

Revista de la Sociedad Mexicana de

Biotechnología y Bioingeniería

Año 2026 Volumen 30, Número 2
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotechnología y Bioingeniería

Índice

Instrucciones para los autores 3

Premio Alfredo Sánchez Marroquín

Análisis numérico de puntos de presión en la pisada durante la bipedestación y marcha por tiempos prolongados para el diseño de una plantilla personalizada para impresión en 3D

Jesús Alejandro Serrato-Pedrosa, Guillermo Urriolagoitia-Sosa,
Beatriz Romero-Ángeles, Francisco Carrasco-Hernández,
Francisco Javier Gallegos-Funes, Guillermo Manuel Urriolagoitia-Calderón 8

Expresión génica diferencial en *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T asociada con la producción de sideróforos relacionados al biocontrol

Valeria Valenzuela Ruiz; Fannie I. Parra Cota; Gustavo Santoyo; Lorena Jacqueline Gómez-Godínez; Luis A. Cira Chávez; Sergio de los Santos Villalobos 20

Premio Sergio Sánchez Esquivel

De verde a marrón: Desarrollo de una fábrica fotosintética de melanina en *Chlamydomonas reinhardtii* mediante expresión heteróloga.

Ana Carleth Escobar-Ricárdez, Caleb Edmundo Rosales-Linares, Gabriela Aimee Salazar-Mata, Lorena Yamileth Balón-Rosas, Daniela Morales-Sánchez 31

Aspectos clave, desafíos y oportunidades en el desarrollo de vacunas contra la Influenza aviar

Jennifer Jaramillo-López, Romina Rodríguez-Sanoja, Gabriela Gómez Verduzco, Silvia Moreno-Mendieta 42

Conductive materials and their promising role in the anaerobic treatment of agro-industrial wastewaters.

Christopher A. Díaz-Muñiz, Francisco J. Cervantes 57

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. 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.

Revista de la Sociedad Mexicana de **Biología** y Bioingeniería

MESA DIRECTIVA

2024 – 2026

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

Presidente

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Vicepresidente

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez

Secretario

Dra. Neith Aracely Pacheco López

Tesorero

Dra. Andrea Sabido Ramos

Subsecretario

Dra. Carolina Peña Montes

Subtesorero

M. en C. Oscar Ulises García Flores

Vocal estudiante

M. en C. Ileana Emilia Gutiérrez Cancino

Vocal Profesional

EDITORIA

Dra. María Soledad Córdova Aguilar

UNAM

Co-editor

Dr. Jorge Gracida

UAQ

COMISIÓN DE PREMIOS

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso

Taketa

Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Investigación en Biotecnología.

Dra. Josefina Barrera Cortés

CINVESTAV

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Dra. Clelia de la Peña Seaman

Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia

Instituto Tecnológico de Sonora

Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias

Formación y edición

Pas. QA Mariana Espinoza Tapia

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 se pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño 10. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño 10. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras.
7. Las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto, pero se anexarán en hojas separadas y al igual que las figuras, al final del manuscrito.
8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribirá como sigue: “Gutiérrez et al. (2003), han demostrado...” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado...”

Instrucciones para los autores

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

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

Artículos:

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

Libros:

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

Capítulos de libros:

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

Patentes:

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

Congresos y reuniones:

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

Instrucciones para los autores

Sitios en internet:

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

Tesis de pre y posgrado:

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

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

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

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

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

Premio Alfredo Sánchez Marroquín 2025 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 2023 y el 28 de febrero de 2025. Los ganadores se comprometieron a la redacción de un artículo *in extenso* con los resultados obtenidos en su tesis. Las tesis ganadoras son:

Maestría

Análisis numérico de puntos de presión en la pisada durante la bipedestación y marcha por tiempos prolongados para el diseño de una plantilla personalizada para impresión en 3D

Jesús Alejandro Serrato-Pedrosa, Guillermo Urriolagoitia-Sosa, Beatriz Romero-Ángeles, Francisco Carrasco-Hernández, Francisco Javier Gallegos-Funes, Guillermo Manuel Urriolagoitia-Calderón

Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Politécnico Nacional.

Doctorado

Expresión génica diferencial en *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T asociada con la producción de sideróforos relacionados al biocontrol

Valeria Valenzuela Ruiz; Fannie I. Parra Cota; Gustavo Santoyo; Lorena Jacqueline Gómez-Godínez; Luis A. Cira Chávez; Sergio de los Santos Villalobos

Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano. Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON).

Análisis numérico de puntos de presión en la pisada durante la bipedestación y marcha por tiempos prolongados para el diseño de una plantilla personalizada para impresión en 3D

Jesus Alejandro Serrato-Pedrosa*¹, Guillermo Urriolagoitia-Sosa¹, Beatriz Romero-Ángeles¹, Francisco Carrasco-Hernández², Francisco Javier Gallegos-Funes¹, Guillermo Manuel Urriolagoitia-Calderón¹

¹*Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco, Edif. 5, 2do Piso, Col. Lindavista, Alcaldía Gustavo A. Madero, C.P. 07320, Ciudad de México, México.*

²*Universidad Tecnológica de Durango, Departamento Académico de Mecatrónica y Energías Renovables, Carretera Durango—Mezquital km 4.5 s/n, Gabino Santillán, Durango C.P. 34308, México.*

**alejandroserrato@live.com.mx*

Resumen

La distribución de la presión plantar es un parámetro ampliamente reconocido para evaluar la estructura y el comportamiento biomecánico del pie, al determinar las afecciones musculoesqueléticas y diagnosticar anomalías en los pies. Los efectos que se producen en el pie al caminar proporcionan indicadores relevantes para mejorar el rendimiento habitual o las terapias de rehabilitación. Por ello, se hace necesaria la incorporación de herramientas de Ingeniería computacionales para optimizar los análisis biomecánicos de presión plantar. La metodología empleada en esta investigación fue dirigida hacia dos casos de estudio, inicialmente en evaluar mediante El Método del Elemento Finito (MEF), los puntos de presión en la planta del pie durante la bipedestación y las cinco fases de apoyo del ciclo de marcha normal. Posteriormente, se diseñó y analizó numéricamente una plantilla personalizada imprimible en 3D para observar la respuesta mecánica en las zonas críticas plantares utilizando un dispositivo ortésico personalizado. Los resultados experimentales validaron la precisión del análisis numérico, ya que ambos métodos exhibieron comportamientos extremadamente cercanos. Al analizar la diferencia de error promedio entre todas las simulaciones numéricas y el análisis experimental para cada una de las fases para la presión máxima, se mantuvo por debajo del 5%. Esta baja discrepancia respalda la validez de las consideraciones tomadas en el modelo para estudiar la distribución de presión plantar y su utilidad en el análisis biomecánico del pie. La metodología aplicada se desacata como una herramienta complementaria en el asesoramiento clínico existente, permitiendo predecir el comportamiento del cuerpo para tomar medidas oportunas.

Palabras Claves: *Órtesis plantares, presión plantar; análisis de elementos finitos; imágenes médicas; medicina personalizada; baropodometría*

Abstract

The distribution of plantar pressure is a widely recognized parameter for evaluating the structure and biomechanical behavior of the foot, determining musculoskeletal conditions, and diagnosing foot abnormalities. The effects produced on the foot when walking provide relevant indicators for improving normal performance or rehabilitation therapies. Therefore, it is necessary to incorporate computational engineering tools to optimize biomechanical analyses of plantar pressure. The methodology used in this research focused on two case studies, initially evaluating the pressure points on the sole of the foot during standing and the five support phases of the normal gait cycle using the Finite Element Method (FEM). Subsequently, a customized 3D-printable insole was designed and numerically analyzed to observe the mechanical response in critical plantar areas using a customized orthotic device. The experimental results validated the accuracy of the numerical analysis, as both methods exhibited extremely similar behaviors. When analyzing the average error difference between all numerical simulations and the experimental analysis for each of the phases for maximum pressure, it remained below 5%. This low discrepancy supports the validity of the

considerations taken in the model to study plantar pressure distribution and its usefulness in the biomechanical analysis of the foot. The methodology applied stands out as a complementary tool in existing clinical assessment, allowing the behavior of the body to be predicted in order to take timely measures.

Key Words: *Foot orthotics, plantar pressure; finite element analysis; medical imaging; personalized medicine; baropodometry*

Introducción

La constante evolución tecnológica ha permitido brindar soluciones futuristas en diversos campos de estudio, generando una transformación radical en la forma en que se abordan temas relacionados con la salud. Esta convergencia colaborativa combina los principios de la Ingeniería con los conocimientos médicos para desarrollar soluciones innovadoras que mejoren la salud y el bienestar de las personas, donde se ha propiciado un gran auge en la multidisciplinariedad de nuevas ramas de investigación como lo es la Biomecánica, Biomedicina, Biotecnología, entre otras (Song et al., 2022). Concretamente, la Biomecánica es una disciplina que combina la Ingeniería con la Biología, se encarga de estudiar los principios físicos que explican el comportamiento de los sistemas biológicos bajo diferentes situaciones (Roupa et al., 2022). Dentro de esta emergente disciplina, se extiende una subrama de estudio como lo es el modelado computacional; esta surge como una herramienta fundamental para analizar y comprender la complejidad de los organismos vivos (Zabala-Travers, 2021).

Por medio de la creación de elementos biológicos tridimensionales, es posible replicar y predecir el comportamiento mecánico de estructuras como huesos, músculos, articulaciones y en general tejidos orgánicos (Filardi, 2018). Estos modelos permiten explorar una amplia gama de fenómenos, desde la locomoción humana hasta la prueba y desarrollo de nuevos biomateriales (Kermen & Mohammadi, 2021). Habiendo mencionado la relevancia de estudiar al cuerpo humano desde perspectivas de ciencias en conjunto, la comprensión de la pisada es un proceso biomecánico complejo que involucra evaluar su impacto en el cuerpo y en el equilibrio (McKeon et al., 2015). La construcción de modelos representando los tejidos biológicos (biomodelos) en conjunto con el enfoque de Ingeniería Mecánica, aporta herramientas y técnicas para el desarrollo de

modelos que representen los tejidos biológicos (biomodelos), de forma precisa y eficiente (Requena-Pérez et al., 2024; Zabala-Travers, 2021). De esta manera, por medio de la utilización del Método del Elemento Finito se analizan los efectos producidos en el pie durante diferentes actividades. Por lo tanto, este enfoque integral busca profundizar la comprensión de los puntos de presión y orientar hacia un asesoramiento clínico personalizado (Serrato-Pedrosa, Urriolagoitia-Sosa, Romero-Ángeles, Carrasco-Hernández, et al., 2024; Serrato-Pedrosa, Urriolagoitia-Sosa, Romero-Ángeles, Urriolagoitia-Calderón, et al., 2024).

El presente trabajo se enfoca en mejorar el diseño de plantillas ortopédicas personalizadas al analizar el comportamiento biomecánico del pie al mantener la posición natural más básica, la bipedestación. Se busca obtener los puntos de presión de la zona plantar y diseñar una plantilla imprimible personalizada para la redistribución de presión. Además, se pretende estudiar los músculos intrínsecos del pie, el comportamiento de la piel bajo presión y el efecto de usar un elemento ortopédico de contacto total en el pie.

Igualmente, los análisis numéricos no solo se centran en analizar la bipedestación, sino que también en analizar cuasi estáticamente las fases de apoyo del pie al ejercer el ciclo de marcha normal. El biomodelo generado en 3D permite capturar de manera compleja morfología de pie, lo que brinda la capacidad de análisis detallados y perspectivas que no son fácilmente alcanzables con representaciones tradicionales. Continuando con el propósito principal, esta investigación pretende proveer información confiable y a la vanguardia del comportamiento biomecánico en la región plantar al utilizar dispositivos ortopédicos, ya que los métodos experimentales a menudo no proporcionan datos suficientes para un diagnóstico preciso de la función del pie.

Materiales y Métodos

La metodología se realizó en cuatro etapas que se desglosan de la siguiente manera.

a) Construcción del biomodelo

El modelo biológico en 3D del pie se desarrolló en un varón mexicano adulto de 30 años de edad que presentaba un estado de salud normal a través de una Tomografía Computarizada (TC). Además, el paciente presentaba un índice de masa corporal y una morfología del pie estándar. Posteriormente, se llevó a cabo la adquisición de imágenes, visualización y segmentación de los datos DICOM para la construcción del modelo mediante el programa Simpleware ScanIP®. La interfaz del programa médico permite la segmentación de cada corte del miembro a reconstruir en los 3 planos previamente mencionados. Basado en el estándar de reconocimiento de la atenuación de los rayos X, Hounsfield (UH), lo que permite visualizar los tonos de los píxeles que componen los distintos tejidos del modelo a recrear y siendo más visibles aquellos elementos biológicos que cuenten con densidades altas (Schreiber et al., 2011). Al identificar los elementos a reconstruir en el modelo, se divide a cada uno de los tejidos en segmentos que mantienen tonos similares en la escala de Hounsfield mediante el uso del comando threshold (umbral). El cual, delimita el perímetro de los valores que le dan el contorno al tejido. Este es agrupado en un conjunto que el programa médico conoce como máscara. El número de máscaras dependerá de la cantidad de tejidos a modelar. El proceso de segmentación se centró principalmente en la reconstrucción de dos estructuras críticas de los tejidos blandos, la musculatura intrínseca del pie y la piel, y en la comprensión profunda del análisis biomecánico de los puntos de presión en la superficie plantar. Existen 22 músculos intrínsecos distribuidos en 4 capas o volúmenes diferentes en una concentración de diversos tejidos, principalmente tejido adiposo. Los músculos intrínsecos proporcionan soporte y estabilidad en el pie, en contraste con los músculos extrínsecos responsables del movimiento y las fuerzas en el pie (Jastifer, 2023). Por lo tanto, se decidió representarlos como un cuerpo sólido encapsulado del total de los músculos. Una vez realizado adecuadamente este proceso, se aplicó al modelo biológico la solidificación y el suavizado de los elementos creados para

optimizar su compleja geometría. Se generó un remallado en el biomodelo, dando como resultado una estructura de malla computacionalmente eficiente y más adecuada para su posterior discretización. Todos los procedimientos computacionales se llevaron a cabo con el software Materialise 3-Matic®.

b) Análisis numéricos del biomodelo

El desarrollo de las simulaciones numéricas corresponde a los distintos pasos empleados en la etapa de preprocesamiento de los programas computacionales de elementos finitos, donde destacan la asignación de propiedades mecánicas, condiciones de frontera y proceso de discretizado. Por lo tanto, la asignación de propiedades mecánicas al modelo se corresponde con las encontradas en la literatura biomecánica por Luboz y Nafiseh para el tejido muscular encapsulado y las propiedades mecánicas de la piel (Luboz et al., 2015). Además, las fuerzas de reacción del suelo en la región plantar se produjeron empleando una placa rígida mediante desplazamientos como agente externo (Su et al., 2017). Se realizaron 6 distintos casos de análisis en el biomodelo, como lo fueron estado de bipedestación y las 5 fases de apoyo del ciclo de marcha (Contacto inicial, Respuesta a la carga, Apoyo medio, Apoyo final y Prebalanceo). La aplicación del agente externo recae en la placa que realiza un desplazamiento vertical de 5 mm penetrando la superficie plantar del modelo para producir cargas verticales, ya que el peso de la persona analizada es de 80 kg (Smith et al., 2019). Este produce una fuerza de 400 N en cada pie, existiendo una relación de acuerdo a bases experimentales (Parker et al., 2015). Por otro lado, para simular las fuerzas de reacción del suelo para las fases de apoyo y de acuerdo con la literatura médica-experimental, se tiene registro que entre 1-2 mm de desplazamiento adicional se genera en la piel del pie de acuerdo al grado de dorsiflexión y plantar flexión (Kharazi et al., 2021). Por otro lado, en otra investigación se demuestra un desplazamiento similar de 1-3 mm en el antepié en la dorsiflexión de los dedos durante la fase de prebalanceo (Bojsen-Møller & Lamoreux, 1979). Incluso en diferentes investigaciones se emplean rangos entre 6-10 mm como elemento de indentación en la parte del antepié para evaluar la respuesta del talón

y de entre 10-14 mm(Chokhandre et al., 2012). Mediante el uso de ultrasonidos y ecografías, se aprecia un estiramiento en la piel de la planta del pie de hasta 10 mm en las zonas de contacto del pie con el suelo durante la marcha(Strzalkowski et al., 2015). Por lo tanto, de acuerdo a estas consideraciones en la literatura experimental, se aplicaron desplazamientos verticales entre 5.5-8.5 mm para las respectivas fases de apoyo. De esta manera se aplicaron las condiciones de frontera correspondientes para replicar estas situaciones en el pie modelado. Para lograr una alta fidelidad en los resultados, se empleó la discretización del modelo de elementos finitos con elementos sólidos 3D de alto orden con 20 nodos por elemento. El análisis abarca tres regiones distintas: piel, masa muscular encapsulada y la placa. Utilizando un discretizado fino-adaptivo en las zonas de interés y semicontrolado, se generó un total de 371.120 elementos y 196.576 nodos. Los tejidos blandos tienen características extremadamente complejas de caracterizar, al ser estructuras multicapa reforzadas con colágeno y con un comportamiento no lineal y anisotrópicos. Además de ser considerados como materiales hiperelásticos y viscoelásticos. Puntualmente, para este estudio las características de la piel y el músculo fueron simplificadas y consideradas con un comportamiento lineal-elástico, continuo, homogéneo e isotrópico. Asimismo, tomando los valores aportados en la literatura de los modelos biomecánicos del pie por Luboz(Luboz et al., 2015).

c) Validación numérico-experimental (Estudio de Baropodometría)

Se realizó un estudio baropodométrico para validar la fiabilidad de las hipótesis y la biofidelidad del modelo. En el presente estudio se utilizó el software FreeSTEP® y el baropodómetro Professional 180 cm × 50 cm Platform para cuantificar los puntos de presión durante un análisis estático y del ciclo de marcha. utiliza sensores resistivos, conductores de oro de 24 K con revestimiento de aislante que alcanzan hasta 500 Hz de frecuencia, adquiriendo 3 huellas por paso completo que profundizan la información obtenida sobre los efectos de las fuerzas de reacción del suelo. La alta adquisición de datos permite conseguir alrededor de 400 fotogramas por segundo de acuerdo al ritmo o velocidad con la que se realice el estudio,

donde el pie es seccionado en 8 regiones anatómicas, separando principalmente al retropié, mediopié y antepié. Utilizando los valores y secciones proporcionados por el programa, se compararon los resultados experimentales obtenidos con las predicciones del modelo numérico resueltas mediante el MEF.

d) Diseño y simulación del comportamiento con plantilla personalizada

Se revisaron diversas metodologías para el diseño de plantilla específico para el biomodelo utilizado en el análisis de presión plantar(Anggoro et al., 2021; Cheng et al., 2021; Danko et al., 2023; Li et al., 2020). Teniendo como principal elemento el modelo tridimensional del pie derecho del paciente, se utilizó una combinación de procedimientos tradicionales y tecnológicos para cumplir con los criterios de personalización necesarios en el proceso de diseño, para la construcción de una órtesis plantar de contacto total no correctiva que orille al desempeño óptimo del pie. El modelo biológico del pie se colocó justo encima de la plantilla, utilizando operaciones booleanas y trabajando con superficies para crear una plantilla personalizada basada en diseños paramétricos establecidos por herramientas computarizadas especializadas en el diseño de plantillas(Hu et al., 2021; Jonnala & Kumar, 2023; Zuñiga et al., 2022). El uso y modelado de superficies para el diseño de la plantilla permitió suavizar ciertas regiones y ajustar la órtesis a la morfología del pie, principalmente la zona del soporte para el arco medial, altura de la cuña lateral y medial, la región metatarsal y la parte de la talonera. Se empleó una plantilla de contacto total personalizada y diseñada en 3D a la que se le asignaron propiedades de Poliuretano Termoplástico (TPU) para analizar el comportamiento biomecánico y los efectos de atenuación de los puntos de contacto de presión plantar máxima dentro de un calzado ortopédico específico para un paciente bajo una posición anatómica y unos principios mecánicos idénticos, simulando los 6 casos previos. Esta inclusión refleja la práctica habitual de los dispositivos ortopédicos, en los que las propiedades amortiguadoras de la plantilla absorben una parte significativa de las fuerzas de reacción del suelo(Van Alsenoy et al., 2023). La base médica de los estudios sobre la región plantar demuestra que las

plantillas modeladas paraméricamente influyen de forma demostrable en el comportamiento biomecánico óptimo(Xie et al., 2021; Zolfagharian et al., 2021). La selección del TPU como material para la plantilla se consideró tras analizar diversas investigaciones que destacaban sus características ventajosas, como los efectos de amortiguación que favorecen la redistribución de puntos de sobrecarga, resistencia a la compresión y alivio de malestares(Rodríguez-Parada et al., 2021; Rohm & Manas-Zloczower, 2023). Asimismo, por su capacidad de ser utilizada en la manufactura aditiva(Li et al., 2020), ofreciendo soluciones impresas en 3D rentables y personalizables. En la Figura 1 se aprecian las medidas de los parámetros más importantes

de la órtesis plantar como lo son la longitud total, longitud interior, longitud exterior, ancho interior, ancho exterior, radio de la talonera (zona del talón), radio del hallux (dedo gordo), espesor general y espesor de la talonera. El espesor de la plantilla es de 3 mm, este es el grosor habitual en los dispositivos de soporte plantar para actividades comunes de bajo impacto (Mendes et al., 2020). Igualmente, el espesor no es un factor crucial al utilizar TPU, ya que resistencia es proporcional al parámetro del relleno durante la impresión, independientemente del grosor de la plantilla, por lo que el porcentaje de infill es realmente el factor determinante cuando se genera un producto de este material con manufactura aditiva(Lee et al., 2019).

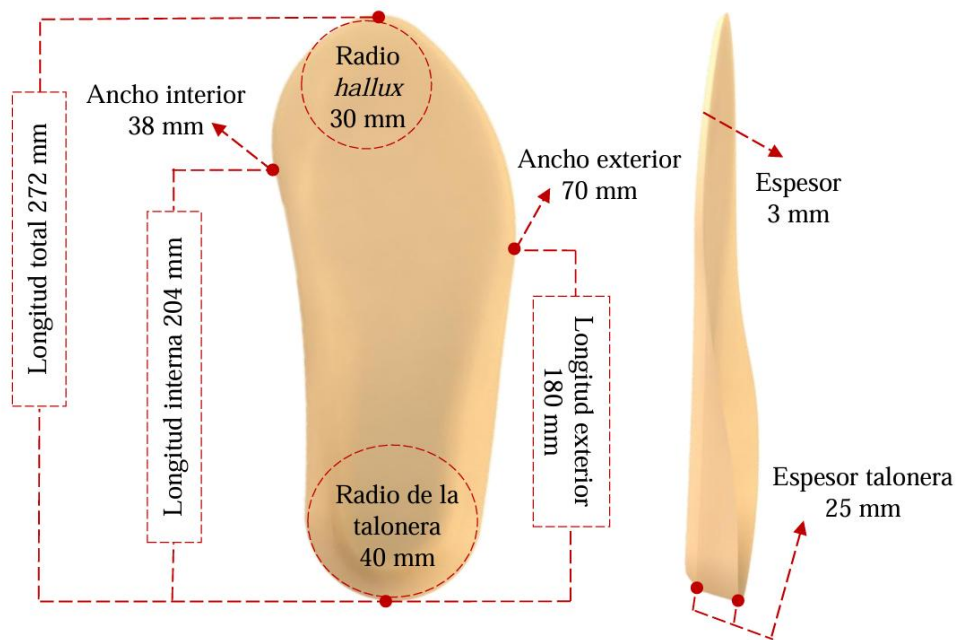


Figura 1. Medidas paramétricas del diseño de la plantilla personalizada

Resultados y discusión

Resultados análisis numéricos del biomodelo en bipedestación y fases de apoyo

La convergencia de las ecuaciones del análisis numérico permitió la obtención de resultados predictivos precisos de la presión; previamente se empleó la teoría falla de von Mises, esfuerzos principales máximos y mínimos debido a su capacidad para proporcionar valiosos datos de estimación en el comportamiento biomecánico de la planta del pie, ya que estas teorías analizan diferentes tipos de esfuerzos en todos los ejes

y planos. Por lo tanto, es ideal para evaluar las propiedades dúctiles del biomodelo y las complejas condiciones de la región plantar bajo el ciclo de la marcha. Los resultados de los análisis numéricos mostraron que los valores más altos de presión plantar distribuida se encuentran alrededor de 0.050-0.063 MPa (variando de tensión a compresión según la teoría de falla analizada) en el modelo muscular (Figura 2). Por otro lado, el estudio baropodométrico arrojó un valor presión máxima de 0.0686 MPa (presión dado por la plataforma 700 gr/cm²). Con lo que, las

Artículos

teorías mostraron un comportamiento bastante similar con respecto al análisis experimental, a pesar de los diferentes criterios empleados (únicamente esfuerzos nominales y combinación con esfuerzos cortantes). La estrecha similitud entre los valores obtenidos del análisis experimental y numérico, particularmente con el modelo de Perrier, indicó con mayor precisión la predicción en la distribución de presión plantar máxima y media (Figura 3). Esta validación respalda la confiabilidad del modelo para estudiar la distribución de presión plantar y su impacto en la Biomecánica del pie durante la bipedestación. Por otro lado, los resultados de los análisis de las distintas fases de apoyo del ciclo de marcha indican que, la fase más crítica se presenta durante el prebalanceo

donde los campos de esfuerzos más elevados se distribuyen en la zona superior de la primera cabeza metatarsal y el hallux, donde se genera una distribución de esfuerzos en forma de anillo; esta manera en que la zona plantar se comporta debe interpretarse considerando las limitaciones del modelo, particularmente el uso exclusivo de tejidos blandos. La mayoría de los análisis revelaron una distribución de esfuerzos uniforme, representada por tonos verdes en la escala de colores, con valores entre 0.055 y 0.08 MPa, lo que igualmente coincide con la presión promedio general. Esta observación se corrobora con el resultado del estudio baropodométrico, que registró un valor de 787 gr/cm² (equivalente a 0.0771 MPa) (Figura 4).

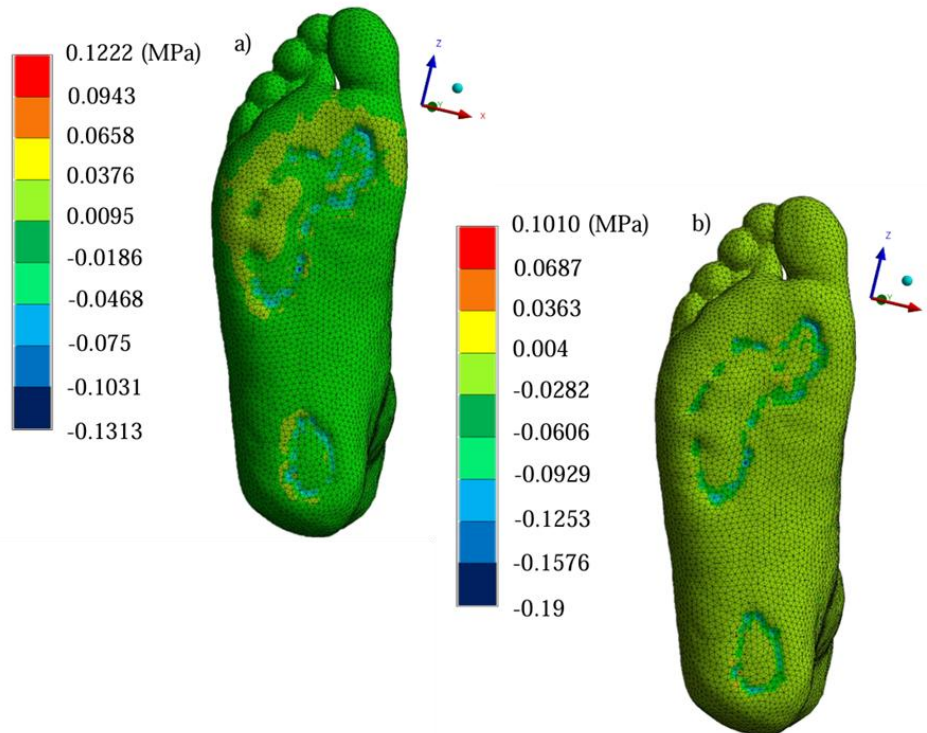


Figura 2. Evaluación numérica en bipedestación. (a) Esfuerzos principales máximos. (b) Esfuerzos principales mínimos

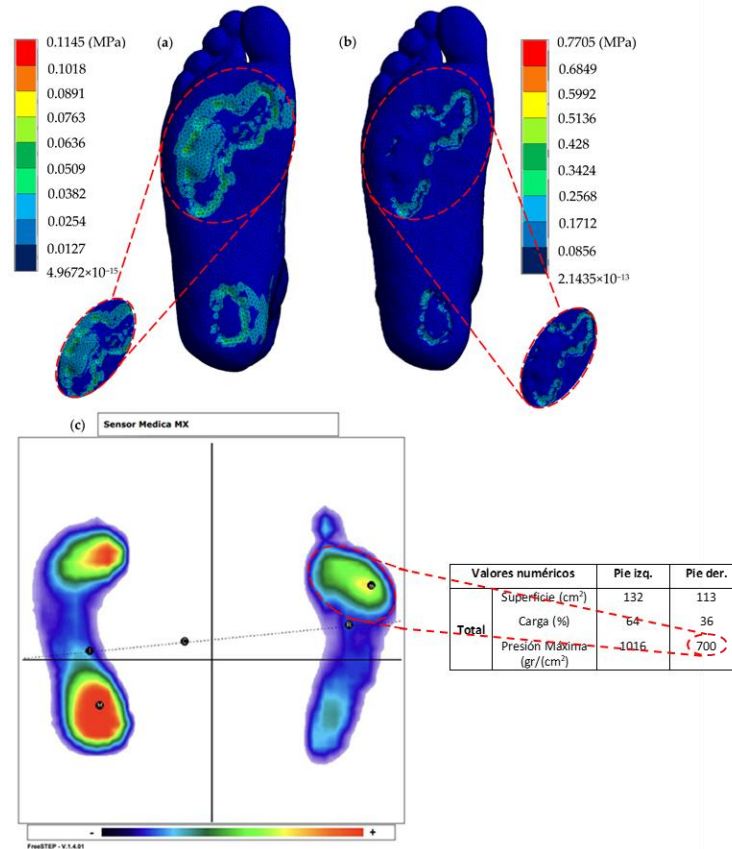


Figura 3. Comparación de resultados numéricos y experimentales. a) Modelo con propiedades de Perrier. b) Modelo con propiedades de Nafiseh. c) Estudio baropodométrico. (Serrato-Pedrosa, Urriolagoitia-Sosa, Romero-Ángeles, Urriolagoitia-Calderón, et al., 2024)

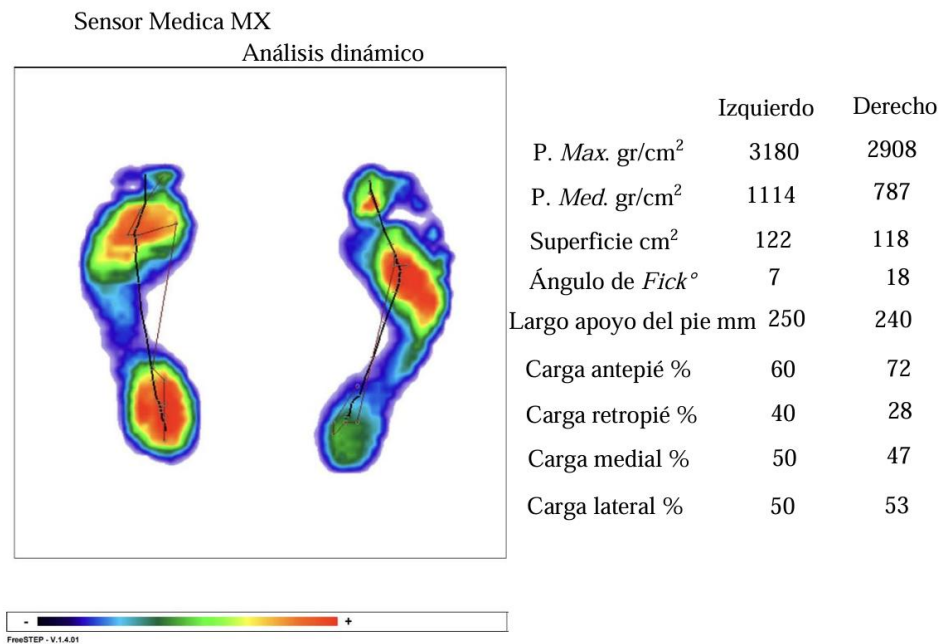


Figura 4. Valoración clínica del análisis dinámico. Imagen tomada de (Serrato-Pedrosa, Urriolagoitia-Sosa, Romero-Ángeles, Carrasco-Hernández, et al., 2024)

Resultados de validación numérico-experimental

Para el proceso de validación, se compararon los resultados numéricos y los valores máximos de presión plantar en cada una de las cinco fases de apoyo con los adquiridos en el estudio baropodométrico de la marcha y el análisis estático. La comparación entre los resultados experimentales y numéricos en el

análisis estático demostró que las propiedades de Luboz eran más acercadas con la prueba de baropodometría; por lo tanto, esta fue usada en la corroboración del ciclo de marcha. En la Figura 5 y 6, se realizó una comparación entre los resultados experimentales y numéricos de la presión plantar máxima.

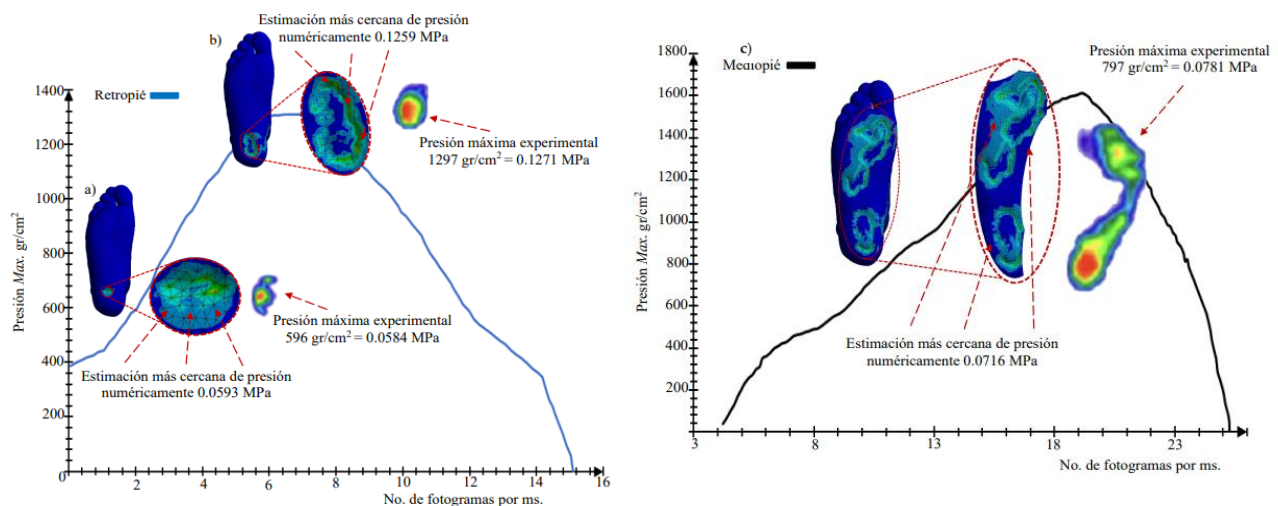


Figura 5. Comparación de resultados experimentales y numéricos en primeras fases del ciclo de marcha. a) Fase de contacto inicial. b) Fase de respuesta a la carga. c) Fase de apoyo medio. Imagen tomada de (Serrato-Pedrosa, Urriolagoitia-Sosa, Romero-Ángeles, Carrasco-Hernández, et al., 2024)

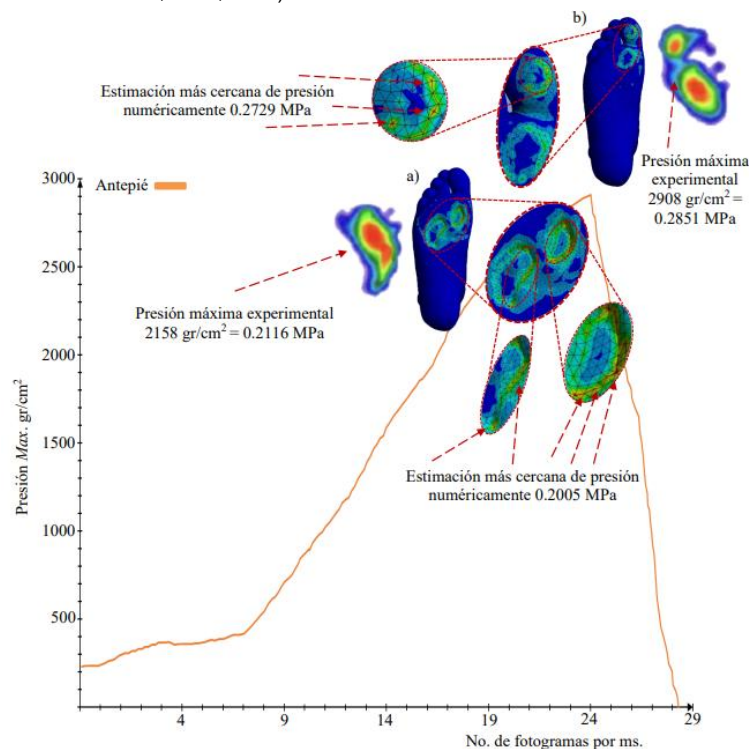


Figura 6. Comparación de resultados experimentales y numéricos en fases finales del ciclo de marcha. a) Fase de apoyo final. b) Fase de prebalanceo. Imagen tomada de (Serrato-Pedrosa, Urriolagoitia-Sosa, Romero-Ángeles, Carrasco-Hernández, et al., 2024)

Resultados del comportamiento con plantilla personalizada

Los análisis numéricos del modelo durante las fases de apoyo del ciclo de la marcha respaldan la selección del material y el diseño paramétrico de la plantilla, lo que permite atenuar considerablemente los picos de presión plantar, especialmente en fases de apoyo críticas como el contacto inicial y el prebalanceo. En lo que respecta al análisis con plantilla del contacto inicial, con la implementación de la plantilla los esfuerzos son ampliamente distribuidos en el retropié; minimizando el punto donde se concentran los esfuerzos, disminuyendo el valor máximo de 0.1334 MPa a 0.0529 MPa. Asimismo, se generó un efecto similar en la fase de respuesta a la carga, donde los esfuerzos son redistribuidos en la parte central y no concentrándose alrededor; lo que atenúa el valor de presión plantar máximo. A diferencia de la bipedestación, en la fase de apoyo medio, al no mantener contacto con toda la planta del pie y preferentemente en contacto con la primera cabeza metatarsal del antepié y el retropié (lo que representa una fase más crítica), la presión máxima disminuye. De esta manera, el efecto generado con la plantilla se disipa en su mayoría, teniendo un comportamiento adecuado de concentrarse en la parte superior de la primera cabeza metatarsal cuando se desempeña la marcha normal. Para las fases finales de apoyo, en el apoyo final el espectro generado se asemeja al generado sin plantilla; sin embargo, los esfuerzos son reducidos sobre todo en la parte central del antepié y disminuyen las

concentraciones en la parte inferior de la parte medial del antepié. Finalmente, para la fase del prebalanceo la aplicación de la plantilla permitió que una amortiguación en el antepié, disminuyendo los esfuerzos específicamente en la punta del dedo gordo, para redistribuir mayormente en la parte central inferior del hallaux. Asimismo, el punto de presión máximo fue aminorado a un pequeño punto, bajando de 0.2729 MPa a 0.1874 MPa. De esta manera en la Figura 7 se muestran los resultados de la presión plantar utilizando la plantilla específica para el paciente simulando las cinco fases de apoyo. Estos resultados permiten visualizar la redistribución de la presión en la planta del pie.

Los diferentes análisis numéricos mostraron el comportamiento de la planta del pie bajo diferentes condiciones, específicamente al mantener bipedestación y durante las fases de apoyo del ciclo de marcha. En donde se presenta el espectro de distribución de presión plantar y los puntos máximos de presión. Los resultados obtenidos respaldan la utilidad del análisis numérico en el estudio de los tejidos blandos de pie. Finalmente, los métodos presentados en esta investigación abordan con éxito las necesidades específicas que cada paciente requiere en relación con la prescripción ortésica, desde la reconstrucción morfológica del pie hasta la aplicación de simulaciones numéricas que analizan la precisión del diseño de la plantilla y las propiedades de amortiguación asignadas para redistribuir adecuadamente los puntos de presión excesiva.

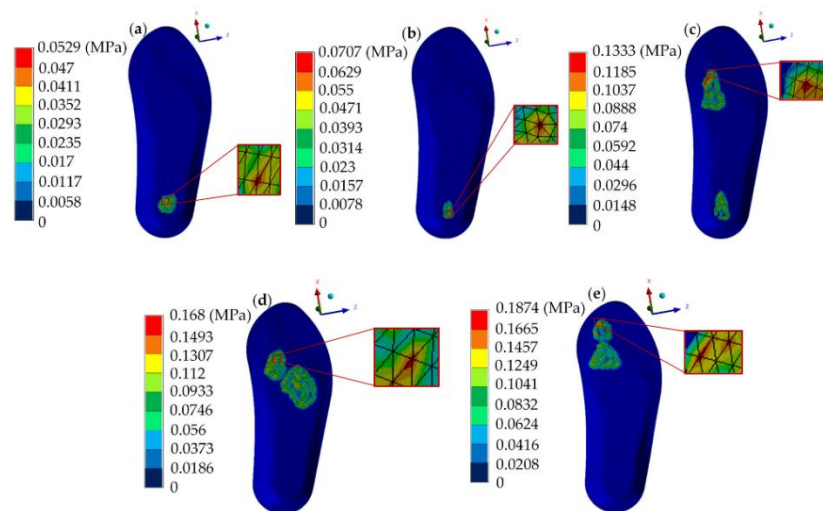


Figura 7. Esfuerzo de von Mises en la región plantar de la plantilla diseñada para todas las fases de apoyo. a) Fase de contacto inicial. b) Fase de respuesta a la carga. c) Fase de apoyo medio. d) Fase de apoyo final. e) Fase de prebalanceo. Imagen tomada de (Serrato-Pedrosa, Urriolagoitia-Sosa, Romero-Ángeles, Carrasco-Hernández, et al., 2024)

Conclusiones

Conclusiones Los resultados y observaciones del presente trabajo de investigación demostraron que la reconstrucción de modelos biológicos tridimensionales en combinación con simulaciones numéricas se posiciona como una metodología de asistencia a corto plazo para procedimientos médicos tales como la planificación quirúrgica, prescripción de dispositivos ortopédicos, terapias de rehabilitación y el desarrollo de principios biomecánicos más sólidos para la educación. Las técnicas emergentes para diseñar y desarrollar órtesis planares personalizadas de alto calidad se enfocan en materiales imprimibles en 3D, los cuales suelen ser evaluados numéricamente antes de su impresión y uso posterior. De igual manera, el uso de tecnologías de impresión 3D ha sido cada vez más reconocido como un estándar para el diseño y la reconstrucción de órtesis debido a su desempeño óptimo. El empleo de estos procedimientos tecnológicos resulta ventajoso por su eficiencia temporal y asequibilidad en comparación con los procedimientos tradicionales. El MEF se ha consolidado como una herramienta poderosa para evaluar el comportamiento de los tejidos biológicos, ofreciendo información valiosa para comprender su complejidad. Esta técnica de ingeniería numérica tiene el potencial de generar un impacto aún mayor en el campo médico. Cabe destacar que la aplicación de este método requiere un sólido conocimiento de mecánica, conocimientos en la segmentación del modelo y un equipo computacional potente. El análisis numérico puede aplicarse a diversos enfoques y, junto con la supervisión médica, puede impulsar técnicas más sofisticadas para evaluar la complejidad del cuerpo humano. Es importante mencionar que el análisis numérico no reemplaza las pruebas experimentales, sino que se destaca como una metodología complementaria para los procedimientos médicos existentes. Permitiendo predecir el comportamiento del cuerpo para tomar medidas oportunas. Por lo tanto, los métodos aplicados en este trabajo tienen el potencial de transformar los procedimientos de personalización tradicionales en el campo médico, con la intención de crear dispositivos protésicos y ortésicos específicos al usuario. En consecuencia, todos los métodos descritos en la presente tesis se alinean con los avances

recientes en la Biomecánica del pie, cuyo objetivo es revolucionar la industria del calzado y la Ortopedia de miembros inferiores, contribuyendo a la mejora de los tratamientos de rehabilitación y la calidad de vida de las personas a través de órtesis plantares enfocadas en satisfacer las necesidades individuales específicas.

Referencias

- Anggoro, P., Bawono, B., Jamari, J., Tauviqirrahman, M., & Bayuseno, A. (2021). Advanced design and manufacturing of custom orthotics insoles based on hybrid Taguchi-response surface method. *Heliyon*, 7(3), e06481. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06481>
- Bojsen-Møller, F., & Lamoreux, L. (1979). Significance of free dorsiflexion of the toes in walking. *Acta Orthopaedica*, 50(4), 471-479. <https://doi.org/10.3109/17453677908989792>
- Cheng, K.-W., Peng, Y., Chen, T. L.-W., Zhang, G., Cheung, J. C.-W., Lam, W.-K., Wong, D. W.-C., & Zhang, M. (2021). A Three-Dimensional Printed Foot Orthosis for Flexible Flatfoot: An Exploratory Biomechanical Study on Arch Support Reinforcement and Undercut. *Materials*, 14(18), 5297. <https://doi.org/10.3390/ma14185297>
- Chokhandre, S., Halloran, J. P., van den Bogert, A. J., & Erdemir, A. (2012). A three-dimensional inverse finite element analysis of the heel pad. *Journal of Biomechanical Engineering*, 134(3), 031002. <https://doi.org/10.1115/1.4005692>
- Danko, M., Sekac, J., Dzivakova, E., Zivcak, J., & Hudak, R. (2023). 3D printing of individual running insoles—A case study. *Orthopedic Research and Reviews*, 15, 105-118. <https://doi.org/10.2147/ORR.S399624>
- Filardi, V. (2018). Finite element analysis of the foot: stress and displacement shielding. *Journal of Orthopaedics*, 15(4), 974-979. <https://doi.org/10.1016/j.jor.2018.08.037>
- Hu, C.-W., Dabnichki, P., Baca, A., Nguyen, C. T., & Pang, T. Y. (2021). Preventive strategy of flatfoot deformity using fully automated procedure. *Medical Engineering & Physics*, 95, 15-24.

Artículos

<https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2021.07.006>

Jastifer, J. R. (2023). Intrinsic muscles of the foot: Anatomy, function, rehabilitation. *Physical Therapy in Sport*, 61, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.ptsp.2023.02.005>

Jonnala, U. K., & Kumar, Y. R. (2023). Design and development of fused deposition modeling (FDM) 3D-Printed Orthotic Insole by using gyroid structure. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 145, 106005. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2023.106005>

Kermen, E., & Mohammadi, H. (2021). Mechanics of foot orthotics: Material properties. *Journal of Medical Engineering & Technology*, 45(8), 627-641. <https://doi.org/10.1080/03091902.2021.1940332>

Kharazi, M., Bohm, S., Theodorakis, C., Mersmann, F., & Arampatzis, A. (2021). Quantifying mechanical loading and elastic strain energy of the human Achilles tendon during walking and running. *Scientific Reports*, 11(1), 5830. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84847-w>

Lee, H., Eom, R.-i., & Lee, Y. (2019). Evaluation of the Mechanical Properties of Porous Thermoplastic Polyurethane Obtained by 3D Printing for Protective Gear. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019(1), 5838361. <https://doi.org/10.1155/2019/5838361>

Li, J., Shu, W., Yang, Y., & Yan, R. (2020). Parametric modeling and performance analysis of a personalized insole based on 3D scanning and selective laser sintering. *International Journal of Computer Integrated Manufacturing*, 33(9), 936-945. <https://doi.org/10.1080/0951192X.2020.1815849>

Luboz, V., Perrier, A., Bucki, M., Diot, B., Cannard, F., Vuillerme, N., & Payan, Y. (2015). Influence of the calcaneus shape on the risk of posterior heel ulcer using 3D patient-specific biomechanical modeling. *Annals of Biomedical Engineering*, 43(2), 325-335. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1182-6>

McKeon, P. O., Hertel, J., Bramble, D., & Davis, I. (2015). The foot core system: a new paradigm for understanding intrinsic foot muscle function. *British Journal of Sports Medicine*, 49(5), 290. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2013-092690>

Mendes, A. A. M. T., de Almeida Silva, H. J., Costa, A. R. A., Pinheiro, Y. T., de Almeida Lins, C. A., & de Souza, M. C. (2020). Main types of insoles described in the literature and their applicability for musculoskeletal disorders of the lower limbs: A systematic review of clinical studies. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*, 24(4), 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2020.06.001>

Parker, D., Cooper, G., Pearson, S., Crofts, G., Howard, D., Busby, P., & Nester, C. (2015). A device for characterising the mechanical properties of the plantar soft tissue of the foot. *Medical Engineering & Physics*, 37(11), 1098-1104. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2015.08.008>

Requena-Pérez, M., Andrés-Cano, P., Galán-Romero, L., & Suffo, M. (2024). Comparative study of biomodels manufactured using 3D printing techniques for surgical planning and medical training. *Expert Review of Medical Devices*, 21(3), 239-248. <https://doi.org/10.1080/17434440.2024.2306884>

Rodríguez-Parada, L., de la Rosa, S., & Mayuet, P. F. (2021). Influence of 3D-Printed TPU Properties for the Design of Elastic Products. *Polymers*, 13(15), 2519. <https://doi.org/10.3390/polym13152519>

Rohm, K., & Manas-Zloczower, I. (2023). A micromechanical approach to TPU mechanical properties: Framework and experimental validation. *Mechanics of Materials*, 180, 104627. <https://doi.org/10.1016/j.mechmat.2023.104627>

Roupa, I., da Silva, M. R., Marques, F., Gonçalves, S. B., Flores, P., & da Silva, M. T. (2022). On the modeling of biomechanical systems for human movement analysis: a narrative review. *Archives of Computational Methods in Engineering*, 29(7), 4915-4958. <https://doi.org/10.1007/s11831-022-09757-0>

Artículos

Schreiber, J. J., Anderson, P. A., Rosas, H. G., Buchholz, A. L., & Au, A. G. (2011). Hounsfield Units for Assessing Bone Mineral Density and Strength: A Tool for Osteoporosis Management. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 93(11), 1057-1063.
<https://doi.org/10.2106/jbjs.J.00160>

Serrato-Pedrosa, J. A., Urriolagoitia-Sosa, G., Romero-Ángeles, B., Carrasco-Hernández, F., Gallegos-Funes, F. J., Trejo-Enriquez, A., Carbajal-López, A., Gomez-Niebla, J. A., Correa-Corona, M. I., & Urriolagoitia-Calderón, G. M. (2024). Numerical Analysis of the Plantar Pressure Points during the Stance Phases for the Design of a 3D-Printable Patient-Specific Insole. *Prosthesis*, 6(3), 429-456.
<https://doi.org/10.3390/prosthesis6030032>

Serrato-Pedrosa, J. A., Urriolagoitia-Sosa, G., Romero-Ángeles, B., Urriolagoitia-Calderón, G. M., Cruz-López, S., Urriolagoitia-Luna, A., Carbajal-López, D. E., Guereca-Ibarra, J. R., & Murillo-Aleman, G. (2024). Biomechanical Evaluation of Plantar Pressure Distribution towards a Customized 3D Orthotic Device: A Methodological Case Study through a Finite Element Analysis Approach. *Applied Sciences*, 14(4), 1650.
<https://doi.org/10.3390/app14041650>

Smith, S. G., Yokich, M. K., Beaudette, S. M., Brown, S. H., & Bent, L. R. (2019). Effects of foot position on skin structural deformation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 95, 240-248.
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.04.012>

Song, Y., Shao, E., Bíró, I., Baker, J. S., & Gu, Y. (2022). Finite element modelling for footwear design and evaluation: A systematic scoping review. *Heliyon*, 8(10), e10940.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10940>

Strzalkowski, N. D. J., Triano, J. J., Lam, C. K., Templeton, C. A., & Bent, L. R. (2015). Thresholds of skin sensitivity are partially influenced by mechanical properties of the skin on the foot sole. *Physiological Reports*, 3(6), e12425.
<https://doi.org/10.14814/phy2.12425>

Su, S., Mo, Z., Guo, J., & Fan, Y. (2017). The Effect of Arch Height and Material Hardness of Personalized Insole on Correction and Tissues of Flatfoot. *Journal of Healthcare Engineering*, 2017(1), 8614341.
<https://doi.org/10.1155/2017/8614341>

Van Alsenoy, K., van der Linden, M. L., Ryu, J. H., Girard, O., Al Raisi, L., & Santos, D. (2023). Isolated and combined effects of EVA and TPU custom foot orthoses on constant speed, treadmill running kinematics. *Frontiers in Earth Science*, Volume 11 - 2023, 1170661.
<https://doi.org/10.3389/feart.2023.1170661>

Xie, J., Zhou, Z., Luo, T., Pang, H., Meng, X., & Zhou, F. (2021). Study on design and additive manufacturing of customized bionic sports sole for the elderly. *IEEE Access*, 9, 69830-69838.
<https://doi.org/10.1109/ACCESS.2021.3078162>

Zabala-Travers, S. (2021). Biomodeling and 3D printing: a novel radiology subspecialty. *Annals of 3D Printed Medicine*, 4, 100038.
<https://doi.org/10.1016/j.stlm.2021.100038>

Zolfagharian, A., Lakhi, M., Ranjbar, S., & Bodaghi, M. (2021). Custom shoe sole design and modeling toward 3D printing. *International Journal of Bioprinting*, 7(4), 396.
<https://doi.org/10.18063/ijb.v7i4.396>

Zuñiga, J., Moscoso, M., Padilla-Huamantínco, P. G., Lazo-Porras, M., Tenorio-Mucha, J., Padilla-Huamantínco, W., & Tincopa, J. P. (2022). Development of 3D-Printed Orthopedic Insoles for Patients with Diabetes and Evaluation with Electronic Pressure Sensors. *Designs*, 6(5), 95.
<https://doi.org/10.3390/designs6050095>

Expresión génica diferencial en *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T asociada con la producción de sideróforos relacionados al biocontrol

Valeria Valenzuela Ruiz^a; Fannie I. Parra Cota^c; Gustavo Santoyo^d; Lorena Jacqueline Gómez-Godínez^e; Luis A. Cira Chávez^a; Sergio de los Santos Villalobos^{b*}

^aDepartamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano. Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), 5 de febrero 818 Sur, C.P. 85000, Col. Centro, Cd. Obregón, Sonora, México. ^bDepartamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano. Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), 5 de febrero 818 Sur, C.P. 85000, Col. Centro, Cd. Obregón, Sonora, México. ^cCampo Experimental Norman E. Borlaug, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Norman E. Borlaug Km. 12, C. P. 85000, Cd. Obregón, Sonora, México. ^dInstituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Av. Francisco J. Múgica s/n, Edif. B-3, Ciudad Universitaria, C. P. 58030, Morelia, Michoacán, México. ^eLaboratorio de Recursos Genéticos Microbianos, Centro Nacional de Recursos Genéticos. Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Boulevard de la Biodiversidad 400, Rancho las Cruces, C.P. 47600. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.

* Autor de correspondencia: sergio.delossantos@itson.edu.mx

Resumen

La búsqueda de alternativas sostenibles para el manejo de enfermedades en cultivos básicos como el trigo ha impulsado el estudio de microorganismos con potencial de biocontrol. En este contexto, *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T destaca por su capacidad para sintetizar metabolitos bioactivos, entre ellos sideróforos con alta afinidad por el hierro, como la bacillibactina. El objetivo de este estudio fue caracterizar la regulación transcripcional de los genes asociados a la biosíntesis de sideróforos a lo largo de diferentes fases de crecimiento. Los análisis de minería genómica mediante KEGG y antiSMASH confirmaron la presencia de un clúster génico completo de tipo *dhbA*, *dhbC* y *dhbF*, mientras que el análisis transcriptómico evidenció una sobreexpresión significativa ($\log_2FC > 2.0$; $FDR < 0.05$) de genes para la producción de sideróforos durante las fases de adaptación y estacionaria en comparación con la fase exponencial. Esta sobreexpresión se asocia a la desrepresión mediada por el regulador Fur bajo condiciones de baja biodisponibilidad de hierro en el medio LB. La activación del gen *besA*, involucrado en la aceleración de la esporulación mediada por bacillibactina, sugiere una interrelación entre la adquisición de hierro y la diferenciación celular. Desde una perspectiva ecológica, la expresión sostenida de sideróforos podría contribuir a la inhibición de fitopatógenos dependientes de hierro mediante competencia férrica. En conjunto, estos resultados sustentan el doble papel de la bacillibactina en la adaptación metabólica y el biocontrol, consolidando a *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T como un prometedor agente biotecnológico.

Palabras Claves: Sideróforos, Biocontrol, Transcriptoma, *Bacillus*

Abstract

The growing need for sustainable agricultural practices has intensified research on microbial biocontrol agents capable of mitigating phytopathogenic diseases in staple crops such as wheat. In this context, *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T has emerged as a promising biocontrol strain due to its ability to synthesize bioactive metabolites, including siderophores with high iron-chelating capacity. This study aimed to elucidate the transcriptional regulation of siderophore biosynthesis pathways, particularly bacillibactin, across different growth phases of TE3^T. Genomic mining using KEGG and antiSMASH confirmed the presence of a complete *dhbA*, *dhbC* and *dhbF* gene cluster. Transcriptomic analysis revealed significant overexpression ($\log_2FC > 2.0$, $FDR < 0.05$) of siderophore-related genes during the adaptation and stationary phases compared to the exponential phase. This overexpression is consistent with Fur-mediated derepression under conditions of limited iron bioavailability in LB medium, suggesting an adaptive response for maintaining iron homeostasis

and ecological competitiveness. Moreover, the upregulation of *besA*, a gene required for bacillibactin-mediated acceleration of sporulation, indicates a potential link between siderophore synthesis and cell differentiation. From an ecological perspective, the sustained expression of siderophore genes likely contributes to the inhibition of phytopathogens through competitive iron sequestration and the modulation of rhizospheric interactions. Collectively, these findings provide molecular evidence supporting the dual role of bacillibactin in metabolic adaptation and biocontrol, reinforcing the potential of *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T as a biological control agent.

Key Words: Siderophores, Biocontrol, Transcriptome, Bacillus

Introducción

El crecimiento de la población mundial, que se proyecta alcanzará los 9.7 mil millones de personas para 2050 (United Nations, 2024), ejerce una presión creciente sobre los sistemas agrícolas para garantizar la seguridad alimentaria global (FAO, 2020). Con el crecimiento proyectado de la población mundial, se estima que la demanda de alimentos se duplicará para el año 2050 en comparación con los niveles actuales (Pérez Vázquez et al., 2018). Este escenario ha impulsado la evolución de los sistemas de producción agrícola hacia la adopción de variedades más productivas y resilientes, cultivadas bajo prácticas agrícolas intensivas, con el doble objetivo de sostener el rendimiento y preservar la calidad nutricional (Lenaerts et al., 2019; Pretty & Bharucha, 2014).

En este contexto, los cereales desempeñan un papel estratégico, ya que constituyen la base de la dieta mundial y aportan más del 50% de la energía calórica consumida por la humanidad (das Graças Costa & de Souza, 2023). Entre ellos, el trigo se distingue como una fuente esencial de carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales, fibra dietética y diversos fitoquímicos que contribuyen de manera significativa a la nutrición humana. Aportando cerca del 20% de las calorías y proteínas consumidas por la población mundial (FAO, 2022), pero al mismo tiempo es uno de los cultivos más vulnerables a los efectos del cambio climático (Asseng et al., 2015; Pequeno et al., 2024). El incremento de las temperaturas y la variabilidad en los patrones de precipitación no solo reducen su rendimiento, con pérdidas estimadas de hasta un 6% por cada grado Celsius de aumento en la temperatura global, donde a la vez se proyecta un incremento en la incidencia y propagación de enfermedades fúngicas y bacterianas que amenazan su productividad (Zhao et al., 2017).

Entre las enfermedades más comunes en trigo destacan la roya de la hoja (*Puccinia triticina*), la roya amarilla (*P. striiformis*), la roya del tallo (*P. graminis*), la mancha foliar causada por *Bipolaris sorokiniana*, la septoriosis (*Zymoseptoria tritici*) y la fusariosis de la espiga (*Fusarium graminearum*), que en conjunto ocasionan pérdidas anuales estimadas del 15 a 20% de la producción mundial (FAO, 2021; Figueroa et al., 2018; Villa-Rodríguez et al., 2016). Estas cifras representan no solo un riesgo económico, sino también una amenaza directa a la seguridad alimentaria, particularmente en regiones altamente dependientes del trigo.

Ante este panorama, el biocontrol microbiano se plantea como una estrategia sostenible y eficaz frente al uso excesivo de fungicidas sintéticos. Entre los microorganismos más estudiados, las especies del género *Bacillus* han demostrado una notable versatilidad como agentes de biocontrol, gracias a su capacidad de formar endosporas resistentes, colonizar eficientemente la rizósfera y sintetizar una amplia gama de metabolitos bioactivos (Khan et al., 2022).

Un mecanismo clave es la producción de sideróforos (Dunyashev et al., 2021; Khan et al., 2022). Estos son metabolitos secundarios de bajo peso molecular que actúan como agentes quelantes de hierro, un micronutriente esencial pero generalmente limitado en los suelos debido a su baja solubilidad en condiciones aeróbicas y a pH neutro o alcalino (Timofeeva et al., 2022). En tales ambientes, el hierro se encuentra predominantemente en forma de Fe³⁺ insoluble, lo que lo hace poco accesible para la mayoría de los organismos (Timofeeva et al., 2022). *Bacillus* sintetiza sideróforos como la bacillibactina, que poseen grupos catecol o hidroxamato con alta afinidad por el Fe³⁺, formando complejos solubles que son transportados activamente hacia el interior de

la célula bacteriana mediante receptores de membrana específicos dependientes de transportadores ABC (Khan et al., 2022). Este mecanismo no solo asegura la supervivencia y el crecimiento de la bacteria en ambientes pobres en hierro, sino que también restringe la disponibilidad de este nutriente crítico para los fitopatógenos presentes en la rizósfera (Vishwakarma et al., 2024). La competencia por hierro es, por tanto, un mecanismo indirecto de biocontrol, al limitar la proliferación de hongos y bacterias patógenas que requieren hierro para procesos fundamentales como la respiración, la síntesis de ADN y la producción de toxinas (Villarreal-Delgado et al., 2018). Adicionalmente, se ha reportado que los sideróforos de *Bacillus* pueden inducir respuestas defensivas en las plantas, actuando como señales moleculares que estimulan la resistencia sistémica inducida (ISR), lo que amplifica su efecto protector contra una amplia gama de patógenos (Parra-Cota et al., 2024). Su acción no solo limita la disponibilidad de este micronutriente esencial para los patógenos, reduciendo así su crecimiento, sino que también fortalece la competitividad de *Bacillus* en ambientes rizosféricos pobres en hierro (Villarreal-Delgado et al., 2018). Además, estudios recientes han mostrado que la producción de sideróforos puede incrementar la supresión de enfermedades de suelo hasta en un 40% (Shao et al., 2024), subrayando su importancia en el biocontrol.

En este contexto, analizar la expresión génica diferencial en *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T ofrece la oportunidad de comprender con mayor profundidad los mecanismos moleculares que sustentan la producción de metabolitos bioactivos y su potencial aplicación.

Materiales y métodos

Cepas microbianas y condiciones de cultivo
Bacillus cabrialesii subsp. *cabrialesii* TE3^T fue obtenida de la colección de cultivos COLMENA (de los Santos Villalobos et al., 2019; de los Santos-Villalobos et al., 2021). La cepa TE3^T se cultivó en caldo nutritivo a 32 °C durante 24 h (1×10^6 UFC mL⁻¹) para la extracción de ADN mediante el método de fenol-cloroformo (Valenzuela-Aragón et al., 2019).

Minería genómica

Utilizando el genoma completo de *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T (número de acceso GenBank: GCA_004124315.2) (Valenzuela Ruiz et al., 2023) se realizó una minería genómica utilizando la plataforma KEGG Automatic Annotation Server (KAAS) (Moriya et al., 2007) con el objetivo de identificar y anotar genes asociados a rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de sideróforos. El genoma se sometió a un análisis de anotación funcional mediante el método *bi-directional best hit* (BBH), empleando como referencia organismos del género *Bacillus* disponibles en la base de datos KEGG.

Extracción y secuenciación de ARN

La cepa TE3^T se cultivó en medio LB a 28 °C y se tomaron muestras a las 6, 12 y 18 h para la extracción de ARN. Las células se lisaron con lisozima y reactivo TRI, seguidas de una extracción con cloroformo, precipitación con isopropanol y tratamiento con DNasa (Villa-Rodríguez et al., 2018). La integridad del ARN se confirmó mediante Bioanalyzer. Las bibliotecas se prepararon con el kit TruSeq Stranded mRNA (tras la eliminación de rRNA) y se secuenciaron en un Illumina NextSeq 500 (2 × 150 bp).

Procesamiento y análisis de datos transcriptómicos

Las lecturas crudas fueron filtradas por calidad con Trimmomatic v0.32 (Bolger et al., 2014) y alineadas al genoma de TE3^T (GenBank: CP096889.1) utilizando Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012). La cuantificación de lecturas se realizó con FeatureCounts (Liao et al., 2014). El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo con EdgeR v3.24.1 (FDR < 0.05, $|\log_2FC| \geq 1.5$) (Robinson et al., 2009).

Anotación funcional y análisis de redes

Los genes diferencialmente expresados (DEGs, por sus siglas en inglés) se anotaron con RAST (Brettin et al., 2015). Sus posiciones genómicas se reordenaron con Mauve (Rissman et al., 2009) y las secuencias se analizaron en busca de BGCs relacionados con el biocontrol utilizando antiSMASH v7.1.0 (Blin et al., 2025). Las secuencias proteicas asociadas se visualizaron con STRING v11 (Szklarczyk et al., 2019) y Cytoscape v3.10.2 (Shannon et al., 2003).

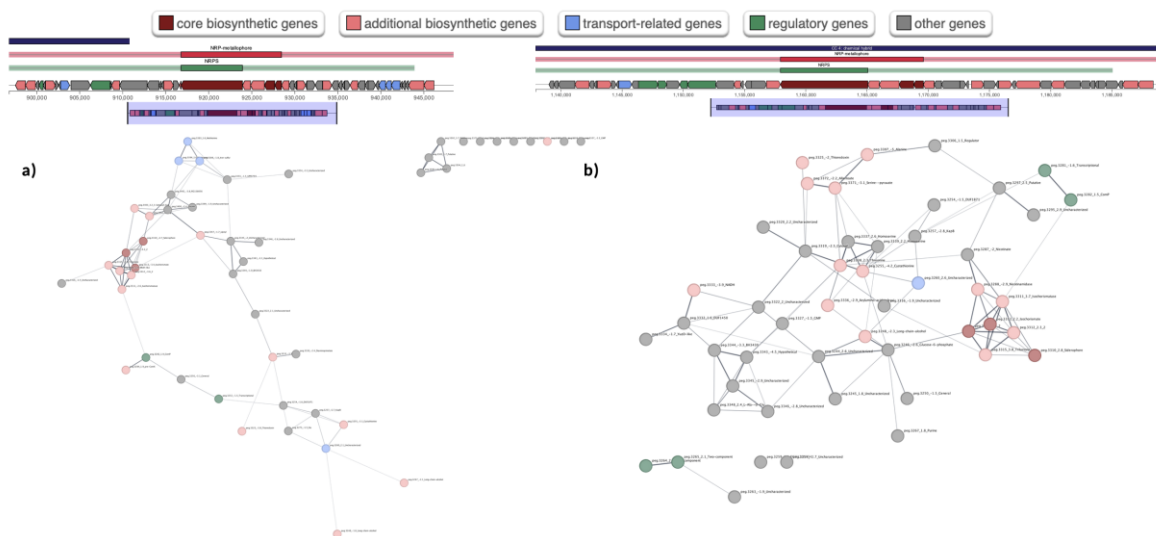


Figura 2. a) Red de interacción de genes expresados diferencialmente ($\log_2FC \pm 1.5$) en la comparación entre la fase exponencial y la fase de adaptación. b) Red de interacción de genes expresados diferencialmente en la comparación entre la fase estacionaria y la fase de adaptación. Ambas redes fueron generadas en STRING v12.0.

La sobreexpresión de genes asociados a la biosíntesis de sideróforos, particularmente de bacillibactina, observada en *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T durante las fases de adaptación y estacionaria, puede atribuirse a mecanismos de regulación dependientes de la disponibilidad intracelular de hierro, así como al ajuste metabólico característico de estas etapas del crecimiento bacteriano. Este comportamiento es consistente con la fisiología general de especies del género *Bacillus*, en las cuales la expresión de sideróforos se activa en respuesta a condiciones de estrés férrico o competencia nutricional (Santos et al., 2014).

Durante la fase de adaptación, las células experimentan una transición metabólica hacia las condiciones del nuevo entorno, caracterizada por una reprogramación transcripcional compleja orientada a optimizar la adquisición de nutrientes, la síntesis de cofactores y la protección frente al estrés oxidativo (Luo et al., 2017; Nithyapriya et al., 2021). En este contexto, la activación temprana de los genes implicados en la síntesis y transporte de sideróforos representa una respuesta anticipatoria ante la baja biodisponibilidad de hierro libre en el medio LB, el cual, aunque no carece completamente del metal, se considera moderadamente limitado en hierro biodisponible debido a la presencia de quelantes naturales en los extractos de levadura y peptonas. Esta limitación desencadena la desrepresión del

regulador Fur (*Ferric uptake regulator*), promoviendo la expresión de los genes *dhbA*, *dhbC* y *dhbF* (\log_2FC de 3.4, 4.2 y 2.7, respectivamente, en la fase de adaptación), responsables de la síntesis de bacillibactina, así como de los sistemas de transporte dependientes de permeasas tipo FeuA–FeuBCD, que facilitan la internalización del complejo Fe^{3+} –bacillibactina. La activación de esta vía optimiza la capacidad de adaptación y supervivencia en un entorno nutricionalmente restrictivo (Rizzi et al., 2019; Santos et al., 2020).

En la fase estacionaria, la persistencia de la sobreexpresión de genes relacionados con sideróforos (genes *core* con valores de \log_2FC de 2.2-2.8) sugiere un mecanismo adaptativo de mantenimiento metabólico bajo condiciones de agotamiento de nutrientes y competencia microbiana intensificada (Santos et al., 2014). En esta etapa, TE3^T podría sostener la producción de bacillibactina como una estrategia dual: por un lado, para asegurar la disponibilidad intracelular de hierro requerido por enzimas esenciales y prevenir el colapso de procesos redox críticos; y por otro, para restringir el acceso al hierro por parte de microorganismos competidores, generando un microambiente de exclusión férrica (Rizzi et al., 2019; Santos et al., 2020; Santos et al., 2014; Villa-Rodríguez et al., 2021). La activación del gen *besA* (\log_2FC de 3.8 en la fase estacionaria con adaptación como control), involucrado en la aceleración

de la esporulación mediada por bacillibactina, refuerza esta interpretación (Rizzi et al., 2019). Este fenómeno ha sido ampliamente documentado en especies filogenéticamente relacionadas, como *B. subtilis* y *B. velezensis*, donde la producción sostenida de sideróforos se asocia con una mayor competitividad ecológica y con la capacidad de biocontrol frente a fitopatógenos dependientes del hierro (Villarreal-Delgado et al., 2018; Zhong et al., 2024). Finalmente, Villa Rodríguez et al., (2021), evidenciaron que TE3^T posee genes para la producción de bacillibactina y otros metabolitos secundarios con capacidad para inhibir el crecimiento de *Bipolaris sorokiniana*, agente causal de la mancha borrosa en trigo.

Desde un punto de vista ecológico y funcional, la expresión mantenida de sideróforos durante la fase estacionaria confiere a *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T una ventaja adaptativa significativa en ambientes oligotróficos, como la rizosfera, donde la presión selectiva por hierro es elevada. La secreción extracelular de bacillibactina no solo promueve la adquisición de hierro por la célula productora, sino que también modula la disponibilidad férrica del microambiente, limitando el crecimiento de microorganismos competidores e incluso induciendo respuestas de resistencia sistémica en las plantas hospedantes (Kesaulya et al., 2018). Este comportamiento sugiere que la sobreexpresión de genes siderofóricos observada en *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T responde a una estrategia metabólica integrada, en la cual la regulación del hierro, la respuesta al estrés y la competencia ecológica convergen para optimizar la supervivencia y la funcionalidad biocontroladora del microorganismo.

Conclusiones

En conjunto, los resultados evidencian que *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T presenta una regulación transcripcional altamente sensible a la disponibilidad de hierro, manifestada por la sobreexpresión coordinada de genes implicados en la biosíntesis y transporte de sideróforos tipo bacillibactina durante las fases de adaptación y estacionaria. Este patrón de expresión sugiere una estrategia metabólica multifuncional, en la que la producción sostenida de bacillibactina no solo garantiza la homeostasis férrica intracelular, sino que

también potencia la competitividad ecológica del microorganismo en entornos oligotróficos como la rizósfera. En la rizósfera del trigo, dicha capacidad podría favorecer la competitividad ecológica de la cepa y contribuir a la inhibición de fitopatógenos dependientes de hierro, como *Bipolaris sorokiniana*, mediante mecanismos de competencia férrica y posible inducción de resistencia sistémica. La persistencia de la actividad de sideróforos apunta a una interconexión funcional entre la adquisición de hierro, la diferenciación celular y la supervivencia bacteriana bajo condiciones de estrés nutricional.

Desde una perspectiva aplicada, esta capacidad de regulación y producción de sideróforos confiere a *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T un papel determinante en la inhibición de fitopatógenos dependientes de hierro, a través de mecanismos de competencia férrica y de posible inducción de resistencia sistémica en plantas hospedantes. Estos hallazgos fortalecen el potencial de *Bacillus cabrialesii* subsp. *cabrialesii* TE3^T como una herramienta prometedora en estrategias sostenibles de manejo agrícola.

Referencias

- Asseng, S., Ewert, F., Martre, P., Rötter, R. P., Lobell, D. B., Cammarano, D., Kimball, B. A., Ottman, M. J., Wall, G. W., White, J. W., Reynolds, M. P., Alderman, P. D., Prasad, P. V. V., Aggarwal, P. K., Anothai, J., Basso, B., Biernath, C., Challinor, A. J., De Sanctis, G., ... Zhu, Y. (2015). Rising temperatures reduce global wheat production. *Nature Climate Change*, 5(2), 143–147. <https://doi.org/10.1038/nclimate2470>
- Blin, K., Shaw, S., Vader, L., Szenei, J., Reitz, Z. L., Augustijn, H. E., Cediél-Becerra, J. D. D., de Crécy-Lagard, V., Koetsier, R. A., Williams, S. E., Cruz-Morales, P., Wongwas, S., Segurado Luchsinger, A. E., Biermann, F., Korenskaia, A., Zdouc, M. M., Meijer, D., Terlouw, B. R., van der Hooft, J. J. J., ... Weber, T. (2025). antiSMASH 8.0: extended gene cluster detection capabilities and analyses of chemistry, enzymology, and regulation. *Nucleic Acids Research*, 53(W1), W32–W38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf334>

Artículos

- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Thomason, J. A., Stevens, R., Vonstein, V., Wattam, A. R., & Xia, F. (2015). RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5(1), 8365. <https://doi.org/10.1038/srep08365>
- das Graças Costa, E., & de Souza, P. M. (2023). Introduction to Cereals. In *Cereal-Based Food Products* (pp. 1–24). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-40308-8_1
- de los Santos Villalobos, S., Robles, R. I., Parra Cota, F. I., Larsen, J., Lozano, P., & Tiedje, J. M. (2019). *Bacillus cabrialesii* sp. Nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*triticum turgidum* subsp. *durum*) in the yaqui valley, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(12), 3939–3945. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003711>
- de los Santos-Villalobos, S., Díaz-Rodríguez, A. M., Ávila-Mascareño, M. F., Martínez-Vidales, A. D., & Parra-Cota, F. I. (2021). Colmena: A culture collection of native microorganisms for harnessing the agrobiotechnological potential in soils and contributing to food security. In *Diversity* (Vol. 13, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/d13080337>
- Dunyashev, T. P., Laptev, G. Yu., Yildirim, E. A., Ilina, L. A., Filippova, V. A., Tiurina, D. G., Dubrovin, A. V., Tarlavin, N. V., Bikonya, S. N., Brazhnik, E. A., Melikidy, V. H., & Platonov, A. V. (2021). Identification of genes associated with the synthesis of siderophores by the *Bacillus subtilis*. *Journal of Livestock Science*, 12(4), 287. <https://doi.org/10.33259/JLivestSci.2021.287-291>
- Figuerola, M., Hammond-Kosack, K. E., & Solomon, P. S. (2018). A review of wheat diseases—a field perspective. In *Molecular Plant Pathology* (Vol. 19, Issue 6, pp. 1523–1536). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/mpp.12618>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2020). *New standards to curb the global spread of plant pests and diseases*. <http://www.fao.org/news/story/en/item/1187738/code/>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2022). *FAOSTAT: Food Balances (2010-2021)
- Isela Parra-Cota, F., Experimental Norman Borlaug, C. E., Ángel Leal, J., Fernanda Villarreal-Delgado, M., Enrique Arreola Silva No, G., Guzmán, C., Escalante-Beltrán, A., & de los Santos-Villalobos, S. (2024). *El género Bacillus como agente de control biológico de plagas y patógenos para una agricultura sostenible*. <https://doi.org/10.18781/R>
- Kesaulya, H., Hasinu, J. V., & Tuhumury, G. N. (2018). Potential of *Bacillus spp* produces siderophores insuppressing thewilt disease of banana plants. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 102, 012016. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/102/1/012016>
- Khan, A. R., Mustafa, A., Hyder, S., Valipour, M., Rizvi, Z. F., Gondal, A. S., Yousuf, Z., Iqbal, R., & Daraz, U. (2022). *Bacillus spp.* as Bioagents: Uses and Application for Sustainable Agriculture. *Biology*, 11(12), 1763. <https://doi.org/10.3390/biology11121763>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lenaerts, B., Collard, B. C. Y., & Demont, M. (2019). Review: Improving global food security through accelerated plant breeding. *Plant Science*, 287, 110207. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110207>

Artículos

- Luo, H., Chiang, H.-H., Louw, M., Susanto, A., & Chen, D. (2017). Nutrient Sensing and the Oxidative Stress Response. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(6), 449–460. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.02.008>
- Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A. C., & Kanehisa, M. (2007). KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server), W182–W185. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm321>
- Nithyapriya, S., Lalitha, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., Dailin, D. J., El Enshasy, H. A., Luh Suriani, N., & Herlambang, S. (2021). Production, Purification, and Characterization of Bacillibactin Siderophore of *Bacillus subtilis* and Its Application for Improvement in Plant Growth and Oil Content in Sesame. *Sustainability*, 13(10), 5394. <https://doi.org/10.3390/su13105394>
- Pequeno, D. N. L., Ferreira, T. B., Fernandes, J. M. C., Singh, P. K., Pavan, W., Sonder, K., Robertson, R., Krupnik, T. J., Erenstein, O., & Asseng, S. (2024). Production vulnerability to wheat blast disease under climate change. *Nature Climate Change*, 14(2), 178–183. <https://doi.org/10.1038/s41558-023-01902-2>
- Pérez Vázquez, A., Leyva Trinidad, D. A., & Gómez Merino, F. C. (2018). Desafíos y propuestas para lograr la seguridad alimentaria hacia el año 2050. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(1), 175–189. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.857>
- Pretty, J., & Bharucha, Z. P. (2014). Sustainable intensification in agricultural systems. *Annals of Botany*, 114(8), 1571–1596. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu205>
- Rissman, A. I., Mau, B., Biehl, B. S., Darling, A. E., Glasner, J. D., & Perna, N. T. (2009). Reordering contigs of draft genomes using the Mauve Aligner. *Bioinformatics*, 25(16), 2071–2073. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp356>
- Rizzi, A., Roy, S., Bellenger, J.-P., & Beauregard, P. B. (2019). Iron Homeostasis in *Bacillus subtilis* Requires Siderophore Production and Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.02439-18>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Santos, R. E. R. de S., Batista, B. B., & da Silva Neto, J. F. (2020). Ferric Uptake Regulator Fur Coordinates Siderophore Production and Defense against Iron Toxicity and Oxidative Stress and Contributes to Virulence in *Chromobacterium violaceum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(21). <https://doi.org/10.1128/AEM.01620-20>
- Santos, S., Neto, I. F. F., Machado, M. D., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2014). Siderophore Production by *Bacillus megaterium*: Effect of Growth Phase and Cultural Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(1), 549–560. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0562-y>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Shao, Z., Gu, S., Zhang, X., Xue, J., Yan, T., Guo, S., Pommier, T., Jousset, A., Yang, T., Xu, Y., Shen, Q., & Wei, Z. (2024). Siderophore interactions drive the ability of *Pseudomonas* spp. consortia to protect tomato against *Ralstonia solanacearum*. *Horticulture Research*, 11(9). <https://doi.org/10.1093/hr/uhae186>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2019). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>

Artículos

Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2022). Bacterial Siderophores: Classification, Biosynthesis, Perspectives of Use in Agriculture. *Plants*, 11(22), 3065. <https://doi.org/10.3390/plants11223065>

United Nations. (2024). 9.7 billion on Earth by 2050, but growth rate slowing, says new UN population report. United Nations Academic Impact. Retrieved September 7, 2025, from <https://www.un.org/en/academic-impact/97-billion-earth-2050-growth-rate-slowing-says-new-un-population-report>

Valenzuela Ruiz, V., Santoyo, G., Gómez Godínez, L. J., Cira Chávez, L. A., Parra Cota, F. I., & de los Santos Villalobos, S. (2023). Complete genome sequencing of *Bacillus cabrialesii* TE3^T: A plant growth-promoting and biological control agent isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) in the Yaqui Valley. *Current Research in Microbial Sciences*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2023.100193>

Valenzuela-Aragon, B., Parra-Cota, F. I., Santoyo, G., Arellano-Wattenbarger, G. L., & de los Santos-Villalobos, S. (2019). Plant-assisted selection: a promising alternative for in vivo identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) growth promoting bacteria. *Plant and Soil*, 435(1–2), 367–384. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-03901-1>

Villa-Rodríguez, E., Ibarra-Gámez, C., & de los Santos-Villalobos, S. (2018). Extraction of high-quality RNA from *Bacillus subtilis* with a lysozyme pre-treatment followed by the Trizol method. *Journal of Microbiological Methods*, 147, 14–16. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.02.011>

Villa-Rodríguez, E., Lugo-Enríquez, C., de los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., & Figueroa-López, P. (2016). First Report of *Cochliobolus sativus* Causing Spot Blotch on Durum Wheat (*Triticum durum*) in the Yaqui Valley, Mexico. In *Plant Disease* (Vol. 100, Issue 11). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0634-PDN>

Villa-Rodríguez, E., Moreno-Ulloa, A., Castro-Longoria, E., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2021). Integrated omics approaches for deciphering antifungal metabolites produced by a novel *Bacillus* species, *B. cabrialesii* TE3^T, against the spot blotch disease of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Microbiological Research*, 251, 126826. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126826>

Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>

Vishwakarma, S. K., Ilyas, T., Shahid, M., Malviya, D., Kumar, S., Singh, S., Johri, P., Singh, U. B., & Singh, H. V. (2024). *Bacillus* spp.: Nature's Gift to Agriculture and Humankind (pp. 1–36). https://doi.org/10.1007/978-981-99-8195-3_1

Zhao, C., Liu, B., Piao, S., Wang, X., Lobell, D. B., Huang, Y., Huang, M., Yao, Y., Bassu, S., Ciais, P., Durand, J.-L., Elliott, J., Ewert, F., Janssens, I. A., Li, T., Lin, E., Liu, Q., Martre, P., Müller, C., ... Asseng, S. (2017). Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35), 9326–9331. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701762114>

Zhong, X., Jin, Y., Ren, H., Hong, T., Zheng, J., Fan, W., Hong, J., Chen, Z., Wang, A., Lu, H., Zhong, K., & Huang, G. (2024). Research progress of *Bacillus velezensis* in plant disease resistance and growth promotion. *Frontiers in Industrial Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/finmi.2024.1442980>

Premio Sergio Sánchez Esquivel 2025 a los mejores protocolos de tesis en Biotecnología y Bioingeniería

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

Los protocolos ganadores de la convocatoria 2025 son:

Licenciatura

De verde a marrón: Desarrollo de una fábrica fotosintética de melanina en *Chlamydomonas reinhardtii* mediante expresión heteróloga.

Ana Carleth Escobar-Ricárdez, Caleb Edmundo Rosales-Linares, Gabriela Aimee Salazar-Mata, Lorena Yamileth Balón-Rosas, Daniela Morales-Sánchez

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

Maestría

Aspectos clave, desafíos y oportunidades en el desarrollo de vacunas contra la Influenza aviar

Jennifer Jaramillo-López, Romina Rodríguez-Sanoja, Gabriela Gómez Verduzco, Silvia Moreno-Mendieta

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

Doctorado

Conductive materials and their promising role in the anaerobic treatment of agro-industrial wastewaters.

Christopher A. Díaz-Muñiz, Francisco J. Cervantes

Laboratory for Research on Advanced Processes for Water Treatment, Engineering Institute, Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México

De verde a marrón: Desarrollo de una fábrica fotosintética de melanina en *Chlamydomonas reinhardtii* mediante expresión heteróloga

Ana Carleth Escobar-Ricárdez^{1,2}, Caleb Edmundo Rosales-Linares^{1,3}, Gabriela Aimee Salazar-Mata¹, Lorena Yamileth Balón-Rosas¹, Daniela Morales-Sánchez^{1*}

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62700

²Tecnológico Nacional de México, campus Tuxtla Gutiérrez, Carretera Panamericana Km 1080, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, 29050

³Universidad Politécnica del Estado de Morelos UPEMor, Boulevard Cuauhnáhuac 566, Jiutepec, Morelos, 62550

*daniela.morales@ibt.unam.mx

Resumen

Chlamydomonas reinhardtii es un organismo fotosintético versátil y seguro (GRAS), que emerge como una plataforma prometedora para la producción de metabolitos de alto valor biotecnológico. Este estudio demuestra la viabilidad de utilizar esta microalga como fábrica fotosintética para la producción de melanina. Mediante el sistema de biología sintética MoClo, se diseñó el vector MelAL2 portando el gen *melA* de *Rhizobium etli*, que codifica para una tirosinasa clave en la ruta de síntesis de melanina. La cepa *C. reinhardtii* UVM4 fue transformada exitosamente y las cepas seleccionadas mostraron una alta fluorescencia del reportero mRuby2 (hasta 120 RFU) confirmando la expresión del transgén. Cabe mencionar que, la integración estable del gen *melA* en el genoma de *C. reinhardtii* se validó por PCR. Asimismo, los cultivos transformados desarrollaron una pigmentación oscura distintiva, correlacionada con un aumento significativo en la absorbancia a 400 nm en el sobrenadante, confirmando cuantitativamente la producción de melanina en niveles muy superiores a los observados en las cepas control. Estos resultados constituyen una prueba pionera para la síntesis heteróloga de melanina en microalgas, estableciendo las bases para el desarrollo de plataformas de producción sostenible para pigmentos y otros metabolitos de interés biotecnológico.

Palabras Claves: Fotoprotección, tirosinasa, gen *melA*, microalga, MoClo

Abstract

Chlamydomonas reinhardtii is a versatile and safe photosynthetic organism (GRAS), emerging as a promising platform for the production of high-value biotechnological metabolites. This study demonstrates the feasibility of using this microalga as a photosynthetic factory for melanin production. Through the MoClo synthetic biology system, the MelAL2 vector was designed carrying the *melA* gene from *Rhizobium etli*, which encodes a key tyrosinase in the melanin synthesis pathway. The *C. reinhardtii* UVM4 strain was successfully transformed and the selected strains showed high mRuby2 reporter fluorescence (up to 120 RFU) confirming transgene expression. Notably, the stable integration of the *melA* gene into the *C. reinhardtii* genome was validated by PCR. Furthermore, the transformed cultures developed a distinctive dark pigmentation, correlated with a significant increase in absorbance at 400 nm in the supernatant, quantitatively confirming melanin production at levels far superior to those observed in control strains. These results constitute pioneering proof for the heterologous synthesis of melanin in microalgae, establishing the foundation for the development of sustainable production platforms for pigments and other metabolites of biotechnological interest.

Key Words: Photoprotection, tyrosinase, *melA* gene, microalgae, MoClo

Introducción

Las microalgas, un grupo diverso de microorganismos fotosintéticos presentes tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres, incluyen algas eucariotas y procariotas (Maeda *et al.*, 1995). Las cianobacterias o algas verde-azules son ejemplos de procariotas (*Cyanophyceae*), mientras que las eucariotas, incluyen a las algas verdes (*Chlorophyta*), las diatomeas (*Bacillariophyta*), algas cafés (*Phaeophyceae*), algas rojas (*Rhodophyceae*), etc. (Mata *et al.*, 2010). Estos microorganismos no solo se destacan por su eficiencia en la fijación de CO₂ (superior a la de las plantas), sino también por su capacidad para convertir este gas en moléculas de alto valor biotecnológico, como ácidos grasos omega, proteínas, polisacáridos, probióticos, vitaminas y pigmentos antioxidantes (Morales-Sánchez *et al.*, 2017).

Su versatilidad metabólica permite que se puedan cultivar de tres maneras diferentes: 1. Cultivo fototrófico, utilizando ya sea luz solar o artificial y CO₂ en sistemas abiertos al ambiente tipo circuito y/o en sistemas cerrados como fotobiorreactores (Mata *et al.*, 2010), 2. Cultivo heterotrófico, utilizando una fuente de carbono orgánica en biorreactores (Morales-Sánchez *et al.*, 2015) y 3. Cultivo mixotrófico, con luz y fuente de carbono orgánica (Moon *et al.*, 2013, Urme *et al.*, 2025). Cabe destacar que los cultivos de microalgas pueden integrar múltiples objetivos dentro de un mismo proceso, como el tratamiento de aguas residuales, la obtención de biocombustibles, la producción de sustancias químicas finas, entre otros (Arredondo and Vázquez-Duhalt, 1991).

Asimismo, estos microorganismos se perfilan como una plataforma eficiente, segura y económica para la producción de proteínas heterólogas. Esta ventaja se sustenta en su condición de organismo GRAS (Generally Recognized as Safe), al no compartir patógenos con humanos, lo que garantiza un alto perfil de seguridad (Torres-Tiji *et al.*, 2020). A ello se suman sus cortos tiempos de duplicación (inferiores a 5 horas en algunas especies) y sus requerimientos nutricionales sencillos, basados principalmente en CO₂, lo que abarata notablemente su cultivo a gran escala (Metting Jr., 1996). Estas

características las hacen significativamente más viables en comparación con sistemas convencionales como el cultivo de células de mamíferos (Banerjee and Ward, 2022). Gracias a estas propiedades, las microalgas resultan altamente prometedoras para su uso como suplementos alimenticios, vehículos de administración de fármacos, posibles portadores de vacunas orales y sistemas sostenibles de producción de proteínas heterólogas (Khavari *et al.*, 2021).

***Chlamydomonas reinhardtii* como plataforma genética**

El alga verde unicelular *C. reinhardtii* es un organismo modelo consolidado en estudios de la fotosíntesis, la función flagelar, entre otros (Riekhof *et al.*, 2005; Merchant *et al.*, 2007). Su genoma está ampliamente caracterizado, con sus tres compartimentos (núcleo, cloroplasto y mitocondria) completamente secuenciados (Maul *et al.*, 2002; Popescu and Lee 2007; Merchant *et al.*, 2007) y cuenta con un robusto conjunto de herramientas moleculares y métodos de transformación genética bien establecidos (Harris *et al.*, 2009). Desde el punto de vista biotecnológico, *C. reinhardtii* presenta ventajas notables ya que crece relativamente rápido, duplicándose cada 5-8 horas con una capacidad de alcanzar altas densidades celulares (superiores a 10⁷ células/mL) y requerimientos de cultivo mínimos, lo que la hace económica y de manejo sencillo (Rasala and Mayfield, 2011). En ella se han expresado con éxito diversas proteínas de valor, como las hormonas de crecimiento humano, vacunas y otros biofármacos, tanto en el núcleo como en el cloroplasto (Tabla 1) (Wannathong *et al.*, 2016; Siddiqui *et al.*, 2020). No obstante, el desarrollo de sistemas de expresión multigénica en esta microalga ha avanzado más lentamente que en otros huéspedes, como las células de tabaco (Guo *et al.*, 2017). A pesar de ello, los recientes avances en la producción de proteínas recombinantes sugieren que *C. reinhardtii* podría tener un papel clave en la producción de compuestos de interés para las industrias farmacéutica y nutracéutica (Masi *et al.*, 2023).

Una estrategia particularmente prometedora para superar estas limitaciones es la adopción de herramientas estandarizadas de biología sintética. Bajo el marco del ciclo Diseño-Construcción-Prueba-Aprendizaje (Endy,

2011), estas herramientas permiten la ingeniería racional de organismos mediante el uso de partes genéticas modulares y estandarizadas para simplificar la construcción de moléculas de ADN (Endy, 2011). Entre los estándares disponibles, destaca la tecnología Golden Gate Modular Cloning (MoClo) (Casini *et al.*, 2015), que se basa en enzimas de restricción de tipo IIS. Este sistema permite el ensamblaje eficiente de construcciones multigénicas complejas a partir de partes básicas de genes como promotores, CDS y terminadores en tan solo dos pasos (Engler *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2011). MoClo no sólo acelera el proceso de clonación, sino que también facilita la combinatoria de elementos genéticos y el diseño de vías metabólicas completas (Smanski *et al.*, 2014). Si bien, MoClo es eficiente y versátil, requiere de una inversión inicial en el desarrollo de una biblioteca estandarizada de partes genéticas “domesticadas”, es decir, libres de sitios de restricción tipo IIS y, en su caso, optimizadas en codones para el huésped (según corresponda). Para *C. reinhardtii*, este recurso ya está disponible, un kit abierto de 119 módulos genéticos, validados funcionalmente en diversas cepas, que incluyen promotores, UTRs, terminadores, etiquetas, reporteros, genes de resistencia a antibióticos e intrones clonados en diversas posiciones para permitir la máxima modularidad (Crozet *et al.*, 2018). Este conjunto de herramientas permite la rápida construcción de cepas modificadas genéticamente, agilizando tanto la investigación básica como las aplicaciones biotecnológicas en microalgas.

Producción heteróloga de proteínas en *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii se considera una plataforma potencial para el estudio de la

expresión génica (Rasala and Mayfield 2015), no solo por su estatus GRAS y sus genomas completamente secuenciados (Specht *et al.*, 2010), sino también por características genómicas distintivas. Entre estas destacan un genoma nuclear rico en GC (62-68%) y un genoma cloroplástico predominantemente AT (Franklin *et al.*, 2002). No obstante, la inserción aleatoria de ADN en el núcleo (con un tamaño de aproximadamente 121 Mb) suele asociarse con deleciones y un bajo nivel de expresión de proteínas heterólogas, lo que representa un desafío para la obtención de mutantes estables (Harris, 2001). Por el contrario, el genoma del cloroplasto (195 kb), que presenta una estructura de repeticiones invertidas similar al de plantas terrestres (Harris, 2001), ofrece una ruta alternativa para la expresión.

Los niveles de expresión de proteínas heterólogas dependen de diversos factores, como la optimización de codones de proteínas recombinantes, la secuencia promotora, las regiones no traducidas (UTR), el silenciamiento génico, las proteasas y otras moléculas presentes en el medio de cultivo. Otro factor crítico que afecta la expresión son los clones generados que no se mantienen en condiciones selectivas (Doron *et al.*, 2016; Cutolo *et al.*, 2022). La tabla 1 muestra un resumen, a partir del año 2010, de las biomoléculas expresadas en *C. reinhardtii*, su organelo genéticamente transformado, el porcentaje de expresión de la proteína soluble total, la concentración en miligramos por litro y el vector de clonación. La mayoría de los estudios sobre expresión heteróloga de proteínas en microalgas se han centrado en *C. reinhardtii* como organismo modelo por su facilidad de cultivo y manipulación genética. Además, la producción heteróloga de proteínas ha sido factible tanto en núcleo como en el cloroplasto (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las biomoléculas expresadas heterológamente en *C. reinhardtii*, su organelo genéticamente transformado, porcentaje de expresión de la proteína soluble total, concentración en miligramos por litro y el vector de clonación.

Proteína heteróloga	Organelo donde se efectuó la expresión	*Porcentaje en la proteína soluble total (%)	Expresión (mg/L)	Vector	Referencia
14FN3 (14va fibronectina humana tipo dominio III)	Cloroplasto	3	ND	<i>psbA</i> /cepa deficiente D1	Rasala <i>et al.</i> 2010 [43]
VEGF (factor de crecimiento vascular)	Cloroplasto	2	ND	<i>psbA</i> /cepa deficiente D1	Rasala <i>et al.</i> 2010 [43]

Artículos

endotelial humano) Endolysins-Pal y Cpl1	Núcleo	1	1.3 mg/gDCW	Sitio de inserción <i>psbH</i> /vector pSRSap/promotor <i>psaA</i>	Stoffels <i>et al.</i> 2017 [64]
Hormona de crecimiento	ND	ND	0.5	Sitio de inserción <i>psbH</i> /vector pASapl/promotor <i>psaA</i> y <i>atpA</i>	Wannathong <i>et al.</i> 2016 [65]
Xilanasa	Núcleo	0.25	ND	Sistema de expresión Ble 2A	Rasala <i>et al.</i> 2012 [67]
Inmunotoxina (α CD22H - CH23PE40)	Cloroplasto	0.2-0.3	ND	<i>psbA</i> /cepa deficiente D1	Tran <i>et al.</i> 2013 [42]
CD22Gel (CD22-scFv ligado a gelonina, una proteína que inactiva el ribosoma de <i>G. multiflorum</i>)	Cloroplasto	0.2-0.3	ND	<i>psbA</i> /cepa deficiente D1	Tran <i>et al.</i> 2013 [42]
PFs25 (proteína de superficie de 25 kDa de <i>Plasmodium falciparum</i>)	Cloroplasto	0.5	125	<i>psbA</i> /cepa deficiente D1	Gregory <i>et al.</i> 2013 [54]
NCQ proteína sintética con péptidos bioactivos que presentan diferentes actividades	Cloroplasto	0.16-2.4	ND	Sitio de inserción <i>tscA</i> /promotores <i>rbcl</i> o <i>atpA</i>	Campos-Quevedo <i>et al.</i> 2013 [60]
Proteína del papilomavirus humano tipo 16 E7, mutante atenuada (E7GGG)	Cloroplasto	0.12	ND	Sitio de inserción /vector pCG2/ promotor <i>psbD</i>	Demurtas <i>et al.</i> 2013
Angiotensina II fusionado al antígeno de la cápside del virus de Hepatitis B (HbcAg)	Núcleo	0.05	ND	Sitio de inserción random / cassette del vector HbcAgl / promotor CaMV 35S	Soria-Guerra <i>et al.</i> 2014

ND: No disponible

*Expresión (%) a partir de la proteína soluble total.

La producción de proteínas heterólogas se ha establecido en diversos sistemas, como bacterias, levaduras, plantas, animales transgénicos y células de mamíferos (Wang *et al.*, 2019; Mi *et al.*, 2020; Morin *et al.*, 2020). Sin embargo, cada plataforma presenta limitaciones significativas en comparación con *C. reinhardtii*. Por ejemplo, los sistemas bacterianos carecen de la maquinaria para modificaciones postraduccionales complejas y con frecuencia presentan dificultades en el plegamiento y ensamblaje de proteínas multiméricas (Potvin and Zhang, 2010). Las levaduras, aunque eucariotas, tienden a realizar hiperglucosilación de las proteínas recombinantes, lo que puede alterar su función biológica o inducir respuestas

inmunogénicas no deseadas, limitando así su aplicabilidad terapéutica (Serrano, 2001). Por otra parte, los sistemas basados en células de mamíferos e insectos implican elevados costos de cultivo, medios complejos y una mayor susceptibilidad a la contaminación microbiana (Serrano 2001; Schirrmann *et al.*, 2008). Frente a estas desventajas, *C. reinhardtii* surge como una alternativa que las supera en gran medida, al ofrecer un sistema de expresión eucariota completo, de bajo costo y con perfil GRAS. El desafío principal radica en su aún bajo rendimiento proteico en comparación con estas plataformas tradicionales. Sin embargo, esta limitación podría superarse en el futuro mediante estrategias integradas que combinen el

escalado en biorreactores, la optimización de los bioprocesos y el continuo avance en las herramientas de ingeniería genética específicas para esta microalga.

Del gen al pigmento: Producción de melanina

La melanina es un biopolímero que cumple funciones cruciales en la fotoprotección contra la radiación ultravioleta, la resistencia al estrés oxidativo y la adaptación a condiciones ambientales extremas. Cabe mencionar que este pigmento deriva su nombre "melanina" de "melanos", una antigua palabra griega para negro (Tran-Ly *et al.*, 2020). En los humanos, la melanina es el pigmento prominente responsable del color de la piel, el cabello y los ojos (Tran-Ly *et al.*, 2020). Su estructura polimérica y naturaleza aromática le confieren propiedades únicas, entre las que destacan su capacidad de absorber un amplio espectro de radiación, actuar como intercambiador catiónico, funcionar como semiconductor amorfo y en algunos casos, exhibir actividad antimicrobiana y antiviral (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). Estas características han motivado su creciente exploración en campos tan diversos como la biomedicina, la cosmética, la electrónica orgánica y el desarrollo de biomateriales avanzados. No obstante, su producción a escala industrial se ha visto limitada por los métodos convencionales, a menudo costosos y poco sostenibles, lo que ha incentivado la búsqueda de sistemas de producción alternativos (Tsouko *et al.*, 2023; Menichetti *et al.*, 2024). Entre los distintos tipos de melanina, las eumelaninas, caracterizadas por su coloración que oscila entre el marrón y el negro, son las más abundantes y mejor estudiadas. Su biosíntesis se inicia con la oxidación de L-tirosina, proceso catalizado principalmente por la enzima tirosinasa (EC 1.14.18.1), una monooxigenasa dependiente de cobre. Esta enzima lleva a cabo la hidroxilación de L-tirosina a L-DOPA y posteriormente oxida este compuesto a dopacromo, el cual se polimeriza de manera espontánea para formar eumelanina (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). Estructuralmente, las tirosinasas presentan un sitio activo con dos átomos de cobre coordinados por residuos de histidina, lo que les confiere la capacidad de interactuar con el oxígeno molecular y catalizar reacciones de oxidación altamente específicas.

Recientemente, las tirosinasas de origen bacteriano han despertado especial interés debido a su mayor estabilidad y propiedades bioquímicas distintivas en comparación con las de origen fúngico. Entre ellas, la tirosinasa codificada por el gen *melA* de *Rhizobium etli* CFN42 ha sido ampliamente caracterizada (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006; Chávez-Béjar *et al.*, 2013; Scranton *et al.*, 2015). Entre las plataformas microbianas, *Escherichia coli* se ha consolidado como el sistema preferente para la producción recombinante de esta enzima. Cuando se expresa en *E. coli*, la tirosinasa MelA demuestra una alta eficiencia en la síntesis de eumelanina a partir de L-tirosina (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). Una ventaja fundamental es su mayor afinidad por la L-tirosina que por la L-DOPA, lo que minimiza la acumulación de intermediarios inestables y favorece una ruta de síntesis más directa. El desarrollo de cepas de *E. coli* genéticamente optimizadas ha permitido aumentar la disponibilidad del precursor L-tirosina, mejorando los rendimientos. Este sistema presenta ventajas notables, como su alta densidad celular, crecimiento rápido y la disponibilidad de herramientas genéticas establecidas. No obstante, a pesar del éxito de *E. coli* como plataforma de expresión, este sistema presenta limitaciones inherentes, como la inactivación térmica de la tirosinasa a 37°C (que obliga a usar temperaturas subóptimas), el consumo competitivo de L-tirosina endógena que inhibe el crecimiento celular y la acumulación intracelular de intermediarios reactivos. Estas desventajas subrayan la necesidad de explorar sistemas de expresión alternativos, más allá de los modelos bacterianos tradicionales, que permitan una producción de melanina más eficiente y sostenible.

¿Del sol a la melanina? La biofábrica del AlgaeLab IBT-UNAM

La expresión heteróloga del gen *melA* en *C. reinhardtii* representa un área prácticamente inexplorada. Si bien, la producción de eumelanina mediante este gen se ha demostrado viable en bacterias, no existen reportes previos de su síntesis en microalgas. Este vacío de conocimiento representa una oportunidad para desarrollar un sistema de producción eucariota y fotosintético para la producción de melanina, que podría superar limitaciones asociadas a *E. coli*, tales como la

inestabilidad termal de la enzima y la toxicidad de intermediarios. Además, se plantea la hipótesis de que el ambiente intracelular de *C. reinhardtii*, con sus compartimentos subcelulares especializados y su maquinaria metabólica organizada, podría promover un plegamiento más eficiente de la tirosinasa MelA, así como una biosíntesis más estable y eficaz del polímero.

La elección de *C. reinhardtii* como hospedero alternativo se fundamenta directamente en sus ventajas fisiológicas. Su rango de temperatura de cultivo óptimo (25-28°C) es ideal para la actividad de la termolábil tirosinasa MelA, resolviendo el principal cuello de botella en *E. coli*. Asimismo, su capacidad de crecer de manera fotoautotrófica utilizando CO₂ permite concebir un proceso de bioproducción sustancialmente más económico y sostenible, al eliminar la necesidad de fuentes de carbono orgánicas costosas.

Finalmente, se espera que el contexto metabólico único de esta microalga, capaz de sintetizar su propio precursor L-tirosina de manera fotoautotrófica, favorezca un suministro eficiente del sustrato para la síntesis del polímero.

En conjunto, los antecedentes delimitan un panorama donde la melanina es un biopolímero de gran valor biotecnológico, el gen *melA* de *R. etli* es un biocatalizador robusto y bien caracterizado y *E. coli* ha servido como sistema inicial para demostrar la factibilidad de su producción recombinante. Sin embargo, trasladar esta estrategia a *C. reinhardtii* no solo representa un reto, sino

también una innovación tecnológica con implicaciones en la bioproducción sustentable de eumelanina, integrando la biología sintética con el potencial de los organismos fotosintéticos. Por estas razones y con base en los antecedentes descritos previamente, el presente trabajo realizado en nuestro laboratorio plantea evaluar la viabilidad de la expresión heteróloga del gen *melA* de *R. etli* (que codifica para una tirosinasa involucrada en la síntesis de melanina) en el citoplasma de *C. reinhardtii* usando el sistema MoClo. La estrategia general de nuestro trabajo se muestra en la Figura 1, en donde se pueden apreciar los tres puntos clave del proceso de generación de las cepas transgénicas: A) diseño y construcción, B) transformación y selección y C) producción y caracterización.

En este estudio, nuestros resultados indicaron que la transformación de *C. reinhardtii* UVM4 con el vector MelAL2 fue exitosa, ya que se observó la pigmentación en los cultivos transformados, un indicativo directo de la síntesis de melanina (Figura 2, matraces). Además, la expresión del transgén se confirmó cuantitativamente con la medición de la proteína fluorescente mRuby2, donde las cepas transformadas presentaron niveles significativamente más altos de fluorescencia (hasta 120 RFU, $p < 0.05$) en comparación con las cepas control UVM4 y CC125. Adicionalmente, la cuantificación de melanina en el sobrenadante de cultivo (Tabla 2), reveló que algunas de las cepas transformadas presentaron valores de absorbancia a 400 nm, superiores a los controles no transformados.

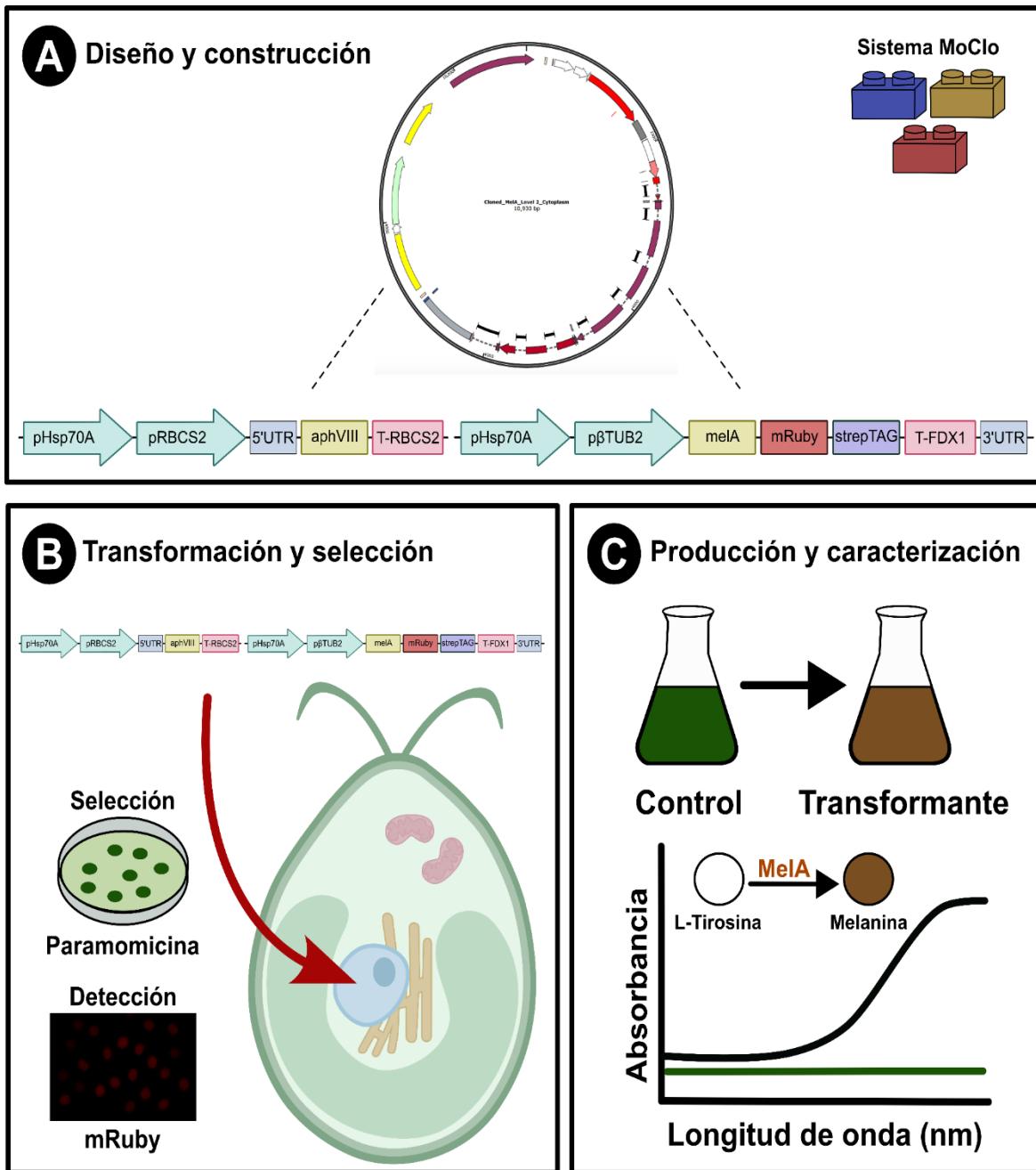


Figura 1. Estrategia para el desarrollo de una fábrica fotosintética de melanina en *Chlamydomonas reinhardtii*. (A) Diseño del vector de expresión MelAL2 mediante el sistema MoClo, mostrando los elementos modulares: casete de resistencia a paramomicina y unidad transcripcional con el gen *melA* de *R. etli*, el reportero mRuby2 y la etiqueta StrepTAG bajo el control de promotores HSP70A-RBCS2. (B) Transformación de *C. reinhardtii* UVM4 y selección de clones transformantes basada en resistencia a paramomicina y fluorescencia mRuby2. (C) Evidencia fenotípica y bioquímica de la producción de melanina: cambio de color en cultivos líquidos, espectro de absorción característico en el sobrenadante y representación esquemática de la conversión de L-tirosina a melanina por la tirosinasa MelA funcional.

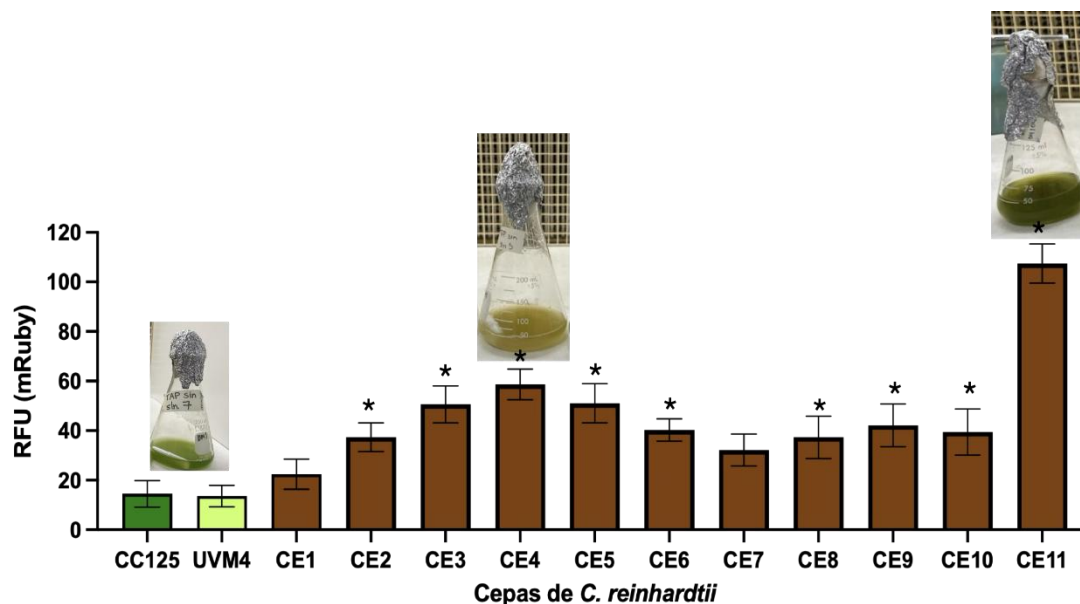


Figura 2. Niveles de RFU asociados a la fluorescencia de mRuby2 en cepas transformadas y producción de melanina en sobrenadante. Los asteriscos en las barras denotan diferencias significativas con respecto a la cepa parental UVM4 y cepa silvestre CC125 (análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba de diferencias significativas honestas (HSD) *post-hoc* Tukey ($p < 0.05$)).

Tabla 2. Producción de melanina en algunas cepas transgénicas seleccionadas.

Cepa	Melanina en sobrenadante (DO_{400nm}/g_{DCW})
UVM4	0
CE4	1.9
CE6	2.46
CE7	2.5
CE10	1.62

Conclusiones

La expresión exitosa del gen *melA* de *R. etli* en *C. reinhardtii* y la posterior producción de melanina demuestran la viabilidad de esta microalga como plataforma de expresión eucariota para enzimas complejas y metabolitos de alto valor biotecnológico. Este logro no solo valida la funcionalidad de la tirosinasa bacteriana MelA en un contexto algal, sino que también confirma la capacidad de *C. reinhardtii* para suministrar el precursor L-tirosina y catalizar las reacciones de polimerización necesarias. Este hallazgo es de particular relevancia biotecnológica, ya que constituye, según nuestro conocimiento, el primer reporte de producción de melanina en

microalgas. Los resultados obtenidos posicionan a *C. reinhardtii* como una alternativa sostenible y prometedora a los sistemas bacterianos tradicionales, superando limitaciones clave como la termolabilidad de la tirosinasa y el uso de fuentes de carbono orgánicas. Al aprovechar su metabolismo fotosintético, este sistema representa un avance significativo hacia procesos de producción más ecológicos y económicamente viables. Futuras investigaciones deberán centrarse en incrementar la productividad de melanina mediante estrategias de ingeniería metabólica, evaluar la escalabilidad en biorreactores y explorar las propiedades

fisicoquímicas de la melanina algal para aplicaciones biotecnológicas específicas

Referencias

Arredondo BOR & Vázquez-Duhalt R (1991) Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo* 17, 99-111.
Banerjee A & Ward V (2022) Production of recombinant and therapeutic proteins in microalgae. *Current Opinion in Biotechnology* 78, 102784.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102784>

Cabrera-Valladares N, Martínez A, Piñero S, Lagunas-Muñoz VH, Tinoco R, de Anda R, Vázquez-Duhalt R, Bolívar F, & Gosset G (2006). Expression of the *melA* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(6), 772–779.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.004>

Casini A, Storch M, Baldwin GS, & Ellis T (2015) Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 568-576.

<https://doi.org/10.1038/nrm4014>

Chávez-Béjar, M. I., Balderas-Hernandez, V. E., Gutiérrez-Alejandre, A., Martínez, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* to optimize melanin synthesis from glucose. *Microbial cell factories*, 12, 108.

<https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-108>

Crozet P, Navarro FJ, Willmund F, Mehrshahi P, Bakowski K, Lauersen KJ, Pérez-Pérez ME, Auroy P, Rovira AG, Sauret-Gueto S, et al. (2018) Birth of a photosynthetic chassis: a MoClo toolkit enabling synthetic biology in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synthetic Biology* 7 2074-2086.

<https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00251>

Cutolo EA, Mandalà G, Dall'osto L, Bassi R (2022) Harnessing the algal chloroplast for heterologous protein production. *Microorganisms* 10, 743.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms10040743>

Doron L, Segal N, Shapira M (2016) Transgene Expression in Microalgae—From Tools to Applications. *Frontiers in Plant Science* 7, 505.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00505>

Endy D (2011) Building a new biology. *Comptes Rendus Chimie* 14, 424-428.

<https://doi.org/10.1016/j.crci.2010.11.013>

Engler C, Kandzia R, & Marillonnet S (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS One* 3, e3647.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>

Franklin S, Ngo B, Efuet E, Mayfield SP (2002) Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *The Plant Journal* 30, 733–744.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01319.x>

Guo Y, Xiong H, Fan Q, & Duanmu D (2024) Heterologous gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast by heterologous promoters and terminators, intercistronic expression elements and minichromosome, *Microbiology and Biotechnology* 17(12), e70069.

<https://doi.org/10.1111/1751-7915.70069>

Harris EH (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 52, 363–406.

<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363>

Harris EH, Stern DB, Witman GB (2009) *The Chlamydomonas Sourcebook*. Second Edition, Academic Press, Oxford.

Khavari F, Saidijam M, Taheri M, & Nouri F (2021) Microalgae: therapeutic potentials and applications. *Molecular Biology Reports* 48, 4757.

<https://doi.org/10.1007/s11033-021-06422-w>

Maeda, K., Owada, M., Kimura, N., Omata, K., & Karube, I. (1995). CO₂ fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energy Conversion and Management*. Jun-Sept 1995; 36(6-9), 717-720.

[https://doi.org/10.1016/0196-8904\(95\)00105-M](https://doi.org/10.1016/0196-8904(95)00105-M)

Artículos

- Masi A, Leonelli F, Scognamiglio V, Gasperuzzo G, Antonacci A, & Terzidis MA (2023) *Chlamydomonas reinhardtii*: a factory of nutraceutical and food supplements for human health. *Molecules* 28(3), 1185. <https://doi.org/10.3390/molecules28031185>
- Mata, T. M., Martinis, A. A., Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Jan 2010; 14(1), 217-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Maul JE, Lilly JW, Cui L, dePamphilis CW, Miller W, Harris EH, Stern DB (2002) The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *The Plant Cell* 14(11), 2659-2679. <https://doi.org/10.1105/tpc.006155>
- Menichetti, A., Mordini, D., Vicenzi, S., & Montalti, M. (2024). Melanin for photoprotection and hair coloration in the emerging era of nanocosmetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 5862. <https://doi.org/10.3390/ijms25115862>
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, et al. (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245-250. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>
- Metting Jr FB (1996) Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 17(5-6), 477-489. <https://doi.org/10.1007/BF01574779>
- Mi Y, Zhu Z, Qian G, Li Y, Meng X, Xue J, Chen Q, Sun W, Shi Y (2020) Inducing hairy roots by *Agrobacterium* rhizogenes mediated transformation in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Journal of Visualized Experiments* 157, e60828. <https://doi.org/10.3791/60828>
- Moon M, Kim CW, Park WK, Yoo G, Choi YE & Yang JW (2013) Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research* 2(4), 325-357. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.003>
- Morales-Sánchez D, Kim Y, Terng EL, Peterson L, & Cerutti H (2017) A multidomain enzyme, with glycerol-3-phosphate dehydrogenase and phosphatase activities, is involved in a chloroplastic pathway for glycerol synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 90: 1079-1092. <https://doi.org/10.1111/tpj.13530>
- Morales-Sánchez D, Martínez-Rodríguez A & Martínez A (2015) Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1773-2>
- Morin N, Czerwiec Q, Nicaud JM, Neuvéglise C, Rossignol T (2020) Transforming *Candida hispaniensis*, a promising oleaginous and flavogenic yeast. *Yeast* 37, 348–355. <https://doi.org/10.1002/yea.3466>
- Popescu CE & Lee RW (2007) Mitochondrial genome sequence evolution in *Chlamydomonas*. *Genetics* 175, 819-826. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.063156>
- Potvin G, & Zhang Z (2010) Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review. *Biotechnology Advances* 28, 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.006>
- Rasala BA & Mayfield SP (2011) The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. *Bioengineered Bugs* 2(1), 50-54. <https://doi.org/10.4161/bbug.2.1.13423>
- Riekhof WR, Sears BB, & Benning C (2005) Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr. *Eukaryotic Cell* 4, 242-252. <https://doi.org/10.1128/ec.4.2.242-252.2005>
- Schirrmann T, Al-Halabi L, Dübel S, Hust M (2008) Production systems for recombinant antibodies. *Frontiers in Bioscience-Landmark: a journal and virtual library* 13, 4576–4594. <https://doi.org/10.2741/3024>
- Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. (2015). *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products

Artículos

production. *The Plant Journal*, 82(3), 523–531.

<https://doi.org/10.1111/tpj.12780>

Serrano AG (2001) Estudio de la producción heteróloga de una lipasa del hongo *Rhizopus oryzae* en la levadura metilotrófica *Pichia Pastoris*. Ph.D. Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, 2001.

Siddiqui A, Wei Z, Boehm M, & Ahmad N (2020) Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 67, 30-40.

<https://doi.org/10.1002/bab.1823>

Smanski MJ, Bhatia S, Zhao D, Park Y, Woodruff BAL, Giannoukos G, Ciulla D, Busby M, Calderon J, Nicol R, Gordon DB, Densmore D, & Voight CA (2014) Functional optimization of gene clusters by combinatorial design and assembly. *Nature Biotechnology* 32, 1241-1249.

<https://doi.org/10.1038/nbt.3063>

Specht E, Miyake-Stoner S, Mayfield S (2010) Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology Letters* 32, 1373–1383.

<https://doi.org/10.1007/s10529-010-0326-5>

Torres-Tiji Y, Fields FJ & Mayfield SP (2020) Microalgae as a future food source. *Biotechnology Advances* 41, 107536.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107536>

Tran-Ly, A.N., Reyes, C., Schwarze, F.W.M.R. et al. Microbial production of melanin and its

various applications. *World J Microbiol Biotechnol* 36, 170 (2020).

<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02941-z>

Tsouko, E., Tolia, E., & Sarris, D. (2023). Microbial melanin: Renewable feedstock and emerging applications in food-related systems. *Sustainability*, 15(9), 7516.

<https://doi.org/10.3390/su15097516>

Urme SRA, Barth L, Serrano-Carreón L, Martínez A & Morales-Sánchez D (2025) Mixotrophic cultivation of polar microalga *Chlamydomonas* sp. RCC2488 (Malina) using potato peel hydrolysates as carbon source. *BioEnergy Research* 18, 28.

<https://doi.org/10.1007/s12155-025-10829-9>

Wang L, Yang L, Wen X, Chen Z, Liang Q, Li J, Wang W (2019) Rapid and high-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by square-wave electroporation. *Bioscience Reports* 39, BSR20181210.

<https://doi.org/10.1042/BSR20181210>

Wannathong T, Waterhouse JC, Young RE, Economou CK, & Purton S (2016) New tools for chloroplast genetic engineering allow the synthesis of human growth hormone in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 5467-5477.

<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7354-6>

Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, & Marillonnet S (2011) A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS ONE* 6, e16765.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>

Aspectos clave, desafíos y oportunidades en el desarrollo de vacunas contra la Influenza aviar

Jennifer Jaramillo-López^{1,2}, Romina Rodríguez-Sanoja¹, Gabriela Gómez Verduzco³, Silvia Moreno-Mendieta^{1,4*}

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A.P. 70228, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México.

²Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A.P. 70228, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México

³Departamento de medicina y zootecnia de aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A.P. 70228, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México.

⁴Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), Av. Insurgentes Sur 1582, Col. Crédito Constructor, Ciudad de México 03940.

*moreno.sa@iibiomedicas.unam.mx

Resumen

El virus de influenza aviar (IA) puede clasificarse como virus de baja o alta patogenicidad; este último es de importancia en Salud Pública ya que es una zoonosis que provoca alta y rápida mortalidad. Si bien hay vacunas comerciales contra esta enfermedad, estas no previenen la infección, sino que disminuyen la mortalidad y reducen la diseminación viral. Estas vacunas son de virus inactivado y enfrentan muchas limitaciones, tales como la incapacidad de proteger si el virus con el que se inmuniza no coincide con el subtipo circulante en campo, la aplicación parenteral, la cual se busca evitar en el contexto de la avicultura comercial y la falta de inducción de respuesta humoral en mucosas. Frente a esta problemática, este artículo analiza aspectos necesarios a considerar para el desarrollo de nuevas vacunas contra esta enfermedad, destacando los retos que impone la propia naturaleza del virus como el ciclo viral en la célula, la respuesta inmune que se desencadena y la posibilidad de conferir protección universal frente a los principales subtipos, así como las oportunidades que ofrece el enfoque racional actual, en lugar del empírico, para el diseño de vacunas de próxima generación, incluidas las vacunas de subunidades y de vectores. Finalmente, este artículo también examina las estrategias para superar las limitaciones de las vacunas disponibles y en desarrollo, como el uso de adyuvantes y plataformas de entrega para mejorar la respuesta inmune.

Palabras Claves: *influenza aviar, vacunas de nueva generación, respuesta inmune en aves.*

Abstract

Avian influenza (AI) virus can be classified as either low-pathogenic or highly pathogenic; the latter is of public health importance because it is a zoonosis that causes high and rapid mortality. While vaccines against this disease are available on the market, they do not prevent infection but rather decrease mortality and reduce viral shedding. These vaccines are inactivated virus vaccines and face many limitations, such as their inability to protect if the virus used for immunization does not match the circulating subtype in the field, their parenteral administration (which is generally avoided in commercial poultry farming), and their lack of induction of a humoral immune response in mucous membranes. In response to this problem, this article addresses essential considerations for the development of new vaccines against this disease, highlighting the challenges posed by the virus itself and the opportunities presented by the current rational, rather than empirical, approach to designing next-generation vaccines, including subunit and vector vaccines. This approach considers fundamental aspects such as the viral cycle within the cell, the resulting immune response, and the potential for conferring universal protection against the main subtypes. This article also examines strategies for overcoming the limitations of available and developing vaccines, such as the use of adjuvants and delivery platforms to enhance the immune response.

Key Words: *avian influenza, next-generation vaccines, immune response in birds*

Introducción

Los virus de influenza aviar (IA) pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, son de ARN, envueltos, orientados en sentido negativo y con un genoma segmentado en ocho genes, de los cuales destacan los genes que codifican para la Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA), ya que éstas son proteínas ubicadas en la superficie del virión y determinan la clasificación de la IA en subtipos de acuerdo a su combinación, resultando en una amplia variedad de subtipos debido a que se han identificado 16 HA y 9 NA. De acuerdo con su virulencia, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), clasifica a los virus en IA de baja patogenicidad (IABP) e IA de alta patogenicidad (IAAP) (OMSA, 2021a).

La infección por IABP en aves suele limitarse al aparato respiratorio y gastrointestinal debido a la afinidad del virus por replicarse en las células epiteliales y, aunque generalmente es una infección asintomática, también puede provocar una manifestación clínica leve o moderada, caracterizada principalmente por caída en la producción de huevos y pérdida de peso (EFSA, 2017). Por otra parte, los virus de IAAP tienden a replicarse de forma sistémica, debido a una mutación en el sitio de ruptura o clivaje de la HA, el cual pasa de ser monobásico a polibásico; en consecuencia, el clivaje (necesario para el ingreso a la células hospedadora) no será realizado solo por la acción de proteasas tipo tripsina (como en el caso de IABP), sino también por enzimas tipo furina (PACE por sus siglas en inglés, "Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme"), las cuales están unidas a la membrana de la mayoría de células, favoreciendo la replicación en otros tejidos. Por lo general, la infección por IAAP puede ser tan rápida que provoca la muerte súbita del animal antes de que manifieste signos clínicos (OMSA, 1998). Aunque tanto IAAP como IABP tienen un impacto negativo sobre la producción avícola (representado por caída en la producción, pérdida de ganancia de peso y mortalidad), particularmente la IAAP ha cobrado relevancia debido a que ha infectado mamíferos, incluyendo al ser humano (Gashaw, 2020). Por tal motivo, la implementación de medidas de prevención, entre ellas la vacunación, resulta importante para limitar el impacto de esta enfermedad no solo en la avicultura comercial, sino también en la salud pública.

Sin embargo, las vacunas disponibles actualmente no impiden la infección, sino que buscan controlar la enfermedad y evitar la muerte del animal, así como la diseminación del virus que se da a través de secreciones respiratorias u oculares, así como a través de las heces.

Previo al diseño racional de vacunas contra esta enfermedad, es importante considerar aspectos biológicos propios del virus, como la dinámica de infección viral y la respuesta inmune que se desencadena. También es fundamental revisar las ventajas y limitaciones de las vacunas actuales, con el fin de identificar los retos que se deben superar y las oportunidades que se abren para el desarrollo y obtención de nuevas y mejores vacunas.

Ciclo viral

La HA es la proteína responsable del ingreso a la célula, y aunque se sintetiza en su forma precursora, HA0, su activación se produce por la escisión en HA1 y HA2, gracias a la actividad de proteasas tipo tripsina (presentes en aparato respiratorio y gastrointestinal) o enzimas tipo furina (las cuales se expresan de forma generalizada en distintas células) (Chauhan & Gordon, 2022). La subunidad HA1 del virus de IA tiene afinidad a unirse al ácido siálico unido a galactosa mediante enlaces α -2,3 (presentes en receptores de las células del aparato respiratorio de las aves), aunque se ha demostrado que mutaciones en esta secuencia pueden modificar la afinidad hacia enlaces α -2,6, presentes en el aparato respiratorio de los humanos, de esta manera, favoreciendo su infección (AbuBakar et al., 2023).

Una vez que se une al receptor, el virus es endocitado y expuesto al pH ácido del endosoma gracias a la proteína M2, que actúa como canal iónico y permite la acidificación del interior del virión, en consecuencia, la subunidad HA2 expone su péptido de fusión y facilita la unión del virus con la membrana endosomal de la célula infectada, con ello, el complejo ribonucleoproteico (CRNP) viral, que contienen el ARN viral, recubierto por una estructura helicoidal compuesta de nucleoproteína (NP) y un complejo de polimerasas (PB1, PB2 y PA), es liberado dentro de la célula, y aunque la fusión ocurre en la región perinuclear, el transporte hacia el núcleo celular es facilitado por señales de localización nuclear de la NP

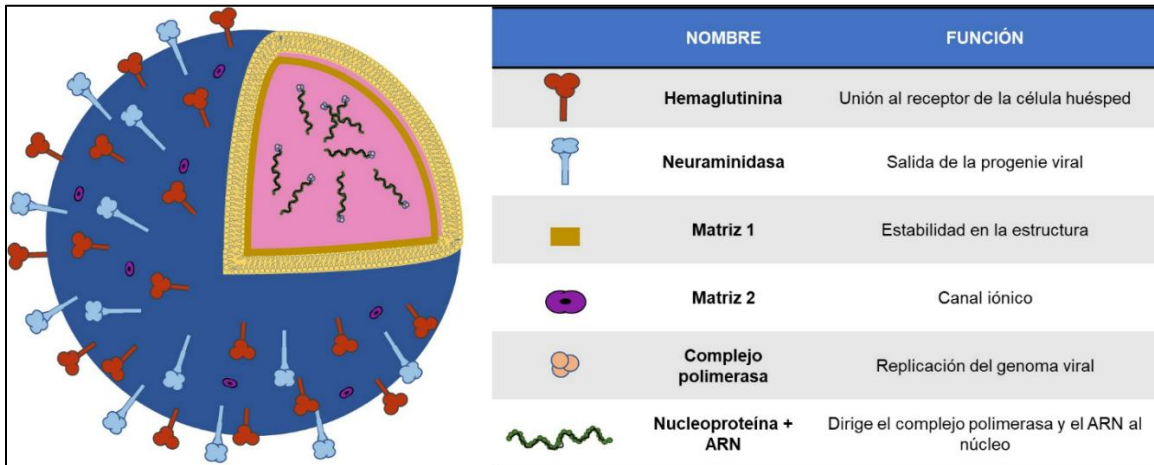


Figura 1. Estructura del virus de influenza aviar y funciones de las proteínas más relevantes.

(Carter & Iqbal, 2024). En la figura 1 se muestra la estructura del virus y se indican las principales funciones de cada uno de sus componentes.

Dentro del núcleo celular se inician la transcripción y replicación del genoma viral. El CRNP contiene 8 genes que codifican para 10 proteínas esenciales (HA, NA, M1, M2, NP, NS1, NS2, PB1, PB2 y PA). La proteína NS1 ha destacado en el escape a la respuesta inmune contra IA, ya que se ha demostrado que inhibe la producción de IFN- α y β al interferir en las vías de señalización (Jia et al., 2010; Mibayashi et al., 2007). NS1 junto con PB2 pueden inhibir la activación del promotor de IFN- β (Liniger et al., 2012), mientras que también se ha demostrado que NS1 y M1 disminuyen la expresión del receptor de IgY en macrófagos (Sun et al., 2024). Finalmente, NS1 también inhibe la apoptosis mediada por la unión Fas-Fas ligando (Xing et al., 2009). Gracias a las polimerasas virales y la ARN polimerasa II del hospedador se conduce a la replicación y transcripción viral, los ARNm virales van desde el núcleo al ribosoma para la traducción, aunque la NP traducida irá al núcleo para proteger al ARN recién sintetizado, protegiéndolo de la degradación, a esto, se unirá el complejo de polimerasas, generando un nuevo CRNP viral. Las proteínas virales y el CRNP se dirigirán a la membrana de la célula hospedadora para la gemación de la progenie viral gracias a la actividad sialidasa de la NA (Carter & Iqbal, 2024; C.-W. Lee & Saif, 2009). Analizar el ciclo de vida del virus es fundamental en el diseño de vacunas, ya que

permite identificar fases determinantes en la interacción del virus con las células del huésped. Conocer la estructura del virus y cómo este ingresa, se replica y se propaga a otras células ayuda a dimensionar cómo se espera que la respuesta inmune inducida por la vacuna se dirija a antígenos claves en la unión a la célula huésped (como HA) o en la salida de los viriones (como NA). Sin embargo, HA y NA son muy susceptibles a mutaciones; en consecuencia, la respuesta inmune inducida por la vacuna será deficiente si esos antígenos mutan, por lo que también es necesario considerar antígenos con secuencias conservadas entre subtipos (y menos susceptibles a mutaciones) como M y NP.

Respuesta inmune frente a la infección por el virus de IA

En la respuesta inmune innata contra IA destaca la importancia del reconocimiento del virus por receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) (Evseev & Magor, 2019). J. Cornelissen et al., 2012 demostraron en pollos un incremento en la expresión de ARNm de TLR3 y TLR7 posterior a la infección con IABP, y aunque aves migratorias (como los patos) tienen el RRP RIG-I y tienen una mejor respuesta protectora contra IA, los pollos no tienen el gen que expresa RIG-I, volviéndolos más susceptibles a la enfermedad; sin embargo, sí hay mayor expresión del receptor MDA5 cuando se infectan con subtipos IABP (J. Cornelissen et al., 2012) o IAAP (Karpala et al., 2011). Tras la activación de los receptores gracias al reconocimiento del ARN viral, inicia la señalización mediada por

moléculas adaptadoras (MyD88 y TRIF en el caso de TLR 3 y 7 y MAVS y STING en el caso de MDA5), que induce la activación de factores de transcripción (IRF7 y NF- κ B) para la producción de interferón tipo I (IFN-I) y citocinas proinflamatorias (Hassan & Sharif, 2025).

A las pocas horas post-infección, ya sea con IABP (Karpala et al., 2008) o IAAP (Moulin et al., 2011), se ha demostrado un incremento en la producción de IFN-I, aunque esto es más evidente en la infección con IAAP. Por otra parte, también se ha evidenciado el incremento de IFN- γ en los primeros días post-infección (Guan et al., 2015) y se ha demostrado *in vitro* su actividad inhibitoria en la replicación viral en fibroblastos de pollo infectados con IABP H9N2 (Yuk et al., 2016). Además, aunque el IFN- λ (un IFN de tipo III) tiene un menor impacto en la respuesta innata contra IA (Masuda et al., 2012), se sugiere que podría tener una actividad importante a nivel de mucosas al retrasar la replicación viral (Reuter et al., 2014). Como resultado de la producción de IFN, se activa una vía de señalización que estimula activadores transcripcionales como ISGF3 y GAF para modular la expresión de genes al unirse a regiones promotoras, entre los genes relacionados con la infección con IA en aves se encuentran: IFIT5 (Rohaim et al., 2018), IFITM3 (Rohaim et al., 2024), IFITM2 (Smith et al., 2015), OASL (Sutejo et al., 2012) y viperina (Goossens et al., 2015).

Además, la IAAP conduce al incremento en la expresión de ARNm de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 e IL-8 en el pulmón (Cornelissen et al., 2013), mientras que la infección por IABP tiene una menor respuesta inflamatoria mediada por citocinas. En el contexto de esta enfermedad, es común escuchar el término “tormenta de citocinas”, el cual hace alusión a la producción desregulada de citocinas que potencian el proceso patológico principalmente en pulmones de las aves infectadas (Gu et al., 2019).

Respecto a la respuesta inmune adaptativa, a los 7 días post-infección con IABP se puede detectar IgY sérica en pollos (Sá e Silva & Swayne, 2012). Respecto a IgA, una inmunoglobulina importante considerando la vía de ingreso del virus, se puede detectar IgA en fluido lagrimal a las 2 semanas post vacunación (Jang et al., 2018). Debido a la rápida mortalidad inducida por la infección con IAAP en pollos, la producción de anticuerpos

específicos se ve impedida. Además, previo a la vacunación es importante considerar la presencia de anticuerpos maternos, los cuales son transferidos al embrión y tienen el propósito de conferir protección mediada por anticuerpos en los pollos tras la eclosión; sin embargo, la vida media promedio de estos anticuerpos es de 4 días (Gharaibeh & Mahmoud, 2013), aunque pueden llegar a proteger tras la eclosión hasta 10 días (Abdelwhab et al., 2012).

Principalmente, la respuesta humoral va dirigida contra epítomos de antígenos como las proteínas de superficie del virus y con alta relevancia en el ciclo viral. Una de las proteínas más importantes y antigénicas es la HA, la cual es responsable del ingreso del virión a la célula. Aunque esta proteína se compone de dos subunidades, la proteína completa induce anticuerpos neutralizantes (Wei et al., 2008), sin embargo; es bien conocido que la secuencia de esta proteína es altamente susceptible a mutaciones que permiten el escape del virus frente a anticuerpos anti-HA neutralizantes, por otra parte, HA2 es más conservada entre los subtipos de IA (J.-S. Lee et al., 2013).

Otra proteína de relevancia es la NA, responsable de la liberación de la progenie viral. Los anticuerpos anti-NA evitan la diseminación viral al impedir la salida de los nuevos viriones (Halbherr et al., 2015); sin embargo, los anticuerpos anti-NA pueden ser menos eficaces frente a IAAP (Capua et al., 2003). Similarmente, anticuerpos anti-M2 interfieren con la liberación del genoma viral en la célula infectada y su secuencia es altamente conservada (Liu et al., 2005); sin embargo, por sí sola puede resultar pobremente inmunogénica (Kalaiyarasu et al., 2021).

Por otra parte, la respuesta inmune mediada por células CD8⁺ es importante contra infecciones virales. En el caso de IA, la respuesta CD8⁺ está influenciada positivamente tras la infección y alcanza su pico entre 3 y 5 días post-infección (Huang et al., 2012). Seo et al. (2002) sugieren que los linfocitos T CD8⁺ de memoria localizados en pulmón son importantes en la protección contra un desafío H5N1. Además, se ha demostrado respuesta CD8⁺ contra HA y NP, aunque en mayor medida contra NP (S. Singh et al., 2010).

Entender la respuesta inmune que se genera durante la infección natural con el virus

permite distinguir qué tipo de respuesta adaptativa se buscaría inducir con una vacuna: humoral (anticuerpos que neutralicen el virus y eviten la diseminación), celular (linfocitos T CD8+ que eliminen las células infectadas) o ambas. También es importante identificar cuáles antígenos del virus son más inmunogénicos y protectores, ya que ciertas respuestas inmunes pueden ser menos eficaces o duraderas que otras.

Tipos de vacunas contra IA

Debido a que no se recomienda el desarrollo de vacunas de virus vivo atenuadas de IAAP por la posibilidad de reversión viral (WOAH, 2021) y debido a que la inoculación con IAAP en huevos embrionados de pollo no es factible ya que provoca muerte embrionaria a las 24 horas (Spackman & Killian, 2014), las vacunas disponibles contra IA están representadas principalmente por vacunas de virus completo inactivado contra IABP. Este tipo de vacunas se fundamenta en la inactivación del virus para inhibir su replicación y usualmente se preparan en emulsión oleosa. Comúnmente, el virus puede ser inactivado por formaldehído o beta-propiolactona (WOAH, 2021), sin embargo, la estructura proteica puede resultar afectada; en consecuencia, se generan modificaciones en la estructura de epítomos de relevancia y esto tiene un impacto negativo sobre la respuesta humoral, aunque se ha determinado que la inactivación con beta-propiolactona resulta más eficaz para inducir una respuesta inmune adaptativa frente a H9N2 en comparación con formaldehído (Tseng et al., 2024). Este tipo de vacunas destaca en la industria debido a su bajo costo de producción.

También, gracias a las técnicas de genética inversa, se han modificado virus IABP, conservando genes que codifican para proteínas no estructurales y reemplazando genes de interés que codifican para HA y NA provenientes de virus IAAP (Bhatia et al., 2016). Similarmente, se generan mutaciones en la secuencia de ciertos genes para favorecer la replicación del virus en huevos embrionados, o que la secuencia de un gen específico se modifique para que sea conservada entre diferentes subtipos (An et al., 2019). Estas vacunas también requieren ser inactivadas previo a la administración en aves.

Por otra parte, también se han generado vacunas vectorizadas, que se fundamentan

en utilizar un vector, ya sea viral o bacteriano con capacidad de replicarse, y que expresa únicamente ciertas proteínas del virus de IA o que inducirá su expresión tras la infección de las células del hospedador (Suarez & Pantin-Jackwood, 2017). Respecto a las vacunas de vector bacteriano, se han usado microorganismos como *Bacillus subtilis* (Z. Li et al., 2024; Mou et al., 2016), *Lactobacillus plantarum* (Z. Li et al., 2024; W.-T. Yang et al., 2017) y *Salmonella entérica* (Hajam et al., 2018) e incluso vectores de levadura como *Saccharomyces cerevisiae* (Lei et al., 2021). Este tipo de vectores recombinantes son modificados para contener la secuencia de un antígeno de IA, y expresarla como proteína, pudiendo conferir protección frente a IA cuando se realiza un desafío. Zhang et al, (2023), también reportaron la inducción de respuesta inmune humoral de tipo IgY e IgA, así como respuesta celular tras la administración oral simultánea de *Saccharomyces cerevisiae* expresando HA en la superficie y de la levadura transformada con plásmidos de ADN y ARN que codificaban para HA.

De forma análoga, se han diseñado también vectores virales que contienen un inserto, que corresponde a un antígeno de IA o una parte de él (Martínez & García, 2007). Estos vectores al infectar a las células del huésped favorecen la síntesis de proteínas del virus, y entre esas proteínas está el antígeno de interés. Las ventajas de este tipo de vacunas son la aplicación directa en mucosas debido al tropismo de los virus por ese tejido, y que no requieren adyuvante ya que al emular la infección natural inducen una respuesta inmune robusta (Alqazlan et al., 2022). Dentro de los vectores virales como vacunas de IA se encuentra el paramyxovirus aviar (Tsunekuni et al., 2017), el virus de la enfermedad de Marek (Fan et al., 2025) y el herpesvirus de pavo (Li et al., 2011); sin embargo, entre los vectores virales disponibles el virus de Newcastle (NDV) destaca, debido a que se ha insertado el gen HA5 en su secuencia y puede ofrecer protección tanto para IA como para NDV (Veits et al., 2006). Estos sistemas no solo inducen la expresión de proteínas en el hospedador, sino que también se las puede administrar directamente sin necesidad de un vector.

Las vacunas de proteína recombinante pueden producirse en sistemas de expresión heterólogos y purificarse para ser

Artículos

administradas vía parenteral, aunque requieren el uso de adyuvantes para aumentar su inmunogenicidad (Alqazlan et al., 2022). Estas vacunas destacan gracias a la posibilidad de generar secuencias consenso a partir de alineamientos de secuencias conservadas de antígenos de IA y que induzcan una respuesta inmune humoral contra varios subtipos (Wu et al., 2017), o que las secuencias contengan epítomos de linfocitos T para inducir una respuesta inmune adaptativa celular (Haghighi et al., 2009). Además, pueden permitir la diferenciación entre animales vacunados e infectados (Pose et al., 2015).

Recientemente, se han evaluado partículas tipo virus (por sus siglas en inglés, VLP) con

antígenos de superficie de IA como HA, NA, M1 y N1 generadas con el sistema de expresión baculovirus (células de insecto), las cuales demostraron buena protección frente a un desafío con H5N1 (Kang et al., 2019; Tao et al., 2009). También se han probado en aves vacunas de ADN que se enfocan en secuencias consenso de HA para inducir anticuerpos neutralizantes, aunque la respuesta es dosis dependiente (Rao et al., 2008).

En México las vacunas disponibles son principalmente de virus inactivados emulsionados y recombinantes vectorizadas tal como se resume en la tabla 1, y en la figura 2 se resumen las plataformas para la obtención de las vacunas contra IA.

Tabla 1. Vacunas contra influenza aviar disponibles en México

Nombre	Casa comercial	Tipo de vacuna	Vía de aplicación	Subtipo	Indicaciones	Referencia
Vaxigen® Flu H5N8 Clade 2.3.4.4	Avimex	Inactivada (Genética reversa)	SC o IM	H5N8	Desde las cuatro semanas de edad, revacunar entre 21-28 días después de la primera dosis	https://avimex.com.mx/productos/aves/vaxigen-flu-h5n8-clade-2344?product_category=vacunas
Vaxigen Flu H7	Avimex	Inactivada (Genética reversa)	NR	H7N3	NR	https://avimex.com.mx/productos/aves/vaxigen-flu-h7?product_category=vacunas
Vaxigen K-newH5	Avimex	Vectorizada	SC o IM	H5	NR	https://avimex.com.mx/productos/aves/vaxigen-k-newh5?product_category=vacunas
Newcastle influenza concentrada	Avimex	Inactivada	NR	NR	NR	https://avimex.com.mx/productos/aves/newcastle-influenza-concentrada-vacuna-emulsionada?product_category=vacunas
Influenza aviar concentrada	Avimex	Inactivada	NR	NR	NR	https://avimex.com.mx/productos/aves/influenza-aviar-concentrada-vacuna-emulsionada?product_category=vacunas
Vaxigen newH5 congelada	Avimex	Vectorizada	Ocular, oral y aspersión	H5	Dos dosis con 10 a 15 días de diferencia entre ellas en pollo de engorda, 3 aplicaciones en aves de reemplazo y cada 4 a 12 semanas en gallinas en producción	https://avimex.com.mx/productos/aves/vaxigen-newh5-congelada?product_category=vacunas
Emulmax® GR7	Sanfer	Inactivada	SC	H7N3	Aplicar entre los 8-10 días de edad, aplicar mínimo dos refuerzos en ponedoras y reproductoras antes de la postura	https://sanfersaludanimal.com/productos/emulmax-gr7
Emulmax® AI + ND	Sanfer	Inactivada	SC	H5N2	Aplicar entre los 8-10 días de edad, aplicar refuerzo en ponedoras y reproductoras 10 semanas después	https://sanfersaludanimal.com/productos/emulmax-aind
Emulmax® – C AI + N5 G15	Sanfer	Inactivada	SC	H5N2	Aplicar a partir del día de edad en pollo de engorda, ponedoras y reproductoras, revacunar a ponedoras y reproductoras 10 semanas después	https://sanfersaludanimal.com/productos/emulmax-c-ai-n5-g15
Emulmax® – C AI	Sanfer	Inactivada	SC	H5N2	NR	https://sanfersaludanimal.com/productos/emulmax-c-ai

Artículos

AVILAB® I.A. PLUS CONCENTRADA	Avilab	Inactivada	SC	H5N2	Se puede aplicar desde el primer día de edad en aves de engorda y postura y revacunación de acuerdo al criterio del médico veterinario	https://avilab.com.mx/es/productos/i-a-plus-concentrada
AVILAB® I.A. PLUS	Avilab	Inactivada	SC	H5N2	Aplicar una dosis entre los 8-10 días de edad y en ponedoras y reproductoras aplicar refuerzo 10 semanas después	https://avilab.com.mx/en/productos/gallina-i-a-plus
AVILAB® REVGEN H7N3	Avilab	Inactivada (Genética reversa)	SC	H7N3	Administrar a partir de las 3-4 semanas de edad y revacunación de acuerdo al criterio del médico veterinario	https://avilab.com.mx/ajax/producto/20
Vectormune® H7	Ceva	Vectorizada (virus de Marek)	SC o <i>in ovo</i>	H7	Una dosis al día de edad	https://avicultura.ceva.com.mx/products/vectormune-h7/
Vectormune® HVT AIV	Ceva	Vectorizada (virus de Marek)	SC o <i>in ovo</i>	H5	Una dosis en embrión de pollo o una dosis al día de edad	https://www.ceva.com.mx/Especies-y-Productos/Listado-de-Productos/VECTORMUNE-R-HVT-AIV
Cevac® FLU H7 K	Ceva	Inactivada	SC	H7N3	Para uso en naves de función reproductora, de postura y de engorda a partir del día de edad	https://www.avicultura.mx/productos/flu-h7-k
VOLVAC® B.E.S.T AI + ND	Boehringer Ingelheim	Inactivada (expresada en baculovirus)	SC	H5	Una dosis a partir del día 10 de edad	https://www.boehringer-ingelheim.com/sa/salud-animal/productos/volvac-best-ai-nd-0
NOBILIS® Influenza H5N2	MSD	Inactivada	SC o IM	H5N2	Aplicar una dosis entre el día 8-10 de edad. Para aves de reemplazo y reproductoras aplicar refuerzo a las 6-10 semanas.	https://www.msdsalud-animal.mx/productos/nobilis-influenza-h5n2/

*NR: No reportado por la casa comercial

*SC: Subcutánea

*IM: Intramuscular

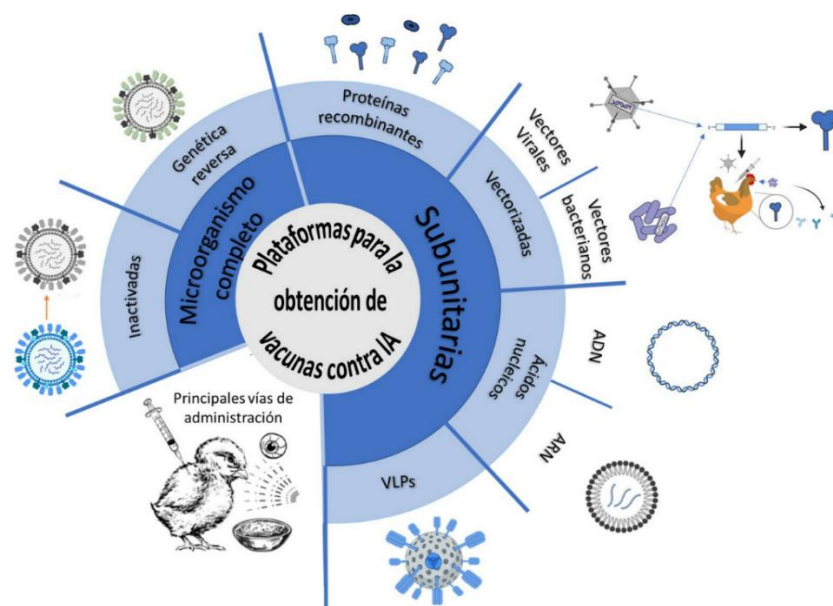


Figura 2. Plataformas de obtención de vacunas contra influenza aviaria y principales vías de aplicación en aves.

Desafíos que enfrentan las vacunas actuales

A pesar de que las vacunas inactivadas son las más utilizadas en la avicultura comercial debido a su bajo costo y protocolo estandarizado de producción, pueden tener una eficacia protectora variable ya que durante su producción puede ocurrir la alteración estructural de proteínas que son relevantes para la inducción de la respuesta inmune, como es el caso de los epítomos altamente inmunogénicos (Herrera-Rodríguez et al., 2019). Aunado a esto, su aplicación es parenteral y se requiere de la aplicación de refuerzos para mantener un título de anticuerpos adecuado durante la vida del animal, condiciones poco compatibles con el sistema de producción intensivo característico de la industria avícola (Alqazlan et al., 2022). Además, este tipo de vacunas no presentan propiedades DIVA (que permiten la diferenciación entre animales vacunados e infectados), condición que se busca cumplir con las vacunas de nueva generación.

Por otro lado, aunque las vacunas vectorizadas pueden ser aplicadas vía mucosa (generando inmunidad en mucosas, ideal considerando la vía de entrada del virus), *in ovo* o vía SC y cumplen con el enfoque DIVA, se enfrentan a una limitación: la inmunidad que pueden tener las aves frente al vector o la interferencia dada por anticuerpos maternos pueden comprometer seriamente la eficacia de la vacuna (Bertran et al., 2018), especialmente cuando se trata de vectores virales como NDV, mientras que en el caso de vectores bacterianos se requieren varios refuerzos de la vacuna cuando se administra por vía oral (Sha et al., 2020).

Respecto a las vacunas de proteína recombinante, son una alternativa segura y que pueden generar inmunidad cruzada contra varios subtipos cuando se administran proteínas conservadas como la proteína M (Ebrahimi et al., 2010) o proteínas provenientes de secuencias consenso (generadas a partir del alineamiento de varias secuencias de HA), además su aplicación no implica la excreción de partículas virales tras la inmunización (Hyoung et al., 2017). No obstante, presentan otras desventajas como pobre inmunogenicidad y estabilidad, además se deben considerar las modificaciones post-traduccionales previo a la elección del sistema de expresión y los costos que acarrea su

producción y purificación que son más altos en comparación con otro tipo de vacunas.

Finalmente, aunque su administración vía mucosa es posible, se requiere el uso de adyuvantes o sistemas de entrega para evitar la degradación por proteasas presentes en secreciones o la eliminación por el aclaramiento propio de la cavidad nasal u ocular (Tetsutani & Ishii, 2012). Esto último también aplica para las vacunas de DNA o RNA.

Finalmente, un desafío importante al que se enfrenta toda vacuna contra IA es la pérdida de la eficacia cuando la HA de la vacuna es antigénicamente distante a la HA del virus de campo, esto ocurre con frecuencia debido a que el virus de IA se caracteriza por una alta tasa de mutación, debido a su genoma segmentado cada gen puede mutar independientemente o combinarse con los genes de otro virus de IA si hay dos virus infectando una misma célula (Causey & Edwards, 2008). Se ha demostrado que la mutación en ciertos aminoácidos puede favorecer el escape del virus frente a la inmunidad generada por vacunas (Zhu et al., 2022). Este problema limita el desarrollo de una vacuna universal contra la IA no solo en aves, sino también en humanos.

Estrategias para enfrentar los desafíos

Considerando la capacidad de mutación del virus de IA, se ha propuesto la selección de regiones conservadas en proteínas de relevancia en el virus, como HA, para alinear sus secuencias y generar secuencias consenso, con mayor probabilidad de brindar protección cruzada contra varios virus heterólogos (Hyoung et al., 2017), aunque la secuencia de HA de la vacuna no tenga alta similitud con la proteína del virus de campo o desafío. La tendencia en diseño de vacunas apunta también a seleccionar no sólo proteínas antigénicamente relevantes, sino proteínas conservadas entre subtipos, que aunque pueden ser menos inmunogénicas (como M2e, NP y HA2), en combinación pueden potenciar la respuesta inmune (Kalaiyarasu et al., 2021; Kang et al., 2019; Q.-Y. Li et al., 2020). Asimismo, con el objetivo de mejorar la producción de vacunas inactivadas modificadas mediante genética reversa, se pueden alterar las secuencias de HA y NA en

virus de IA para mejorar la replicación viral en huevos embrionados (An et al., 2019).

También, es fundamental dirigir el diseño de vacunas hacia la implementación de la estrategia DIVA. Al momento, las vacunas que se basan en vector satisfacen esta necesidad, pues solo inducen la expresión de determinadas proteínas de interés en las células infectadas, y no se genera respuesta humoral contra otras proteínas del virus de IA ya que están ausentes en el inmunógeno, pero que si estarían presentes en la infección natural (Li et al., 2011). De forma similar, mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se pueden diseñar *in silico* proteínas recombinantes para que contengan epítomos específicos de cada antígeno, en lugar de la proteína completa (Herrera-Ong, 2023). Además, la selección de epítomos puede favorecer la inducción de una respuesta inmune celular mediada por linfocitos T CD8+, y no solo una respuesta inmune mediada por anticuerpos (Haghighi et al., 2009). A su vez, se pueden agregar insertos a las secuencias que codifiquen para marcadores positivos como el epítomo TET (derivado de la secuencia de la toxina tetánica de *Clostridium tetani*) (Herrera-Ong, 2023), de tal manera que tras la expresión e inmunización con la proteína se genere una respuesta contra esas secuencias no presentes en una infección con IA.

Cuando se administran antígenos poco inmunogénicos, resulta beneficioso usar adyuvantes que activen y modulen la respuesta inmune, ya sea innata o adaptativa. Tal como lo observaron Tabyenov et al. 2025, que al administrar por vía SC una combinación de un virus H5N8 modificado mediante genética reversa con adyuvantes oleosos como ISA-78 o ISA-71-R lograron aumentar la supervivencia, disminuir la excreción viral y las lesiones en pulmón e hígado luego de desafiar a los animales con IAAP (Tabyenov et al., 2025).

Ligandos de receptores de PAMPs facilitan el reconocimiento del antígeno y con ello la inducción de la respuesta innata y adaptativa, ligandos de TLRs como Pam3CSK4 (St. Paul et al., 2014) y CpG ODN 2007 mejoran la respuesta humoral al combinarse con vacunas inactivadas, aunque incluso este último puede favorecer la respuesta inmune

celular al aumentar los niveles de IFN (Mallick et al., 2012). Incluso se ha reportado que al administrar Pam2CSK4 o poli I:C por una vía mucosa, como la ocular, favorece la producción de interleucinas como IL-1B (Takaki et al., 2016). También se ha reportado que la combinación de una IL-2 recombinante con una vacuna inactivada de IA administrada vía intranasal mejora la respuesta humoral (Xiaowen et al., 2009), aunque se puede obtener una respuesta similar si la secuencia de la citocina está fusionada con el antígeno (Yang et al., 2009).

Finalmente, es importante considerar plataformas de liberación de antígenos. Entre estas plataformas se encuentran las nano- y micropartículas poliméricas. Tal es el caso de nanopartículas de PLGA, que han demostrado un incremento de la respuesta IgY e IgA al combinarse con una vacuna inactivada y un ligando como CpG ODN 2007 (Singh et al., 2016). Liposomas, que favorecen una liberación controlada del antígeno y resultan de particular interés para la administración vía mucosa, ya que extienden la presencia del antígeno en el sitio de administración, y en consecuencia, su reconocimiento (Chiou et al., 2009). Los virosomas pueden ingresar a las células y al tener antígenos como HA y NA en la superficie favorecen la presentación antigénica y con ello su procesamiento, induciendo la activación de linfocitos T CD8+ (Bungener et al., 2002). En la figura 3 se resumen las estrategias biotecnológicas disponibles para superar las desventajas de las vacunas actuales contra la IA.

Conclusiones y perspectivas

La IA se mantiene como una de las enfermedades virales más desafiantes para la avicultura y como una amenaza para la salud pública por su potencial zoonótico. Aunque hay vacunas disponibles contra esta enfermedad, éstas presentan limitantes importantes como la mutación constante del virus (que favorece su escape de la respuesta inmune) y la vía de aplicación que es prioritariamente la parenteral para lograr una inducción de respuesta inmune sistémica. Esto implica una variabilidad en la eficacia protectora y poca o nula inducción de respuesta humoral de tipo IgA (la cual es muy importante debido a que el ingreso del virus es por vía mucosa).

Artículos

No obstante, enfoques innovadores apuestan principalmente al uso de vectores virales y vacunas de subunidad proteica diseñados racionalmente a partir de las secuencias codificantes de todas las proteínas del virus, no solo las inmunodominantes sino las conservadas, que formuladas con adyuvantes seguros para uso por las vías mucosas permitan la inducción de respuesta inmune antigénica específica, con mínimos riesgos

para el animal y el personal que vacuna. Lograr un balance entre costo, seguridad y eficacia sigue siendo desafiante, pero las probabilidades de obtener vacunas con menos limitaciones que las vacunas actuales aumentan conforme hay más y mejores herramientas bioinformáticas y biotecnológicas disponibles para su diseño y obtención.

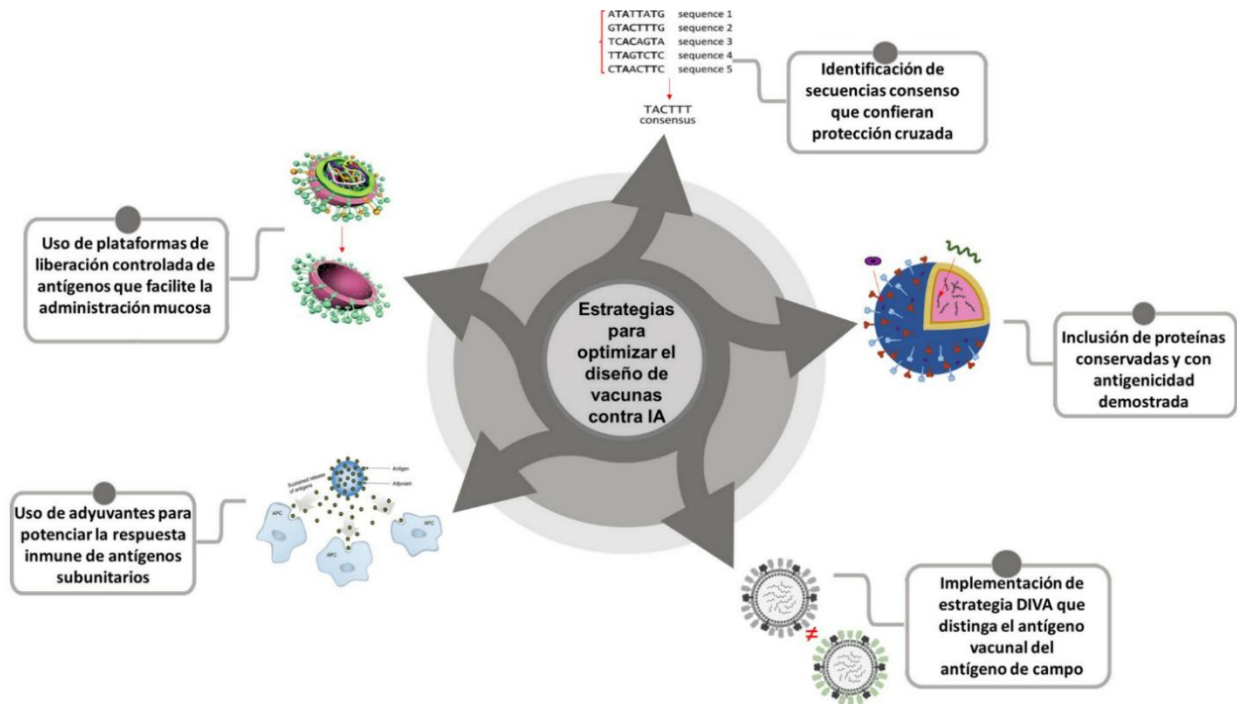


Figura 3. Estrategias disponibles para superar las desventajas de las vacunas actuales contra influenza aviar.

Referencias

Abdelwhab, E. M., Grund, C., Aly, M. M., Beer, M., Harder, T. C., & Hafez, H. M (2012) Influence of maternal immunity on vaccine efficacy and susceptibility of one day old chicks against Egyptian highly pathogenic avian influenza H5N1. *Veterinary Microbiology*, 155(1), 13–20.

AbuBakar, U., Amrani, L., Kamarulzaman, F. A., Karsani, S. A., Hassandarvish, P., & Khairat, J. E. (2023). Avian influenza virus tropism in humans. *Viruses*, 15(4), 833.

Alqazlan, N., Astill, J., Raj, S., & Sharif, S (2022) Strategies for enhancing immunity against avian influenza virus in chickens: A review. *Avian Pathology*, 51(3), 211–235.

An, S.-H., Lee, C.-Y., Hong, S.-M., Choi, J.-G., Lee, Y.-J., Jeong, J.-H., Kim, J.-B., Song, C.-S., Kim, J.-H., & Kwon, H.-J (2019) Bioengineering a highly productive vaccine strain in embryonated chicken eggs and mammals from a non-pathogenic clade 2·3·4·4 H5N8 strain. *Vaccine*, 37(42), 6154–6161.

Bertran, K., Lee, D.-H., Criado, M. F., Balzli, C. L., Killmaster, L. F., Kapczynski, D. R., & Swayne, D. E (2018) Maternal antibody inhibition of recombinant Newcastle disease virus vectored vaccine in a primary or booster avian influenza vaccination program of broiler chickens. *Vaccine*, 36(43), 6361–6372.

Bungener, L., Huckriede, A., Wilschut, J., & Daemen, T (2002) Delivery of protein antigens to the immune system by fusion-active

virosomes: a comparison with liposomes and ISCOMs. *Bioscience Reports*, 22(2), 323–338.

Capua, I., Terregino, C., Cattoli, G., Mutinelli, F., & Rodriguez, J. F. (2003) Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathology*, 32(1), 47–55.

Carter, T., & Iqbal, M. (2024) The influenza A virus replication cycle: a comprehensive review. *Viruses*, 16(2), 316.

Causey, D., & Edwards, S. V. (2008) Ecology of avian influenza virus in birds. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(Supplement_1), S29–S33.

Chauhan, R. P., & Gordon, M. L. (2022) An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates. *Virus Genes*, 58(4), 255–269.

Chiou, C.-J., Tseng, L.-P., Deng, M.-C., Jiang, P.-R., Tasi, S.-L., Chung, T.-W., Huang, Y.-Y., & Liu, D.-Z. (2009) Mucoadhesive liposomes for intranasal immunization with an avian influenza virus vaccine in chickens. *Biomaterials*, 30(29), 5862–5868.

Cornelissen, J. B. W. J., Vervelde, L., Post, J., & Rebel, J. M. J. (2013) Differences in highly pathogenic avian influenza viral pathogenesis and associated early inflammatory response in chickens and ducks. *Avian Pathology*, 42(4), 347–364.

Cornelissen, J., Post, J., Peeters, B., Vervelde, L., & Rebel, J. M. J. (2012) Differential innate responses of chickens and ducks to low-pathogenic avian influenza. *Avian Pathology*, 41(6), 519–529.

Ebrahimi, S. M., Tebianian, M., Aghaiypour, K., Nili, H., & Mirjalili, A. (2010) Prokaryotic expression and characterization of avian influenza A virus M2 gene as a candidate for universal recombinant vaccine against influenza A subtypes; specially H5N1 and H9N2. *Molecular Biology Reports*, 37(6), 2909–2914.

EFSA (2017) Avian influenza overview October 2016–August 2017. *EFSA J.*, 15, e05018.

Evseev, D., & Magor, K. E. (2019) Innate immune responses to avian influenza viruses in ducks and chickens. *Veterinary Sciences*, 6(1), 5.

Fan, W., Zeng, X., Chen, Y., Yu, Q., Zhang, Z., Tian, G., Liu, C., Bao, H., Qi, X., & Wu, L. (2025) A recombinant Marek's disease vaccine candidate provides complete protection against infectious bursal disease virus and H9 subtype avian influenza virus in chickens. *Journal of Virology*, e01149-25.

Gashaw, M. (2020) A review on avian influenza and its economic and public health impact. *Int J Vet Sci Technol*, 4(1), 15–27.

Gharaibeh, S., & Mahmoud, K. (2013) Decay of maternal antibodies in broiler chickens. *Poultry Science*, 92(9), 2333–2336.

Goossens, K. E., Karpala, A. J., Rohringer, A., Ward, A., & Bean, A. G. D. (2015) Characterisation of chicken viperin. *Molecular Immunology*, 63(2), 373–380.

Gu, Y., Hsu, A. C.-Y., Pang, Z., Pan, H., Zuo, X., Wang, G., Zheng, J., & Wang, F. (2019) Role of the innate cytokine storm induced by the influenza A virus. *Viral Immunology*, 32(6), 244–251.

Guan, J., Fu, Q., & Sharif, S. (2015) Replication of an H9N2 avian influenza virus and cytokine gene expression in chickens exposed by aerosol or intranasal routes. *Avian Diseases*, 59(2), 263–268.

Haghighi, H. R., Read, L. R., Haeryfar, S. M. M., Behboudi, S., & Sharif, S. (2009) Identification of a dual-specific T cell epitope of the hemagglutinin antigen of an h5 avian influenza virus in chickens. *PLoS One*, 4(11), e7772.

Hajam, I. A., Kim, J., & Lee, J. H. (2018) Salmonella Gallinarum delivering M2eCD40L in protein and DNA formats acts as a bivalent vaccine against fowl typhoid and H9N2 infection in chickens. *Veterinary Research*, 49(1), 99.

Halbherr, S. J., Ludersdorfer, T. H., Ricklin, M., Locher, S., Berger Rentsch, M., Summerfield, A., & Zimmer, G (2015) Biological and protective properties of immune sera directed to the influenza virus neuraminidase. *Journal of Virology*, 89(3), 1550–1563.

Hassan, M. S. H., & Sharif, S (2025) Immune responses to avian influenza viruses in chickens. *Virology*, 110405.

Herrera-Ong, L. R (2023) Strategic construction of mRNA vaccine derived from conserved and experimentally validated epitopes of avian influenza type A virus: a reverse vaccinology approach. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 12(2), 156. Herrera-Rodriguez, J., Signorazzi, A., Holtrop, M., de Vries-Idema, J., & Huckriede, A (2019) Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza virions to optimize vaccine production. *Vaccine*, 37(12), 1630–1637.

Huang, Z., Fang, D., Lv, P., Bian, X., Ruan, X., Yan, Y., & Zhou, J (2012) Differential cellular immune responses between chickens and ducks to H9N2 avian influenza virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 150(3–4), 169–180.

Hyoung, K. J., Hajam, I. A., & Lee, J. H (2017) A consensus-hemagglutinin-based vaccine delivered by an attenuated Salmonella mutant protects chickens against heterologous H7N1 influenza virus. *Oncotarget*, 8(24), 38780.

Jang, H., Elaiash, M., Kc, M., Abundo, M. C., Ghorbani, A., Ngunjiri, J. M., & Lee, C.-W (2018) Efficacy and synergy of live-attenuated and inactivated influenza vaccines in young chickens. *PLoS One*, 13(4), e0195285.

Jia, D., Rahbar, R., Chan, R. W. Y., Lee, S. M. Y., Chan, M. C. W., Wang, B. X., Baker, D. P., Sun, B., Peiris, J. S. M., & Nicholls, J. M (2010) Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling. *PLoS One*, 5(11), e13927.

Kalaiyarasu, S., Bhatia, S., Mishra, N., Senthil Kumar, D., Kumar, M., Sood, R., Rajukumar, K., Ponnusamy, B., Desai, D., & Singh, V. P (2021) Elicitation of Highly Pathogenic Avian

Influenza H5N1 M2e and HA2-Specific Humoral and Cell-Mediated Immune Response in Chicken Following Immunization With Recombinant M2e–HA2 Fusion Protein. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 571999.

Kang, H.-J., Chu, K.-B., Lee, D.-H., Lee, S.-H., Park, B. R., Kim, M.-C., Kang, S.-M., & Quan, F.-S (2019) Influenza M2 virus-like particle vaccination enhances protection in combination with avian influenza HA VLPs. *PLoS One*, 14(6), e0216871.

Karpala, A. J., Lowenthal, J. W., & Bean, A. G (2008) Activation of the TLR3 pathway regulates IFN β production in chickens. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(4), 435–444.

Karpala, A. J., Stewart, C., McKay, J., Lowenthal, J. W., & Bean, A. G. D (2011) Characterization of chicken Mda5 activity: regulation of IFN- β in the absence of RIG-I functionality.

Lee, C.-W., & Saif, Y. M (2009) Avian influenza virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(4), 301–310.

Lee, J.-S., Chowdhury, M. Y. E., Moon, H.-J., Choi, Y.-K., Talactac, M. R., Kim, J.-H., Park, M.-E., Son, H.-Y., Shin, K.-S., & Kim, C.-J (2013) The highly conserved HA2 protein of the influenza A virus induces a cross protective immune response. *Journal of Virological Methods*, 194(1–2), 280–288.

Lei, H., Lu, X., Li, S., & Ren, Y (2021) High immune efficacy against different avian influenza H5N1 viruses due to oral administration of a Saccharomyces cerevisiae-based vaccine in chickens. *Scientific Reports*, 11(1), 8977.

Li, Q.-Y., Xu, M.-M., Dong, H., Zhao, J.-H., Xing, J.-H., Wang, G., Yao, J.-Y., Huang, H.-B., Shi, C.-W., & Jiang, Y.-L (2020) Lactobacillus plantarum surface-displayed influenza antigens (NP-M2) with FliC flagellin stimulate generally protective immune responses against H9N2 influenza subtypes in chickens. *Veterinary Microbiology*, 249, 108834.

Li, Y., Reddy, K., Reid, S. M., Cox, W. J., Brown, I. H., Britton, P., Nair, V., & Iqbal, M

Artículos

(2011) Recombinant herpesvirus of turkeys as a vector-based vaccine against highly pathogenic H7N1 avian influenza and Marek's disease. *Vaccine*, 29(46), 8257–8266.

Li, Z., Peng, C., Chen, L., Wang, P., & Wang, F (2024) Construction and immunogenicity evaluation of recombinant *Bacillus subtilis* expressing HA1 protein of H9N2 avian influenza virus. *Current Microbiology*, 81(1), 25.

Liniger, M., Moulin, H. R., Sakoda, Y., Ruggli, N., & Summerfield, A (2012) Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 controls type I IFN induction in chicken macrophage HD-11 cells: a polygenic trait that involves NS1 and the polymerase complex. *Virology Journal*, 9(1), 7.

Liu, W., Zou, P., Ding, J., Lu, Y., & Chen, Y.-H (2005) Sequence comparison between the extracellular domain of M2 protein human and avian influenza A virus provides new information for bivalent influenza vaccine design. *Microbes and Infection*, 7(2), 171–177.

Mallick, A. I., Kulkarni, R. R., St. Paul, M., Parvizi, P., Nagy, E., Behboudi, S., & Sharif, S (2012) Vaccination with CpG-adjuvanted avian influenza virosomes promotes antiviral immune responses and reduces virus shedding in chickens. *Viral Immunology*, 25(3), 226–231.

Martínez-Sobrido, L., & García-Sastre, A (2007) Recombinant influenza virus vectors. *Future Virology*, 2(4), 401–416.

Masuda, Y., Matsuda, A., Usui, T., Sugai, T., Asano, A., & Yamano, Y (2012) Biological effects of chicken type III interferon on expression of interferon-stimulated genes in chickens: comparison with type I and type II interferons. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(11), 1381–1386.

Mibayashi, M., Martínez-Sobrido, L., Loo, Y.-M., Cárdenas, W. B., Gale Jr, M., & García-Sastre, A (2007) Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *Journal of Virology*, 81(2), 514–524.

Mou, C., Zhu, L., Yang, J., Xu, W., Cheng, X., & Yang, Q (2016) Immune responses induced by recombinant *Bacillus subtilis* expressing

the hemagglutinin protein of H5N1 in chickens. *Scientific Reports*, 6(1), 38403.

Moulin, H. R., Liniger, M., Python, S., Guzylack-Piriou, L., Ocaña-Macchi, M., Ruggli, N., & Summerfield, A (2011) High interferon type I responses in the lung, plasma and spleen during highly pathogenic H5N1 infection of chicken. *Veterinary Research*, 42(1), 6.

OMSA (1998) *Código Sanitario para los Animales Terrestres - Capítulo 10.4 - Infección por los virus de influenza aviar de alta patogenicidad*. https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmfile=chapitre_aviar_influenza_virus.htm

OMSA (2021a) *Manual Terrestre de la OMSA - Capítulo 3.3.4. - Influenza aviar*. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf

OMSA(2021b) Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE Paris, France.

Pose, A. G., Rodriguez, E. S., Mendez, A. C., Gomez, J. N., Redondo, A. V., Rodriguez, E. R., Ramos, E. M. G., Gutiérrez, A. Á., Moltó, M. P. R., & Roche, D. G (2015) Dual function of the hemagglutinin H5 fused to chicken CD154 in a potential strategy of DIVA against avian influenza disease: preliminary study. *Open Veterinary Journal*, 5(2), 138–147.

Rao, S., Kong, W.-P., Wei, C.-J., Yang, Z.-Y., Nason, M., Styles, D., DeTolla, L. J., Sorrell, E. M., Song, H., & Wan, H (2008) Multivalent HA DNA vaccination protects against highly pathogenic H5N1 avian influenza infection in chickens and mice. *PLoS One*, 3(6), e2432.

Reuter, A., Soubies, S., Härtle, S., Schusser, B., Kaspers, B., Staeheli, P., & Rubbenstroth, D (2014) Antiviral activity of lambda interferon in chickens. *Journal of Virology*, 88(5), 2835–2843.

Rohaim, M. A., Gardiner, E. L., El Naggar, R. F., Abdelsabour, M. A., Madbouly, Y. M., Atasoy, M. O., Ahmed, K. A., El-Safty, M. M., & Munir, M (2024) Avian sarcoma/leukosis

virus (RCAS)-mediated over-expression of IFITM3 protects chicks from highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1. *Microbes and Infection*, 26(1–2), 105231.

Rohaim, M. A., Santhakumar, D., Naggar, R. F. El, Iqbal, M., Hussein, H. A., & Munir, M (2018) Chickens expressing IFIT5 ameliorate clinical outcome and pathology of highly pathogenic avian influenza and velogenic newcastle disease viruses. *Frontiers in Immunology*, 9, 2025.

Sá e Silva, M., & Swayne, D. E (2012) Serum and egg yolk antibody detection in chickens infected with low pathogenicity avian influenza virus. *Avian Diseases*, 56(3), 601–604.
Seo, S. H., Peiris, M., & Webster, R. G (2002) Protective cross-reactive cellular immunity to lethal A/Goose/Guangdong/1/96-like H5N1 influenza virus is correlated with the proportion of pulmonary CD8+ T cells expressing gamma interferon. *Journal of Virology*, 76(10), 4886–4890.

Sha, Z., Shang, H., Miao, Y., Huang, J., Niu, X., Chen, R., Hu, L., Huang, H., Wei, K., & Zhu, R (2020) Recombinant *Lactococcus Lactis* expressing M1-HA2 fusion protein provides protective mucosal immunity against H9N2 avian influenza virus in chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 153.

Singh, S. M., Alkie, T. N., Abdelaziz, K. T., Hodgins, D. C., Novy, A., Nagy, E., & Sharif, S (2016) Characterization of immune responses to an inactivated avian influenza virus vaccine adjuvanted with nanoparticles containing CpG ODN. *Viral Immunology*, 29(5), 269–275.

Singh, S., Toro, H., Tang, D.-C., Briles, W. E., Yates, L. M., Kopulos, R. T., & Collisson, E. W (2010) Non-replicating adenovirus vectors expressing avian influenza virus hemagglutinin and nucleocapsid proteins induce chicken specific effector, memory and effector memory CD8+ T lymphocytes. *Virology*, 405(1), 62–69.

Smith, J., Smith, N., Yu, L., Paton, I. R., Gutowska, M. W., Forrest, H. L., Danner, A. F., Seiler, J. P., Digard, P., & Webster, R. G (2015) A comparative analysis of host responses to avian influenza infection in ducks and chickens highlights a role for the interferon-induced transmembrane proteins in

viral resistance. *BMC Genomics*, 16(1), 574.
Spackman, E., & Killian, M. L (2014) Avian influenza virus isolation, propagation, and titration in embryonated chicken eggs. In *Animal influenza virus* (pp. 125–140). Springer.

St. Paul, M., Brisbin, J. T., Barjesteh, N., Villaneueva, A. I., Parvizi, P., Read, L. R., Nagy, E., & Sharif, S (2014) Avian influenza virus vaccines containing Toll-like receptors 2 and 5 ligand adjuvants promote protective immune responses in chickens. *Viral Immunology*, 27(4), 160–166.

Suarez, D. L., & Pantin-Jackwood, M. J (2017) Recombinant viral-vectored vaccines for the control of avian influenza in poultry. *Veterinary Microbiology*, 206, 144–151.

Sun, Z., Zhang, W., Li, J., Yang, K., Zhang, Y., & Li, Z (2024) H9N2 avian influenza virus downregulates FcγR expression in chicken macrophage cell line HD11 by activating the JNK MAPK pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 2650.

Sutejo, R., Yeo, D. S., Myaing, M. Z., Hui, C., Xia, J., Ko, D., Cheung, P. C. F., Tan, B.-H., & Sugrue, R. J (2012) Activation of type I and III interferon signalling pathways occurs in lung epithelial cells infected with low pathogenic avian influenza viruses. *PLoS One*, 7(3), e33732.

Tabynov, K., Kuanyshbek, A., Yelchibayeva, L., Zharmambet, K., Zhumadilova, Z., Fomin, G., Petrovsky, N., Shekoni, O. C., Renukaradhya, G. J., & Tabynov, K (2025) Evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy of inactivated reverse-genetics-based H5N8 highly pathogenic avian influenza virus vaccine with various adjuvants via parenteral and mucosal routes in chickens. *Frontiers in Immunology*, 16, 1539492.

Takaki, H., Sato, H., Kurata, R., Hikono, H., Hiono, T., Kida, H., Matsumoto, M., Saito, T., & Seya, T (2016) Cytokine responses to eye spray adjuvants for enhancing vaccine-induced immunity in chickens. *Microbiology and Immunology*, 60(7), 511–515.

Tao, P., Luo, M., Zhu, D., Qu, S., Yang, Z., Gao, M., Guo, D., & Pan, Z (2009) Virus-like particle vaccine comprised of the HA, NA, and

M1 proteins of an avian isolated H5N1 influenza virus induces protective immunity against homologous and heterologous strains in mice. *Viral Immunology*, 22(4), 273–281.

Tseng, Is., Pan, B.-Y., Feng, Y.-C., & Fang, C.-T (2024) Re-evaluating efficacy of vaccines against highly pathogenic avian influenza virus in poultry: a systematic review and meta-analysis. *One Health*, 100714.

Tsunekuni, R., Hikono, H., Tanikawa, T., Kurata, R., Nakaya, T., & Saito, T (2017) Recombinant avian paramyxovirus serotypes 2, 6, and 10 as vaccine vectors for highly pathogenic avian influenza in chickens with antibodies against Newcastle disease virus. *Avian Diseases*, 61(3), 296–306.

Veits, J., Wiesner, D., Fuchs, W., Hoffmann, B., Granzow, H., Starick, E., Mundt, E., Schirmer, H., Mebatsion, T., & Mettenleiter, T. C (2006) Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), 8197–8202.

Wei, C.-J., Xu, L., Kong, W.-P., Shi, W., Canis, K., Stevens, J., Yang, Z.-Y., Dell, A., Haslam, S. M., & Wilson, I. A (2008) Comparative efficacy of neutralizing antibodies elicited by recombinant hemagglutinin proteins from avian H5N1 influenza virus. *Journal of Virology*, 82(13), 6200–6208.

Wu, P., Lu, J., Zhang, X., Mei, M., Feng, L., Peng, D., Hou, J., Kang, S.-M., Liu, X., & Tang, Y (2017) Single dose of consensus hemagglutinin-based virus-like particles vaccine protects chickens against divergent H5 subtype influenza viruses. *Frontiers in Immunology*, 8, 1649.

Xiaowen, Z., Qinghua, Y., Xiaofei, Z., & Qian, Y (2009) Co-administration of inactivated avian influenza virus with CpG or rIL-2 strongly enhances the local immune response after intranasal immunization in chicken. *Vaccine*, 27(41), 5628–5632.

Xing, Z., Cardona, C. J., Adams, S., Yang, Z., Li, J., Perez, D., & Woolcock, P. R (2009) Differential regulation of antiviral and proinflammatory cytokines and suppression of Fas-mediated apoptosis by NS1 of H9N2 avian influenza virus in chicken macrophages. *Journal of General Virology*, 90(5), 1109–1118.

Yang, W.-T., Yang, G.-L., Shi, S.-H., Liu, Y.-Y., Huang, H.-B., Jiang, Y.-L., Wang, J.-Z., Shi, C.-W., Jing, Y.-B., & Wang, C.-F (2017) Protection of chickens against H9N2 avian influenza virus challenge with recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing conserved antigens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 4593–4603.

Yang, Y., Leggat, D., Herbert, A., Roberts, P. C., & Sundick, R. S (2009) A novel method to incorporate bioactive cytokines as adjuvants on the surface of virus particles. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 29(1), 9–22.

Yuk, S.-S., Lee, D.-H., Park, J.-K., Tseren-Ochir, E.-O., Kwon, J.-H., Noh, J.-Y., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Choi, I.-S., & Song, C.-S (2016) Pre-immune state induced by chicken interferon gamma inhibits the replication of H1N1 human and H9N2 avian influenza viruses in chicken embryo fibroblasts. *Virology Journal*, 13(1), 71.

Zhang, H., Xie, R., Zhang, H., Sun, R., Li, S., Xia, C., Li, Z., Zhang, L., Guo, Y., & Huang, J (2023) Recombinant hemagglutinin protein and DNA-RNA-combined nucleic acid vaccines harbored by yeast elicit protective immunity against H9N2 avian influenza infection. *Poultry Science*, 102(6), 102662.

Zhu, R., Xu, S., Sun, W., Li, Q., Wang, S., Shi, H., & Liu, X (2022) HA gene amino acid mutations contribute to antigenic variation and immune escape of H9N2 influenza virus. *Veterinary Research*, 53(1), 43.

Conductive materials and their promising role in the anaerobic treatment of agro-industrial wastewaters

Christopher A. Díaz-Muñoz¹ & Francisco J. Cervantes*¹

¹Laboratory for Research on Advanced Processes for Water Treatment, Engineering Institute, Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Blvd. Juriquilla 3001, 76230, Queretaro, Mexico
fcervantes@iingen.unam.mx

Resumen

La digestión anaerobia (DA) es una tecnología ampliamente aplicada para el tratamiento de aguas residuales industriales, que permite la transformación de la materia orgánica en biogás, constituido principalmente de metano (CH₄). A pesar de las ventajas ambientales que ofrece la DA, la optimización de la producción de CH₄ y la estabilidad de los reactores siguen constituyendo un reto, particularmente durante el tratamiento de aguas residuales de composición compleja. Trabajos recientes se han enfocado en la mejora del desempeño de la DA a través de la adición de nanomateriales conductores, que incluyen materiales hechos de carbono y de hierro. Dichos materiales facilitan la transferencia de electrones entre los microorganismos, mejorando las relaciones sintróficas cruciales para la metanogénesis, pero que, además, para el desarrollo de nuevas tecnologías, como aquellas relacionadas con la oxidación anaerobia de amonio (NH₄⁺). La integración de nanomateriales conductores en los sistemas de tratamiento anaerobio ha demostrado mejorar su estabilidad y aplicabilidad. La presente revisión destaca los beneficios por los cuales los nanomateriales conductores mejoran la capacidad metabólica de los microorganismos anaerobios y discute su prometedor rol en el tratamiento anaerobio de aguas residuales agroindustriales. Los hallazgos enfatizan que al suplementar nanomateriales conductores ofrece una estrategia viable para superar las limitaciones existentes en la DA, además de promover metabolismos novedosos que puedan ayudar a reducir la contaminación del agua y mejorar de manera eficiente y sostenible el manejo de aguas residuales en el sector agroindustrial.

Palabras Claves: Digestión anaerobia, materiales conductores, aguas residuales agroindustriales, Feamox, transferencia de electrones

Abstract

Anaerobic digestion (AD) is a widely adopted technology for treating industrial wastewater, enabling the transformation of organic matter into biogas, mainly constituted of methane (CH₄). Despite its environmental advantages, optimizing CH₄ production and reactor stability remains a challenge, particularly with complex wastewater streams. Recent research has focused on enhancing AD performance through the addition of nano-sized conductive materials (nano-CMs), including carbon-based and iron-based materials. These nano-CMs facilitate electron transfer between microorganisms, thereby improving syntrophic interactions crucial for efficient methanogenesis, but also for the development of other novel technologies, such as those related to anaerobic ammonium (NH₄⁺) removal. The integration of nano-CMs in anaerobic treatment systems has demonstrated improved process stability and applicability. This review highlights the benefits by which nano-CMs enhance the metabolic capacity of anaerobic microorganisms and discusses their promising role in the anaerobic treatment of agro-industrial wastewaters. The findings emphasize that supplementing nano-CMs to AD offers a viable strategy for overcoming existing limitations, besides promoting novel metabolisms that can help to reduce water pollution and changing the way for a more efficient and sustainable wastewater management practices in agro-industrial sectors.

Key Words: Anaerobic digestion, conductive materials, agro-industrial wastewater, Feamox, electron transfer

Introduction

Agro-industrial activities are dedicated to producing, processing and commercializing agricultural and forestry products for food purposes, such as production of meat or dairy products (Rosete, 2020). Despite their economic importance, agro-industrial activities impact negatively on the environment, generating large amounts of solid wastes and wastewater (Martinez-Burgos et al., 2021). Anaerobic digestion (AD) is a consolidated biotechnology applied in wastewater treatment that allows the transformation of organic matter into biogas and other valuable products. AD is based on the metabolism of different types of microorganisms that transform organic matter into biogas, mainly composed of methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂), of which CH₄ produced could be used as biofuel to generate heat and electric energy when its burned (Rittmann and McCarty, 2020). Besides the production of CH₄, AD offers other important benefits, in contrast to other types of biological wastewater treatments; for example, AD generates less wasted sludge, there is no need for oxygen supplementation, microorganisms require fewer nutrient requirements, and is appropriate for high strength wastewaters (Rajeshwari et al., 2000). Because of the many benefits that AD offers, many types of wastewater and organic solid wastes are treated by this biotechnology around the world; however, the improvement in CH₄ generation and organic removal is still a challenge, especially during the treatment of complex wastewaters. Several strategies have

been developed to improve CH₄ generation, including the separation of fermentative and methanogenic steps, the use of different reactors configuration (Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactor, Anaerobic Membrane Bioreactor, etc.) or co-digestion of different types of streams or residues (Basset et al., 2016; Bella and Rao, 2023). Recently, the use of conductive materials (CMs) has becoming popular due to the proven benefits on lab-scale AD, and many researches has conducted to tests different materials on different wastewaters under several conditions, demonstrating the great potential of adding CMs in AD process. The mechanisms in what CMs influence in AD are described below.

Electron transfer in the anaerobic digestion process

AD process occurs in four well defined steps, hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis (Nguyen et al., 2019) (**Figure 1**). In step 1, bacteria break the bonds of complex organic matter constituted of polymers (proteins, lipids, and carbohydrates) releasing monosaccharides, aminoacids and long volatile fatty acids. In acidogenesis (step 2) volatile fatty acids (VFAs) and alcohols are produced and then are converted into acetate and hydrogen gas (H₂) in the acetogenesis (step 3). Finally, in methanogenesis (step 4) archaea produce CH₄ by two mainly pathways, by the fermentation of acetate into CH₄ (acetolactic methanogenesis) and by the reduction of CO₂ employing H₂ as electron donor (hydrogenotrophic methanogenesis).

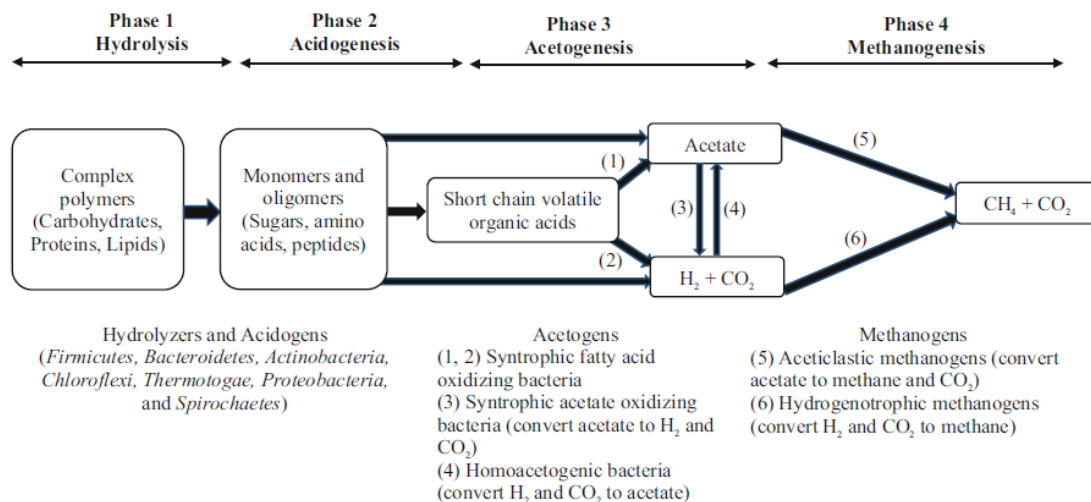


Figura 1. The four steps of anaerobic digestion process and the microbes associated to each step. Figure taken from Nguyen et al. (2019).

Despite the well knowledge of AD developed in the past years, challenges on the CH₄ production and reactors stability are still problems that need to be addressed for improving the process and applicability. Given that the AD process depends on the interaction between fermentative bacteria and methanogenic archaea, steps 3 and 4 of the AD could be considered as the limiting step that condition the CH₄ production (Wu et al., 2020). Several strategies have focused on improving the syntrophic relationship between bacteria and archaea, for example, promoting the interchange of electrons between microorganisms. In the AD process, bacteria ferment organic acids and alcohols releasing electrons in form of H₂ and formate (considered as electron carriers) that are taken by archaea to produce CH₄. This process is namely as mediated interspecies electron transfer (MIET) where electron transfer occurs through the interchange of soluble electron carriers between electron donor bacteria and electron acceptor archaea (Lovley, 2017). Despite the majority of CH₄ is produced this way, MIET requires low H₂ partial pressures that allow fermentative reactions to be thermodynamically feasible, archaea must be able to consume the H₂ produced, otherwise fermentation reactions are interrupted, resulting in VFAs accumulation thus inhibiting methanogenesis and result in digestors failure (Kamagata, 2015).

On the other hand, some microorganisms can share electrons without the need of electron carriers, stablishing direct connections between electron generation microbes and electron consumer microbes, process known as direct electron transfer (DIET) (Lovley, 2017). DIET is important in several types of metabolisms; however, a great attention has been placed on its relevance in methanogenesis given that several studies have demonstrated that DIET increase the performance of the process. Three main ways have been proposed in what DIET could occur related to the production of CH₄. The first one is that fermentative bacteria can share electrons with archaea by means of electrically conductive pilli (e-pilli). Pilli are biological structures composed of aromatic amino acids that enable the transfer of electrons microorganisms (Tan et al., 2017). The second one is that some microbes use c-type cytochromes to share electrons; however,

unlike e-pilli, the transfer of electrons only occur at a very short distance between microorganisms (McGlynn et al., 2015). Finally, the third way in what microorganisms could share electrons is through CMs, such as carbon-based materials (activated carbon, biochar), iron-based materials (magnetite, hematite or goethite) or its combination in composites. These materials serve as bridge between bacteria and archaea allowing the sharing of electrons between them without the need of complex structures (as those mentioned above). Besides, several studies have proposed that CMs are able to enrich microbes with the capacity of transfer electrons directly (Li et al., 2021; Wu et al., 2020).

Benefits of supplementing conductive nanomaterials in anaerobic digestion

Conductive nano-sized materials have been gaining popularity in their application as boosters for AD. Different materials have been tested for enhancing AD, the most important are iron-based materials, that include ferric iron oxides/hydroxides and zero-valent Fe (Fe⁰). Iron-based materials have high conductivity, are non-toxic for microorganisms, and are cheaper than other nanomaterials, such as palladium nanoparticles, that convert them into perfect boosters for AD (Wu et al., 2023). In the same way, carbon-based materials have shown their capacity to enhance AD, the most common materials used include biochar, activated carbon (granular and powder), carbon cloths, graphene, and carbon nanotubes. Carbon-based materials own high conductivity, large surface area, and they can adsorb toxic compounds. Additionally, some materials, such as biochar, are made of plant and food residues that make them a cheap option (Park et al., 2018). Recently, some research showed that combination of iron and carbon materials through different chemical methods results in modified materials, known as composites, that could resulted in a synergistic material that combines the properties of iron and carbon materials (Wu et al., 2023).

The benefits of supplementing nanomaterials in AD depend on the type of inoculum, the substrate and the operation conditions (type of reactor, hydraulic retention time/organic loading rate, temperature, etc.). In general,

Artículos

conductive nanomaterials have demonstrated clear improvements in AD performance; for example, increasing CH₄ production rate, besides COD removal and shortening the Lag

phase, among other benefits. **Table 1** shows the most important parameters improvement when nano-CMs are added to the digestors for wastewater treatment.

Tabla 1. Performance parameters improvement when conductive nanomaterials are supplemented in anaerobic digestion.

	Material	Size of materials	Parameter	Influence ¹	References
Iron-based materials	Magnetite,	10-50 nm	-CH ₄ productivity	↑	Ambuchi et al. (2017); Baek et al. (2015); Guan et al. (2023); Kato et al. (2012); Zhuang et al. (2018, 2015)
	hematite,	50-100 nm	-COD removal	↑	
	goethite,	20 nm	-Lag phase	↓	
	Fe ₂ O ₃ , Fe ⁰		-Rate of CH ₄ production	↑	
			-Micronutrient	*	
Carbon-based materials	Activated carbon,	Particle size: 0.5-2 um	-CH ₄ production	↑	Ambuchi et al. (2017); Liu et al., (2012); Ramírez-Montoya et al. (2023); Tian et al. (2017); Yuan et al. (2018)
	biochar,	20 nm	-Lag phase	↓	
	carbon nanotubes,	Poros size: 100 nm	-Support for microbial growth	*	
	graphene	9-15 nm	-Redox mediator	*	
		200 nm - 149 μm	-Conductivity	↑	
Composites	Biochar-	149 μm	-(Pseudo) capacitance	↑	Chen et al. (2022); Dai et al. (2022); He et al. (2025); Wang et al. (2021); Zhang et al. (2017)
	Magnetite,		-Specific surface area	↑	
	Biochar-Fe ⁰		-Degradation of micropollutants	↑	

1: ↑ (Increment); ↓ (Decrement); * (Other properties)

Despite the proved benefits of adding conductive nanomaterials for AD, most of the experiments have been carried out under ideal conditions, with simple substrates (acetate, ethanol or glucose), mesophilic or thermophilic temperatures, and/or with defined co-cultures. Nanomaterials have the potential to be applied in the anaerobic treatment of complex wastewater as those produced in agro-

industrial facilities. **Table 2** shows the main characteristics of representative agro-industrial streams, such as slaughterhouse, piggery, and dairy industry wastewater. These wastewaters possess high quantities of organic matter, nutrients (ammonium and phosphorus) and other compounds, representing a great challenge for their treatment.

Tabla 2. General characteristics of representative agro-industrial wastewater.

Parameter	Slaughterhouse	Piggery	Dairy industry
	Range		
COD (mg/L)	500-15900	19100-50600	2200-10000
Total nitrogen (mg/L)	50-841	3000-5200	54-1150
Total phosphorus (mg/L)	25-200	660-920	15-283
NH ₄ ⁺ (mg/L)	200-300	1820-3300	5-277
TSS (mg/L)	270-6400	20500-46500	310-5070
Greases and oils (mg/L)	40-1385	—	70-2880
pH	4.9-8.1	6.0-6.5	4.0-12.0

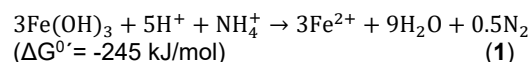
Taken and adapted from Carvalho et al., (2013); Bustillo-Lecompte & Mehrvar, (2015); Girard et al., (2015). TSS: Total suspended solids.

Potential applications of conductive nanomaterials for anaerobic treatment of agro-industrial wastewater

There is no question that CMs supplementation on the AD process offer great benefits, not only in allowing a faster transformation of organic matter to CH₄, also helping in maintain a stable process for the treatment of high strength wastewaters that are difficult to treat. Other potential applications of nano-CMs are those related to the removal of other pollutants, such as NH₄⁺. Due to the high concentration of nitrogenated compounds in agro-industrial effluents, including slaughterhouse and piggery wastewater, the AD of these effluents release NH₄⁺ because of the hydrolysis of proteins and urea, resulting in implementation of a second stage for the removal of NH₄⁺. The most popular way to remove NH₄⁺ is through the nitrification-denitrification process, that consists in oxidation of NH₄⁺ to NO₃⁻ with oxygen as electron acceptor by nitrifier bacteria, then in a second step, the NO₃⁻ produced is reduced sequentially to N₂ under anaerobic conditions (Rittmann and McCarty, 2020). Nevertheless, this process has some disadvantages, for example, in the nitrification step, high amounts of O₂ are required to allow the complete transformation of NH₄⁺ to NO₃⁻; while in the denitrification step, the quantity of COD must be appropriate for the complete reduction of NO₃⁻ to N₂, besides high amount of sludge could be generated due to the fast growth of denitrifiers and have to be assessed according to environmental legislation (Rittmann and McCarty, 2020). Another problem with this process is the generation of greenhouse gases, like Nitrous oxide (N₂O), due to the incomplete reduction of NO₃⁻ (Guo et al., 2017).

Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) is an anaerobic biotechnology suitable for NH₄⁺ removal. The process consists of partly oxidizing the NH₄⁺ to nitrite (NO₂⁻) in a preliminary step, so that microbes are able to oxidize the NH₄⁺ to N₂ employing the NO₂⁻ as the electron acceptor in the anammox process. The advantages of this process are that requires low amount of O₂, much fewer production of sludge compared to denitrification process and no production of N₂O; however, due the low rate of growing of the microorganisms involved, enrichment of

anammox microbes is hard, besides the presence of organic matter and other pollutants could impact negatively the reactor, deteriorating its performance (Chen et al., 2022). Other anaerobic biotechnologies have the potential to be applied for wastewater treatment, for instance, the anaerobic ammonium oxidation coupled with ferric iron reduction, process named as Feammox, which occurs naturally in anoxic environments, such as sediments of rivers, wetlands, and riparian soils rich in Fe(III) minerals (Clément et al., 2005; Ding et al., 2014). Microorganisms capable of Feammox can oxidize NH₄⁺ to N₂ (**Equation 1**) in the presence of Fe(III) minerals, generating ferrous iron (Fe²⁺) (Yang et al., 2012).



Some research has been conducted to exploit the ability of Feammox microorganisms in the removal of NH₄⁺ employing different ferric iron materials; nonetheless, very few research demonstrates that nano-size Fe(III) materials can serve as electron acceptor for Feammox process. For example, nanostructured Fe oxyhydroxides were added to treat wastewater containing 100 mg/L of NH₄⁺ achieving 52 % of NH₄⁺ removal in batch conditions (Desireddy et al., 2020). Likewise, Swathi et al. (2018) demonstrated that granulated nanoscale oxyhydroxides of Fe (GNOF) with a particle size of 15 to 30 nm, achieved NH₄⁺ removal rates of 130 mg/L/d (feed NH₄⁺ = 500 mg/L and COD = 160 mg/L) in serum bottles in a semi-continuous operation with an HRT of 0.5 d.

Despite, the great potential of Fe(III) materials in the Feammox process, more research is needed to understand and demonstrate that nano-sized materials are suitable in contrast to micro and macro materials for NH₄⁺ remediation.

Conclusions and perspectives

Wastewater treatment has become an important activity with a positive impact on human populations, anaerobic treatment is gaining popularity over aerobic treatment due to the economic, environmental, and feasibility advantages that it offers. With the growing of human population, high quality water will be required and the biotechnological process for wastewater remediation will have an important

role, not just for being able to clean contaminated waters, but also for important resources that anaerobic treatment can offer, like CH₄. Also, the role of nano-CMs has shown a promising application in anaerobic treatment, enhancing the metabolic capabilities of microorganisms that allows a faster wastewater decontamination and the obtention of relevant products. In the same way nano-CMs helps to develop new processes for wastewater treatment, such as Feamnox, helping to achieve environmental and economic sustainability.

Acknowledgements

C.A. Díaz-Muñoz acknowledges SECIHTI for his doctoral scholarship (CVU: 1080170). This project was funded by UNAM through the project number DGAPA-PAPIIT IT100224 and GII3406.

Referencias

Ambuchi, J.J., Zhang, Z., Shan, L., Liang, D., Zhang, P., Feng, Y., 2017. Response of anaerobic granular sludge to iron oxide nanoparticles and multi-wall carbon nanotubes during beet sugar industrial wastewater treatment. *Water Res.* 117, 87–94.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.050>

Baek, G., Kim, J., Cho, K., Bae, H., Lee, C., 2015. The biostimulation of anaerobic digestion with (semi)conductive ferric oxides: their potential for enhanced biomethanation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 10355–10366.
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6900-y>

Basset, N., Santos, E., Dosta, J., Mata-Álvarez, J., 2016. Start-up and operation of an AnMBR for winery wastewater treatment. *Ecol. Eng.* 86, 279–289.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.11.003>

Bella, K., Rao, P.V., 2023. Anaerobic digestion of dairy wastewater: effect of different parameters and co-digestion options—a review. *Biomass Convers. Biorefinery* 13, 2527–2552.
<https://doi.org/10.1007/s13399-020-01247-2>

Bustillo-Lecompte, C.F., Mehrvar, M., 2015. Slaughterhouse wastewater characteristics, treatment, and management in the meat processing industry: A review on trends and advances. *J. Environ. Manage.* 161, 287–302.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.07.008>

Carvalho, F., Prazeres, A.R., Rivas, J., 2013. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Sci. Total Environ.* 445–446, 385–396.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>

Chen, J., Zhang, P., Zhang, J., He, Y., Tong, Y.W., 2022. Micro-Nano Magnetite-Loaded Biochar Enhances Interspecies Electron Transfer and Viability of Functional Microorganisms in Anaerobic Digestion. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 10, 2811–2821.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c08288>

Chen, Y., Guo, G., Li, Y.Y., 2022. A review on upgrading of the anammox-based nitrogen removal processes: Performance, stability, and control strategies. *Bioresour. Technol.* 364, 127992.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2022.12.7992>

Clément, J.C., Shrestha, J., Ehrenfeld, J.G., Jaffé, P.R., 2005. Ammonium oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron under anaerobic conditions in wetland soils. *Soil Biol. Biochem.* 37, 2323–2328.
<https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2005.03.027>

Dai, C., Yang, L., Wang, J., Li, D., Zhang, Y., Zhou, X., 2022. Enhancing anaerobic digestion of pharmaceutical industries wastewater with the composite addition of zero valent iron (ZVI) and granular activated carbon (GAC). *Bioresour. Technol.* 346, 126566.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126566>

Desireddy, S., P.c., S., M. Maliyekkal, S., 2020. Anoxic ammonia removal using granulated nanostructured Fe oxyhydroxides and the effect of pH, temperature and potential inhibitors on the process. *J. Water Process Eng.* 33, 101066.
<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.101066>

Ding, L.-J., An, X.-L., Li, S., Zhang, G.-L., Zhu, Y.-G., 2014. Nitrogen Loss through Anaerobic Ammonium Oxidation Coupled to Iron Reduction from Paddy Soils in a Chronosequence. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10641–10647.
<https://doi.org/10.1021/es503113s>

- Girard, M., Nikiema, J., Brzezinski, R., Buelna, G., Heitz, M., 2015. A review of the environmental pollution originating from the piggy industry and of the available mitigation technologies: towards the simultaneous biofiltration of swine slurry and methane. *https://doi.org/10.1680/jees.2014.9.1.80* 9, 80–92.
<https://doi.org/10.1680/JEES.2014.9.1.80>
- Guan, Q., Qu, Y., Zhai, Y., Shi, W., Zhao, M., Huang, Z., Ruan, W., 2023. Enhancement of methane production in anaerobic digestion of high salinity organic wastewater: The synergistic effect of nano-magnetite and potassium ions. *Chemosphere* 318, 137974.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137974>
- Guo, G., Wang, Y., Hao, T., Wu, D., Chen, G.-H., 2017. Enzymatic nitrous oxide emissions from wastewater treatment. *Front. Environ. Sci. Eng.* 12, 10.
<https://doi.org/10.1007/s11783-018-1021-3>
- He, Z.-W., Jia, Y.-L., Tang, C.-C., Zhou, A.-J., Liu, W., Ren, Y.-X., Wang, A., Chen, R., 2025. Novel insights to the synergistic effects of magnetic biochar in anaerobic digestion while treating synthetic organic wastewater for biomethane recovery. *Chem. Eng. J.* 524, 169186.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.169186>
- Kamagata, Y., 2015. Syntrophy in Anaerobic Digestion, in: *Anaerobic Biotechnology*. IMPERIAL COLLEGE PRESS, pp. 13–30.
https://doi.org/10.1142/9781783267910_0002
- Kato, S., Hashimoto, K., Watanabe, K., 2012. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals. *Environ. Microbiol.* 14, 1646–1654.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02611.x>
- Li, L., Xu, Y., Dai, X., Dai, L., 2021. Principles and advancements in improving anaerobic digestion of organic waste via direct interspecies electron transfer. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 148, 111367.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111367>
- Liu, F., Rotaru, A.E., Shrestha, P.M., Malvankar, N.S., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2012. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. *Energy Environ. Sci.* 5, 8982–8989.
<https://doi.org/10.1039/C2EE22459C>
- Lovley, D.R., 2017. Syntrophy Goes Electric: Direct Interspecies Electron Transfer. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 643–664.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020420>
- Martinez-Burgos, W.J., Bittencourt Sydney, E., Bianchi Pedroni Medeiros, A., Magalhães, A.I., de Carvalho, J.C., Karp, S.G., Porto de Souza Vandenberghe, L., Junior Letti, L.A., Thomaz Soccol, V., de Melo Pereira, G.V., Rodrigues, C., Lorenci Woiciechowski, A., Soccol, C.R., 2021. Agro-industrial wastewater in a circular economy: Characteristics, impacts and applications for bioenergy and biochemicals. *Bioresour. Technol.* 341, 125795.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125795>
- McGlynn, S.E., Chadwick, G.L., Kempes, C.P., Orphan, V.J., 2015. Single cell activity reveals direct electron transfer in methanotrophic consortia. *Nature* 526, 531–535.
<https://doi.org/10.1038/nature15512>
- Nguyen, L.N., Nguyen, A.Q., Nghiem, L.D., 2019. Microbial Community in Anaerobic Digestion System: Progression in Microbial Ecology, in: Bui, X.-T., Chiemchaisri, C., Fujioka, T., Varjani, S. (Eds.), *Water and Wastewater Treatment Technologies*. Springer, Singapore, pp. 331–355.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-3259-3_15
- Park, J.H., Kang, H.J., Park, K.H., Park, H.D., 2018. Direct interspecies electron transfer via conductive materials: A perspective for anaerobic digestion applications. *Bioresour. Technol.* 254, 300–311.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.095>
- Rajeshwari, K.V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K., Kishore, V.V.N., 2000. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 4, 135–156.
[https://doi.org/10.1016/S1364-0321\(99\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S1364-0321(99)00014-3)
- Ramírez-Montoya, L.A., Valenzuela, E.I., De Velasco-Maldonado, P.S., Hernández-Montoya, V., Menéndez, J.A., Montes-Morán, M.A., Cervantes, F.J., 2023. Carbon-based materials boost the anaerobic treatment of

- slaughterhouse wastewater. *J. Water Process Eng.* 56, 104553.
<https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2023.104553>
- Rittmann, B.E., McCarty, P.L., 2020. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications, 2nd Edition.* ed. McGraw-Hill Education.
- Rittmann, B.E., McCarty, P.L., 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications, Environmental Biotechnology: Principles and Applications.* McGraw-Hill Education.
- Rosete, A.R.M., 2020. Property, access, exclusion: Agribusiness venture agreements in the Philippines. *J. Rural Stud.* 79, 65–73.
<https://doi.org/10.1016/j.rurstud.2020.08.037>
- Swathi, D., Sabumon, P.C., Maliyekkal, S.M., 2018. Anoxic ammonia removal using granulated nanoscale oxyhydroxides of Fe (GNOF) in a SBR. *J. Environ. Chem. Eng.* 6, 4273–4281.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.05.033>
- Tan, Y., Adhikari, R.Y., Malvankar, N.S., Ward, J.E., Woodard, T.L., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2017. Expressing the *Geobacter metallireducens* PiliA in *Geobacter sulfurreducens* Yields Pili with Exceptional Conductivity. *mBio* 8, 10.1128/mbio.02203-16.
<https://doi.org/10.1128/mbio.02203-16>
- Tian, T., Qiao, S., Li, X., Zhang, M., Zhou, J., 2017. Nano-graphene induced positive effects on methanogenesis in anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 224, 41–47.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.10.058>
- Wang, M., Zhao, Z., Zhang, Y., 2021. Magnetite-contained biochar derived from fenton sludge modulated electron transfer of microorganisms in anaerobic digestion. *J. Hazard. Mater.* 403.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.12397>
- Wu, L., Jin, T., Chen, H., Shen, Z., Zhou, Y., 2023. Conductive materials as fantastic toolkits to stimulate direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion: new insights into methanogenesis contribution, characterization technology, and downstream treatment. *J. Environ. Manage.* 326, 116732.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116732>
- Wu, Y., Wang, S., Liang, D., Li, N., 2020. Conductive materials in anaerobic digestion: From mechanism to application. *Bioresour. Technol.* 298.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.12240>
- Yang, W.H., Weber, K.A., Silver, W.L., 2012. Nitrogen loss from soil through anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction. *Nat. Geosci.* 5, 538–541.
<https://doi.org/10.1038/ngeo1530>
- Yuan, H.Y., Ding, L.J., Zama, E.F., Liu, P.P., Hozzein, W.N., Zhu, Y.G., 2018. Biochar Modulates Methanogenesis through Electron Syntrophy of Microorganisms with Ethanol as a Substrate. *Environ. Sci. Technol.* 52, 12198–12207.
https://doi.org/10.1021/ACS.EST.8B04121/A_SSET/IMAGES/LARGE/ES-2018-04121R_0007.JPEG
- Zhang, H., Liu, J., Ou, C., Faheem, Shen, J., Yu, H., Jiao, Z., Han, W., Sun, X., Li, J., Wang, L., 2017. Reuse of Fenton sludge as an iron source for NiFe₂O₄ synthesis and its application in the Fenton-based process. *J. Environ. Sci.* 53, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/J.JES.2016.05.010>
- Zhuang, L., Ma, J., Yu, Z., Wang, Y., Tang, J., 2018. Magnetite accelerates syntrophic acetate oxidation in methanogenic systems with high ammonia concentrations. *Microb. Biotechnol.* 11, 710–720.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13286>
- Zhuang, L., Tang, J., Wang, Y., Hu, M., Zhou, S., 2015. Conductive iron oxide minerals accelerate syntrophic cooperation in methanogenic benzoate degradation. *J. Hazard. Mater.* 293, 37–45.
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2015.03.039>



www.smbb.com.mx