational design and machine learning. *Pathogens*, 11(7), 756.

Berns, K. I. (2020). The unusual properties of the AAV inverted terminal repeat. *Human gene therapy*, 31(9-10), 518-523.

Berns, K.I. (2007). *Parvoviridae*. En Knipe, D.

M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., & Straus, S. E. (Eds.), *Fields Virology* (pp. 2437-2477). Lippincott Williams & Wilkins.

Börner, K., Kienle, E., Huang, L.-Y., Weinmann, J., Sacher, A., Bayer, P., Stüllein, C., Fakhiri, J., Zimmermann, L., Westhaus, A., Beneke, J., Beil, N., Wiedtke, E., Schmelas, C., Miltner, D., Rau, A., Erfle, H., Kräusslich, H.-G., Müller, M., Agbandje-McKenna, M., & Grimm, D. (2020). Pre-arrayed pan-AAV peptide display libraries for rapid single-round screening. *Molecular therapy*, 28(4), 1016-1032.

Bovier, P. A. (2008). Epaxal®: A virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection. *Expert review of vaccines*, 7(8), 1141-1150.

Büning, H., & Srivastava, A. (2019). Capsid modifications for targeting and improving the efficacy of AAV vectors. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 12, 248-265.

Calcedo, R., & Wilson, J. M. (2013). Humoral immune response to AAV. *Frontiers in immunology*, 4, 341.

Charlton Hume, H. K., Vidigal, J., Carrondo, M. J., Middelberg, A. P., Roldão, A., & Lua, L. H. (2019). Synthetic biology for bioengineering virus-like particle vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(4), 919-935.

Chiorini, J. A., Wiener, S. M., Yang, L., Smith, R. H., Safer, B., Kilcoin, N. P., Liu, Y., Urcelay, E., & Kotin, R. M. (1996). The roles of AAV Rep proteins in gene expression and targeted integration. *Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in Gene Therapy*, 25-33.

Cuevas-Juárez, E., Liñan-Torres, A., Hernández, C., Kopylov, M., Potter, C. S., Carragher, B., Ramírez, O. T. & Palomares, L. A. (2023). Mimotope discovery as a tool to design a vaccine against Zika and dengue viruses. *Biotechnology and Bioengineering*.

Datoo, M. S., Natama, M. H., Somé, A., Traoré, O., Rouamba, T., Bellamy, D., Yameogo, P., Valia, D., Tegneri, M., Ouedraogo, F., Soma, R., Sawadogo, S., Sorgho, F., Derra, K., Rouamba, E., Orindi, B., Ramos Lopez, F., Flaxman, A., Cappuccini, F., Kailath, R., Elias, S.,

- Mukhopadhyay, E., Noe, A., Cairns, M., Lawrie, A., Roberts, R., Valéa, I., Sorgho, H., Williams, N., Glenn, G., Fries, L., Reimer, J., Ewer, K., J., Shaligram, U., Hill, A. V. S., & Tinto, H. (2021). Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 397(10287), 1809-1818.
- Daya, S., & Berns, K. I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical microbiology reviews*, 21(4), 583-593.
- Dubielzig, R., King, J. A., Weger, S., Kern, A., & Kleinschmidt, J. A. (1999). Adeno-associated virus type 2 protein interactions: formation of pre-encapsulation complexes. *Journal of virology*, 73(11), 8989-8998.
- Elmore, Z. C., Patrick Havlik, L., Oh, D. K., Anderson, L., Daaboul, G., Devlin, G. W., Vincent, H. A., & Asokan, A. (2021). The membrane associated accessory protein is an adeno-associated viral egress factor. *Nature communications*, 12(1), 6239.
- Emanuel, J., Callison, J., Dowd, K. A., Pierson, T. C., Feldmann, H., & Marzi, A. (2018). A VSV-based Zika virus vaccine protects mice from lethal challenge. *Scientific reports*, 8(1), 11043.
- Flores, F. M., Orozco, F. A. J., & Castrejón, H. V. (2006). Biología molecular de los vectores adenovirales. *Cirugía y Cirujanos*, 74(6), 483-493.
- Fominaya, J. M. (2007). Vectores de transferencia en terapia génica. Curso de Biotecnología Aplicada. Ed. Grupo SANED.
- Issa, S. S., Shaimardanova, A. A., Solovyeva, V. V., & Rizvanov, A. A. (2023). Various AAV Serotypes and Their Applications in Gene Therapy: An Overview. *Cells*, 12(5), 785.
- Jungmann, A., Müller, O., & Rapti, K. (2017). Cell-based measurement of neutralizing Antibodies against adeno-associated virus (AAV). *Cardiac Gene Therapy: Methods and Protocols*, 109-126.
- Klimek, K., & Ginalska, G. (2020). Proteins and peptides as important modifiers of the polymer scaffolds for tissue engineering applications—a review. *Polymers*, 12(4), 844.
- Lam, A. K., Frabutt, D., Li, L., & Xiao, W. (2021). Chemical modifications of the capsid or redirecting and improving the efficacy of adeno-associated virus vectors. *Human Gene Therapy*, 32(23-24), 1433-1438.
- Liñan-Torres, A. (2021). Desarrollo de un candidato a vacuna dual contra los virus dengue y Zika mediante la presentación de un mimótopo en la cápside de virus adeno-asociado del serotipo 8. Instituto de Biotecnología, Maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Lizarazo-Salcedo, C. G., González-Jiménez, E. E., Arias-Portela, C. Y., & Guarguati-Ariza, J. (2018). Nanomateriales: un acercamiento a lo básico. *Medicina y Seguridad del Trabajo*, 64(251), 109-118.
- Malik, S., Kishore, S., Nag, S., Dhasmana, A., Preetam, S., Mitra, O., León-Figueroa, D. A., Mohanty, A., Chattu, V. K., Assefi, M., Padhi, B. K., & Sah, R. (2023). Ebola Virus Disease Vaccines: Development, Current Perspectives & Challenges. *Vaccines*, 11(2), 268.
- Martínez-Flores, D. (2020). Desarrollo de nanopartículas genéticamente codificadas con actividad biológica selectiva. Instituto de Fisiología Celular, Maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Maurer, A. C., & Weitzman, M. D. (2020). Adeno-associated virus genome interactions important for vector production and transduction. *Human Gene Therapy*, 31(9-10), 499-511.
- Maurer, A. C., Pacouret, S., Diaz, A. K. C., Blake, J., Andres-Mateos, E., & Vandenberghe, L. H. (2018). The assembly-activating protein promotes stability and interactions between AAV's viral proteins to nucleate capsid assembly. *Cell reports*, 23(6), 1817-1830.
- McNeale, D., Esquirol, L., Okada, S., Strampel, S., Dashti, N., Rehm, B., Douglas, T., Vickers, C., & Sainsbury, F. (2023). Tunable In Vivo Colocalization of Enzymes within P22 Capsid-Based Nanoreactors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(14), 17705-

17715.

Meier, A. F., Fraefel, C., & Seyffert, M. (2020). The interplay between adeno-associated virus and its helper viruses. *Viruses*, 12(6), 662.

Mena-Enriquez, M., Flores-Contreras, L., & Armendáriz-Borunda, J. (2012). Vectores virales adeno-asociados: métodos de producción, purificación y aplicaciones en terapia génica. *Revista de investigación clínica*, 64(5), 487-94.

Mingozzi, F., & Büning, H. (2015). Adeno-associated viral vectors at the frontier between tolerance and immunity. *Frontiers in immunology*, 6, 120.

Mingozzi, F., & High, K. A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature reviews genetics*, 12(5), 341-355.

Mitra, A., Ahmed, M. A., Krishna, R., Sun, K., Gibbons, F. D., Campagne, O., Rayad, N., Roman, Y. M., Albusaysi, S., Burian, M., & Younis, I. R. (2023). Model-Informed Approaches and Innovative Clinical Trial Design for Adeno-Associated Viral Vector-Based Gene Therapy Product Development: A White Paper. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 114(3), 515-529.

Muik, A., Reul, J., Friedel, T., Muth, A., Hartmann, K. P., Schneider, I. C., Münch, R. C., & Buchholz, C. J. (2017). Covalent coupling of high-affinity ligands to the surface of viral vector particles by protein trans-splicing mediates cell type-specific gene transfer. *Biomaterials*, 144, 84-94.

Naddaf, M. (2023). Second malaria vaccine to win global approval is cheaper and easier to make. *Nature*.

Nonnenmacher, M., & Weber, T. (2012). Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene therapy*, 19(6), 649-658.

Plascencia-Villa, G., Saniger, J. M., Ascencio, J. A., Palomares, L. A., & Ramírez, O. T. (2009). Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals. *Biotechnology and }*

bioengineering, 104(5), 871-881.

Pupo, A., Fernández, A., Low, S. H., François, A., Suárez-Amarán, L., & Samulski, R. J. (2022). AAV vectors: The Rubik's cube of human gene therapy. *Molecular Therapy*.

Reguera, D., de Pablo, P. J., Abrescia, N. G., Mateu, M. G., Hernández-Rojas, J., Castón, J. R., & San Martín, C. (2023). Physical Virology in Spain. *Biophysica*, 3(4), 598-619.

Rojas-Gómez, R. (2009). Estudio de la capacidad de unión y transporte de cápsides de virus adenoasociado tipo 2 en células de mamífero. Instituto de Biotecnología, Maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

Rozalén, J., Callejo, V. C., & Jordán, J. (2003). Terapia génica. Vectores de expresión. *Offarm: farmacia y sociedad*, 22(8), 102-108.

Rybniker, J., Nowag, A., Janicki, H., Demant, K., Hartmann, P., & Büning, H. (2012). Incorporation of antigens into viral capsids augments immunogenicity of adeno-associated virus vector-based vaccines. *Journal of virology*, 86(24), 13800-13804.

Sierra-Delgado, J. A., Bautista-Nino, P. K., Vargas-Castellanos, C. I., Serrano Diaz, N. C., & Rincon, M. Y. (2019). Respuesta inmune y terapia génica con vectores virales adenoasociados. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 79(6), 493-501.

Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB), 2023. (<https://smbb.mx/premios/premio-sergio-sanchez-esquivel/>)

Tejeda-Rodríguez, J. A., Nunez, A., Soto, F., García-Gradilla, V., Cadena-Nava, R., Wang, J., & Vazquez-Duhalt, R. (2019). Virus-Based Nanomotors for Cargo Delivery. *ChemNanoMat*, 5(2), 194-200.

Thomas, S. J. (2023). Is new dengue vaccine efficacy data a relief or cause for concern?. *npj Vaccines*, 8(1), 55.

Travieso, T., Li, J., Mahesh, S., Mello, J. D. F. R. E., & Blasi, M. (2022). The use of viral vectors in vaccine development. *npj Vaccines*, 7(1), 75.

Artículos

Villanueva-Flores, F., Castro-Lugo, A., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2020). Understanding cellular interactions with nanomaterials: Towards a rational design of medical nanodevices. *Nanotechnology*, 31(13), 132002.

Wen, A. M., & Steinmetz, N. F. (2016). Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy. *Chemical Society Reviews*, 45(15), 4074-4126.

Xiao, X., Li, J., & Samulski, R. J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *Journal of virology*, 72(3), 2224-2232.

Zhang, C., Yao, T., Zheng, Y., Li, Z., Zhang, Q., Zhang, L., & Zhou, D. (2016). Development of next generation adeno-associated viral vectors capable of selective tropism and efficient gene delivery. *Biomaterials*, 80, 134-145.

Zhao, Z., Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2022). Viral vector-based gene therapies in the clinic. *Bioengineering & translational medicine*, 7(1), e10258.

Desarrollo de vacunas nasales como estrategia para disminuir la infección de SARS-CoV-2

Mónica Márquez, Daniel Guillén, Romina Rodríguez-Sanoja*.

Instituto de *Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México.*

**romina@iibiomedicas.unam.mx*

Resumen

Las vacunas actuales aprobadas y administradas contra SARS-CoV-2 son efectivas en términos de reducción en la mortalidad y en enfermedad severa, sin embargo, el reto de conseguir inmunidad protectora aún sigue pendiente de cumplir. La inmunización vía mucosa es una alternativa para lograr la inmunidad deseada, previniendo la infección y por tanto la transmisión viral y la aparición de variantes, debido a esto, es necesario seguir innovando en el desarrollo de nuevos candidatos vacunales vía nasal, enfocándose en cumplir los objetivos de inmunidad neutralizante. En esta revisión se incluyen algunos avances en el desarrollo de prototipos de vacunas intranasales, que abarca una gran variedad de plataformas a utilizar como adenovirus, nanopartículas híbridas de polímeros y materiales inorgánicos, así como subunidades proteicas administradas en conjunto con adyuvantes. A pesar de que los candidatos presentados a continuación tienen resultados prometedores, aún es necesario continuar evaluando la inmunidad generada a largo plazo.

Palabras Claves: SARS-CoV-2, inmunidad en mucosas, vacunas intranasales, COVID-19

Abstract

The current vaccines approved and applied against SARS-CoV-2 are effective in terms of reducing mortality and severe disease, however, the challenge of achieving protective immunity remains to be reached. Mucosal immunization is an alternative to produce the desired immunity, preventing viral infection and therefore transmission and the variants appearance; consequently, it is necessary to continue innovating in the development of new nasal vaccine candidates, focusing on meeting the objectives of neutralizing immunity. This review includes some advances in the development of intranasal vaccine prototypes, where a wide variety of platforms were found to be used such as adenovirus, hybrid nanoparticles of polymers and inorganic materials, as well as protein subunits administered together with adjuvants. Although the candidates presented below have promising results, it is still necessary to continue evaluating the long-term immunity generated.

Key Words: SARS-CoV-2, mucosal immunity, nasal vaccines, COVID-19

Introducción

El SARS-CoV-2, causante de la enfermedad COVID-19, es un betacoronavirus de cadena sencilla de ARN de sentido positivo (+ssRNA) que se compone principalmente de cuatro proteínas estructurales: membrana (M), envoltura (E), nucleocápside (N) y espícula (S); esta última se encuentra localizada en la superficie viral y es la encargada del acoplamiento y entrada a la célula huésped por medio de la interacción del dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés) con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2) (Ludwig et al., 2020). La mayoría de las vacunas actuales aprobadas para uso humano se basan en diferentes tecnologías como mRNA liberado por nanopartículas lipídicas, virus inactivo y vectores adenovirales, entre otros; y todas tienen como blanco la proteína S en su totalidad o una región de ella, como el RBD.

A pesar de que las estrategias de vacunación han provocado un descenso en los índices de mortalidad y de casos de enfermedad severa, aún siguen apareciendo casos de COVID-19 alrededor del mundo; esto se debe posiblemente a que las vacunas actuales se evalúan principalmente en términos de eficacia en reducir la carga viral y no se evalúa la prevención de la infección, es por eso que se buscan estrategias en donde se logre inmunidad protectora, en donde se prevenga la infección, evitando que el virus pueda transmitirse.

La aparición de las diferentes variantes del SARS-CoV-2 aumenta las consideraciones para el diseño de una vacuna efectiva ya que se ha demostrado (Carabelli et al., 2023) que las alteraciones en las propiedades funcionales y cambios en la antigenicidad del virus confieren la capacidad de evadir una respuesta inmune generada por las vacunas o infecciones previas.

Un aspecto importante para lograr inmunidad protectora es la vía de administración, debido a que se contempla que la inmunoprotección debe ser en los tejidos que actúan como vía de entrada para el patógeno, es decir, inducir respuesta inmune robusta de IgA secretora, permitiendo neutralizar al virus en el inicio del ciclo de infección, disminuyendo la carga viral

en los individuos infectados (Butler et al., 2021)

Alternativas para vacunación contra SARS-CoV-2

Las vacunas actuales aprobadas y administradas contra SARS-CoV-2 son efectivas para la prevención de la enfermedad grave y la hospitalización, sin embargo, la aparición de nuevas variantes del virus sigue siendo una gran preocupación a nivel mundial, es por eso que se siguen desarrollando nuevos candidatos que al aplicarse como refuerzo de las vacunas actuales, tengan como meta principal reducir la infección y transmisión del SARS-CoV-2 en las vías respiratorias mientras se mantiene o aumenta la protección contra la enfermedad sintomática y severa. El uso de vacunación vía nasal es un acercamiento para lograr estas metas por medio de la inducción de respuesta inmune duradera localizada en vías respiratorias que tengan el potencial de prevenir la infección viral, replicación y transmisión, siendo una posibilidad de que estas vacunas vías mucosa sean aplicables para cualquier tipo de infección viral que se transmita y replique por vías respiratorias.

Uno de los más grandes retos en la vacunación vía mucosa es la selección correcta de plataformas y adyuvantes, la vía de administración y marcadores de respuesta inmune que puedan ser cuantificados en los estudios correspondientes. Lo ideal en la búsqueda de protección vía nasal, es lograr una producción alta de anticuerpos neutralizantes presentes en las vías respiratorias superiores. Además, la búsqueda de células B y T de memoria en fluidos de lavados broncoalveolares (BAL) que reflejen inmunidad en las vías respiratorias inferiores (Knisely et al., 2023). En cuanto a la producción de anticuerpos, una característica importante de la respuesta inmune en mucosas es la producción local y secreción de inmunoglobulina A dimérica o multimérica ya que promueve el atrapamiento de los antígenos en la mucosa, además puede bloquear o intervenir estéricamente las moléculas superficiales del patógeno que tengan la capacidad de unirse a receptores en el epitelio. La producción de IgG local también se ve enriquecida después de la inmunización al administrar antígenos vía mucosa y de igual manera que los anticuerpos IgA pueden tener

un rol importante en el bloqueo de la entrada de patógenos (Figura 1) (Neutra & Kozlowski., 2006).

Dentro de los retos a considerar en el desarrollo de una vacuna vía mucosa es que los antígenos pueden ser diluidos en secreciones mucosales, capturados por moco, atacados por proteasas y nucleasas y ser excluidos por las barreras epiteliales; para eliminar estos problemas, las estrategias en la formulación de vacunas pueden ser más efectivas cuando mimetizan al patógeno en cuestión, es decir, que sean multiméricas o particuladas, que puedan adherirse a las superficies de la mucosa y estimular respuesta inmune que tenga como blanco al patógeno (Neutra & Kozlowski., 2006).

Vacunas vía nasal contra SARS-CoV-2 en fase preclínica

Como se ha mencionado anteriormente, el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación contra SARS-CoV-2 que tengan como objetivo generar una protección neutralizante y evitar el esparcimiento del virus, es de gran importancia. Debido a que el SARS-CoV-2 es un virus respiratorio y la infección se lleva en el tracto respiratorio inferior, gran parte de las alternativas se han centrado en vacunas nasales que confieran la producción de anticuerpos neutralizantes en vías respiratorias superiores e inferiores, además, la importancia de generar la protección adecuada podrá evitar el esparcimiento del virus y, por lo tanto, la generación de nuevas variantes del virus se verá reducida.

Se han reportado (King et al., 2021) resultados preclínicos de inmunogenicidad estudiando AdCOVID, un candidato vacunal intranasal contra COVID-19 utilizando como vector un adenovirus serotipo 5 (Ad5) deficiente en replicación que codifica el RBD de la proteína Spike del SARS-CoV-2. Se demostró la inmunogenicidad del AdCOVID siguiendo un esquema de vacunación de dosis única en ratones hembra C56BL/6J y CD1, dando como resultado la inducción de anticuerpos IgG e IgA específicos de Spike; se encontraron tanto en suero como en BAL observándose que estos anticuerpos permanecen por al menos 6 meses. Adicionalmente, se demostró la funcionalidad de esta vacuna en ensayos de neutralización, concluyendo que, una sola administración de

AdCOVID protege completamente a ratones K18-hACE2 del reto letal.

En otros estudios utilizando adenovirus como vectores, Wu et al. (2020) ha reportado que, una sola vacunación con adenovirus no replicante del tipo 5 que codifica para la proteína Spike (Ad5-nCoV), protege completamente a ratones BALB/c contra la infección en el tracto respiratorio superior e inferior por SARS-CoV-2 adaptada a ratón. Adicionalmente, se observó que una única dosis de Ad5-CoV protege de infección con la cepa wt del SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superiores e inferiores en hurones.

Hassan et al. (2020) evaluaron la actividad protectora de una vacuna utilizando como vector adenovirus de chimpancé codificando la proteína Spike del SARS-CoV-2 (ChAd-SARS-CoV-2-S). Demostrando que la vacuna, en un esquema de única dosis administrada vía intranasal induce altos niveles de anticuerpos neutralizantes, promueve respuesta celular (T) y de inmunoglobulina A (IgA) sistémica y en mucosas, además previene la infección de SARS-CoV-2 tanto en el tracto respiratorio superior e inferior. En estudios más recientes, Hassan et al. (2021) se reporta que ChAd-SARS-CoV-2-S, confiere casi en su totalidad protección en el tracto respiratorio inferior y superior después del reto con variantes del SARS-CoV-2 (B.1.351, B.1.1.28, y B.1.617.1), sugiriendo que la inmunización con esta vacuna proporciona protección de hasta 9 meses contra cepas emergentes del SARS-CoV-2.

En otros estudios (An et al., 2021), se ha utilizado el virus parainfluenza tipo 5 (PIV5) expresando la proteína S del SARS-CoV-2 (CVXGA1), demostrando que una sola dosis intranasal de CVXGA1 protege contra la infección letal en ratones K18-hACE2. Adicionalmente, la inmunización con CVXGA1 previene la infección en hurones y bloquean la transmisión, sugiriendo que esta vacuna, provee una estrategia para inducir respuesta inmune celular e innata, además de reducir la infección de SARS-CoV-2.

En el desarrollo de vacunas intranasales contra COVID-19, se ha propuesto el uso de los candidatos vacunales como refuerzo después de la administración intramuscular,

debido a que, actualmente es la situación en la se encuentra una gran cantidad de países y poblaciones, además de buscar alternativas capaces de montar una respuesta inmune a largo tiempo, vía anticuerpos neutralizantes que puedan ser ventajosos contra el virus.

En la búsqueda de nuevas estrategias Zhou et al. (2022) diseñaron una vacuna de DNA basada en el virus de la influenza atenuado (LAIV) en donde el gen RBD se fusionó al dominio PD1 humano (PD1-RBD-DNA/LAIV-HK68-RBD) la cual fue administrada vía intranasal como refuerzo después de una primera dosis intramuscular con las vacunas comerciales Pfizer/BioNTech o Sinovac. Observando inducción de respuesta inmune sistémica y mucosa, incluyendo IgA/IgG en BAL y células T CD8 en pulmón. Posterior al reto con virus pseudotipados que contienen la mutación D614G (característica de las variantes de interés del SARS-CoV-2), sugiriendo que los anticuerpos generados posterior a la estrategia de vacunación vía intranasal pueden ser efectivos contra las variantes de interés.

Se ha estudiado la vacunación nasal, en donde, en contraste con dos dosis intramusculares de una vacuna de mRNA, los refuerzos intranasales con vectores adenovirales inducen altos niveles de IgA en mucosa y células T residentes de pulmón (TRM), además que la neutralización en mucosas de variantes de preocupación del SARS-CoV-2 también mejora. Concluyendo que la primera dosis de mRNA provoca una respuesta integral de células T que consiste en TRM circulante y pulmonar después del refuerzo, adicionalmente, se reporta que las estrategias de refuerzo intranasales llevan a una protección completa contra la infección de SARS-CoV-2 en ratones (Lapiente et al., 2021).

En otros estudios (Bricker et al., 2021) se ha comparado la capacidad inmunogénica de la administración intranasal e intramuscular de una vacuna utilizando como vector un adenovirus de chimpancé que codifica a la proteína Spike del SARS-CoV-2 ([ChAd]-SARS-CoV-2-S) administrados en hámster sirios. Se reportó que se observa una respuesta robusta de anticuerpos neutralizantes específicos de Spike después de la administración intramuscular con ChAd-

SARS-CoV-2-S, sin embargo, cuando los animales son administrados vía intranasal, los niveles de anticuerpos en suero son mayores. Adicionalmente, observaron que, posterior al reto, los hámsteres inmunizados con ChAd-SARS-CoV-2 no presentaron pérdida de peso, también se encontró reducción en la infección viral en hisopados nasales y pulmonares, sugiriendo que la inmunización intranasal con ChAd-SARS-CoV-2 proporciona protección contra la infección de SARS-CoV-2.

Dentro de las estrategias para lograr un candidato vacunal, se han evaluado nanopartículas híbridas compuestas de materiales inorgánicos y poliméricos como vehículo de antígenos de interés. Kumar et al. (2021) reportan el potencial de una vacuna intranasal de DNA que codifica la proteína S del SARS-CoV-2 en modelos animales inmunocompetentes (BALB/c y C57BL/6J). Demostrando que la estrategia de vacunación utilizando como vehículo nanopartículas de quitosan-oro produce anticuerpos IgG, IgA e IgM, además de neutralización en ensayos de pseudovirus expresando la proteína S de diferentes variantes, sugiriendo que los altos niveles de IgA anti-SARS-CoV-2 en mucosa de pulmones y la presencia de células T residentes de tejido pueden inhibir de manera eficaz al virus y sus variantes en el sitio de entrada del virus. Además, se ha reportado (Chandrasekar et al., 2021) la respuesta inmune provocada por la administración heteróloga vía intranasal de Vaccinia Ankara Modificada (MVA) que expresa a las proteínas spike y nucleocápside del SARS-CoV-2, en donde se observó la producción de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 tanto en suero como en BAL en ratones (C57BL/6).

De manera interesante, se ha reportado el análisis de una vacuna de subunidad que consiste en la proteína Spike administrada con un adyuvante estimulante de TLR2 (Pam2Cys) por vía parenteral y mucosa; ambas rutas inducen títulos sustanciales de anticuerpos neutralizantes, sin embargo, la vacunación nasal genera IgA anti-Spike, aumenta anticuerpos neutralizantes en suero y en vías respiratorias, adicionalmente, se observó un incremento en la respuesta CD4+, concluyendo que en ratones K18-hACE2, la estrategia de vacunación antes mencionada proporciona protección completa contra la

Artículos

enfermedad e inmunidad esterilizante en pulmón contra SARS-CoV-2 (Ashhurst et al., 2022).

De acuerdo con los estudios antes descritos y resumidos en la Tabla 1, se observa que la evaluación preclínica de una amplia gama de vacunas intranasales conduce a resultados prometedores en cuanto a protección contra SARS-CoV-2, las variantes de interés y la reducción en la transmisión del virus. Los vectores adenovirales han sido los más utilizados en estos prototipos vacunales ya que previamente han sido evaluados en diferentes modelos animales y se ha observado que confieren protección superior cuando se administran vía intranasal comparado con la parenteral; adicionalmente

se ha contemplado el uso de adenovirus de chimpancé, debido a la posible inmunidad preexistente de adenovirus en humanos (Guo et al., 2018). Aunque los vectores adenovirales sean de primera elección, también se ha evaluado la capacidad de otros sistemas, como aquellas que se basan en micro y nanopartículas basadas en polímeros como el quitosán y algunas derivadas de materiales inorgánicos, además se ha observado resultados prometedores al usar nuevas tecnologías como DNA y subunidades proteicas. Sin embargo, aún queda por determinar el alcance de la inmunidad protectora inducida por estas vacunas, así como la evaluación de la seguridad a largo plazo.

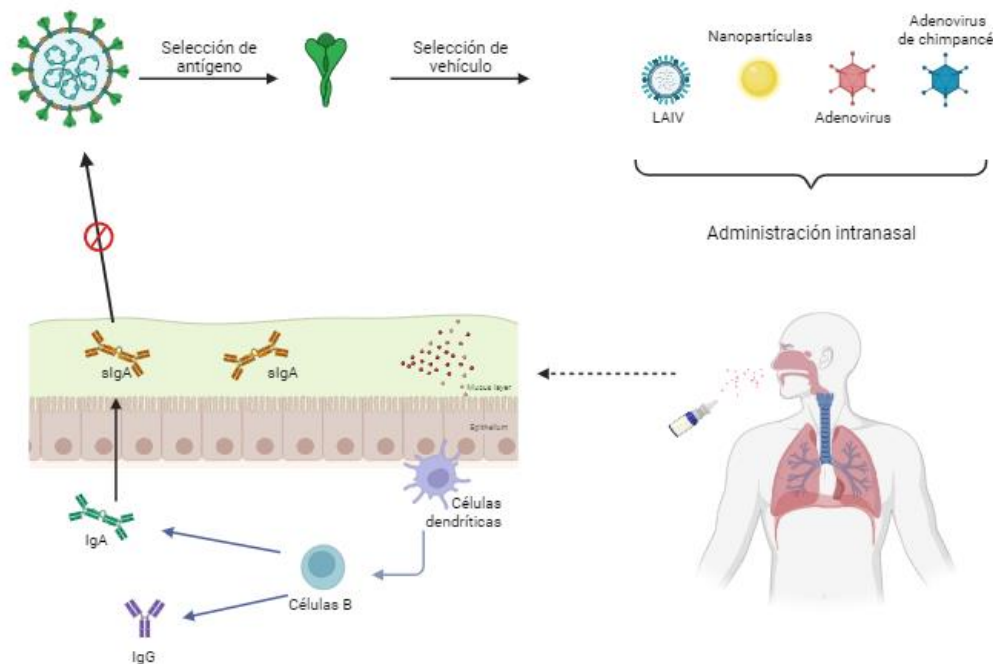


Figura 1. Vacunas intranasales contra SARS-CoV-2. Las vacunas en desarrollo tienen como antígeno a la proteína Spike, la selección del vehículo para la administración del antígeno es indispensable para generar la respuesta inmune esperada. El vehículo de elección deberá permitir que el antígeno no sea degradado y que pueda atravesar el moco y la barrera epitelial para llegar a los sitios de inducción de respuesta inmune. Una característica importante de la respuesta inmune en mucosas es la producción y secreción de IgA, la cual bloquea moléculas superficiales del patógeno que tengan la capacidad de unirse a receptores o ligandos y, por lo tanto, evita la infección.

Artículos

Tabla 1. Vacunas vía intranasal contra SARS-CoV-2 en fase preclínica.

Vehículo	Antígeno	Modelo animal	Respuesta observada	Referencia
Ad5	RBD	Ratones C56BC/6J y CD1	Anticuerpos <u>IgG</u> e <u>IgA</u> y neutralizantes	King et al., 2021
Ad5	S	Ratones BALB/c	Anticuerpos <u>IgG</u> e <u>IgA</u> y neutralizantes	Wu et al., 2020
<u>ChAd</u>	S	Ratones BALB/c	Anticuerpos <u>IgG</u> e <u>IgA</u>	Hassan et al., 2020
<u>ChAd</u>	S	Ratones K18-hACE2 C57BL/6	Anticuerpos neutralizantes	Hassan et al., 2021
PIV5	S	Ratones K18-hACE 2, BALB/c,	Anticuerpos <u>IgG</u> y neutralizantes.	An et al., 2021
		Hurones	Ab <u>IgG</u> e <u>IgA</u> y neutralizantes	
LAIV	RBD	Ratones BALB/c y K18-ACE2	Anticuerpos <u>IgA</u> , <u>IgG</u> y neutralizantes.	Zhou et al., 2022
Ad5 y Ad19a	S y N	Ratones BALB/c	Anticuerpos <u>IgA</u> , <u>IgG</u> y neutralizantes	Lapiente et al., 2021
<u>ChAd</u>	S	Hámsteres sirios	Anticuerpos <u>IgG</u> y neutralizantes	Bricker et al., 2021
<u>Nanopartículas híbridas</u>	S	Ratones BALB/c y C57BL/6J	Anticuerpos <u>IgG</u> , <u>IgA</u> , <u>IgM</u> y neutralizantes	Kumar et al., 2021
MVA	S y N	Ratones C57BL/6	Anticuerpos <u>IgA</u> , <u>IgG</u> y neutralizantes	Chandrasekar et al., 2021
Pam2Cys	S	Ratones C57BL/6 y K18-hACE2	Anticuerpos <u>IgA</u> , <u>IgG</u> y neutralizantes	Ashhurst et al., 2022

Ad5: adenovirus tipo 5. Ad19a: adenovirus tipo 19a. ChAd: adenovirus de chimpancé. PIV5: virus de parainfluenza tipo 5. LAIV: virus de influenza atenuado. MVA: Vaccinia Ankara Modificada. S: spike. RBD: dominio de unión al receptor. N: nucleocápside

Conclusiones

Las vacunas actuales contra SARS-CoV-2 reducen significativamente la mortalidad y la aparición de sintomatología grave causada por la COVID-19, sin embargo, la protección contra la infección sigue siendo poco efectiva, es por eso por lo que se buscan nuevas estrategias de vacunación en donde se aumente la inmunidad y disminuya la carga viral en el tracto respiratorio disminuyendo la transmisión viral entre humanos y evitando la aparición de nuevas variantes de preocupación del virus. Por lo tanto, se requieren vacunas vía mucosa, seguras y eficientes para afrontar estos desafíos.

Actualmente, se encuentran en desarrollo una gran cantidad de prototipos administrados vía intranasal, que han demostrado que al administrarse como única dosis o como refuerzo, son efectivas para neutralizar el virus y disminuir la carga viral en el tracto respiratorio superior e inferior. Las formulaciones preferidas en las vacunas en desarrollo comprenden a la proteína Spike o una región de esta como antígeno y los vectores adenovirales como vehículo, sin embargo, también se ha incluido el estudio de

diferentes vehículos como lo son las micro y nanopartículas poliméricas e inorgánicas, demostrando ser efectivas en la generación de inmunidad protectora.

Aunque esta revisión se centró en los prototipos en fase preclínica de vacunas intranasales contra SARS-CoV-2, actualmente hay candidatos vacunales que ya se encuentran en fases clínicas como la vacuna ChAdOx1-S, Cansino, Codagenix y Vaxart, por mencionar algunas. Sin embargo, aunque han tenido resultados favorables, aún se deberá determinar y evaluar el tiempo en el que la inmunidad generada aún es neutralizante. Los avances en el desarrollo de vacunas vía nasal contra COVID-19 han sido exhaustivos y se ha podido afrontar los retos en el desarrollo de un candidato vacunal y los propios de la vía de administración con la que se espera tener inmunidad protectora.

Referencias

An D, Li K, Rowe DK, et al., (2021) Protection of K18-hACE2 mice and ferrets against SARS-CoV-2 challenge by a single-dose mucosal immunization with a parainfluenza virus 5-based COVID-19 vaccine. *Sci Adv.* 7(27):

eabi5246.

<https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.a bi5246>

Ashhurst A, Johansen M, Maxwell J, et al., (2022) Mucosal TLR2-activating protein-based vaccination induces potent pulmonary immunity and protection against SARS-CoV-2 in mice. *Nat Commun.* 13(1): 1–18.

<https://www.nature.com/articles/s41467-022-34297-3>

Bricker TL, Darling TL, Hassan AO, et al., (2021) A single intranasal or intramuscular immunization with chimpanzee adenovirus-vectored SARS-CoV-2 vaccine protects against pneumonia in hamsters. *Cell Rep.* 36(3): 109400.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34245672/>

Butler SE, Crowley AR, Natarajan H, et al., (2021) Distinct features and functions of systemic and mucosal humoral immunity among SARS-CoV-2 convalescent individuals. *Front Immunol.* 28; 11:618685.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.618685>

Carabelli, A.M., Peacock, T.P., Thorne, L.G. et al., (2023) SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol.* 21:162–177.

<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00841-7>

Chandrasekar SS, Phanse Y, Hildebrand RE, et al. (2021) Localized and systemic immune responses against SARS-CoV-2 following mucosal immunization. *Vaccines.* 9(2):132.

<https://doi.org/10.3390/vaccines9020132>

Guo J, Mondal M, Zhou D. (2018) Development of novel vaccine vectors: Chimpanzee adenoviral vectors. *Hum Vaccin Immunother.* 3;14(7):1679-1685.

<https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1419108>

Hassan AO, Kafai NM, Dmitriev IP, et al., (2020) A single-dose intranasal chad vaccine protects upper and lower respiratory tracts against SARS-CoV-2. *Cell.* 183(1): 169–184.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.026>

Hassan AO, Shrihari S, Gorman MJ, et al., (2021) An intranasal vaccine durably protects against SARS-CoV-2 variants in mice. *Cell*

Rep. 36(4):109452.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109452>

King RG, Silva-Sanchez A, Peel JN, et al. (2021) Single-dose intranasal administration of AdCOVID elicits systemic and mucosal immunity against SARS-CoV-2 in mice. *Vaccines.* 9(8):881.

<https://doi.org/10.3390/vaccines9080881>

Knisely, JM, Buyon, LE, Mandt, R. et al. (2023) Mucosal vaccines for SARS-CoV-2: scientific gaps and opportunities—workshop report. *npj Vaccines* 8, 53.

<https://doi.org/10.1038/s41541-023-00654-6>

Kumar US, Afjei R, Ferrara K, et al., (2021) Gold-nanostar-chitosan-mediated delivery of SARS-CoV-2 DNA vaccine for respiratory mucosal immunization: development and proof-of-principle. *ACS Nano.* 27.

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.1c05002>

Lapuente D, Fuchs J, Willar J, et al., (2021) Protective mucosal immunity against SARS-CoV-2 after heterologous systemic prime-mucosal boost immunization. *Nat Commun* 12(1): 6871.

<https://www.nature.com/articles/s41467-021-27063-4>

Ludwig S, Zarbock A. (2020) Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. *Anesth Analg.* 131(1):93-96.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7173023/>

Neutra, M., Kozlowski, P. (2006) Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 6, 148–158.

<https://doi.org/10.1038/nri1777>

Wu S, Zhong G, Zhang J, et al. (2020) A single dose of an adenovirusvectored vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge. *Nat Commun.* 11(1):4081.

<https://doi.org/10.1038/s41467-020-17972-1>

Zhou R, Wang P, Wong YC, et al. (2022) Nasal prevention of SARS-CoV-2 infection by intranasal influenza-based boost vaccination in mouse models. *EBioMedicine.* 75:103762. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103762>

Descubrimiento de lantipéptidos por minería genómica: un nuevo enfoque en la búsqueda de nuevos fármacos

Carlos García-Ausencio^{1*}, Fernando Guzmán-Chávez¹, Andrea Aguilar-Cabrera¹, Sergio Sánchez¹

¹Laboratorio de Microbiología Industrial, Instituto de Investigaciones biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Coyoacán, CDMX
carlos_adgar@iibiomedicas.unam.mx

Resumen

El aumento continuo de la resistencia bacteriana por el uso indiscriminado de antibióticos ha hecho necesaria la búsqueda de nuevos fármacos con potencial terapéutico en diversas fuentes naturales que van desde organismos fotosintéticos hasta bacterias, a partir de las cuales se han aislado una gran cantidad de moléculas bioactivas como los antibacterianos. A pesar de haber sido explotados en la era dorada de los antibióticos, las bacterias siguen siendo una fuente prolífica por explorar de nuevos compuestos bioactivos, ya que, a partir del uso de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, así como el desarrollo de herramientas bioinformáticas, tal como la minería genómica, se ha documentado el enorme arsenal biosintético que albergan estos microorganismos dentro de su genoma. En este sentido, los lantipéptidos son un grupo de compuestos que se visualizan como potenciales fármacos antibacterianos gracias a su actividad contra diversos patógenos de interés clínico, además de sus fascinantes características estructurales no observadas en otros grupos de péptidos. En esta contribución, se describen algunas herramientas de minería genómica que han sido útiles en el descubrimiento de nuevos lantipéptidos bioactivos, así como un panorama general de su biosíntesis y su potencial aplicación como fármacos antibacterianos.

Palabras Claves: *lantipéptidos, minería genómica, RiPPs, antibacterianos*

Abstract

The prolonged increase in bacterial resistance to antibiotics has made it necessary to search for new potential drugs in various natural sources as bacteria from which many bioactive molecules such as antibacterials have been isolated. Despite having been exploited in the golden era of antibiotics, nowadays these microorganisms continue to be a prolific source of new bioactive compounds, thanks to massive new sequencing technologies, as well as the development of bioinformatics tools such as genomic mining, the enormous biosynthetic potential that these microorganisms harbor within their genome has been documented. In this sense, lanthipeptides are a group of compounds that are envisioned as potential antibacterial drugs thanks to their activity against various pathogens of clinical interest, in addition to their fascinating structural features not observed in other groups of peptides. In this review, we describe some genomic mining tools that have been useful in the discovery of new bioactive lanthipeptides, as well as an overview of their biosynthesis and their potential application as antibacterial drugs.

Key Words: *lanthipeptides, genome mining, RiPPs, actinobacterials*

Introducción

Durante la era dorada de los antibióticos se describieron una gran cantidad de moléculas bioactivas derivadas de diversas fuentes, principalmente aquellas provenientes de bacterias del género *Streptomyces* a partir del uso de diversos ensayos biodirigidos. A pesar de que esta metodología dio buenos resultados, fue abandonada debido a que con el tiempo se redescubrían compuestos que ya habían sido descritos anteriormente, e incluso se pensaba que muchos de estos microorganismos ya no tenían la capacidad de producir compuestos novedosos (Lewis, 2013). Actualmente, con la creciente problemática de la resistencia bacteriana a los antibióticos, ha resurgido el interés por la búsqueda de nuevas moléculas que puedan ser efectivas en el tratamiento de las infecciones asociadas a patógenos bacterianos, sobre todo aquellos que se encuentran en el grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.) los cuales se consideran como una amenaza importante en la lucha contra la resistencia bacteriana debido a su tolerancia a una gran batería de antibióticos de uso clínico tanto a nivel nacional, como mundial (De Oliveira et al., 2020; Ma et al., 2020; Pendleton et al., 2013).

Un grupo de compuestos que representa una alternativa terapéutica son los péptidos producidos ribosomalmente y modificados postraduccionalmente conocidos como RiPPs, por sus siglas en inglés, los cuales son péptidos pequeños que posterior a su síntesis en el ribosoma sufren modificaciones postraduccionales catalizadas por enzimas específicas (Ortega & van der Donk, 2016;

RiPPs: Péptidos producidos ribosomalmente y modificados postraduccionalmente

Los RiPPs representan uno de los grupos más importantes de compuestos obtenidos a partir de fuentes naturales de los que se han descrito más de 40 familias a la fecha (Montalbán-López et al., 2021b). Su producción se ha caracterizado tanto en bacterias Gram positivas y negativas, así

Rodríguez, 2022). Gracias a este procesamiento, los RiPPs presentan diversas actividades biológicas como antibacterianos, antivirales, anticancerígenos y antiparasitarios, por lo que son compuestos potencialmente atractivos para ser utilizados en la terapia clínica (Cao et al., 2021; Fu et al., 2021; Y. Li et al., 2019). Estos péptidos se encuentran codificados dentro del genoma de los microorganismos en genes que se encuentran co-agrupados (conocidos como clústeres de genes biosintéticos; BGC por sus siglas en inglés) y que son esenciales para producir el producto bioactivo final. De acuerdo con las características estructurales de estos péptidos, los RiPPs se suelen agrupar en distintos grupos, entre los que podemos mencionar a los lantipéptidos (Montalbán-López et al., 2021a). Debido a su actividad antibacteriana contra algunas cepas multidrogaresistentes y sobre todo aquellas que pertenecen al grupo ESKAPE, estas moléculas se visualizan como una estrategia prometedora en la lucha contra la resistencia bacteriana a los antibióticos. Actualmente, existen diversas metodologías para estudiar y producir lantipéptidos, una de ellas es la utilización de herramientas bioinformáticas, tal como la minería genómica para la predicción y descubrimiento de nuevos BCGs dentro del genoma de los microorganismos de interés (Russell & Truman, 2020; Ziemert et al., 2016), metodología que ha arrojado diferentes y valiosos resultados a la fecha. Este trabajo presenta los principales avances en el descubrimiento de nuevos lantipéptidos bioactivos mediante minería de genomas en diversos filos bacterianos, así como un enfoque general en su procesamiento biosintético y su potencial aplicación como fármacos antibacterianos.

como en organismos eucariotas como los hongos (Caetano et al., 2020; Ozaki et al., 2023). Un BGC típico de un RiPP contiene un grupo de genes que da lugar al péptido precursor, las enzimas biosintéticas principales, las enzimas modificadoras secundarias, así como genes de regulación, de transporte y en algunos casos, genes de inmunidad del hospedero como se observa en la Figura 1 (Do & Link, 2023; Ortega & van der Donk, 2016; Rubin & Ding, 2020).

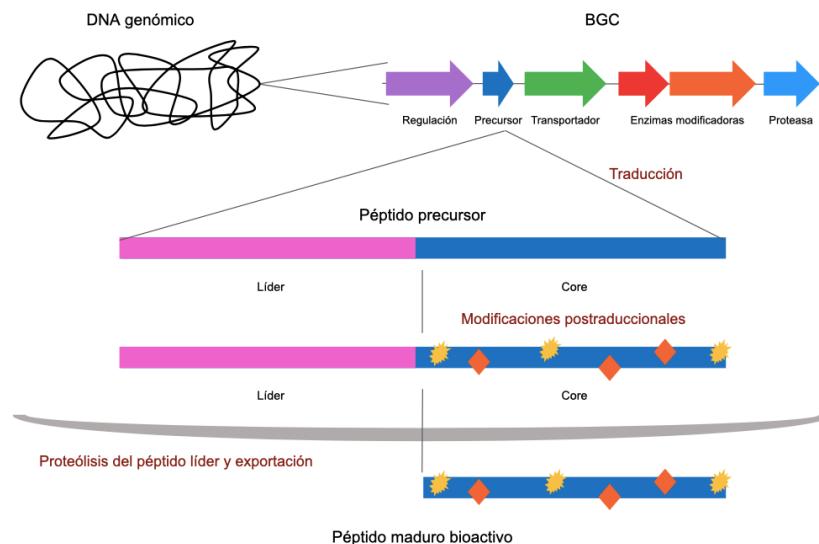


Figura 1. Procesamiento biosintético general de los RiPPs. Se muestran la región de líder y la región core del péptido precursor. Asimismo, se muestra la organización típica de un BGC productor de un péptido modificado postraduccionalmente.

Las enzimas biosintéticas principales comprenden los complejos enzimáticos que forman las modificaciones centrales del RiPP como las deshidrataciones o ciclaciones, mientras que las enzimas biosintéticas secundarias son aquellas que colocan modificaciones adicionales en el péptido como las hidroxilaciones, acilaciones, oxidaciones, glicosilaciones, isomerizaciones, halogenaciones o proteólisis de algún segmento del péptido (Montalbán-López et al., 2012; Wu & van der Donk, 2021). En algunos casos, estas modificaciones adicionales son importantes para mejorar la bioactividad del péptido o para proveerles de alguna propiedad como una mayor resistencia a proteasas o una mejor actividad biológica (Cruz et al., 2015; Funk & van der Donk, 2017).

De manera general, los lantipéptidos representan una de las familias más prominentes que se han caracterizado debido a la potente actividad antibacteriana contra diversos patógenos de interés clínico, lo cual se abordará en la siguiente sección.

Lantipéptidos antibacterianos

Los lantipéptidos son una clase de RiPPs que se caracterizan por la presencia de las estructuras modificadas lantioninas (Lan) y 3-metil-lantioninas (MeLan), las cuales provienen de dos procesos postraduccionales característicos: una deshidratación y una ciclación. La reacción de deshidratación se

efectúa sobre los residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) del péptido precursor, lo que genera los aminoácidos modificados dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb), respectivamente. Posteriormente, se lleva a cabo una reacción de ciclación, donde los residuos de cisteína (Cys) presentes en el péptido atacan nucleofílicamente a los residuos deshidratados para formar un enlace tioéter. Si la unión proviene de una Dha y una Cys, el anillo formado es una Lan, mientras que una unión entre Dhb y Cys forma una MeLan, dando como resultados péptidos reticulados con múltiples anillos (Dischinger et al., 2014; Lagedroste et al., 2020; Wu & van der Donk, 2021).

Al igual que otros grupos de RiPPs, las modificaciones postraduccionales de los lantipéptidos requieren enzimas especializadas en la deshidratación y la ciclación, las cuales se pueden clasificar en seis clases distintas. La **clase I** corresponde a los lantipéptidos que son modificados por las enzimas LanB y LanC que catalizan la reacción de deshidratación y ciclación, respectivamente. Por su parte, la **clase II** es modificada por una única enzima biosintética bifuncional conocida como LanM; esta enzima contiene un dominio de deshidratación ubicado en el extremo amino terminal (N-terminal) y un dominio de ciclación en el extremo carboxilo terminal (C-terminal). En las **clases III y IV** las modificaciones postraduccionales son catalizadas por

enzimas trifuncionales conocidas como LanKC y LanL, respectivamente; estas se encuentran formadas por un dominio de liasa N-terminal y un dominio cinasa central que, en conjunto, son las responsables de deshidratar los aminoácidos Ser y Thr del péptido precursor. En seguida, en el extremo C-terminal se encuentra localizado el dominio ciclasa que genera los enlaces tioéter. La diferencia entre LanKC y LanL radica en su dominio de ciclasa, ya que en la enzima LanL presenta motivos similares a los que se encuentran en LanC y que son importantes para su actividad catalítica, mientras que el dominio ciclasa de LanKC no presenta estos motivos (Goto et al., 2010; Repka et al., 2017; van der Donk & Nair, 2014).

La **clase V** se encuentra formada por tres enzimas biosintética individuales: LanY (liasa) y LanK (cinasa), cuya función en conjunto es obtener los aminoácidos deshidratados, y una enzima ciclasa putativa cuya actividad no se ha esclarecido totalmente (Ortiz-López et al., 2020; Xu et al., 2020). De manera similar a LanKC y LanL, los lantipéptidos de **clase VI** son obtenidos por la actividad de una enzima con versión truncada de los dominios de liasa y ciclasa conocida como LanKCB (He et al., 2023). En todas las clases es necesaria la presencia de una proteasa que escinda el péptido líder de la región modificada. Este último paso biosintético es muy importante, ya que los péptidos no son bioactivos mientras se mantenga la región de péptido líder en su estructura modificada (Repka et al., 2017).

Los lantipéptidos han sido estudios ampliamente gracias a su actividad antibacteriana por lo que también se les suele nombrar como lantibióticos (lantipéptido más antibiótico). Por ejemplo, la nisina, el primer lantipéptido descrito y caracterizado producido por *Lactococcus lactis* subs. *lactis*, es utilizado como conservante alimenticio gracias a su actividad contra bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* y de otros contaminantes de los alimentos de los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Clostridium* (Field, O' Connor, et al., 2016; Shin et al., 2016). También se ha descrito que la nisina en combinación con polimixina puede inhibir la formación de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (Field, Seisling, et al., 2016), asimismo, se ha reportado que

las modificaciones sintéticas sobre la nisina pueden hacer más efectiva su actividad contra microorganismos Gram-negativos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter aerogenes* (Q. Li et al., 2018). La microbisporicina (NAI-07), producida por varias especies de *Microbispora*, es de los lantibióticos más potentes reportados en la actualidad al inhibir bacterias multidrogoresistentes como *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA), *Enterococci* resistente a vancomicina (VRE), *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, así como contra bacterias Gram-negativas como *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae* (Brunati et al., 2018; Münch et al., 2014). Por su parte, la cebulantina producida por *Saccharopolyspora cebuensis*, ha sido activa contra *Vibrio parahaemolyticus* (Moon et al., 2019).

Los lantipéptidos de clase II también se caracterizan por su actividad contra diversos patógenos de interés clínico; el lantibiótico NVB302, un derivado de la actagardina producida por *Actinoplanes garbadinensis* y *Actinoplanes liguriae*, ha demostrado ser efectivo en la infección ocasionada por *Clostridium difficile* (Boakes & Dawson, 2014; Crowther et al., 2013). La mutacina 1140, producida por *Streptococcus mutans*, ha sido probada exitosamente contra MRSA en un modelo murino, asimismo, variaciones en su estructura han demostrado ser útiles para inhibir a *C. difficile* (Geng et al., 2018; Hillman et al., 1998; Kers et al., 2018).

Hasta el momento, no se ha reportado que los lantipéptidos de clase III y IV muestren alguna actividad contra patógenos de interés clínico, sin embargo, se han descrito en estas otro tipo de actividades como antivirales o antialodínicos, las cuales se han abordado en otras revisiones. Los lantipéptidos de clase V fueron descubiertos recientemente y hasta el momento solo se han descrito dos miembros bioactivos de esta clase; cacaoidin producido por *Streptomyces cacaoi* que mostró actividad contra MRSA y *C. difficile*, mientras que el lexpéptido identificado en *Streptomyces rochei*, fue efectivo contra *Staphylococcus epidermidis* resistente a metilicina (MRSE), *Enterococcus faecalis* y MRSA (Ortiz-López et al., 2020; Xu et al., 2020).

Los lantipéptidos han sido descritos en varios filos bacterianos, caracterizándose principalmente aquellos producidos por firmicutes, bacterias ácido-lácticas (BAL) y actinobacterias. Debido a que la gran mayoría de estos péptidos fueron aislados con ensayos biodirigidos, el uso de técnicas informáticas surge como perspectiva novedosa para la posible identificación de nuevos péptidos tanto en organismos ya conocidos, que han sido empleados como fuentes de compuestos bioactivos, como en aquellos que recientemente se han caracterizados. En general, la minería genómica es referida como el análisis de la información genética de los microorganismos para el descubrimiento de nuevos productos naturales utilizando para ello diversas plataformas informáticas que facilitan estos análisis (Ziemert, et al., 2016).

El uso de herramientas bioinformáticas en minería genómica

Con la llegada de las tecnologías de secuenciación masiva, se comenzaron a obtener las secuencias genómicas de diversos microorganismos, como fue el caso de *Streptomyces coelicolor*, una actinobacteria caracterizada principalmente por producir los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina. Al analizar su genoma, se observó que se encontraban codificados varios genes que daban lugar a diversos compuestos que no habían sido observados previamente, lo que sugería que esta actinobacteria tenía el potencial biosintético de producir más compuestos distintos a los que se habían descrito anteriormente (Bentley et al., 2002; Bérdy, 2012). Más tarde, esta hipótesis fue confirmada con la secuenciación de diversas cepas bacterianas sobre todo del grupo de las actinobacterias; como en *Streptomyces avermitilis*, productor del antiparasitario avermectina, donde se observó que más del 6% de su genoma codificaba BGCs distintos al antiparasitario (Ikeda et al., 2014). Estos descubrimientos dieron paso a la creación de herramientas bioinformáticas de minería genómica con el fin de analizar diversas secuencias y encontrar BGCs únicos y novedosos. Con los resultados obtenidos en estos análisis, se enfatiza el descubrimiento de moléculas nuevas y se evita el redescubrimiento de moléculas ya

caracterizadas. Actualmente, se dispone de un repertorio amplio de plataformas de minería genómica basadas en diversos fundamentos y características de los cuales presentaremos aquellos especializados en la búsqueda de RiPPs y lantipéptidos.

Una de las plataformas más conocidas es AntiSMASH (*antibiotics and secondary metabolite analysis shell*). Esta herramienta basa su búsqueda en los modelos ocultos de Markov (HMMs) presentes en los motivos proteicos de las enzimas biosintéticas encargadas de la biosíntesis de los péptidos. En su última actualización de este año, antiSMASH tiene la capacidad de reconocer hasta 81 familias distintas de productos naturales, así como de realizar una predicción de las estructuras químicas de los péptidos, los genes de regulación, la similitud con clústeres ya reportados y las masas asociadas a los productos predichos (Blin et al., 2023) siendo hoy en día una de las plataformas más amplias y de mayor uso en minería genómica.

Al igual que antiSMASH, se han desarrollado otras plataformas basadas en HMMs. BAGEL (*BActeriocin GENome mining Tool*) es una plataforma dirigida a la búsqueda de RiPPs y de otras clases de bacteriocinas, su algoritmo se basa en el empleo de bases de datos de péptidos de NCBI, UniProt, MiBiG y RiPPMiner, utilizando HMMs que se encuentran asociados a genes de contexto (van Heel et al., 2018). De igual manera, ThioFinder es otra plataforma basada en HMMs que se encuentra enfocada en la búsqueda de tiopéptidos (J. Li et al., 2012). Por su parte, PRISM (*PRediction Informatics for Secondary Metabolomes*) es una plataforma mayormente especializada en la búsqueda de sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) y policétidos sintasas (Skinnider et al., 2020), aunque también es capaz de identificar BGC relacionados a la síntesis de RiPPs, pero con un catálogo más reducido que las plataformas mencionadas anteriormente. RRE-Finder centra su búsqueda en detectar homólogos a dominios RRE (*RIPP recognition element*) que se encuentran presentes en diversas familias de RiPPs y a diferencia de las otras plataformas, RRE-Finder depende de la presencia de los RRE en los clústeres para identificar un nuevo producto (Kloosterman, Shelton, et al., 2020).

También se encuentran disponibles plataformas que basan sus análisis en datos peptidogénomicos. RiPPQuest es una herramienta basada en un algoritmo conocido como *Peptide-Spectrum Matches*, donde se comparan espectroscopías de masas (MS) de RiPPs putativos con los péptidos candidatos predichos en los análisis genómicos, sin embargo, debido a que se enfoca únicamente en la búsqueda de lantipéptidos, posteriormente fue desarrollado MetaMiner donde a diferencia de la otra plataforma, se comparan datos genómicos o metagenómicos con espectros de masas en tándem de comunidades de bacterias y hongos, ampliando la capacidad de búsqueda (Cao et al., 2019; Mohimani et al., 2014).

Asimismo, se han desarrollado plataformas basadas en inteligencia artificial. RODEO (*Rapid ORF Description and Evaluation Online*) es una plataforma que combina métodos de evaluaciones heurísticos, HMMs y *machine learning* dependiente de genes de contexto para la búsqueda de varias clases de RiPPs (Tietz et al., 2017). DeepRiPP basa su búsqueda en *Deep learning* independiente de genes de contexto, que adicional a la búsqueda de BGCs, realiza una predicción de clase, predicción de sitio de corte del péptido líder y asigna un índice de novedad al ingresar una secuencia precursora (Merwin et al. 2020a). De igual forma, RiPPMiner y RiPPMiner-Genome compilan varias herramientas para sus predicciones; para la

identificación de ORFs (*open reading frame*) utiliza PRODIGAL y HMM, mientras que para la anotación de péptidos precursores utiliza *machine learning* y para la predicción de sitios de corte y estructuras modificadas se basa en SVM (*Support Vector Machine*) (Agrawal et al., 2021). DecRiPPter (*Data-driven Exploratory Class-independent RiPP TrackER*) es una plataforma que combina SVM con análisis pangenómicos enfocados en el descubrimiento de RiPPs y durante el primer ensayo de prueba se pudieron identificar 42 nuevas familias de péptidos (Kloosterman, Cimermanic, et al., 2020). Por su parte, RiPPER es útil para identificar péptidos precursores mediante una metodología independiente de familia y basada en RODEO, PRODIGAL y Pfam (Santos-Aberturas et al., 2019). Finalmente, NeuRiPP es una herramienta de aprendizaje automático con la capacidad de identificar grupos de RiPPs recientemente caracterizados (de los Santos, 2019).

Lantipéptidos descubiertos por minería genómica

Al presente, se han obtenido diversos péptidos bioactivos utilizando herramientas de minería genómica. Muchos de estos péptidos han presentado actividad biológica o características que los hacen únicos y que no se habían observado en otros lantipéptidos ya reportados.

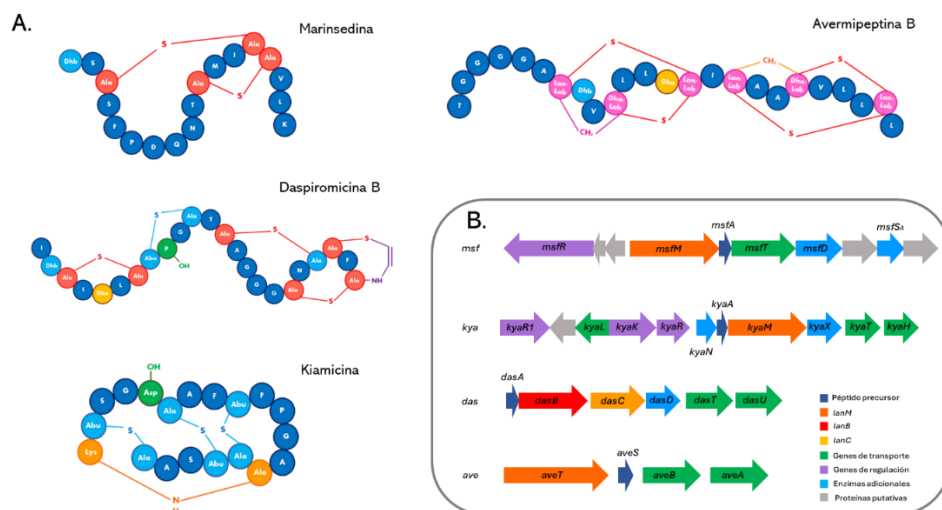


Figura 2. Estructuras y BGCs de algunos lantipéptidos bioactivos descubiertos con minería genómica. (A) Estructuras de los péptidos. Se muestran el anticancerígeno marinsedina y los antibacterianos daspiromicina B, kiamicina y avermipeptina B, los cuales fueron aislados de actinobacterias. (B) Arquitectura de los clústeres de genes biosintéticos, mrsf: marinsedina; kya: kiamicina; das: daspiromicina B; ave: avermipeptina B.

La clase IV de los lantipéptidos fue reportada por primera vez en 2010 con el hallazgo de la venezuelina, mientras se analizaba el genoma de *Streptomyces venezuelae*, productor de cloranfenicol (Goto et al., 2010). Más tarde, con la herramienta AntiSMASH, se ubicó el clúster de la estreptocolina en el productor del antibiótico kirromicina *Streptomyces collinus* Tü 365. El lantipéptido fue clonado y expresado heterológamente y a pesar de no presentar actividad antibacteriana, se observó que era un inhibidor moderado de la proteína tirosina fosfatasa (PTP1B), por lo que podría ser utilizado potencialmente como auxiliar en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Iftime et al., 2015).

Asimismo, los lantipéptidos de clase V fueron reportados por primera vez con el descubrimiento del pristinin A3 utilizando la plataforma DecRiPPter en genomas de *Streptomyces* (Kloosterman, Cimermanic, et al., 2020). Estudios bioinformáticos posteriores dieron lugar a la elucidación de cacoidin y el lexapéptido, dos lantipéptidos con actividad contra patógenos del grupo ESKAPE (Pei et al., 2022). Por otro lado, la clase VI fue identificada mediante un análisis con PSI-BLAST (*Position-Specific Iterated* BLAST) en *Streptococcus suis* YS35, aunque hasta el momento no se ha elucidado su actividad biológica (He et al., 2023).

Con estas herramientas también se han descrito a los lantibióticos de dos componentes: lichenidicina, haloduracina y roseocina. La lichenidicina fue obtenida de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 mediante un análisis de homólogos a la enzima LanM, mientras que la haloduracina fue aislada de *Bacillus halodurans* C-125 al realizar una búsqueda de homólogos al lantipéptido mersacidina (Shenkarev et al., 2010). Por su parte, la haloduracina ha demostrado actividad comparable con la nisina, e incluso potenciada al inhibir el crecimiento de VRE y *S. aureus*, asimismo, es efectiva contra esporas de *Bacillus anthracis* y en combinación con cloranfenicol muestra actividad sinérgica contra *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus* (Danesh et al., 2017a, 2017b; Oman & van der Donk, 2009). De igual manera, la lichenidicina es activa contra MRSA, *Enterococcus faecium*, *Haemophilus influenza* y *Listeria monocytogenes* (Barbosa et al., 2022).

Respecto a la roseocina, este péptido fue descubierto mediante un análisis con PSI-BLAST en *Streptomyces roseosporus* NRRL 11379, representando el primer lantibiótico de dos componentes descrito en actinobacterias. Al igual que otros lantibióticos de dos componentes, ambos péptidos mostraron actividad sinérgica contra MRSA y VRE (M. Singh et al., 2020). Por otro lado, el sistema Flv es un sistema de lantipéptido de dos componentes con doce sustratos distintos y solamente dos enzimas modificadoras LanM. Este sistema fue reportado en la bacteria anaerobia rumiante *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 cuando se realizaba una búsqueda de homólogos a LanM en BLAST, donde además se demostró experimentalmente que una de las enzimas era capaz de modificar hasta ocho sustratos, mientras que la otra enzima solo modificaba uno de los péptidos, sin embargo, algunos de los lantipéptidos mostraron actividad sinérgica antibacteriana, representando el primer ejemplo de lantipéptido multicomponente con alta tolerancia al sustrato lo que dio como resultado péptidos antibacterianos (X. Zhao & van der Donk, 2016).

La avermipeptina B fue identificada con un análisis de antiSMASH en el genoma de *Streptomyces actuosus* ATCC 25421, representando uno de los únicos ejemplos de lantipéptidos clase III con actividad antibacteriana al ser eficaz contra *S. aureus* (Liu, Sun, & Hu 2018). Un análisis con antiSMASH y una posterior búsqueda en BLAST basada en lantipéptidos que contengan la modificación adicional aminovinil-cisteína (AviCys), condujo al descubrimiento de las daspiromicinas A y B expresadas exitosamente en *Streptomyces albus*, que además mostraron excelente actividad antibacteriana contra MRSA y VRE (Shi et al., 2022). Adicionalmente, la utilización en conjunto de BLAST y antiSMASH, han permitido el descubrimiento de homólogos a la familia de la cinamicina (lantipéptidos clase II), el cual es uno de los grupos más sobresalientes de lantipéptidos obtenidos de actinobacterias, gracias a la afinidad de los péptidos a unir fosfatidiletanolamina (PE), un componente de membranas celulares procariontas y eucariotas y debido al cual se les ha asociado actividad antibacteriana, antiviral y antitumoral (Cheng et al., 2021; Richard et al., 2015; M. Zhao,

2011). Esta familia se ha extendido con el descubrimiento de la cinamicina B en *Actinomadura atramentaria* NBRC 14695 y de la kiamicina en una especie de *Saccharopolyspora* aislada de hormiga, ambos con características muy similares al lantibiótico cinamicina, el lantipéptido prototipo del grupo (Kodani et al., 2016; Vikeli et al., 2020).

Uno de los ejemplos más sobresalientes de lantipéptidos con diversidad de actividades biológicas es la brevicilina, recientemente descubierta mediante un análisis auxiliado con BAGEL en *Brevibacillus* sp. AF8. Este lantipéptido de clase I inhibe a *S. aureus*, *E. coli*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *Candida albicans* y *Colletotrichum acutatum*, así como también inhibe la replicación y la entrada a las células blanco del virus SARS-CoV-2 (Singh et al., 2023). Un análisis conjunto de antiSMASH y BAGEL en el genoma de la cepa *Bacillus subtilis* EH11 (productor de otro lantipéptido), evidenció el BGC de la balucina, un lantipéptido de clase I con actividad antibacteriana contra los patógenos alimenticios *B. cereus* y *L. monocytogenes* (Fu et al., 2023).

Es de notarse que existen otros ejemplos destacables de lantipéptidos descubiertos por minería genómica en bacterias aisladas de ambientes inhóspitos, como la marinsedina obtenida de la bacteriana marina *Marinicella sediminis* F2, que mostró actividad citotóxica moderada contra la línea celular HeLa (Han et al., 2022). Por otro lado, en *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2, se describió la producción de un lantipéptido de clase II y uno de clase I conocidos como geobacilinas I y II, respectivamente, a partir de la anotación en el genoma la bacteria termofílica. Geobacilina I mostró actividad contra VRE, *B. anthracis*, *Streptococcus dysgalactiae* y MRSA (Garg et al., 2012).

Conclusiones y prospectivas

La caracterización de nuevos productos naturales bioactivos bajo metodologías de fermentación ha resultado en el descubrimiento de interesantes compuestos antibacterianos, sin embargo, la búsqueda de péptidos pequeños como los lantipéptidos es a menudo complicada con estos sistemas, ya que con frecuencia se reportan clústeres

biosintéticos que permanecen silenciados en condiciones de laboratorio, o que la producción de los lantipéptidos puede llegar a ser muy baja provocando que su actividad puede pasar desapercibida tanto en ensayos biodirigidos, así como en los análisis cromatográficos (Lee et al., 2020; Ongey & Neubauer, 2016). Las herramientas de minería genómica actuales han permitido sobrepasar esta problemática al permitir la búsqueda directa de nuevas moléculas dentro del genoma de los microorganismos. Bajo este enfoque, es posible obtener compuestos novedosos con posteriores enfoques experimentales, así como determinar sus actividades biológicas.

Los lantipéptidos representan un grupo de RiPPs con potente actividad antibacteriana tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, por lo que bajo el contexto de la problemática actual de resistencia bacteriana a los antibióticos, estos péptidos son candidatos con potencial para emplearse como fármacos de uso clínico. La minería de genomas ha permitido el descubrimiento de diversos lantipéptidos efectivos contra diversos patógenos bacterianos, sobre todo aquellos pertenecientes al grupo ESKAPE. Esto también ha permitido el descubrimiento de nuevas variantes de los lantibióticos más potentes que los predecesores. Un estudio realizado por Chaudhary y colaboradores (2023), demostró la amplia presencia de homólogos al lantipéptido roseocina en todo el filo de las actinobacterias, encontrando variaciones que aumentaron la actividad antibacteriana de la propia roseocina contra MRSA (Chaudhary et al., 2023).

Asimismo, se han elucidado nuevas clases de lantipéptidos, todo con base en variaciones en la arquitectura de los BGC hallados por minería genómica, principalmente en géneros pertenecientes a las actinobacterias. Algunos otros estudios han demostrado el enorme arsenal biosintético de lantipéptidos que aún permanecen ocultos en estos microorganismos, representando uno de los grupos de RiPPs más predominantes dentro del filo (Arulprakasam & Dharumadurai, 2021; Poorinmohammad et al., 2019). En un estudio realizado por Zhang et al, se reportó la presencia de BGC con organizaciones de genes únicas en actinobacterias, lo que sugiere la presencia de nuevas familias de

lantipéptidos que aún no han sido caracterizadas experimentalmente. Asimismo, se observó la presencia de genes de NRPS y genes de policétidos sintasas en conjunto con genes asociados a la producción de lantipéptidos, lo cual no ocurre frecuentemente en otros filos bacterianos. Este hallazgo sugiere que muchos de estos clústeres son capaces de producir compuestos diversos al entrecruzar vías de síntesis de péptidos ribosomales y no ribosomales, como se ha visto en otros compuestos como la feganomicina (Noike et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha optado por una metodología basada en minería de genomas para la elucidación de diversos BGC potenciales para la producción de antibacterianos. Para ello nos hemos basado en la búsqueda en el genoma de actinobacterias endófitas de plantas medicinales y hemos encontrado varios casos interesantes. Un bacteriolisina (peptidoglucano hidrolasa) fue exitosamente producida en *E. coli* a partir de un aislado, mostrando un espectro amplio de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras (Vázquez-Hernández, 2017). Por otro lado, el endófito *Embleya* sp. NF3 es uno de los

Referencias

Agrawal, P., Amir, S., Deepak, Barua, D., & Mohanty, D. (2021). RiPPMiner-Genome: A web resource for automated prediction of crosslinked chemical structures of RiPPs by genome mining. *Journal of Molecular Biology*, 433(11), 166887. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166887>

Arulprakasam, K. R., & Dharamadurai, D. (2021). Genome mining of biosynthetic gene clusters intended for secondary metabolites conservation in *Actinobacteria*. *Microbial Pathogenesis*, 161, 105252. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105252>

Barbosa, J. C., Silva, Í. C., Caetano, T., Mösker, E., Seidel, M., Lourenço, J., Süßmuth, R. D., Santos, N. C., Gonçalves, S., & Mendo, S. (2022). Assessing the potential of the two-peptide lantibiotic lichenicidin as a new generation antimicrobial. *World Journal of Microbiology and*

productores más prolíficos de estefimicina B reportado a la fecha que además posee un repertorio biosintético único con alrededor de 70 BGC potenciales localizados con un análisis de antiSMASHv7.0.1 (Rodríguez-Peña et al., 2022). A partir de este endófito, se han clonado heterológamente dos RiPPs con actividad antibacteriana contra microorganismos Gram-positivos; un lassopéptido clase II que fue activo contra una cepa de *Staphylococcus aureus* (Rodríguez Luna, 2019) y un lantipéptido clase I activo contra *Micrococcus luteus* (Roblero Mejía, 2023).

Estos hallazgos soportan la utilidad de las herramientas bioinformáticas en el descubrimiento de nuevos productos naturales, sin dejar de lado la búsqueda en productores de antibióticos ya conocidos ni los nuevos microorganismos recién caracterizados.

Agradecimientos

Agradecemos el financiamiento del Programa PAPIIT, DGAPA-UNAM, proyecto IN205922, así como al CONAHCYT por la beca otorgada a Carlos García-Ausencio durante sus estudios de doctorado.

Biotechnology, 38(1), 18. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03196-y>

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., ... Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885), 141–147. <https://doi.org/10.1038/417141a>

Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65(8), 385–395. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>

Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., Fetter, A., Terlouw, B. R., Metcalf, W. W., Helfrich, E. J. N., van Wezel, G. P., Medema, M. H., &

Artículos

- Weber, T. (2023). antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W46–W50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>
- Boakes, S., & Dawson, M. J. (2014). Discovery and development of NVB302, a semisynthetic antibiotic for treatment of *Clostridium difficile* infection. *Natural Products* (pp. 455–468). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118794623.ch24>
- Brunati, C., Thomsen, T. T., Gaspari, E., Maffioli, S., Sosio, M., Jabes, D., Løbner-Olesen, A., & Donadio, S. (2018). Expanding the potential of NAI-107 for treating serious ESKAPE pathogens: synergistic combinations against Gram-negatives and bactericidal activity against non-dividing cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 414–424. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx395>
- Caetano, T., van der Donk, W., & Mendo, S. (2020). Bacteroidetes can be a rich source of novel lanthipeptides: The case study of *Pedobacter lusitanus*. *Microbiological Research*, 235, 126441. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126441>
- Cao, L., Do, T., & Link, A. J. (2021). Mechanisms of action of ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptides (RiPPs). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48(3–4). <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab005>
- Cao, L., Gurevich, A., Alexander, K. L., Naman, C. B., Leão, T., Glukhov, E., Luzzatto-Knaan, T., Vargas, F., Quinn, R., Bouslimani, A., Nothias, L. F., Singh, N. K., Sanders, J. G., Benitez, R. A. S., Thompson, L. R., Hamid, M.-N., Morton, J. T., Mikheenko, A., Shlemov, A., ... Mohimani, H. (2019). MetaMiner: A scalable peptidogenomics approach for discovery of ribosomal peptide natural products with blind modifications from microbial communities. *Cell Systems*, 9(6), 600-608.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.09.004>
- Chaudhary, S., Kishen, S., Singh, M., Jassal, S., Pathania, R., Bisht, K., & Sareen, D. (2023). Phylogeny-guided genome mining of roseocin family lantibiotics to generate improved variants of roseocin. *AMB Express*, 13(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13568-023-01536-9>
- Cheng, C., Chen, H., Tong, L., Li, Z., Yang, Y., Wu, S., Wiseman, J. S., & Han, Y. (2021). Mathermycin, an anti-cancer molecule that targets cell surface phospholipids. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 413, 115410. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115410>
- Crowther, G. S., Baines, S. D., Todhunter, S. L., Freeman, J., Chilton, C. H., & Wilcox, M. H. (2013). Evaluation of NVB302 versus vancomycin activity in an *in vitro* human gut model of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), 168–176. <https://doi.org/10.1093/jac/dks359>
- Cruz, J. C. S., Iorio, M., Monciardini, P., Simone, M., Brunati, C., Gaspari, E., Maffioli, S. I., Wellington, E., Sosio, M., & Donadio, S. (2015). Brominated variant of the lantibiotic NAI-107 with enhanced antibacterial potency. *Journal of Natural Products*, 78(11), 2642–2647. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00576>
- Danesh, A., Ljungh, Å., Mattiasson, B., & Mamo, G. (2017a). Synergistic effect of haloduracin and chloramphenicol against clinically important Gram-positive bacteria. *Biotechnology Reports*, 13, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.008>
- Danesh, A., Ljungh, Å., Mattiasson, B., & Mamo, G. (2017b). Synergistic effect of haloduracin and chloramphenicol against clinically important Gram-positive bacteria. *Biotechnology Reports*, 13, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.008>
- de los Santos, E. L. C. (2019). NeuRiPP: Neural network identification of RiPP precursor peptides. *Scientific Reports*, 9(1), 13406. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49764-z>
- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>
- Dischinger, J., Basi Chipalu, S., & Bierbaum, G. (2014). Lantibiotics: Promising candidates

- for future applications in health care. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(1), 51–62.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.09.003>
- Do, T., & Link, A. J. (2023). Protein engineering in Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptides (RiPPs). *Biochemistry*, 62(2), 201–209.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00714>
- Field, D., O' Connor, R., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2016). *In Vitro* activities of nisin and nisin derivatives alone and in combination with antibiotics against *Staphylococcus* biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00508>
- Field, D., Seisling, N., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2016). Synergistic nisin-polymyxin combinations for the control of *Pseudomonas* Biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01713>
- Fu, Y., Jaarsma, A. H., & Kuipers, O. P. (2021). Antiviral activities and applications of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(8), 3921–3940. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03759-0>
- Fu, Y., Zhou, L., & Kuipers, O. P. (2023). Discovery, biosynthesis, and characterization of a lanthipeptide from *Bacillus subtilis* EH11 with a unique lanthionine ring pattern. *Cell Reports Physical Science*, 4(8), 101524.
<https://doi.org/10.1016/j.xcrp.2023.101524>
- Funk, M. A., & van der Donk, W. A. (2017). Ribosomal natural products, tailored to fit. *Accounts of Chemical Research*, 50(7), 1577–1586.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00175>
- Garg, N., Tang, W., Goto, Y., Nair, S. K., & van der Donk, W. A. (2012). Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), 5241–5246.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1116815109>
- Geng, M., Ravichandran, A., Escano, J., & Smith, L. (2018). Efficacious analogs of the lantibiotic mutacin 1140 against a systemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(12).
<https://doi.org/10.1128/AAC.01626-18>
- Goto, Y., Li, B., Claesen, J., Shi, Y., Bibb, M. J., & van der Donk, W. A. (2010). Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights. *PLoS Biology*, 8(3), e1000339.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000339>
- Han, Y., Wang, X., Zhang, Y., & Huo, L. (2022). Discovery and characterization of Marinsedin, a new class II lanthipeptide derived from marine bacterium *Marinicella sediminis* F2^T. *ACS Chemical Biology*, 17(4), 785–790.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00021>
- He, Y., Fan, A., Han, M., Li, H., Li, M., Fan, H., An, X., Song, L., Zhu, S., & Tong, Y. (2023). Mammalian commensal *Streptococci* utilize a rare family of class VI lanthipeptide synthetases to synthesize miniature lanthipeptide-type ribosomal peptide natural products. *Biochemistry*, 62(2), 462–475.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00534>
- Hillman, J. D., Novák, J., Sagura, E., Gutierrez, J. A., Brooks, T. A., Crowley, P. J., Hess, M., Azizi, A., Leung, K.-P., Cvitkovitch, D., & Bleiweis, A. S. (1998). Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 66(6), 2743–2749.
<https://doi.org/10.1128/IAI.66.6.2743-2749.1998>
- Iftime, D., Jasyk, M., Kulik, A., Imhoff, J. F., Stegmann, E., Wohlleben, W., Süßmuth, R. D., & Weber, T. (2015). Streptocollin, a type IV lanthipeptide produced by *Streptomyces collinus* Tü 365. *ChemBioChem*, 16(18), 2615–2623.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201500377>
- Ikeda, H., Shin-ya, K., & Omura, S. (2014). Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 233–250.
<https://doi.org/10.1007/s10295-013-1327-x>

- Kers, J. A., Sharp, R. E., Defusco, A. W., Park, J. H., Xu, J., Pulse, M. E., Weiss, W. J., & Handfield, M. (2018). Mutacin 1140 Lantibiotic variants are efficacious against *Clostridium difficile* infection. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00415>
- Kloosterman, A. M., Cimermancic, P., Elsayed, S. S., Du, C., Hadjithomas, M., Donia, M. S., Fischbach, M. A., van Wezel, G. P., & Medema, M. H. (2020). Expansion of RiPP biosynthetic space through integration of pan-genomics and machine learning uncovers a novel class of lanthipeptides. *PLOS Biology*, 18(12), e3001026. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001026>
- Kloosterman, A. M., Shelton, K. E., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Mitchell, D. A. (2020). RRE-Finder: a genome-mining tool for class-independent RiPP Discovery. *mSystems*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00267-20>
- Kodani, S., Komaki, H., Ishimura, S., Hemmi, H., & Ohnishi-Kameyama, M. (2016). Isolation and structure determination of a new lantibiotic cinnamycin B from *Actinomadura atramentaria* based on genome mining. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(8), 1159–1165. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1788-9>
- Lagedroste, M., Reiners, J., Knospe, C. V., Smits, S. H. J., & Schmitt, L. (2020). A structural view on the maturation of lanthipeptides. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01183>
- Lee, N., Hwang, S., Kim, J., Cho, S., Palsson, B., & Cho, B.-K. (2020). Mini review: Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1548–1556. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.024>
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5), 371–387. <https://doi.org/10.1038/nrd3975>
- Li, J., Qu, X., He, X., Duan, L., Wu, G., Bi, D., Deng, Z., Liu, W., & Ou, H.-Y. (2012). ThioFinder: A web-based tool for the identification of thiopeptide gene clusters in DNA Sequences. *PLoS ONE*, 7(9), e45878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045878>
- Li, Q., Montalban-Lopez, M., & Kuipers, O. P. (2018). Increasing the antimicrobial activity of nisin-based lantibiotics against Gram-Negative pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(12). <https://doi.org/10.1128/AEM.00052-18>
- Li, Y., Liu, J., Tang, H., Qiu, Y., Chen, D., & Liu, W. (2019). Discovery of new thioviridamide-like compounds with antitumor activities. *Chinese Journal of Chemistry*, 37(10), 1015–1020. <https://doi.org/10.1002/cjoc.201900235>
- Liu, W., Sun, F., & Hu, Y. (2018). Genome Mining-Mediated discovery of a new avermipeptin analogue in *Streptomyces actuosus* ATCC 25421. *ChemistryOpen*, 7(7), 558–561. <https://doi.org/10.1002/open.201800130>
- Ma, Y., Wang, C., Li, Y., Li, J., Wan, Q., Chen, J., Tay, F. R., & Niu, L. (2020). Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. *Advanced Science*, 7(1). <https://doi.org/10.1002/advs.201901872>
- Merwin, N. J., Mousa, W. K., Dejong, C. A., Skinnider, M. A., Cannon, M. J., Li, H., Dial, K., Gunabalasingam, M., Johnston, C., & Magarvey, N. A. (2020). DeepRiPP integrates multiomics data to automate discovery of novel ribosomally synthesized natural products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(1), 371–380. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901493116>
- Mohimani, H., Kersten, R. D., Liu, W.-T., Wang, M., Purvine, S. O., Wu, S., Brewer, H. M., Pasa-Tolic, L., Bandeira, N., Moore, B. S., Pevzner, P. A., & Dorrestein, P. C. (2014). Automated genome mining of ribosomal peptide natural products. *ACS Chemical Biology*, 9(7), 1545–1551. <https://doi.org/10.1021/cb500199h>
- Montalbán-López, M., Scott, T. A., Ramesh, S., Rahman, I. R., van Heel, A. J., Viel, J. H., Bandarian, V., Dittmann, E., Genilloud, O., Goto, Y., Grande Burgos, M. J., Hill, C., Kim, S., Koehnke, J., Latham, J. A., Link, A. J., Martínez, B., Nair, S. K., Nicolet, Y., ... van der

- Donk, W. A. (2021a). New developments in RiPP discovery, enzymology and engineering. *Natural Product Reports*, 38(1), 130–239. <https://doi.org/10.1039/D0NP00027B>
- Montalbán-López, M., Scott, T. A., Ramesh, S., Rahman, I. R., van Heel, A. J., Viel, J. H., Bandarian, V., Dittmann, E., Genilloud, O., Goto, Y., Grande Burgos, M. J., Hill, C., Kim, S., Koehnke, J., Latham, J. A., Link, A. J., Martínez, B., Nair, S. K., Nicolet, Y., ... van der Donk, W. A. (2021b). New developments in RiPP discovery, enzymology and engineering. *Natural Product Reports*, 38(1), 130–239. <https://doi.org/10.1039/D0NP00027B>
- Montalbán-López, M., Zhou, L., Buivydas, A., van Heel, A. J., & Kuipers, O. P. (2012). Increasing the success rate of lantibiotic drug discovery by Synthetic Biology. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(8), 695–709. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.693476>
- Moon, K., Xu, F., & Seyedsayamdost, M. R. (2019). Cebulantin, a cryptic lanthipeptide antibiotic uncovered using Bioactivity-Coupled HiTES. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(18), 5973–5977. <https://doi.org/10.1002/anie.201901342>
- Münch, D., Müller, A., Schneider, T., Kohl, B., Wenzel, M., Bandow, J. E., Maffioli, S., Sosio, M., Donadio, S., Wimmer, R., & Sahl, H.-G. (2014). The lantibiotic NAI-107 binds to bactoprenol-bound cell wall precursors and impairs membrane functions. *Journal of Biological Chemistry*, 289(17), 12063–12076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.537449>
- Noike, M., Matsui, T., Ooya, K., Sasaki, I., Ohtaki, S., Hamano, Y., Maruyama, C., Ishikawa, J., Satoh, Y., Ito, H., Morita, H., & Dairi, T. (2015). A peptide ligase and the ribosome cooperate to synthesize the peptide pheganomycin. *Nature Chemical Biology*, 11(1), 71–76. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1697>
- Oman, T. J., & van der Donk, W. A. (2009). Insights into the mode of action of the two-peptide lantibiotic Haloduracin. *ACS Chemical Biology*, 4(10), 865–874. <https://doi.org/10.1021/cb900194x>
- Ongey, E. L., & Neubauer, P. (2016). Lanthipeptides: chemical synthesis versus *in vivo* biosynthesis as tools for pharmaceutical production. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0502-y>
- Ortega, M. A., & van der Donk, W. A. (2016). New insights into the biosynthetic logic of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products. *Cell Chemical Biology*, 23(1), 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.11.012>
- Ortiz-López, F. J., Carretero-Molina, D., Sánchez-Hidalgo, M., Martín, J., González, I., Román-Hurtado, F., de la Cruz, M., García-Fernández, S., Reyes, F., Deisinger, J. P., Müller, A., Schneider, T., & Genilloud, O. (2020). Cacaoidin, first member of the new lanthidin RiPP family. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(31), 12654–12658. <https://doi.org/10.1002/anie.202005187>
- Ozaki, T., Minami, A., & Oikawa, H. (2023). Recent advances in the biosynthesis of ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptides of fungal origin. *The Journal of Antibiotics*, 76(1), 3–13. <https://doi.org/10.1038/s41429-022-00576-w>
- Pei, Z.-F., Zhu, L., Sarksian, R., van der Donk, W. A., & Nair, S. K. (2022). Class V lanthipeptide cyclase directs the biosynthesis of a stapled peptide natural product. *Journal of the American Chemical Society*, 144(38), 17549–17557. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c06808>
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert review of anti-infective therapy*, 11(3), 297–308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>
- Poorinmohammad, N., Bagheban-Shemirani, R., & Hamedi, J. (2019). Genome mining for ribosomally synthesised and post-translationally modified peptides (RiPPs) reveals undiscovered bioactive potentials of *Actinobacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 112(10), 1477–1499. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01276-6>
- Repka, L. M., Chekan, J. R., Nair, S. K., & van der Donk, W. A. (2017). Mechanistic understanding of lanthipeptide biosynthetic

enzymes. *Chemical Reviews*, 117(8), 5457–5520.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00591>

Richard, A. S., Zhang, A., Park, S.-J., Farzan, M., Zong, M., & Choe, H. (2015). Virion-associated phosphatidylethanolamine promotes TIM1-mediated infection by Ebola, dengue, and West Nile viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47), 14682–14687.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1508095112>

Roblero Mejía, O. (2023). Aplicación de minería de genomas para la detección de un péptido antimicrobiano y su posterior expresión heteróloga. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. Pp. 1-126.

Rodríguez Luna, S. D. (2019). Identificación y caracterización de un clúster biosintético asociado a lasso péptidos de *Streptomyces scabrissporus* NF3. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. Pp. 1-121.

Rodríguez, V. (2022). Insights into post-translational modification enzymes from RiPPs: A toolkit for applications in peptide synthesis. *Biotechnology Advances*, 56, 107908.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107908>

Rodríguez-Peña, K., Gómez-Román, M. P., Macías-Rubalcava, M. L., Rocha-Zavaleta, L., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. (2022). Bioinformatic comparison of three *Embleya* species and description of steffimycins production by *Embleya* sp. NF3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(8), 3173–3190. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11915-0>

Rubin, G. M., & Ding, Y. (2020). Recent advances in the biosynthesis of RiPPs from multicore-containing precursor peptides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(9–10), 659–674. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02289-1>

Russell, A. H., & Truman, A. W. (2020). Genome mining strategies for ribosomally

synthesised and post-translationally modified peptides. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1838–1851.

<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.032>

Santos-Aberturas, J., Chandra, G., Frattaruolo, L., Lacret, R., Pham, T. H., Vior, N. M., Eyles, T. H., & Truman, A. W. (2019). Uncovering the unexplored diversity of thioamidated ribosomal peptides in *Actinobacteria* using the RiPPER genome mining tool. *Nucleic Acids Research*, 47(9), 4624–4637.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkz192>

Shenkarev, Z. O., Finkina, E. I., Nurmukhamedova, E. K., Balandin, S. V., Mineev, K. S., Nadezhdin, K. D., Yakimenko, Z. A., Tagaev, A. A., Temirov, Y. V., Arseniev, A. S., & Ovchinnikova, T. V. (2010). Isolation, structure elucidation, and synergistic antibacterial activity of a novel two-component lantibiotic Lichenicidin from *Bacillus licheniformis* VK21. *Biochemistry*, 49(30), 6462–6472.

<https://doi.org/10.1021/bi100871b>

Shi, J., Ma, J.-Q., Wang, Y.-C., Xu, Z.-F., Zhang, B., Jiao, R.-H., Tan, R.-X., & Ge, H.-M. (2022). Discovery of daspyromycins A and B, 2-aminovinyl-cysteine containing lanthipeptides, through a genomics-based approach. *Chinese Chemical Letters*, 33(1), 511–515.

<https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2021.06.010>

Shin, J. M., Gwak, J. W., Kamarajan, P., Fenno, J. C., Rickard, A. H., & Kapila, Y. L. (2016). Biomedical applications of nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 120(6), 1449–1465.

<https://doi.org/10.1111/jam.13033>

Singh, M., Chaudhary, S., & Sareen, D. (2020). Roseocin, a novel two-component lantibiotic from an actinomycete. *Molecular Microbiology*, 113(2), 326–337.

<https://doi.org/10.1111/mmi.14419>

Singh, S. S., Sharma, D., Singh, C., Kumar, S., Singh, P., Sharma, A., Das, D. K., Pinnaka, A. K., Thakur, K. G., Ringe, R. P., & Korpole, S. (2023). Brevicillin, a novel lanthipeptide from the genus *Brevibacillus* with antimicrobial, antifungal, and antiviral activity. *Journal of Applied Microbiology*, 134(3).

<https://doi.org/10.1093/jambio/lxad054>

Skinnider, M. A., Johnston, C. W., Gunabalasingam, M., Merwin, N. J., Kieliszek, A. M., MacLellan, R. J., Li, H., Ranieri, M. R. M., Webster, A. L. H., Cao, M. P. T., Pfeifle, A., Spencer, N., To, Q. H., Wallace, D. P., Dejong, C. A., & Magarvey, N. A. (2020). Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences. *Nature Communications*, 11(1), 6058. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19986-1>

Tietz, J. I., Schwalen, C. J., Patel, P. S., Maxson, T., Blair, P. M., Tai, H.-C., Zakai, U. I., & Mitchell, D. A. (2017). A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape. *Nature Chemical Biology*, 13(5), 470–478. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2319>

van der Donk, W. A., & Nair, S. K. (2014). Structure and mechanism of lanthipeptide biosynthetic enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 29, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.09.006>

van Heel, A. J., de Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W278–W281. <https://doi.org/10.1093/nar/gky383>

Vázquez Hernández, M. (2017). Minería genómica de una cepa de *Streptomyces* sp. aislada del cuachalalate: alternativa para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad farmacéutica. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. Pp. 1-108.

Vikeli, E., Widdick, D. A., Batey, S. F. D., Heine, D., Holmes, N. A., Bibb, M. J., Martins, D. J., Pierce, N. E., Hutchings, M. I., & Wilkinson, B. (2020). *In Situ* activation and

heterologous production of a cryptic lantibiotic from an african plant ant-derived *Saccharopolyspora* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.01876-19>

Wu, C., & van der Donk, W. A. (2021). Engineering of new-to-nature ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.022>

Xu, M., Zhang, F., Cheng, Z., Bashiri, G., Wang, J., Hong, J., Wang, Y., Xu, L., Chen, X., Huang, S., Lin, S., Deng, Z., & Tao, M. (2020). Functional genome mining reveals a class V lanthipeptide containing a D-amino acid introduced by an F₄₂₀H₂-dependent reductase. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(41), 18029–18035. <https://doi.org/10.1002/anie.202008035>

Zhang, Q., Doroghazi, J. R., Zhao, X., Walker, M. C., & van der Donk, W. A. (2015). Expanded natural product diversity revealed by analysis of lanthipeptide-like gene clusters in *Actinobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13), 4339–4350. <https://doi.org/10.1128/AEM.00635-15>

Zhao, M. (2011). Lantibiotics as probes for phosphatidylethanolamine. *Amino Acids*, 41(5), 1071–1079. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0386-9>

Zhao, X., & van der Donk, W. A. (2016). Structural characterization and bioactivity analysis of the two-component lantibiotic Flv system from a ruminant bacterium. *Cell Chemical Biology*, 23(2), 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.11.01>

Ziemert, N., Alanjary, M., & Weber, T. (2016). The evolution of genome mining in microbes – a review. *Natural Product Reports*, 33(8), 988–1005. <https://doi.org/10.1039/C6NP00025H>

Coproducción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos por *Enterobacter soli* en cultivo sumergido

Ana Patricia Gayosso¹, José Andrés Herrera¹, Neith Aracely Pacheco², Ricardo Hernández^{3*}

¹Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Amatlán de los Reyes, Ver. CP 94946.

²Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco subsección sureste, Mérida, Yuc. CP 97302.

³ CONAHCYT-Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Amatlán de los Reyes, Ver. CP 94946.

*odracerhema@gmail.com

Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son biopolímeros intracelulares, que en los últimos años, han generado gran interés debido a que poseen características similares a la de plásticos sintéticos además, son de naturaleza biológica y biodegradables. Sin embargo, su industrialización es un reto debido a que los costos de producción son de 4 a 9 veces mayores que el requerido para los plásticos sintéticos, por lo cual surge la necesidad de diseñar estrategias que contribuyan a disminuir los costos de producción. De esta manera, la coproducción de PHA con otros metabolitos de interés industrial surge como alternativa para dar valor agregado a moléculas cuya industrialización es condicionada por los altos costos de producción. Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del tiempo de cultivo y la fuente de carbono (sacarosa, fructosa y glucosa) sobre la coproducción de PHA y exopolisacáridos por *Enterobacter soli* en cultivo sumergido. Los resultados obtenidos indicaron que la producción de los biopolímeros esta en función del tiempo de cultivo, por otro lado, al evaluar diferentes fuentes de carbono la producción de exopolisacáridos no mostró diferencias significativas, mientras que la mayor producción de PHA se obtuvo en presencia de sacarosa.

Palabras Claves: *Biopolímero, bioplástico, exopolisacárido, coproducción*

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are intracellular biopolymers, which in recent years, have generated great interest because they have similar characteristics to synthetic plastics, in addition, they are from biological nature and biodegradable. However, its industrialization is a challenge because production costs are 4 to 9 times higher than that required for synthetic plastics, so there is a need to design strategies that contribute to reducing production costs. In this way, the PHAs co-production with other metabolites of industrial interest emerges as an alternative to give added value to molecules whose industrialization is conditioned by high production costs. Therefore, the present was evaluated the effect of cultivation time and carbon source (sucrose, fructose and glucose) on the co-production of PHAs and exopolysaccharides using *Enterobacter soli* in submerged culture. The results indicated that the production of biopolymers is a function of cultivation time, on the other hand, when evaluating different carbon sources, the production of exopolysaccharides did not show significant differences, while the highest production of PHA was obtained when sucrose was used.

Key Words: *Biopolymer, bioplastic, exopolysaccharide, co-production*

Introducción

Los polihidroxicanoatos (PHA) son biopolímeros intracelulares sintetizados por microorganismos como reserva de carbono y energía en respuesta a condiciones de crecimiento adversas (Wang et al., 2019; Kumar et al., 2018; Luo et al., 2020). A lo largo de los años se ha demostrado que los PHA poseen características fisicoquímicas similares a los plásticos convencionales como el polipropileno y el poliestireno (Khatami et al., 2021), por lo cual son considerados clasificados como bioplásticos (Dilshad et al., 2021), dichas características los convierten en una alternativa natural para sustituir a los plásticos convencionales.

Dentro de los principales microorganismos conocidos como productores de PHA se puede destacar bacterias como *Ralstonia* sp., *Bacillus* sp., *Halomonas* sp. y *Pseudomonas* sp. Asimismo, se ha reportado que las características del biopolímero dependerán de la fuente de carbono y el microorganismo utilizado, y dependiendo de estos se sintetizan diversas unidades monoméricas de hidroxiácidos dentro de la cadena principal, siendo estas unidades las que determinan la aplicación más adecuada (textil, biomédico, agrícola, farmacéutico, entre otros) (Ghosh et al., 2021; Kumar et al., 2021). Por ello, se ha generado interés entre la comunidad científica, generando la expectativa de búsqueda de microorganismos productores de PHA. No obstante, pese a las ventajas que presentan los PHA sobre los plásticos convencionales, la industrialización de estos biopolímeros se ve limitada por los altos costos de producción que van de 4 a 9 veces mayor en comparación a los plásticos sintéticos (Kosseva y Rusbandi 2018).

En la actualidad, la coproducción de metabolitos en un mismo sistema ha surgido como como estrategia adecuada para la disminución de costos de producción (Kopperi et al., 2021; Kumar et al., 2018). La coproducción hace énfasis en lograr enfoques integradores que conduzcan hacia la obtención de múltiples productos en una misma línea de producción, de esta manera se permite obtener beneficios adicionales al darle valor agregado a metabolitos con valores relativamente bajos (como los PHA), a partir de la co-síntesis de productos con aplicaciones rentables en distintos sectores

industriales (Bongiovani et al., 2019; Dzurendova et al., 2020). En el caso de los PHA se ha reportado su coproducción con exopolisacáridos (EPS) en cultivo sumergido, por ejemplo, Soto et al., 2021 indicaron que *Yangia* sp ND199 co-sintetizó $3.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PHA y $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de EPS utilizando fructosa como fuente de carbono; Bathia et al., 2022 reportaron que *Sphigobium yanoikuyae* BBL01 acumuló 40.8% p/p de PHA, mientras que produjo $2.83 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de EPS, empleando como sustrato biomasa hidrolizada de pino. Por otra parte, Kopperi et al., 2020 obtuvieron valores de 2.62 y $3.92 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PHA y EPS, respectivamente, utilizando glucosa como fuente de carbono y como microorganismo la bacteria *Providencia* sp.

Los EPS son polímeros con actividades fisiológicas y funcionales que tienen diversas aplicaciones en la industria de alimentos y medicina, por lo que son considerados biomoléculas de alto interés industrial (Xu et al., 2019; Zhao et al., 2021). En el sector alimenticio los EPS son utilizados como agentes espesantes, estabilizadores o emulsionantes debido a sus propiedades reológicas; por otra parte, en el campo médico sirven como antioxidantes, antibacteriano, anticancerígeno, antihipertensivo y potenciador de la inmunorregulación (Yalda et al., 2019; Zhou et al., 2019).

En el caso particular del género *Enterobacter* se ha observado la capacidad de producir PHAs y EPS, sin embargo, los estudios publicados solo se han centrado en la obtención de dichos biopolímeros sin considerar la coproducción en un mismo sistema (Dhanya et al., 2021; Kringsly et al., 2022; Prakash et al., 2021, Rakkan et al., 2023). Pese a los beneficios que ofrece la generación de bioplásticos como los PHAs, en México no existe investigación suficiente para establecer la producción comercial sostenible, es por ello que el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la coproducción de PHA y EPS por la bacteria *Enterobacter soli* utilizando diferentes fuentes de carbono.

Materiales y Métodos

Microorganismo

La coproducción de PHAs y EPS fue realizada utilizando *Enterobacter soli* perteneciente al cepario del Laboratorio de Biotecnología

Microbiana del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba.

Pruebas cualitativas para la determinación de la producción de polihidroxicanoatos

Para determinar la capacidad de producción de PHA por la bacteria *Enterobacter soli* se realizaron dos pruebas cualitativas: Tinción de gránulos con Negro de Sudan y determinación en caja Petri con Azul de Nilo.

Tinción de gránulos

La cepa *E. soli* se inoculó en placas de agar nutritivo suplementado con 20 g/L de sacarosa, y se mantuvo a 28 °C durante 48 h. Posterior al tiempo de incubación se realizó un frotis a partir de las colonias crecidas en el medio, tiñendo la superficie del portaobjetos con una solución de Negro de Sudán B al 0.3% (en etanol al 70%). Después de 10 min el portaobjetos con la muestra se lavó con xileno, seguido de una coloración con safranina al 0.5% (Prabhudev et al., 2023).

Medio Azul de Nilo

La cepa *E. soli* se inoculó en placas de agar nutritivo suplementada con 8 g/L de sacarosa y 0.5 mg/mL de azul de Nilo B y se mantuvo a 28 °C durante 72 h. La aparición de un color naranja fluorescente tras la irradiación con luz ultravioleta de las colonias que crecieron en las placas son indicativo resultado positivo para la producción de PHAs (Vega-Vidaurre et al., 2022).

Preparación del inóculo y conservación de la cepa

La cepa se reactivó en tubos inclinados con agar nutritivo (23 g·L⁻¹) suplementado con glucosa (10 g·L⁻¹), y fue mantenida a 28 °C por 24 h. La cepa reactivada se inoculó en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de medio compuesto por (g·L⁻¹): caldo nutritivo (8) y glucosa (20 g·L⁻¹). Los matraces se mantuvieron a 32 °C por 24 h a 150 rpm, la biomasa producida se consideró como el inóculo.

Para la conservación, la cepa se inoculó en tubos inclinados de Agar Nutritivo (23 g·L⁻¹) suplementado con glucosa (10 g·L⁻¹) y se mantuvo a 32 °C por 24 h. La biomasa producida en los tubos se cosecho con 5 mL de tween 80 al 0.01% y la suspensión fue inoculada (para aumentar la biomasa) en matraces Erlenmeyer que contenían Caldo Nutritivo. El cultivo se mantuvo a 32 °C por 24

h a 150 rpm, la biomasa se recuperó por centrifugación a 10,000 x g por 15 min, el pellet obtenido se lavó dos veces y fue resuspendido en agua. Finalmente, la suspensión fue colocada en criovales que contenían glicerol al 50 % y esferas de vidrio estériles y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso (Castilla-Marroquín et al., 2020). A la cepa conservada se le determinó viabilidad al menos cada tres meses y fue conservada periódicamente.

Coproducción de Polihidroxicanoatos y Exopolisacáridos

La coproducción de PHAs y EPS se llevó a cabo por cultivo sumergido utilizando matraces de 125 mL que contenían 75 ml de medio compuesto por (g·L⁻¹): caldo nutritivo (8); fuente de carbono (20); (NH₄)₂SO₄, 2 y KH₂PO₄ (1.5), ajustando el inóculo a 2x10⁵ UFC·mL⁻¹ y fue mantenido en agitación a 32 °C y 150 rpm. Para determinar el efecto de la fuente de carbono sobre la coproducción de metabolitos se utilizó sacarosa, glucosa y fructosa.

Extracción de Polihidroxicanoatos

La extracción de PHA se realizó por digestión de acuerdo a lo descrito por Meneses et al., 2022 con algunas modificaciones. La biomasa producida en el sistema se separó del medio del cultivo por centrifugación a 10,000 x g por 15 min, fue lavada dos veces con agua destilada y liofilizada. La digestión fue realizada resuspendiendo la biomasa en 3 mL de solución de hipoclorito de sodio al 5% (v/v), la mezcla fue mantenida a temperatura ambiente por 3 h y centrifugada, los pellets recuperados fueron lavados con agua destilada. Finalmente, la purificación de los PHAs se realizó lavando con isopropanol frío y secados por liofilización para su análisis.

Recuperación de Exopolisacáridos

Los EPS fueron recuperados por precipitación adicionando 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío por cada volumen de sobrenadante; la mezcla fue mantenida a 4°C por 24 h (Anguluri et al., 2022). Los EPS precipitados se recuperaron por centrifugación a 10,000 x g, fueron lavados dos veces con etanol al 80% (v/v) y se liofilizaron para su análisis (Aramsangtienchai et al., 2020).

Caracterización de Polihidroxicanoatos y Exopolisacáridos

Los PHA y EPS producidos por *E. coli* se caracterizaron mediante la técnica espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (F-TIR). Los espectros infrarrojos de las muestras purificadas se registraron en la región 4000-400 cm^{-1} (Soto et al., 2020).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza unidireccional para detectar diferencias significativas entre las medias de los resultados obtenidos a partir de las diferentes fuentes de carbono. Para realizar la separación de medias se hizo la prueba de Tukey con un $\alpha = 0.05$.

Resultados y Discusión

Determinación de la capacidad de producción de polihidroxicanoatos

Se realizaron las pruebas de tinción con Negro de Sudán B y siembra en medio Azul de Nilo

para verificar la capacidad de producción de PHA por *Enterobacter coli*, los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 1. El resultado de ambas pruebas fue positivo para la producción de PHAs, por un lado la tinción con Negro de Sudán B indicó la presencia de gránulos negros al interior de la célula (figura 1A), esta reacción sucede debido al contacto del colorante con el grupo ácido de los PHAs. Mientras que, los resultados de la siembra en placas con Azul de Nilo demostraron que el crecimiento celular al ser irradiado con luz ultravioleta mostraba una coloración naranja fluorescente (figura 1B), indicando la presencia de PHAs en el medio. De acuerdo con Hong et al., 2020 el Azul de Nilo es un colorante lipofílico que emite fluorescencia en entornos hidrofóbicos, es por ello por lo que los PHA al ser de naturaleza lipídica interaccionan con el colorante, resultando en la coloración fluorescente en luz ultravioleta. Con los resultados obtenidos en las pruebas cualitativas se determinó que *E. coli* tiene la capacidad de acumular PHAs.

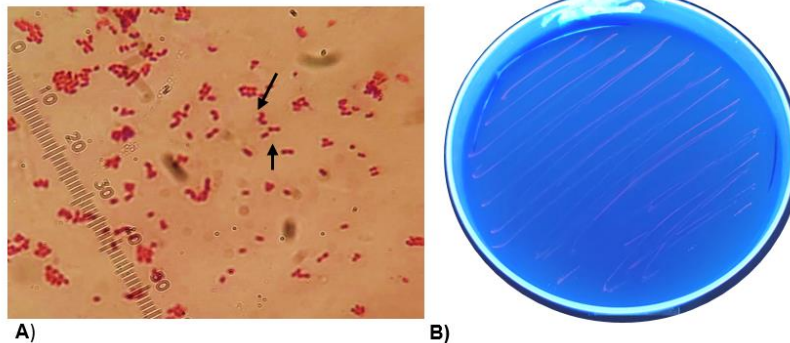


Figura 1. Pruebas cualitativas para la determinación de capacidad de producción de PHA. A) Tinción con Negro de Sudán, presencia de inclusiones negras al interior de la célula correspondientes a gránulos de PHA. B) Acumulación de PHA detectada por el método Azul de Nilo.

Producción de polihidroxicanoatos

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de PHA utilizando sacarosa, glucosa y fructosa como fuente de carbono. Los resultados de la producción de biomasa y PHAs que se muestran en la figura 2 y 3 muestran que tanto la producción de biomasa como PHAs fue mayor cuando se utilizó sacarosa como fuente de carbono. Sin embargo, la máxima producción de PHAs fue observada a las 48 h mientras que la máxima producción de biomasa a las 96 h con las tres fuentes de

carbono (Figura 2). Los resultados obtenidos pueden ser el reflejo del posible agotamiento de nutrientes, la baja disponibilidad de enzimas para la biosíntesis de PHAs y/o el consumo de PHAs como fuente de carbono por las células microbianas (reserva energética) (Gomaa, 2014), estos resultados apoyan a la determinación del tiempo adecuado para la recuperación de PHAs (Geethu et al., 2021). Por lo anterior se considera que el tiempo óptimo para la recuperación de PHA con *E. coli* es a las 48 h, en las condiciones evaluadas.

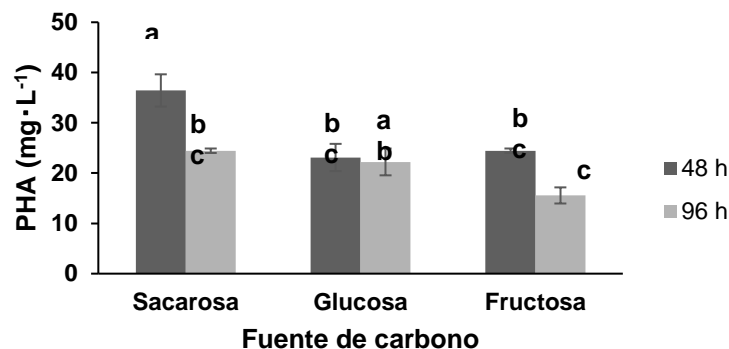


Figura 2. Producción de PHA por *E. coli* utilizando tres fuentes de carbono indicada en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Letras diferentes indican diferencias significativas.

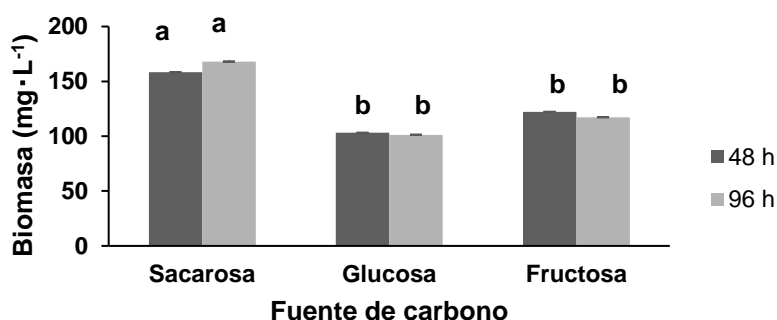


Figura 3. Producción de biomasa por *E. coli* utilizando diferentes fuentes de carbono indicada en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Los resultados de la evaluación del efecto de la fuente de carbono indicaron que la mayor producción de biomasa se obtuvo a las 96 h utilizando sacarosa ($168 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), mientras que la menor producción se presentó a las 96 h ($103 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en presencia de glucosa (Figura 3). Los resultados mostraron que no existe una relación entre la producción de biomasa y PHAs, ya que el mayor contenido de PHAs se observó a las 48 h en presencia de sacarosa 22.75% p/p y un rendimiento de $36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, seguido de glucosa (22.30% p/p, $23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y fructosa (19.7 % p/p, $23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), con respecto a la biomasa.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con lo reportado en la literatura, ya que se ha reportado el mayor rendimiento de biomasa y PHAs utilizando sacarosa como fuente de carbono. Asimismo, en 2022 Muneer et al. indicaron que al utilizar sacarosa al 2% con *Pseudomonas* sp. AK-3 y *Pseudomonas* sp. AK-4, cuando se obtenía la máxima concentración de biomasa había una

acumulación de PHB de 50 y 47% p/p, respectivamente. Además, Li et al., 2021 al evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono (azúcares y ácidos grasos de cadena corta) sobre la producción de PHB con la bacteria *Vibrio alginolyticus*, encontraron la mayor producción de biomasa ($4.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) con un contenido de PHB del 37% p/p utilizando sacarosa como fuente de carbono, en contraste, cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono la máxima concentración de biomasa fue de $1.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y el contenido de PHB fue menor al 10% p/p. También, estudios con la bacteria *Marinobacterium zhoushanense* mostraron que el mayor rendimiento de biomasa ($4.57 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y PHB ($2.89 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) fue obtenido en presencia de sacarosa (Wang et al., 2022).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se alinean a lo reportado por Clifton-García et al., 2020, quienes sugieren que para la producción de PHA es importante considerar el uso de microorganismos que metabolizan fuentes de carbono de bajo costo

y fácil disponibilidad como lo es la sacarosa, mismo que se puede encontrar en la melaza de caña de azúcar, un coproducto abundante en la industria azucarera (Sohn et al., 2020), motivo por el cual la producción de PHAs con *E. soli* puede ser un proceso susceptible de escalamiento para poder producir estas biomoléculas a gran escala.

Producción de exopolisacáridos

La cepa *Enterobacter soli* fue capaz de producir EPS en el mismo medio que se recuperaron los PHAs, utilizando diferentes fuentes de carbono (sacarosa, glucosa y fructosa) (Figura 4). Los rendimientos más altos se obtuvieron a las 48 h de incubación, los cuales oscilaron entre 1.24 a 1.45 g·L⁻¹. Aunque la mayor producción de EPS se observó cuando se utilizó fructosa como

fente de carbono, el análisis estadístico indicó que no existe diferencia significativa en el rendimiento de EPS a las 48 h con respecto al uso de sacarosa, glucosa y fructosa como fuente de carbono, tal y como se puede observar en la Figura 4. Los rendimientos obtenidos en el presente trabajo son superiores a lo reportado para bacterias ácido-lácticas como *Streptococcus thermophilus* 29 mg·L⁻¹ (Karadeniz et al., 2021) y *Lactobacillus paracasei* TD 062 0.609 g·L⁻¹ (Zhang et al., 2021). Sin embargo, bacterias del género *Leuconostoc* producen mayor contenido de EPS, por ejemplo, *L. mesenteroides* SN-8 produjo 2.42 g·L⁻¹ de EPS (Li et al., 2020) y *L. pseudomesenteroides* A24 3.726 g·L⁻¹ (Aita y Moon, 2020), teniendo sacarosa en el medio de cultivo a una concentración de 50 g/L.

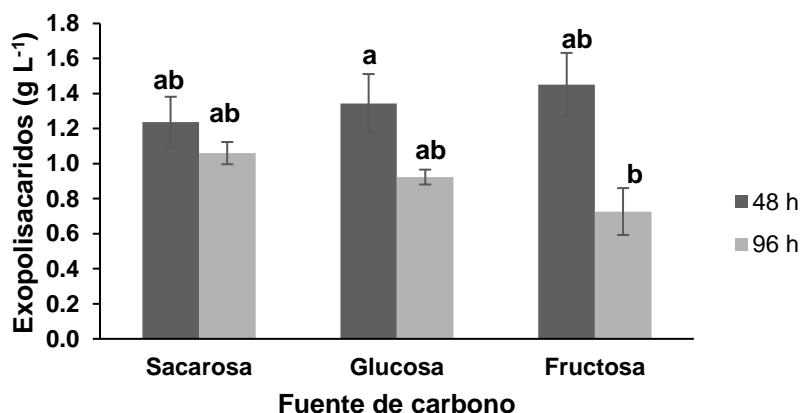


Figura 2. Rendimientos del precipitado recuperado en cultivo sumergido por *E. soli* con tres fuentes de carbono, indicado en g·L⁻¹. Letras diferentes indican diferencias significativas

Por lo anterior, se considera que los rendimientos de EPS obtenidos se encuentran dentro del rango de lo publicado en la literatura. Además, es importante considerar que la concentración de fuente de carbono en el medio fue inferior a lo reportado por los autores anteriores, por lo que el rendimiento de dichos biopolímeros por *E. soli* es susceptible de ser mejorado.

Conclusiones

Se demostró que *Enterobacter soli* es capaz de coproducir polihidroxialcanoatos y exopolisacáridos en el mismo cultivo, siendo la sacarosa la mejor fuente de carbono para la obtención de ambos polímeros.

Referencias

- Aita GM, Moon YH (2023) EPS-Producing Microorganisms from Louisiana's Crusher Juice and the Effect of Processing Conditions on EPS Production. *Sugar Tech*, 25: 482-490. <https://doi.org/10.1007/s12355-022-01235-y>
- Anguluri K, La China S, Brugnoli M, De Vero L, Pulvirenti A, Cassanelli S, Gullo M (2022) Candidate Acetic Acid Bacteria Strains for Levan Production, 14: 2000. <https://doi.org/10.3390/polym14102000>
- Aramsangtienchai P, Kongmon T, Pechroj S, Srisook (2020) Enhanced production and immunomodulatory activity of levan from the acetic acid bacterium, *Tanticharoenia sakaeratensis*, 163: 574-581.

Artículos

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.001>

Bathia SK, Gurav R, Ñim B, Kim S, Cho D-H, jung H, Kim Y-G, Yang Y-H (2022) Coproduction of exopolysaccharide and polyhydroxyalkanoates from *Sphingobium yanoikuyae* BBL01 using biochar pretreated plant biomass hydrolysate Bioresource Technology, 361: 127753.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127753>

Bongiovani N, Popovich CA, Martínez AM, Constela D, Leonardi PI (2019) Biorefinery Approach from *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978: Neutral Lipid and Carotenoid Co-Production Under Nitrate or Phosphate Deprivation. Bioenergy Research, 13: 518-529.

<https://doi.org/10.1007/s12155-019-10045-2>

Castilla-Marroquin JD, Hernández-Martínez R, Debernardi de la Vequia H, Rojas-López M, Hernández-Rosas F (2020). Dextran synthesis by native sugarcane microorganisms, 19: 177-185.
<https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1793>

Clifton-García B, González-Reynoso O, Robledo-Ortiz JR, Villafaña-Rojas J, González-García Y (2020) Forest soil bacteria able to produce homo and copolymers of polyhydroxyalkanoates from several pure and waste carbon sources. Letters in Applied Microbiology, 70(4): 300-309.

<https://doi.org/10.1111/lam.13272>

Dhanya BE, Athmika, Rekha PD (2021) Characterization of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter* sp. YU16-RN5 and its potential to alleviate cadmium induced cytotoxicity in vitro. 3 Biotech, 11 (12): 491.

<https://doi.org/10.1007/s13205-021-03034-w>

Dilshad E, Waheed H, Ali U, Amin A, Ahmed I (2021) General Structure and Classification of Bioplastics and Biodegradable Plastics. In Bioplastics for Sustainable Development. Kuddus M, Roohi (eds). Springer, Singapore. pp. 61-82.

Dzurendova S, Zimmermann B, Kohler A, Tafintseva V, Slany O, Certik M, et al (2020) Microcultivation and FTIR spectroscopy-based screening revealed a nutrient-induced coproduction of high-value metabolites in

oleaginous Mucoromycota fungi. PLoS ONE, 15(6): e0234870.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234870>

Geethu M, Chandrashekar HR, Divyashree MS (2021). Statical optimisation of polyhydroxyalkanoates production in *Bacillus endophyticus* using sucrose as sole source of carbon. Archives of Microbiology, 203: 5993-6005.

<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02554-6>

Ghosh S, Lahiri D, Nag N, Dey A, Sarkar T, Pathak SK, Atan H, Pati S, Ray R (2021) Bacterial biopolymer: its role in pathogenesis to effective biomaterials. Polymers, 13(8): 1242. Doi [10.3390/polym13081242](https://doi.org/10.3390/polym13081242)

Gomaa EZ (2014). Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) By *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* Grown on Cane Molasses Fortified with Ethanol. Brazilian Archives of Biology and Technology 57: 145-154, [10.1590/S1516-89132014000100020](https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100020)

Hong K, Beld J, Davis TD, Burkart MD, Palenik B (2020) Screening and characterization of polyhydroxyalkanoate granules, and phylogenetic analysis of polyhydroxyalkanoate synthase gene *PhaC* in cyanobacteria. Journal of Phycology 57(3): 754-765. <https://doi.org/10.1111/jpy.13123>

Karadeniz DG, Kaskatepe B, Kiyimaci ME, Tok KC, Gumustas M, Karaasian C (2021) Microbial exopolysaccharide production of *Streptococcus thermophilus* and its anti-quorum sensing activity. Archives of Microbiology, 203: 3331-3339.

<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02313-7>

Khatami K, Perez-Zabaleta M, Owusu-Agyeman I (2021) Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production?. Waste Management, 119: 374-388.

<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.10.008>

Kopperi H, Amulya A, Venkata S (2021) Simultaneous biosynthesis of bacterial polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS): Process optimization and Scale-up. Bioresource Technology, 341: 125735.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125735>

5

Kosseva MR, Rusbandi E (2018) Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. *Int. Journal of Biological Macromolecules*, 107: 762-778. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.054>

Kringsly JS, Chathalingath N, Parthiban ST, Sivakumar D, Sabtharishi S et al (2022) Utilization of sugarcane molasses as the main carbon source for the production of polyhydroxyalkanoates from *Enterobacter cloacae*. *Energy Nexus*, 6: 100071. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100071>

Kumar AN, Katakajwala R, Amulya K, Venkata S. 2021. Polyhydroxybutyrate Production from Dark-Fermentative Effluent and Composite Grafting with Bagasse Derived α -Cellulose in a Biorefinery approach. *Chemosphere*, 279: 130563. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130563>

Kumar P, Kim BS (2018) Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresource Technology*, 269: 544-556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.120>

Kumar P, Kim BS (2018) Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresource Technology*, 269: 544-556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.120>

Li H-F, Wang M-R, Tian L-Y, Li Z-J (2021) Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Vibrio alginolyticus* Strains Isolated from Salt Fields. *Molecules*, 26(20): 6283. <https://doi.org/10.3390/molecules26206283>

Luo C-B, Li H-C, Li D-Q, Nawaz H, You TT, Xu (2022) Efficiently unsterile polyhydroxyalkanoate production from lignocellulose by using alkali-halophilic *Halomonas alkalicola* M2. *Bioresource Technology*, 351: 126919. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126919>

Meneses L, Esmail A, Matoa M, Sevrin C, Grandfils C, Barreiros S, Reis MAM, Freitas F, Paiva A (2022) Subcritical Water as a Pre-Treatment of Mixed Microbial Biomass for the Extraction of Polyhydroxyalkanoates. *Bioengineering*, 9: 302.

<https://doi.org/10.3390/bioengineering9070302>

Muneer F, Rasul I, Oasim M, Sajid A, Nadeem H (2020) Optimization, Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Indigenously Isolated Novel Bacteria. *Journal of Polymers and the Environment*, 30: 3523-3533. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02444-y>

Prabhudev S, Shihavi K, Prakashrao (2023) Polyhydroxyalkanoates biosynthesis and optimization of thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain K4E3_SPR_NPP. *Extremophiles* 27 (13). <https://doi.org/10.1007/s00792-023-01300-8>

Prakash K, Rajkumar P, Ramya V, Sivabalan S, Kings AJ, Monisha LR (2021) Exopolysaccharide production by optimized medium using novel marine *Enterobacter cloacae* MBB8 isolate and its antioxidant potential. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2: 100070. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100070>

Rakkan T, Paichid N, Sangkharak K (2022) The Integration of Methylene Blue Decolorization with Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production Using *Enterobacter* Strain TS1L. *Journal of Polymers and the Environment*, 31: 1202-1208. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02692-y>

Sohn YJ, Kim, HT, Baritugo K-A, Song HM, Ryu MH, Kang KH, Jo SY, Kim H, Kim YJ, Choi J et al (2020). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from sucrose by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149: 593-599. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.254>

Soto L, Thabet H, Maghembe R, Gameiro D, Van-Thuoc D, Dishisha T, Hatti-Kaul R (2020) Metabolic potential of the moderate halophile *Yangia* sp. ND199 for co-production of polyhydroxyalkanoates and exopolysaccharides. *Microbiology Open*, 10: e1160. Doi 10.1002/mbo3.1160

Vega-Vidaurre JA, Hernández-Rosas F, Ríos-Corripio MA, Rojas-López M, Hernández-Martínez R (2022). Coproduction of polyhydroxyalkanoates and

Artículos

exopolysaccharide by submerged fermentation using autochthonous bacterial strains. *Chemical Papers*, 76: 2419-2429. <https://doi.org/10.1007/s11696-021-02046-3>

Wang M-R, Li H-F, Yi J-J, Tao S-Y, Li (2022) Production of polyhydroxyalkanoates by three novel species of *Marinobacterium*. *Int. Journal of Biological Macromolecules*, 195(15): 255-263. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.019>

Xu Y, Cui Y, Yue F, Liu L, Shan Y, Liu B, Zhou Y, Lü X (2019) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*: structures, physiochemical functions and applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, 94: 475-499.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.032>

Yalda RS, Ahmad YK, Bahram PG A (2019) A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrates Polymers*, 217: 79-89.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.025>

Zhao D, Jiang J, Liu L, Wang S, Ping W, Ge J (2021) Characterization of exopolysaccharides produced by *Weissella confusa* XG-3 and their potential biotechnological applications. *Int. Journal of Biological Macromolecules*, 178: 306-315.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.182>

Descifrando la comunicación celular en *Bacillus*: Influencia del pH en la esporulación y la heterogeneidad celular

Lorena Yamileth Balón Rosas^{1*}, Agustín Luna Bulbarela¹, Leobardo Serrano Carreón^{1,2}, Enrique Galindo Fentanes^{1,2}.

¹. Instituto de Biotecnología, UNAM. Depto. Ingeniería Celular y Biocatálisis. Av. Universidad 2001, Chamilpa 62210, Cuernavaca, Mor.

². Agro&Biotecnia S de RL de CV, Limones 8, Amate Redondo 62334, Cuernavaca, Mor.

*lorena.balon@ibt.unam.mx

Resumen

Las formulaciones basadas en esporas de *Bacillus spp.*, tienen larga vida de anaquel, siendo uno de los factores clave en el éxito comercial de estas bacterias como agentes de biocontrol. Tal es el caso de las esporas viables de *Bacillus velezensis* 83 (*Bv83*), que son el principio activo del biofungicida mexicano Fungifree ABTM. Las células vegetativas de *Bacillus*, se diferencian a subpoblaciones isogénicas que coexisten en un mismo ambiente; esta heterogeneidad celular está regulada por dos sistemas de comunicación celular (*quorum sensing*, QS): ComQXPA y Rap/Phr que activan la esporulación y la producción de compuestos antimicrobianos y del polímero γ -PGA. En *Bv83*, a pH 6.8, la presencia de γ -PGA es un problema, porque incrementa la viscosidad de los caldos de cultivo, provocando limitaciones en el mezclado y en la transferencia de oxígeno, lo que complica el crecimiento y la esporulación. No obstante, resultados previos muestran que a pH 5.0 se reprime la producción de γ -PGA, pero también la esporulación (ambos regulados por ComQXPA y Rap/Phr). Nuestro trabajo permitió entender el efecto del pH sobre la red de QS, el crecimiento y la esporulación de *Bv83*. Concluimos que, la acidez del medio no afecta consistentemente los genes *comQXPA* y *rap/phr*, pero si hay una influencia negativa de la acidez en los genes que codifican para la esporulación, la síntesis del polímero γ -PGA y la producción de lipopéptidos (Bacilomicina D y surfactina), compuestos importantes para ejercer el biocontrol.

Palabras Claves: *Bacillus*, esporulación, heterogeneidad celular, *quorum sensing*

Abstract

Bacillus spore-based formulations possess long shelf life, being a key factor in the commercial success of these bacteria as biocontrol agents. In México, *Bacillus velezensis* 83 spores are the active ingredient of the biofungicide FungifreeAB™. In this bacteria, vegetative cells differentiate into isogenic subpopulations that coexist in the same environment; this cellular heterogeneity is regulated by two cellular communication (*quorum sensing*, QS) systems: ComQXPA and Rap/Phr, which activate sporulation and the production of antimicrobial compounds and the γ -PGA polymer. In *Bv83*, at pH 6.8, the presence of γ -PGA is a problem as it increases the viscosity of the culture broths, causing limitations in mixing and oxygen transfer, complicating the cell growth and sporulation. However, previous results show that at pH 5.0, γ -PGA production is repressed, but so is sporulation (both regulated by ComQXPA and Rap/Phr).

Our work allowed us to understand the pH effect on the QS network, growth, and sporulation of *Bv83*. We conclude that the acidity of the medium does not consistently affect the *comQXPA* and *rap/phr* genes. However, there is a negative influence of acidity on genes encoding for sporulation, γ -PGA polymer synthesis and the production of lipopeptides (bacilomycin D and surfactin), essential compounds for exerting biocontrol.

Key Words: *Bacillus*, sporulation, cellular heterogeneity, *quorum sensing*

Introducción

Durante los últimos años, el uso de pesticidas químicos se ha incrementado significativamente con el objetivo de prevenir, mitigar o destruir plagas, reducir la pérdida en la producción agrícola y mejorar la calidad de los alimentos. Sin embargo, el uso excesivo de pesticidas químicos, contribuye significativamente a la contaminación ambiental y al desarrollo de patógenos resistentes a estos productos. Además, presentan un problema de salud para el agricultor (que lo aplica) como para el cliente que consume los alimentos. Es por ello por lo que una alternativa más sostenible para obtener una productividad agrícola rentable y segura es el empleo de agentes de control biológico (Galindo *et al.*, 2013; Polyxeni *et al.*, 2016; Tudi *et al.*, 2021). Entre los microorganismos usados como agentes de control biológico se encuentran varias especies del género *Bacillus*, donde los mecanismos de biocontrol están relacionados con la producción de metabolitos antimicrobianos, la competencia nutricional y espacial para proteger y limitar el acceso de los patógenos a los nutrientes, la degradación de moléculas producidas por el patógeno (mediante un proceso conocido como *quorum quenching*), la producción de compuestos volátiles (que tienen un potencial antifúngico) y la inducción de la resistencia sistémica en la planta (Balderas-Ruiz *et al.*, 2020; Fira *et al.*, 2018; Lucke *et al.*, 2020; Rabbee *et al.*, 2019; Serrano & Galindo, 2007). Además, una característica de *Bacillus* que los destaca como un buen agente de control biológico es que las células en crecimiento vegetativo son inducidas a diferenciarse en esporas en respuesta al agotamiento de nutrientes, las cuales, son un tipo celular que están metabólicamente inactivas y son resistentes a condiciones severas, como altas temperaturas, desecación y radiación. Posteriormente, cuando las condiciones ambientales son propicias, la espora germina y vuelve al estado vegetativo. Esto es de gran importancia biotecnológica ya que las esporas permiten la preservación y propagación de la información genética al sobrevivir en condiciones extremas durante largos periodos de tiempo, por lo que representan una opción ideal para producir formulaciones comerciales en polvo con una larga vida de anaquel, adecuadas para su uso en agricultura como biopesticidas (Balderas-Ruiz *et al.*, 3 2020;

Christie & Setlow, 2020; Cristiano-Fajardo *et al.*, 2019; Mckenney *et al.*, 2013; Piggot & Hilbert, 2004; Saggese *et al.*, 2021)

***Bacillus velezensis* 83: un aliado efectivo contra fito-patógenos**

El equipo del Dr. Enrique Galindo y el Dr. Leobardo Serrano (Instituto de Biotecnología, UNAM) en colaboración con el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, Culiacán), desarrollaron el biofungicida mexicano "Fungifree AB", formulado con las esporas viables de *Bacillus velezensis* 83 (Bv83) (anteriormente conocida como *Bacillus subtilis* 83 o *Bacillus amyloliquefaciens* 83) (Balderas-Ruiz *et al.*, 2020; Galindo *et al.*, 2013). Bv83, aislada de la filósfera del árbol de mango, es una bacteria aeróbica Gram positiva, antagonista natural de *Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Botrytis*, *Sphaerotheca* y *Leveillula*, por lo que el biofungicida Fungifree AB es muy efectivo para el biocontrol de estos hongos, en cultivos de gran importancia agrícola (mango, papaya, cítricos, tomate, fresas, berries, aguacate, entre otros). Esta cepa tiene la capacidad de producir compuestos antimicrobianos como la surfactina y la bacilomicina D, metabolitos de sobreflujo de carbono como la acetoína, el 2,3-butanodiol y el acetato, así como el ácido γ -polyglutámico (γ -PGA) (Balderas-Ruiz *et al.*, 2020; Cristiano-Fajardo *et al.*, 2019; Luna-Bulbarela *et al.*, 2018).

Heterogeneidad celular: una decisión regulada por quorum sensing

Las células vegetativas de *Bacillus* tienen la capacidad de diferenciarse a varias subpoblaciones isogénicas con funciones especializadas que coexisten en un mismo ambiente (López & Kolter, 2010; Tasaki *et al.*, 2017). Tal heterogeneidad celular ocurre a través de procesos altamente coordinados que se rigen por *quorum sensing* (QS). El QS es un mecanismo de comunicación celular, que permite a una población bacteriana actuar de manera concertada y dependiente de la concentración celular, mediante el intercambio de moléculas de señalización difusibles, conocidas como autoinductores (AI) (Antunes & Ferreira, 2009; Kalia, 2015). En *Bacillus velezensis*, los sistemas ComQXPA y Rap/Phr están involucrados en la diferenciación de células vegetativas a células

productoras de polímero γ -PGA y de compuestos antimicrobianos como la surfactina y la bacilomicina D, durante el crecimiento celular. Así como, en la diferenciación de células vegetativas a esporas, durante la limitación nutricional. En la figura 1 se indica que, en el sistema ComQXPA, la concentración crítica del autoinductor ComX induce la fosforilación del regulador de respuesta ComA al unirse a ComP (receptor histidina-quinasa unido a membrana). ComA fosforilado activa la transcripción de *degQ*, involucrado en la fosforilación de DegU, que, a su vez promueve la activación del operón *pgsBAC*, que codifica para la γ -PGA sintasa (Anju *et al.*, 2019;

Nordgaard *et al.*, 2021). Además, ComX promueve la expresión de los péptidos Phr, que son necesarios para la activación del regulador maestro de esporulación Spo0A y para inhibir a las fosfatasa Rap (Boguslawski *et al.*, 2015; Špacapan *et al.*, 2020). En los sistemas Rap/Phr, el péptido Phr se secreta al entorno extracelular para ser procesado proteolíticamente y, posteriormente, ser importado al citoplasma por la oligopermeasa Opp, donde los Phr evitan que su fosfatasa Rap afin reprima la actividad de sus reguladores diana (Spo0F, DegU o ComA), (Figura 1) (Anju *et al.*, 2019; Gallegos-Monterrosa & Kovács, 2023).

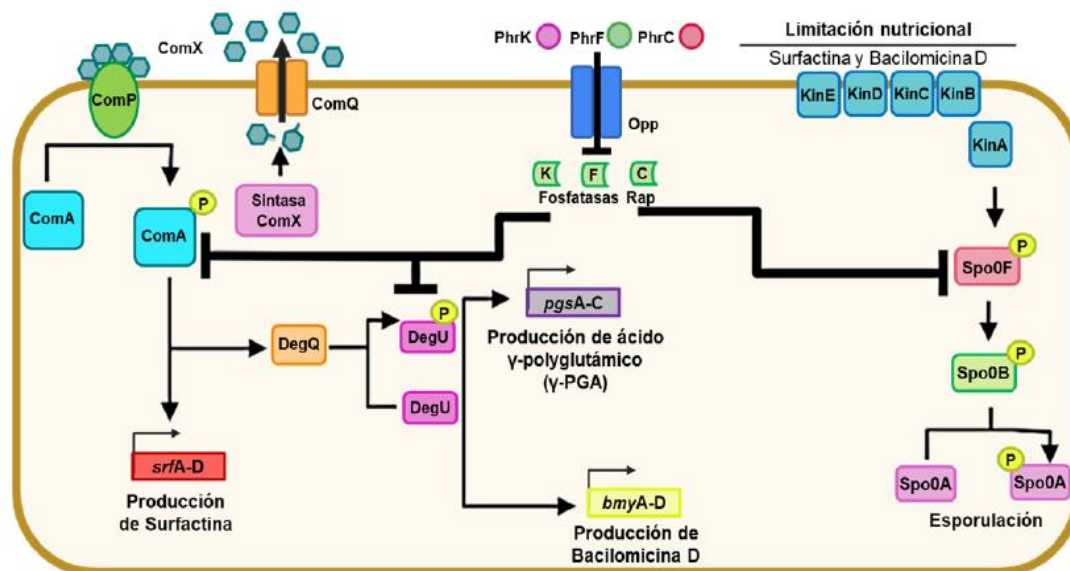


Figura 1. Mecanismo de QS: ComQXPA y Rap/Phr en *Bacillus velezensis*

Acidificando la conversación: efecto del pH ácido en los sistemas ComQXPA y Rap/Phr

En 2007, Okada y colaboradores reportaron que en *Bacillus mojavensis*, el autoinductor ComX es ácido-lábil (tratamiento con ácido trifluoroacético, TFA al 5%) (Okada *et al.*, 2007). No obstante, estudios previos en *Bacillus subtilis* reportaron que en cultivos a pH ácido no se produce surfactina y afecta la

actividad de la oligopermeasa Opp (Cosby *et al.*, 1998). Asimismo, Cosby y Zuber identificaron que, en *Bacillus subtilis*, el pH ácido disminuye la actividad del regulador maestro de QS: SigH (Cosby & Zuber, 1997). Mientras que, en *Bacillus amyloliquefaciens* MBNC, a pH 5.5 se reprimen los genes involucrados en la esporulación y en la producción de biofilm (Chowdhury *et al.*, 2021). Finalmente, en nuestro grupo de investigación, Cristiano-Fajardo y

colaboradores identificaron que en *Bacillus velezensis* 83, la esporulación, la síntesis de γ -PGA y la producción de lipopéptidos (bacilomicina D y surfactina) se abaten en cultivos en lote a pH 5.0, en contraste con los cultivos a pH 6.8, donde esporula y se produce el polímero en cantidades significativas. La presencia de γ -PGA incrementa la viscosidad de los caldos de cultivo, provoca limitaciones en el mezclado, la transferencia de oxígeno y dificulta la recuperación de las esporas (Cristiano-Fajardo *et al.*, 2019). Estos estudios previos nos permitieron sugerir que los sistemas ComQXPA y/o Rap/Phr pueden verse afectados negativamente a nivel transcripcional a pH ácido, lo que llevaría a una sub-expresión de los genes regulados por estos dos sistemas de QS en *Bacillus*.

Revelando el diálogo invisible en *Bacillus velezensis*: cambios transcriptómicos del QS por efecto del pH ácido

Con el objeto de entender lo que sucede a pH ácido (5.0), en términos de la expresión de los genes que codifican para las proteínas ComQXPA y Rap/Phr en *Bacillus velezensis*, se realizó un análisis transcripcional mediante RNAseq durante la etapa de crecimiento y transición celular (célula vegetativa a espora). Para ello, las cinéticas de *Bacillus velezensis* 83 se realizaron en cultivo en lote (por triplicado), bajo condiciones controladas en biorreactores de 10 L con medio mineral definido, utilizando glucosa como única fuente de carbono (10 g/L), bajo dos condiciones de pH de cultivo diferentes: 6.8 (control) y 5.0 (caso). Los parámetros para caracterizar este análisis (pH 5.0 vs pH 6.8), fueron: FDR (*False Discovery Rate*) = 0.05 y un logFC (*log Fold Change*) ≥ 2 (genes sobre-expresados significativamente), y ≤ -2 (genes sub-expresados significativamente).

Como se observa en la tabla 1, identificamos que la acidez del medio (pH 5.0 vs pH 6.8), afecta solamente al gen *comX* del sistema ComQXPA durante la etapa de crecimiento de Bv83. Mientras que, de los sistemas Rap/Phr,

solamente el gen *phrC* se sub-expresó durante la etapa de 5 agotamiento de glucosa.














No obstante, se observó que los genes que se sub-expresan significativamente por efecto del pH ácido, son en su mayoría aquellos que codifican para proteínas involucradas en la formación del tabique asimétrico entre la célula vegetativa y la pre-espora y en la formación del córtex de la pre-espora, así como genes que codifican para proteínas involucradas en la cascada de fosforilación para inducir la esporulación (*spo0F* y *spo0B*). Además, se identificó que entre los genes que se sub-expresaron durante esta etapa fueron aquellos que codifican para proteínas involucradas en la producción de surfactina y bacilomicina D, así como el operón que codifica para las proteínas involucradas en la producción y degradación de γ -PGA. Estos resultados demostrarían que, bajo condiciones ácidas, los genes que se ven afectados significativamente son los de menor jerarquía, y no los genes que codifican para reguladores transcripcionales maestros, mostrando que el efecto del pH ácido es específico en las funciones morfo-fisiológicas de Bv83, reduciendo la heterogeneidad celular bajo estas condiciones de pH ácido (cultivos más homogéneos).

De igual manera, se observó que, durante la etapa de transición a espora, el pH ácido no afectó la expresión de los genes que codifican para el sistema ComQXPA, pero sí se vio afectado negativamente el gen *phrC*, que, al estar sub-expresado, ya no reprime a la fosfatasa RapC, encargada de desfosforilar al regulador maestro ComA. Nuevamente, durante esta etapa, se identificó que entre los genes que se sub-expresaron por efecto del pH de cultivo ácido, se encontraron aquellos que codifican para proteínas involucradas en la producción de surfactina y bacilomicina D, así como el operón que codifica para las proteínas involucradas en la producción y degradación de γ -PGA (tabla 1).

Artículos

Tabla 1. Efecto del pH de cultivo en la expresión diferencial de genes de QS de *Bacillus velezensis* 83, durante la etapa de crecimiento y transición celular. Este análisis transcriptómico indica la comparación entre cultivos en lote a pH ácido (5.0) vs cultivos en lote a pH control (6.8), ambos con medio mineral en biorreactores de 10 L.

Flèche roja: gen sub-expresado significativamente ($\log FC \geq 2$). Flèche verde: gen sobre-expresado significativamente ($\log FC \leq -2$).

Genes de QS	Función de los productos codificados por los genes de <i>quorum sensing</i> .	Etapa de crecimiento celular	Etapa de transición celular
<i>comX</i>	Autoinductor maestro involucrado en la diferenciación de células vegetativas a células productoras de compuestos antimicrobianos (surfactina y Bacilomicina D), γ -PGA, biofilm y esporas.		Sin cambio significativo en su expresión.
<i>comQ</i>	Proteína acoplada a membrana que modifica y transporta a ComX al entorno extracelular.	Sin cambio significativo en su expresión.	Sin cambio significativo en su expresión.
<i>comP</i>	Regulador transcripcional que percibe a ComX. Esta interacción induce la fosforilación de ComA (proteína reguladora de respuesta).		Sin cambio significativo en su expresión.
<i>comA</i>	Regulador maestro que al ser fosforilado activa la transcripción de genes involucrados en la diferenciación a células productoras de compuestos antimicrobianos (surfactina y Bacilomicina D), γ -PGA, biofilm y esporas.	Sin cambio significativo en su expresión.	Sin cambio significativo en su expresión.
<i>srfA-D</i>	Operón que codifica para la sintasa productora de Surfactina, lipopéptido importante para el biocontrol.		
<i>degQ</i>	Proteína encargada de fosforilar al regulador maestro DegU.		Sin cambio significativo en su expresión.
<i>degU</i>	Regulador maestro que al ser fosforilado activa la transcripción de los operones involucrados en la diferenciación a células productoras de γ -PGA y Bacilomicina D.	Sin cambio significativo en su expresión.	Sin cambio significativo en su expresión.
<i>phrK y phrF</i>	Autoinductores encargados de inactivar a su fosfatasa Rap afín (RapK, RapF) para desencadenar la producción de esporas, γ -PGA, biofilm y compuestos antimicrobianos.	Sin cambio significativo en su expresión.	Sin cambio significativo en su expresión.
<i>phrC</i>	Autoinductor encargado de inactivar a RapC, para desencadenar la producción de esporas, γ -PGA, biofilm y compuestos antimicrobianos.	Sin cambio significativo en su expresión.	
<i>pgsA-C</i>	Operón que codifica para la sintasa productora de γ -PGA, polímero importante para el biocontrol.		
<i>bmyA-D</i>	Operón que codifica para la sintasa productora de Bacilomicina D, lipopéptido importante para el biocontrol		
<i>kinA-E</i>	Histidin-cinasas acopladas a membrana que mediante una cascada de fosforilación activan al regulador maestro Spo0A, involucrado en la producción de biofilm y esporas.	Sin cambio significativo en su expresión.	Sin cambio significativo en su expresión.
<i>spo0F</i>	Regulador de respuesta que al estar fosforilado activa al regulador de respuesta Spo0B		
<i>spo0B</i>	Regulador de respuesta que al estar fosforilado activa al regulador maestro Spo0A, involucrado en la producción de biofilm y esporas.		Sin cambio significativo en su expresión.
<i>spo0A</i>	Regulador maestro que al estar fosforilado induce la transcripción de genes involucrados en la producción de esporas y biofilm.	Sin cambio significativo en su expresión.	Sin cambio significativo en su expresión.

Conclusión

El pH ácido solamente afecta a los genes *comX* y *phrC* de los sistemas ComQXPA y Rap/Phr. Sin embargo, si hay una influencia negativa de la acidez del medio sobre los genes que codifican para proteínas involucradas en la heterogeneidad celular de la bacteria, lo que nos permite sugerir que a pH 5.0, obtendríamos cultivos más homogéneos ya que, bajo esta condición las células vegetativas no se diferencian a esporas, a células productoras del polímero γ -PGA y a células productoras de lipopéptidos (bacilomicina D y surfactina).

Referencias

- Anju, S., Aparna, Y., Bhima, B., & Sarada, J. (2019). Novel insights on the *Bacillus quorum sensing* mechanism: Its role in competence, virulence, sporulation and biofilm formation. In: Pallaval Veera Bramhachari (eds), *Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence*, Springer, Singapore pp. 313–327. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2429-1_21
- Antunes, L. C. M., & Ferreira, R. B. R. (2009). Intercellular communication in bacteria. In

Critical Reviews in Microbiology, Vol. 35 (2):66–80.

<https://doi.org/10.1080/10408410902733946>

6

Balderas-Ruíz, K. A., Bustos, P., Santamaria, R. I., González, V., Cristiano-Fajardo, S. A., Barrera-Ortiz, S., Mezo-Villalobos, M., Aranda-Ocampo, S., Guevara-García, Á. A., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2020). *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *AMB Express*. 2020 Sep 7;10(1):163. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01101-8>

Boguslawski, K. M., Hill, P. A., & Griffith, K. L. (2015). Novel mechanisms of controlling the activities of the transcription factors Spo0A and ComA by the plasmid-encoded *quorum sensing* regulators Rap60-Phr60 in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 96(2), 325–348. <https://doi.org/10.1111/mmi.12939>

Chowdhury, N., Goswami, G., Boro, R. C., & Barooah, M. (2021). A pH-dependent gene expression enables *Bacillus amyloliquefaciens* MBNC to adapt to acid stress. *Current Microbiology*, 78(8), 3104–3114. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02573-y>

Christie, G., & Setlow, P. (2020). *Bacillus* spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn. *Cellular Signalling*, 2020 Oct;74:109729. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109729>

Cosby, W. M., Vollenbroich, D., Lee, O. H., & Zuber, P. (1998). Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. *Journal of Bacteriology*, 180(6), 1438–1445. <https://doi.org/10.1128/jb.180.6.1438-1445.1998>

Cosby, W. M., & Zuber, P. (1997). Regulation of *Bacillus subtilis* σ^H (Spo0H) and AbrB in response to changes in external pH. *Journal of Bacteriology*, 179(21), 6778–6787. <https://doi.org/10.1128/jb.179.21.6778-6787.1997>

Cristiano-Fajardo, S. A., Flores, C., Flores, N., Tinoco-Valencia, R., Serrano-Carreón, L., & Galindo, E. (2019). Glucose limitation and glucose uptake rate determines metabolite production and sporulation in high cell density continuous cultures of *Bacillus amyloliquefaciens* 83. *Journal of Biotechnology*. 2019 Jun 20;299:57-65. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.027>

Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*. 2018 Nov 10;285:44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>

Galindo, E., Serrano-Carreón, L., Gutiérrez, C. R., Allende, R., Balderas, K., Patiño, M., Trejo, M., Wong, M. A., Rayo, E., Isauro, D., & Jurado, C. (2013). The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study. *Electronic Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-6>

Gallegos-Monterrosa, R., & Kovács, Á. T. (2023). Phenotypic plasticity: The role of a phosphatase family Rap in the genetic regulation of *Bacilli*. In *Molecular Microbiology*, Vol. 120, Issue 1, pp. 20–31. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/mmi.15060>

Kalia, V. C. (2015). *Quorum sensing vs quorum quenching: A battle with no end in sight*. *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*, 1–391. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8>

López, D., & Kolter, R. (2010). Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 134–149. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00199.x>

Lucke, M., Correa, M. G., & Levy, A. (2020). The role of secretion systems, effectors, and secondary metabolites of beneficial rhizobacteria in interactions with plants and microbes. In *Frontiers in Plant Science*. 2020 Nov 9;11:589416. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.589416>

- Luna-Bulbarela, A., Tinoco-Valencia, R., Corzo, G., Kazuma, K., Konno, K., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2018). Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biological Control*.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.004>
- Mckenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. In *Nature Reviews Microbiology*. 2013 Jan;11(1):33-44.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Nordgaard, M., Mortensen, R. M. R., Kirk, N. K., Gallegos-Monterrosa, R., & Kovács, Á. T. (2021). Deletion of Rap-Phr systems in *Bacillus subtilis* influences in vitro biofilm formation and plant root colonization. *MicrobiologyOpen*, 10(3), e1212.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.1212>
- Okada, M., Yamaguchi, H., Sato, I., Tsuji, F., Qi, J., Dubnau, D., & Sakagami, Y. (2007). Acid labile ComX pheromone from *Bacillus mojavensis* RO-H-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2007 Jul;71(7):1807-10.
<https://doi.org/10.1271/bbb.70245>
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. In *Current Opinion in Microbiology*. 2004 Dec;7(6):579-86. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>
- Polyxeni, N., Sotirios, M., Chrysanthi, K., Panagiotis, S., & Luc, H. (2016). Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in Public Health*, 2016 Jul 18;4:148. doi: 10.3389/fpubh.2016.00148.
- Rabbee, M. F., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. hyun. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. In *Molecules*. 2019 Mar 16;24(6):1046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Saggese, A., Baccigalupi, L., & Ricca, E. (2021). Spore formers as beneficial microbes for humans and animals. *Applied Microbiology*, 1(3), 498–509. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol1030032>
- Serrano, L., & Galindo, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: Un reto multidisciplinario. (*Revista de Ciencia*) *La Academia Mexicana de Ciencias*. 58(1): 77–89.
- Špacapan, M., Danevčič, T., Štefanič, P., Porter, M., Stanley-Wall, N. R., & Mandić-Mulec, I. (2020). The ComX quorum sensing peptide of *Bacillus subtilis* affects biofilm formation negatively and sporulation positively. *Microorganisms*. 2020 Jul 27;8(8):1131.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081131>
- Tasaki, S., Nakayama, M., & Shoji, W. (2017). Morphologies of *Bacillus subtilis* communities responding to environmental variation. *Development Growth and Differentiation*, 59(5): 369–378.
<https://doi.org/10.1111/dgd.12383>
- Tudi, M., Ruan, H. D., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3): 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>



www.smbb.com.mx