



TECNOLOGÍA
en marcha

Revista trimestral
Noviembre 2024
Volumen 37
ISSN-E 2215-3241

CiB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

30 **Número especial**
Aniversario del Centro de
Investigación en Biotecnología



Publicación y directorio en catálogos

latindex

redalyc.org UAEM

Dialnet

melica

SciELO

REDIB
Red Iberoamericana
de Investigación y Docencia Científica

DOAJ

ET
Editorial Tecnológica
de Costa Rica

TEC | Tecnológico
de Costa Rica

Comisión Editorial

Felipe Abarca Fedullo. Director.
Editorial Tecnológica de Costa Rica

Juan Antonio Aguilar Garib
Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica
Universidad Autónoma de Nuevo León.
México

Carlos Andrés Arredondo Orozco
Facultad de Ingenierías
Universidad de Medellín. Colombia

Lars Köhler
Experimenteller Botanischer Garten
Georg-August-Universität Göttingen.
Alemania

Jorge Solano Jiménez
Instituto Costarricense del Cemento
y del Concreto

Edición técnica

Alexa Ramírez Vega

Revisión filológica

Esperanza Buitrago Poveda

Diseño gráfico

Felipe Abarca Fedullo

Diagramación

Alexa Ramírez Vega

Diseño de cubierta

Ariana Sanabria García

Imagen de cubierta

Ariana Sanabria García

Datos de catalogación en publicación

Tecnología en Marcha / Editorial Tecnológica
de Costa Rica. - Vol. 37, número especial.
CIB. Noviembre, 2024.
ISSN-E 2215-3241

1. Ciencia y Tecnología –
Publicaciones periódicas CDD:600



TEC | Tecnológico
de Costa Rica

Apdo 159-7050 Cartago, Costa Rica
Tel.:(506) 2550-2297, 2550-2618
Correo electrónico: editorial@itcr.ac.cr
Web: <https://www.tec.ac.cr/editorial>
http://revistas.tec.ac.cr/tec_marcha



TEC | Tecnológico
de Costa Rica

La Editorial Tecnológica de Costa Rica es una dependencia especializada del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Desde su creación, en 1978, se ha dedicado a la edición y publicación de obras en ciencia y tecnología. Las obras que se han editado abarcan distintos ámbitos respondiendo a la orientación general de la Institución.

Hasta el momento se han editado obras que abarcan distintos campos del conocimiento científico-tecnológico y han constituido aportes para los diferentes sectores de la comunidad nacional e internacional.

La principal motivación de la Editorial es recoger y difundir los conocimientos relevantes en ciencia y tecnología, llevándolos a los sectores de la comunidad que los requieren.

La revista *Tecnología en Marcha* es publicada por la Editorial Tecnológica de Costa Rica, con periodicidad trimestral. Su principal temática es la difusión de resultados de investigación en áreas de Ingeniería. El contenido de la revista está dirigido a investigadores, especialistas, docentes y estudiantes universitarios de todo el mundo.

Publicación y directorio en catálogos





TECNOLOGÍA *en marcha*

Contenidos

| | |
|---|----|
| Edición especial: 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología Special edition: 30th Anniversary of the Biotechnology Research Center <i>Laura A. Calvo-Castro</i> | 4 |
| Centro de Investigación en Biotecnología: 30 Aniversario Biotechnology Research Center: 30th Anniversary <i>Laura A. Calvo-Castro, Carlos Alvarado-Ulloa</i> | 7 |
| Marco regulatorio de Biotecnología moderna y edición génica agropecuaria de Costa Rica Costa Rican agriculture and livestock modern Biotechnology and genome editing legal framework <i>Jason Pérez, Giovanni Garro-Monge, Luis Barboza-Fallas, Alejandro Hernández-Soto, Andrés Gatica-Arias</i> | 20 |
| Microalgae as expression systems for recombinant protein production Microalgas como sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes <i>Luis Muñoz-Solórzano, Kate Willis-Ureña, Sebastián Valverde-Rojas, Montserrat Jarquín-Cordero, Luis Barboza-Fallas</i> | 38 |
| Advances in microalgal biotechnology in Costa Rica: contributions from the Costa Rica Institute of Technology Avances en biotecnología microalgal en Costa Rica: contribuciones del Instituto Tecnológico de Costa Rica <i>Francinie Murillo-Vega, Margie Faith-Vargas, Mauricio Chicas-Romero, Karla Meneses-Montero, Fabián Villalta-Romero</i> | 54 |
| Efecto de azitromicina sobre el crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> Effect of azithromycin on the growth of <i>Chlorella sorokiniana</i> <i>Yariela Núñez-Salazar, Karina Rodríguez-Mora, Eddy Jirón-García, Fabián Villalta-Romero</i> | 69 |
| Bacteriocinas y sus aplicaciones: mini-revisión Bacteriocins and its applications: mini-review <i>Plamen José Cubillo-Komarovova, Roberto Enrique Ledezma-Acevedo, Valeria Salazar-Cedeño, Daniela Murillo-Rodríguez, Dylan Stern-Flores</i> | 79 |

| | |
|---|-----|
| Los insectos como aliados de la biotecnología: siete años de exploración en avispas sociales para la búsqueda nuevos compuestos antibióticos | |
| Insects as allies in biotechnology: a seven-years exploration of neotropical social wasps for novel antibiotic compounds | |
| <i>Laura Chavarría-Pizarro, Kattia Núñez-Montero</i> | 90 |
| Estado actual de las cutinasas en la problemática de la degradación de plásticos de un solo uso | |
| Current state of cutinases in addressing the issue of single-use plastic degradation | |
| <i>Marcel de Jesús Arrieta-Fonseca</i> | 100 |
| Diálogo entre hongos y plantas en la raíz y el suelo | |
| Dialogue between fungi and plants in the root and soil | |
| <i>William Rivera-Méndez, William Watson-Guido</i> | 109 |
| Exploración de las condiciones de cultivo del hongo <i>Ganoderma curtisii</i> para la producción de enzimas con actividad lignocelulósica | |
| Exploring culture conditions of the fungus <i>Ganoderma curtisii</i> for the production of enzymes with lignocellulosic activity | |
| <i>Daniela Salas-Ciudad, Andrés Esquivel-Valerio, Catalina Rosales López</i> | 121 |
| <i>Psilocybe cubensis</i>: potencial neuropsicofarmacéutico de la psilocibina y psilocina | |
| <i>Psilocybe cubensis</i> : neuropsychopharmaceutical potential of psilocybin and psilocin | |
| <i>Frank Carlos Barrientos-Alfaro, Valeria Herrera-Rojas, Michelle Montero-Quesada, Jose Julián Picado-Morales, Magally María Sanabria-Brenes</i> | 132 |
| Inducción de mutaciones y biotecnología vegetal para la producción de cultivos resistentes a condiciones de estrés y con mayor rendimiento | |
| Induction of mutations and plant biotechnology to produce stress-resistant crops with higher yields | |
| <i>Frank Carlos Barrientos-Alfaro, Jason Pérez, Alejandro Hernández-Soto</i> | 143 |
| Optimización de la embriogénesis somática en <i>Coffea arabica</i>: evaluación de la orientación y punto de origen del explante foliar | |
| Optimization of somatic embryogenesis in <i>Coffea arabica</i> : evaluation of leaf explant orientation and origin | |
| <i>Daniela Vargas-Morera, Roselind Vargas-Delgado, Steven Ceciliano-Castro</i> | 158 |
| Reporte de Caso: detección y caracterización del virus del acucharamiento del tomate (TYLCV) en plantas de tomate del cantón de Sarchí, Costa Rica | |
| Case Report: detection and characterization of the tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in tomato plants from Sarchí, Costa Rica | |
| <i>Alexandra Castro-Estrada, Estefanía Chavarría-Jiménez, Mareling García-Madrigal, Verónica Ramos-Salazar, Elsie Lorena Gorostiola-Martínez, Randall Chacón-Cerdas, Luis Alvarado-Marchena</i> | 167 |
| Agentes químicos que dañan al ADN: inducción de genotoxicidad en la vida diaria, riesgo y prevención | |
| DNA-damaging chemical agents: genotoxicity induction in daily life, risk and prevention | |
| <i>Virginia Montero-Campos, Ying Yi Huang-Qiu, Henry Rodríguez-Sevilla</i> | 179 |
| Gut microbiota dysbiosis and the role of its person-to-person transmission in the development of non-communicable diseases | |
| Disbiosis de la microbiota intestinal y el papel de su transmisión de persona-a-persona en el desarrollo de enfermedades no transmisibles | |
| <i>Gloriana Chaves-Jiménez, Mauro Briceño-Chaves</i> | 189 |

Preclinical evaluation of a low-cost mechanical ventilator

Evaluación preclínica de un ventilador mecánico de bajo costo

Randall Chacón-Cerdas, Adrián Quesada-Martínez, Aníbal Ruíz-Barquero, Roberto Estrada-McDermott..... 200

Procesamiento y esterilización de tejido óseo para su uso terapéutico: bases preclínicas desde una universidad tecnológica

Bone tissue processing and sterilization for therapeutic use: preclinical experiments from a technological university

Carolina Centeno-Cerdas, Fabián Somarribas-Brenes, Walter Vargas-Segura, Montserrat Jarquín-Cordero, Andrea Ulloa-Fernández, Laura A. Calvo-Castro..... 215

Incorporating strawberry leaf extract from waste biomass in prototype topical gel and cream formulations

Incorporación de extracto de hoja de fresa procedente de biomasa residual en prototipos de formulaciones tópicas de gel y crema

Karla Salas-Arias, Fabián Villalta-Romero, Randall Chacón-Cerdas, David Hidalgo-Paniagua, Laura A. Calvo-Castro 229

Edición especial: 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología

Special edition: 30th Anniversary of the Biotechnology Research Center


Laura A. Calvo-Castro¹

Clavo-Castro, L.A. Edición especial: 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 4-6.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7628>

¹ Coordinadora. Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 ancalvo@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0001-5101-9105>

El Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) fue creado en 1994 con el objetivo de generar conocimiento científico-tecnológico, capacitación y servicios, en las diferentes áreas de aplicación de la biotecnología, para contribuir con el desarrollo nacional y regional. Localizado en el Campus Central del ITCR en el Cantón Central de la provincia de Cartago en Costa Rica, el CIB cuenta con 14 laboratorios especializados en los cuales se desarrollan anualmente alrededor de 40 proyectos multidisciplinarios de investigación y algunos de extensión en 4 áreas de la biotecnología: Biotecnología Vegetal, Biotecnología Ambiental, Aplicaciones Biomédicas, y Bioprocesos.

Esta Edición Especial de la Revista Tecnología en Marcha conmemora el 30 aniversario de la creación del CIB (celebrado el 11 de marzo de 2024), iniciando con el artículo “El Centro de Investigación en Biotecnología: 30 aniversario”, donde se muestran las estadísticas de los logros de investigación obtenidos por el CIB en los últimos 5 años.

En el área de Biotecnología Vegetal, el artículo “Marco regulatorio de biotecnología moderna y edición génica agropecuaria de Costa Rica” detalla la normativa actual que rige la biotecnología moderna en el país, señalando a Costa Rica como un entorno favorable para el crecimiento económico sostenible y las inversiones en biotecnología. En este contexto, los investigadores del CIB buscan potenciar la seguridad alimentaria y la productividad agrícola en Costa Rica mediante estrategias como las descritas en el artículo “Inducción de mutaciones y biotecnología vegetal para la producción de cultivos resistentes a condiciones de estrés y con mayor rendimiento”, sin dejar de lado el uso de técnicas de biotecnología tradicional para el mejoramiento de cultivos, tal como se describe en “Optimización de la embriogénesis somática en *Coffea arabica*: Evaluación de la orientación y origen del explante foliar”, y la vigilancia continua de plagas agrícolas como se ejemplifica en “Detección y caracterización del virus del acucharamiento del tomate (TYLCV) en plantas de tomate de la región de Sarchí”.

En el área de Biotecnología Ambiental, en coyuntura con la Biotecnología Vegetal y los Bioprocesos, diversas investigaciones del CIB también se abogan a la identificación y producción en diversos sistemas biológicos de biomoléculas de interés alimenticio, agrícola, industrial y medicinal, tal como se describe en “Bacteriocinas y sus aplicaciones: Mini-Revisión”, “Los insectos como aliados de la biotecnología: Siete años de exploración en avispa social para la búsqueda nuevos compuestos antibióticos”, “Diálogo entre hongos y plantas en la raíz y el suelo”, “Exploración de las condiciones de cultivo del hongo *Ganoderma curtisii* para la producción de enzimas con actividad lignocelulósica”, y “*Psilocybe cubensis*: Potencial neuropsicofarmacéutico de la psilocibina y psilocina”.

Por su parte, los artículos “Microalgas como sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes”, “Avances en biotecnología microalgal en Costa Rica: Contribuciones del Instituto Tecnológico de Costa Rica”, y “Efecto de azitromicina sobre el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*” demuestran el potencial de las microalgas como una plataforma para la articulación de las cuatro áreas de investigación del CIB, mostrando el potencial de estos organismos para la producción de alimentos para humanos y animales, para la biorremediación de aguas contaminadas, para la producción de moléculas de interés biomédico, y para la generación de nuevos fertilizantes eco amigables, entre muchas otras aplicaciones.

Finalmente, las investigaciones en el área de Aplicaciones Biomédicas del CIB buscan entender, prevenir, o mejorar aspectos relacionados con la salud humana mediante la aplicación de técnicas innovadoras y el desarrollo de nuevas tecnologías, ejemplificado en los artículos “Agentes químicos que dañan al ADN: Inducción de genotoxicidad en la vida diaria, riesgo y prevención”, “Disbiosis de la microbiota intestinal y el papel de su transmisión de persona-a-persona en el desarrollo de enfermedades no transmisibles”, “Evaluación preclínica

de un ventilador mecánico de bajo costo”, “Procesamiento y esterilización de tejido óseo para su uso terapéutico: Bases preclínicas desde una universidad tecnológica”, e “Incorporación de extracto de hoja de fresa procedente de biomasa residual en prototipos de formulaciones tópicas de gel y crema”.

Cabe mencionar que para esta Edición Especial se dio especial apoyo a estudiantes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela de Biología del ITCR, quienes colaboraron con algunos artículos de revisión de literatura en temas de alto impacto para el futuro de la biotecnología, así como en diversas investigaciones formales, demostrando el compromiso académico y la capacidad de producción científica de nuestros profesionales desde etapas tempranas.



Centro de Investigación en Biotecnología: 30 Aniversario

Biotechnology Research Center: 30th Anniversary

Laura A. Calvo-Castro¹, Carlos Alvarado-Ulloa²

Calvo-Castro, L.A.; Alvarado-Ulloa, C. Centro de investigación en biotecnología: 30 aniversario. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 7-19.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7605>

1 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 ancalvo@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0001-5101-9105>

2 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 calvarado@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0002-3739-2701>

Palabras clave

Biotecnología ambiental; biotecnología vegetal; biocontrol; biomedicina; bioprocesos.

Resumen

El Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) cuenta con 14 laboratorios especializados en los cuales se desarrollan más de 40 proyectos de investigación multidisciplinarios en las áreas de Biotecnología Vegetal, Biotecnología Ambiental, Aplicaciones Biomédicas y Bioprocesos. El objetivo del CIB es generar conocimiento científico-tecnológico, capacitación y servicios, en las diferentes áreas de aplicación de la biotecnología, para contribuir con el desarrollo nacional y regional. En su 30 aniversario, el CIB sigue a la vanguardia en investigación biológica y desarrollo tecnológico, proporcionando soluciones concretas para las diversas necesidades del sector productivo y la sociedad costarricense.

Keywords

Environmental biotechnology; plant biotechnology; biocontrol; biomedicine; bioprocess.

Abstract

The Biotechnology Research Center (CIB) of the School of Biology of the Technological Institute of Costa Rica (TEC) has 14 specialized laboratories and hosts more than 40 multidisciplinary research projects in Plant Biotechnology, Environmental Biotechnology Biomedical Applications, and Bioprocesses. The objective of CIB is to generate scientific-technological knowledge, training, and services, in the different areas of application of biotechnology, to contribute to national and regional development. In its 30th anniversary, CIB continues to generate science and technology in biological and life sciences topics, providing concrete solutions to different needs of the productive sector and general society in Costa Rica.

Introducción

El término “biotecnología” fue acuñado en 1919 por el ingeniero agrícola húngaro Karl Ereky [1]; sin embargo, su uso se popularizó hasta la década de los años 60 para designar las actividades técnicas con seres vivos y sus aplicaciones [2]. Actualmente, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) define la biotecnología como “la aplicación de la ciencia y la tecnología a organismos vivos, así como a sus partes, productos y modelos, para alterar materiales vivos o no vivos, para la producción de conocimiento, bienes y servicios”, y categorizan las acciones en biotecnología en siete categorías: ADN/ARN; proteínas y otras moléculas; cultivo e ingeniería de células y tejidos; bioprocesos; vectores de genes y ARN; bioinformática; y nanobiotecnología [3]. El Manual de Frascati [4] considera cinco áreas de acción de la biotecnología: biotecnología ambiental, biotecnología industrial, biotecnología médica y biotecnología agrícola. Sin embargo, la biotecnología es una actividad multidisciplinaria, que comprende una gran variedad de técnicas, y se considera como un área de tecnologías convergentes con gran potencial de apoyar la productividad científica de otros sectores [5].

Antecedentes

En Costa Rica, las actividades formales en biotecnología iniciaron en la década de los ochenta, particularmente en el área de Biotecnología Vegetal [6]. La Biotecnología se ha incluido como una de las áreas prioritarias de intervención de los Planes Nacionales de Ciencia, Tecnología e Innovación 2011-2014 [5] y 2015-2021 [7], y es parte de los temas de Bioeconomía e Investigación en salud humana y ciencias de la vida del Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación 2022-2027 [8]. Además, el Programa de Innovación y Capital Humano para la Competitividad incluye a la biotecnología como una de las estrategias “claves para el estímulo de la innovación por parte de las empresas domésticas, la atracción de actividades de innovación por parte de empresas globales y el fomento al emprendimiento de base tecnológica” (Ley 9218) [9]. La Biotecnología es también una de las áreas de interés del Plan de Medio Siglo de la Estrategia Siglo XXI [9]

Creación del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB)

El “Área de Biología” fue creada en el TEC en 1982 para la administración de los cursos de biología y genética que se impartían desde 1976 para las carreras de ingeniería en el campo agroforestal. Las primeras actividades de investigación de esta área iniciaron formalmente en 1986, y estuvieron enfocadas en temas de biotecnología vegetal, particularmente en cultivo de tejidos vegetales y mejoramiento genético de especies de interés agrícola y ornamental (chayote, papa, mora, orquídeas), y domesticación de especies forestales nativas. Esto llevó a la creación de la Escuela de Biología en 1991; al establecimiento del primer laboratorio de biotecnología en el TEC en 1992, donde se sumaron actividades de transferencia de tecnología y venta de servicios biotecnológicos; y culminando con la fundación del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), el 10 de marzo del 1994, con la M.Sc. Dora Flores como su primera coordinadora. Además, la creación del CIB sirvió como base para la instauración en 1996 del programa de Bachillerato en Ingeniería en Biotecnología del TEC (con énfasis en cultivo de tejidos vegetales y recursos fitogenéticos), siendo por varios años el único plan de estudios en esta disciplina en el país y en la región centroamericana [6].

Objetivo, Misión y Visión del CIB

El Reglamento del Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR, aprobado por el Consejo Institucional, sesión No. 1810/9, del 23 de febrero de 1995, establece que el Objetivo General del CIB es generar conocimiento científico-tecnológico, capacitación y servicios, en las diferentes áreas de aplicación de la biotecnología, para contribuir con el desarrollo nacional y regional. La Misión del CIB es desarrollar investigación, extensión y servicios en biotecnología, ofreciendo soluciones pertinentes y de excelencia mediante el trabajo multidisciplinario. La Visión del CIB es ser un Centro de Investigación líder en biotecnología que impacte positivamente en el ambiente y en la calidad de vida de la sociedad [10]. Actualmente, las actividades de investigación del CIB contribuyen en las acciones de al menos 12 de los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas (figura 1).



Figura 1. Objetivos de Desarrollo Sostenible a los cuales contribuyen las acciones de investigación del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (2024) (<https://www.un.org/sustainabledevelopment/>).

Proyectos de investigación en el CIB

En el CIB se desarrollan proyectos de investigación y extensión en cuatro áreas (cuadro 1): Biotecnología Ambiental, Biotecnología Vegetal, y Aplicaciones Biomédicas, establecidas desde el 2009; además, en el 2023 se formalizó la creación de una nueva área de investigación en Bioprocesos.

Cuadro 1. Áreas de investigación del Centro de Investigación en Biotecnología, 2024.

| Área | Descripción | Líneas de investigación |
|-------------------------|---|--|
| Biotecnología Ambiental | Involucra estudios relacionados con biodiversidad, aplicaciones de la biotecnología para la producción sostenible, recursos naturales, y fuentes renovables de energía, enfocados hacia la identificación, aislamiento, cultivo a gran escala, y obtención de subproductos de valor. | 1. Cultivos bio-energéticos y micro-algales. |
| | | 2. Bioprospección con microorganismos e insectos. |
| | | 3. Escalamiento de microorganismos y compuestos bioactivos de interés. |
| | | 4. Estudio de comunidades microbianas de potencial agrícola y ambiental. |
| | | 5. Control biológico de plagas y enfermedades como estrategia agrícola y ambiental. |
| Biotecnología Vegetal | Uso de plantas para el estudio de su potencial biotecnológico y desarrollo de productos o servicios. Involucra la aplicación de técnicas de fitomejoramiento, ingeniería genética, cultivo <i>in vitro</i> y todas aquellas requeridas para la conservación, producción o escalamiento de materiales vegetales. | 1. Producción, bio-prospección y escalamiento de biomasa y compuestos funcionales de origen vegetal. |
| | | 2. Conservación y caracterización genética de germoplasma vegetal. |
| | | 3. Aplicaciones ómicas al fitomejoramiento. |
| | | 4. Fitopatología molecular |
| | | 5. Estudio, producción y evaluación de moléculas con aplicaciones en sistemas biológicos |

| Área | Descripción | Líneas de investigación |
|-------------------------|---|---|
| Aplicaciones Biomédicas | Comprende actividades de investigación, docencia y extensión relacionadas a la aplicación de los principios y técnicas de la ingeniería y la biotecnología para aportar a la innovación, prevención, promoción y atención de la salud humana, veterinaria y poblacional. | 1. Biología molecular, estructural, y bioquímica de proteínas |
| | | 2. Sistemas de regulación y expresión génica |
| | | 3. Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa |
| | | 4. Bioactividad |
| | | 5. Toxicología |
| Bioprocesos | Comprende investigaciones consolidadas dirigidas al diseño, escalamiento, prototipado y validación de tecnologías y procesos biotecnológicos que promuevan el desarrollo científico y tecnológico del país, en alianza con sectores académicos y comerciales, a nivel nacional e internacional. | 1. Diseño |
| | | 2. Bioeconomía |
| | | 3. Escalamiento |
| | | 4. Prototipado |
| | | 5. Validación |

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Desde su creación, se han desarrollado en el CIB más de 250 proyectos de investigación y extensión inscritos en la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR, así como numerosos trabajos de tesis (desde Bachillerato hasta Doctorado), proyectos estudiantiles, e investigaciones contratadas a través de la Fundación Tecnológica de Costa Rica (FUNDATEC). En los últimos 5 años, se han realizado en el CIB alrededor de 40 proyectos de investigación y extensión en promedio por año (Figura 2). En el 2023, en el CIB se ejecutaron actividades de cuatro proyectos de extensión y 40 proyectos de investigación (Cuadro 2), 36 de ellos coordinados por la Escuela de Biología y ocho coordinados por otras Escuelas del TEC. La mayoría de los proyectos han sido financiados mediante fondos otorgados por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR; así como por el Fondo del Sistema del Consejo Nacional de Rectores (CONARE) del Sistema de Educación Superior Universitaria Estatal de Costa Rica; el Ministerio de Ciencia, Innovación, Tecnología y Telecomunicaciones (MICITT); el Ministerio de Planificación Nacional y Política Económica (MIDEPLAN); el Ministerio de Agricultura y Ganadería, y otros fondos públicos de Costa Rica. Además, también se ha contado con financiamiento por parte de diversos entes internacionales.

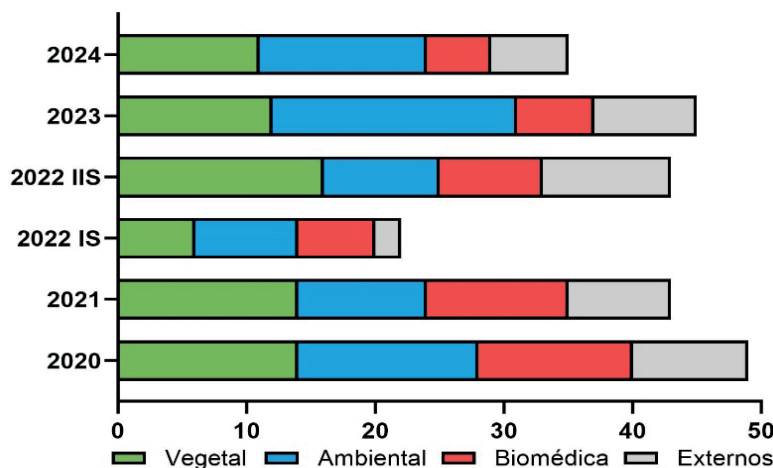


Figura 2. Cantidad de proyectos de investigación desarrollados en el CIB en Biotecnología Vegetal, Biotecnología Ambiental, Aplicaciones Biomédicas, y colaboración en proyectos de otras Escuelas del TEC (externos), del 2020 al 2024. Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Cuadro 2. Listado de los proyectos de investigación y extensión ejecutados en el CIB en los últimos 5 años (2020-2025).

| Vigencia | Nombre del proyecto |
|--------------------------------|---|
| <i>Biotecnología Ambiental</i> | |
| 2020-2023 | Nanobiofertilizantes: uso de arcillas en la preparación de emulsiones de Pickering para formulados agrícolas a base de biomasa microalgal de <i>Arthrospira máxima</i> |
| 2020-2023 | Caracterización de actividad lipasa endógena de especies de microalgas y desarrollo de transesterificación <i>in situ</i> para la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos, como materia prima para biocombustibles |
| 2020-2023 | Alimentómica de microalgas: determinación de metabolitos primarios y secundarios en biomasas microalgales para la elaboración de alimentos funcionales |
| 2020-2023 | Desarrollo de un producto alimenticio a partir de biomasa microalgal de <i>Arthrospira maxima</i> con alto valor nutricional (Financiamiento CONARE) |
| 2022-2023 | Desarrollo sostenible en acuicultura: Nutrición de alevines con nuevo suplemento microalgal rico en proteína (Financiamiento MICITT) |
| 2022-2023 | Acuicultura descarbonizada: Mitigación de carbono mediante la generación de suplementos alimenticios con microalgas nativas (Financiamiento MIDEPLAN) |
| 2021-2023 | Biorefinería de microalgas: Desarrollo de un proceso integral sostenible para la producción de compuestos bioactivos a base de microalgas para la agricultura, ganadería y acuicultura (Financiamiento MICITT) |
| 2022-2023 | Contaminación del maíz costarricense por especies toxigénicas de <i>Fusarium</i> spp (Financiamiento CONARE) |
| 2022-2024 | Genómica de actinobacterias asociadas a avispas sociales para estudio de elementos genéticos antimicrobianos |
| 2022-2024 | Vida en el extremo: Novedoso abordaje para la exploración genómica y fisiológica de microorganismos fotosintéticos extremófilos |
| 2022-2024 | Desarrollo de una estrategia interinstitucional para la reducción de contaminantes emergentes en cuerpos de agua de la GAM, Costa Rica |
| 2022-2024 | Caracterización y aprovechamiento de micorrizas como herramienta de producción sostenible y resistencia ante el estrés hídrico en <i>Coffea arabica</i> |
| 2023-2024 | Interacción entre plantas de piña (<i>Ananas comosus</i>), mediada por hongos micorrícicos, sometidas a diferentes condiciones de estrés |
| 2024-2025 | Metabolómica de compuestos antimicrobianos obtenidos de actinobacterias aisladas de avispas sociales |
| 2023-2024 | Implementación de un plan de manejo con bioestimulantes de microalgas para la producción de hortalizas (Proyecto de Extensión) |
| 2024-2025 | Implementación de bioestimulantes a base de microalgas en la producción comercial de fresa (Proyecto de Extensión) |
| 2024-2025 | Humedales productivos: pasos iniciales para un reúso seguro de agua residual tratada |
| 2024-2025 | Acceso a fuentes novedosas de productos naturales: Alcance multiómico innovador y transdisciplinar para el descubrimiento de metabolitos bioactivos en Actinobacterias y Cianobacterias de ambientes extremos |
| <i>Biotecnología Vegetal</i> | |
| 2020-2024 | Desarrollo y transferencia del conocimiento científico y métodos agroforestales para la producción óptima y sostenible de fibras naturales de abacá (<i>Musa textilis</i> Née) para la exportación (Financiamiento MICITT) |
| 2020-2023 | Formulación de un prototipo de uso tópico a partir de extractos de fresa (<i>Fragaria x ananassa</i> ., variedad Festival) ricos en antocianinas |
| 2022-2024 | Validación de un método de cuantificación de metabolitos de <i>Cannabis</i> sp. mediante HPLC-DAD-FL |
| 2022-2025 | Desarrollo de un método rápido de detección de la enfermedad viral del camote (SPVD) y estudio del comportamiento de insectos vectores asociados, como estrategia de prevención y control fitosanitario en apoyo a la competitividad del sector productivo de Costa Rica (co-financiado por INTA) |
| 2022-2025 | Desarrollo de líneas de caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) producidas por mutagénesis radioinducida para una agricultura más resiliente y productiva |
| 2023-2024 | Producción biotecnológica de dos variedades comerciales de fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>) y fortalecimiento de las capacidades para su manejo en invernadero y campo |

| Vigencia | Nombre del proyecto |
|---|--|
| 2023-2025 | Fortalecimiento de la capacidad productiva de agricultores de papa a través de la biotecnología agrícola como respuesta de reactivación económica: II etapa (Proyecto de Extensión) |
| 2023-2024 | Establecimiento de una estrategia de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Cannabis sativa</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para la producción de fibra y cannabinoides (CBD, CBG) |
| 2023-2024 | Implementación de un protocolo para la identificación de Organismos Genéticamente Modificados en Piña Rosé, algodón y soya de interés comercial de Costa Rica |
| 2023-2024 | Aprovechamiento de residuos de cascarilla de arroz para la producción de xilitol mediante biología sintética |
| 2023-2024 | Caracterización molecular nivel nuclear y plastidial de especies medicinales asociadas al tratamiento de la diabetes |
| 2023-2024 | Evaluación y transferencia de un recubrimiento protector postcosecha a base de quitosano contra <i>Botrytis cinerea</i> en bayas de interés comercial (Proyecto de Extensión) |
| 2024-2026 | Producción de líneas mutantes de arroz tolerantes a suelos ácidos para contribuir con la productividad agrícola nacional |
| 2024-2025 | Determinación del perfil fitoquímico de hoja y fruto de <i>Jatropha curcas</i> (tempate) en Costa Rica (Fase I) |
| <i>Aplicaciones Biomédicas</i> | |
| 2022-2024 | Determinación de los mecanismos moleculares de proteínas pro-coagulantes humanas mediante cristalografía de rayos X de macromoléculas biológicas, Fase II |
| 2022-2023 | Comparación del escenario de exposición a tóxicos para Nefropatía Mesoamericana (Enfermedad Renal Crónica ERC) entre Costa Rica y Panamá y su correlación con la salud de la población afectada |
| 2022-2024 | Papp Fase I: Establecimiento de un modelo intestinal <i>in vitro</i> para el cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente de compuestos bioactivos |
| 2023-2024 | Determinación del potencial hipoglucémico de <i>Kalanchoe pinnata</i> , mediante un modelo agudo vs crónico en ratas diabéticas |
| 2023-2024 | INNOrganic: INNnovation in ORGANIC study models for preclinical testing Fase I (GI): Prueba de concepto en la modelación de un sistema digestivo <i>in vitro</i> en un sistema organ-on-a-chip |
| 2023-2025 | Extra-synaptic Neuregulin-2 signaling functions in GABAergic and glutamatergic cortical networks (Fondo CONARE – Instituto Max Plank) |
| <i>Proyectos coordinados por otras Escuelas del TEC</i> | |
| 2020-2023 | Desarrollo de sistema para evaluación biomecánica de implantes para prótesis óseo-integradas en modelos mímicos de hueso impresos en 3D (Aplicaciones Biomédicas). Escuela de Ciencia e Ingeniería de Materiales |
| 2022-2024 | Uso de hongos micorrízicos arbusculares asociados naturalmente a tres especies forestales (Biotecnología Ambiental). Escuela de Ingeniería Forestal |
| 2022-2024 | Fabricación de celdas biosolares a partir de biomasa de microalgas: Doble cosecha de la energía solar para producción de proteínas fotosintéticas y energía fotovoltaica (Biotecnología Ambiental). Escuela de Ciencia e Ingeniería de Materiales |
| 2022-2025 | Manejo integrado de la marchitez de la melina (<i>Gmelina arborea</i> Roxb.) y de la muerte descendente de la teca (<i>Tectona grandis</i> L.) (Biotecnología Ambiental). Escuela de Ing. Forestal |
| 2022-2024 | Determinación de impactos inmediatos y a largo plazo sobre la dinámica en el hábitat acuático disponible comparando las condiciones en cola de embalse, el trayecto crítico y aguas abajo de la restitución del Proyecto Hidroeléctrico del río Pirrís (Biotecnología Ambiental). Escuela de Ingeniería Agrícola |
| 2022-2024 | Desarrollo de patrón de estimulación mecánica para inducir la diferenciación de mioblastos a músculo esquelético (Aplicaciones Biomédicas). Escuela de Ciencia e Ingeniería de Materiales |
| 2022-2023 | Obtención de materiales porosos producidos a partir de biopolímeros extraídos de residuos agroindustriales para aplicaciones biomédicas (Aplicaciones Biomédicas). Escuela de Química |
| 2023-2024 | Caracterización de la arquitectura vernácula de la ciudad de Puntarenas (Biotecnología Ambiental). Escuela de Arquitectura y Urbanismo |
| 2024-2025 | Determinación del caudal ambiental para el mejoramiento de la gestión integrada del recurso hídrico en el río Sarapiquí mediante una metodología holística (Biotecnología Ambiental). Escuela de Ingeniería Agrícola |

Publicaciones científicas del CIB

Históricamente, los proyectos de investigación y extensión del CIB se enfocaron inicialmente en la transferencia de tecnologías y en la resolución de problemas de los productores agrícolas locales. Debido a esto, durante los primeros años de existencia del CIB, la mayoría de las publicaciones de resultados fueron en boletines y medios de comunicación masiva. Sin embargo, el crecimiento en personal, infraestructura y equipamiento científico ha permitido el aumento y mayor diversificación de las actividades de investigación del CIB, lo cual se refleja en un crecimiento exponencial en la cantidad de artículos científicos publicados en revistas internacionales de alto impacto en los últimos 10 años (Figura 3). El aumento en la cantidad de publicaciones anuales es una tendencia que se repite en casi todos los centros de investigación del TEC, con un incremento marcado a partir de 2018 (Figura 3). Es posible que esto se deba a las nuevas políticas institucionales, que exigen la entrega de al menos una publicación científica por proyecto de investigación y extensión. Además, en el 2018 inició la reinserción de más de 30 investigadores que recibieron becas institucionales para realizar estudios doctorales en los años inmediatamente anteriores.

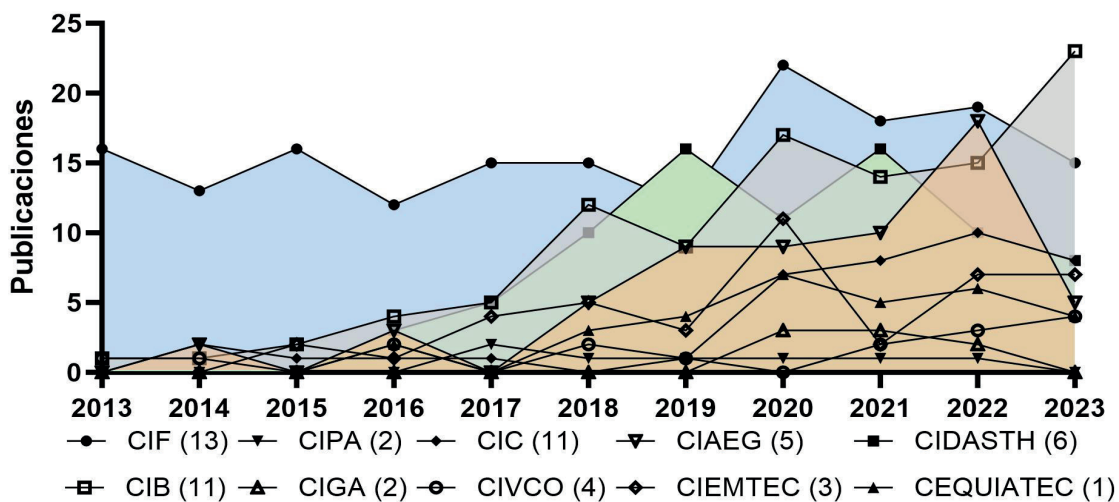


Figura 3. Cantidad de artículos científicos publicados (artículos de investigación original + revisiones de literatura) en revistas científicas indexadas en la base de datos Scopus por los investigadores de mayor producción científica (entre paréntesis) de los centros de investigación del TEC, del 2013 al 2023. CIF, Centro de Investigación en Innovación Forestal; CIB, Centro de Investigación en Biotecnología; CIPA, Centro de Investigación en Protección Ambiental; CIGA, Centro de Investigación en Gestión Agroindustrial; CIC, Centro de Investigaciones en Computación; CIVCO, Centro de Investigación en Construcción; CIAEG, Centro de Investigaciones en Administración, Economía y Gestión Tecnología; CIEMTEC, Centro de Investigación y Extensión en Ingeniería de los Materiales; CIDASTH, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible para el Trópico Húmedo; CEQUIATEC, Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos. Fuente: Pure, Elsevier; febrero 2024; <https://www.elsevier.com/products/pure>.

Sumando los artículos científicos publicados en otras plataformas además de Scopus, los investigadores del CIB generaron más de 30 artículos científicos por año en el 2022 y 2023. Además, muchas de las publicaciones científicas del CIB se han realizado en colaboración con otras instituciones académicas a nivel nacional e internacional (figura 4).



Figura 4. Algunas colaboraciones internacionales (artículos publicados en revistas científicas indexadas en la base de datos Scopus) de los once investigadores de mayor producción científica del CIB en los últimos 5 años. (Pure, Elsevier; febrero 2024; <https://www.elsevier.com/products/pure>).

Recurso humano del CIB

En promedio, en los últimos 5 años han trabajado en el CIB 40 profesores investigadores y extensionistas, de los cuales (para el 2023) 20 fueron mujeres y 20 hombres; tres con grado de Licenciatura, 16 con grado de Maestría, y 21 con grado de Doctorado (52.5%). Trece de estos investigadores cuentan con grados académicos obtenidos fuera del país. Además, por semestre, alrededor de 90 estudiantes (en su mayoría de la carrera de Ingeniería en Biotecnología) participan en los proyectos como asistentes de investigación y extensión, incluyendo estudiantes de tesis en programas desde bachillerato hasta doctorado.

Infraestructura y equipamiento del CIB

El Centro de Investigación en Biotecnología se localiza en la zona este del Campus Central del TEC, en el Cantón Central de la provincia de Cartago, Costa Rica. Actualmente cuenta con 14 laboratorios especializados (Figura 5), un campo experimental frutícola, un invernadero y dos estanques para cultivo de microalgas a gran escala, ocupando una superficie de 15 mil metros cuadrados. También se cuenta con un cuarto frío a 4°C, una bodega para solventes, dos bodegas para materiales, una sala de reuniones para 8 personas, un aula para 30 personas y un pequeño comedor.

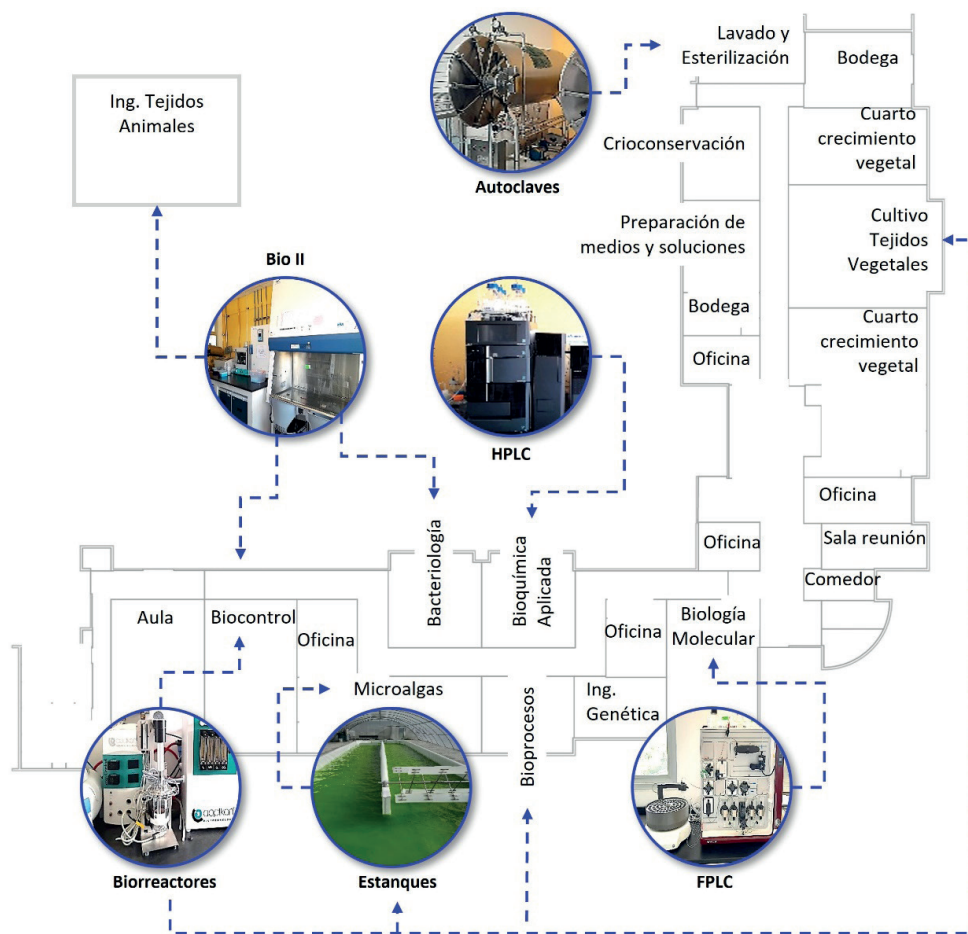


Figura 5. Distribución de los principales laboratorios del CIB y algunos equipos de investigación (plano cortesía de la Oficina de Ingeniería del ITCR).

Además de los equipos de laboratorio básicos (balanzas, microscopios, agitadores, pHmetros, incubadoras, baño maría, centrífugas, ultracongeladores, autoclaves, destilador), el CIB también cuenta con equipos especializados como cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC, por sus siglas en inglés); cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) acoplada con un detector de arreglo de diodos, un detector de fluorescencia y un detector de índice de refracción; sistemas de biorreactores para microorganismos y células vegetales; qPCR; espectrofotómetros (UV, luz visible, y fluorescencia; para microvolumen, cubetas o multiplacas); termocicladores; electroporador; contadores de células; almacenamiento de muestras en nitrógeno líquido; microscopios de fluorescencia; incubadoras de CO₂; un sistema documentador de geles; liofilizadores; entre otros.

La importancia del CIB para Costa Rica

Comunicación de resultados. Los conocimientos y las tecnologías generadas en el CIB se divulgan mediante diversas estrategias de comunicación, incluyendo publicaciones científicas, notas en medios de comunicación masiva y publicaciones en redes sociales. Las múltiples publicaciones científicas derivadas de los proyectos de investigación, incluidos artículos, libros, y ponencias, dan respuesta a problemas y necesidades actuales, sirven de base para

realizar otras investigaciones, y apoyan los diversos procesos de enseñanza. La producción académica del CIB también aporta a los índices de impacto institucionales y nacionales en redes internacionales, aumentando el alcance y visibilidad de la ciencia costarricense.

Impacto en la oferta académica. El desarrollo de nuevos conocimientos y tecnologías a través de los proyectos de investigación ejecutados en el CIB ha permitido actualizar los planes de estudio de los programas académicos en Ingeniería en Biotecnología que imparte el TEC, mejorando el contenido de los diferentes cursos, incluyendo prácticas de laboratorio con técnicas actuales de última tecnología. Asimismo, aproximadamente la mitad de los estudiantes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología participan como asistentes en algún proyecto de investigación del CIB, mejorando su formación académica durante su paso por la universidad, y las horas laboradas les pueden ser reconocidas como experiencia laboral en el futuro.

Oferta de bienes y servicios. Algunas de las tecnologías desarrolladas en el CIB han permitido establecer una variada oferta de servicios y productos que se ponen a disposición del sector productivo y la sociedad costarricense en general, incluyendo análisis de laboratorio, venta de productos terminados (plantas, bioinsumos agrícolas), asesorías, consultorías y capacitaciones, atendiendo necesidades principalmente del sector industrial y agropecuario del país. Además, los recursos generados por la venta de servicios y productos en el CIB permiten la reinversión en actividades de investigación e incluso la generación de empleo.

Transferencia de tecnología. Muchos de los proyectos de investigación del CIB están estrechamente comprometidos con la resolución de problemas locales, e incluyen actividades de capacitación y transferencia de prácticas y tecnologías al sector productivo. Además, cuando las tecnologías son protegidas por alguna modalidad de propiedad intelectual, como el secreto industrial, estas son puestas a disposición por medio de licenciamientos que adquieren las empresas, para mejorar así sus procesos productivos y su inserción en el mercado, incrementando su competitividad mediante innovación.

Perspectivas a futuro de la Biotecnología en Costa Rica

Dado que Costa Rica posee gran diversidad en riqueza natural y cuenta con una población con altos índices educativos y una reconocida vocación por la sostenibilidad, la biotecnología juega un papel fundamental en el desarrollo económico del país. El Plan Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación aprobado para el periodo 2022-2027 [8] consideró la *Bioeconomía* y la *Investigación en Salud Humana y Ciencias de la Vida* como temáticas transversales, donde las aplicaciones biotecnológicas tendrán un gran impacto para lograr los objetivos propuestos. La identificación de Costa Rica como un país de gran riqueza en recursos de biodiversidad sienta las bases para fortalecer la investigación, desarrollo e innovación (I+D+i), especialmente en temas como el desarrollo de nuevos fármacos, la agricultura de precisión, los biomateriales, la biotecnología y la nanotecnología, generando importantes ventajas competitivas para el país en mercados internacionales.

En el año 2020 el Ministerio de Ciencia, Innovación, Tecnología y Telecomunicaciones (MICITT), en conjunto con el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), el Ministerio de Economía, Industria y Comercio (MEIC) y el Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE) presentaron la Estrategia Nacional de Bioeconomía para el periodo 2020-2030, la cual busca posicionar al país como un centro regional en esta temática y aprovechar la ubicación geográfica de Costa Rica para la integración a cadenas de valor en América del Norte y Europa [11]. La visión de la Estrategia Nacional de Bioeconomía es “*cimentar una Costa Rica con producción sostenible de alto valor agregado en todas sus regiones y biociudades emergentes, basada en el aprovechamiento justo y equitativo de su biodiversidad, el uso circular de la biomasa y en el*

progreso biotecnológico del país como sociedad del conocimiento” [11], quedando así claro cómo la biotecnología tendrá un rol importante para lograr el cumplimiento de las políticas y estrategias de desarrollo económico planteadas para el país en los años venideros.

En el estudio denominado “Mapeo de biotecnología: caracterización de la industria”, realizado por la Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER) y presentado en el 2020 [12], se indicó que el sector biotecnológico costarricense había generado en el 2018 un total de 6.821 empleos directos entre empresas, emprendimientos y centros investigación relacionados con esta área. El análisis reveló ingresos alrededor de USD \$629 millones, equivalente al 1,05% de la economía nacional al compararlo con el PIB. Es de esperar que, si las condiciones del país se ven favorecidas por un ambiente apto para realizar negocios y actividades de I+D+i en biotecnología, los índices de empleo e inversión aumentarían y con ello el desarrollo económico del país. De ahí la importancia de generar un “ecosistema” amigable con la inversión generada, para que pueda desarrollarse de manera óptima, sin verse minimizada o reducida por otras políticas equívocas que entorpezcan la actividad.

Algunos de los retos que presenta el país para contar a futuro con un adecuado clima de negocios y para una adecuada realización de actividades de I+D+i en biotecnología, es la adquisición (importación, compra, almacenamiento y distribución) de insumos para la docencia, investigación, desarrollo e innovación en este sector, tales como reactivos químicos e insumos biológicos (enzimas, ácidos nucleicos, proteínas, cepas de bacterias, hongos, células animales, entre otros). El país tiene una brecha importante comparado a otros países científicamente competitivos debido a la limitación en tiempo y forma para obtener la materia prima para la investigación. Las consecuencias de esta situación la sufren los importadores, los comercializadores y los usuarios finales de estos bienes, docentes e investigadores, a nivel público y privado.

Por otro lado, se ha identificado la necesidad de promover el trabajo colaborativo entre la industria, la academia y el gobierno. Es esencial mejorar la coordinación y la cooperación a través de relaciones y alianzas estratégicas más eficientes y dinámicas. Existe una gran necesidad de reducir las complicaciones administrativas, los procesos complejos a nivel regulatorio, de tramitología, de registro de productos y servicios biotecnológicos nacionales e internacionales, que generan trabas e impiden la agilidad a nivel público y privado. También se señala la importancia de incrementar las alianzas público-privadas, en especial en las relaciones de las universidades con las empresas, impulsando un incremento de la innovación a partir de las investigaciones realizadas en los centros de investigación mediante mecanismos de transferencia tecnológica.

Otro elemento que haría de Costa Rica un país atractivo para la inversión extranjera en biotecnología es la generación de encadenamientos dentro del sector productivo que favorezcan la transferencia de tecnología, la implementación de mejores prácticas, y el desarrollo de actividades o servicios especializados en biotecnología de mayor valor agregado. Las inversiones realizadas en el país en infraestructura, instalaciones de laboratorios y capacidades científico-tecnológicas son una base sólida y necesaria para lograr dichos encadenamientos.

Finalmente, para poder superar estos retos mencionados, se requieren programas fuertes e integrales que permitan formar recurso humano altamente calificado y técnico, y promover actividades de investigación y desarrollo de alto impacto y con aplicaciones reales, basadas en necesidades de los diferentes grupos productivos del país.

Conclusiones y recomendaciones

Dadas las capacidades del CIB en términos de infraestructura, equipo y recurso humano, queda claro que este centro de investigación tiene un papel fundamental al sumarse a las instancias que conforman el sistema de innovación costarricense, generando ciencia y tecnología en el área biológica, para dar soluciones concretas a diferentes necesidades del sector productivo y de la sociedad costarricense.

Referencias

- [1] M. G. Fári and U. P. Kralovánszky, "The founding father of biotechnology: Károly (Karl) Ereky," *Int J Horti Sci*, vol. 12, no. 1, pp. 9–12, 2006, doi: 10.31421/ijhs/12/1/615.
- [2] M. Valdez, R. López, and L. Jiménez, "Estado actual de la biotecnología en Costa Rica," *Rev Biol Trop*, vol. 52, no. 3, pp. 733–743, 2004.
- [3] OECD, "Biotechnology," in *OECD Factbook 2013: Economic, Environmental and Social Statistics*, OECD, Paris: OECD Publishing, 2013, pp. 156–157. doi: 10.1787/factbook-2013-en.
- [4] OECD, *Frascati Manual 2015: Guidelines for Collecting and Reporting Data on Research and Experimental Development, The Measurement of Scientific, Technological and Innovation Activities*. Paris: OECD Publishing, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264239012-en> ISBN.
- [5] MICIT, *Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación 2011-2014*. 2011.
- [6] E. Arnáez-Serrano, I. Moreira-González, S. Alvarenga-Venutolo, A. Abdelnour-Esquivel, D. Flores-Mora, and M. Rojas-Chaves, "Proceso Visionario hacia el Desarrollo Biotecnológico," *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 32, pp. 6–11, 2019, doi: 10.18845/tm.v32i9.4614.
- [7] MICITT, *PLAN NACIONAL DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN, 2015-2021*. 2015.
- [8] MICITT, *Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, 2022-2027*. 2021.
- [9] "Estado de la Ciencia, la Tecnología y la Innovación," 2014. doi: 10.2307/j.ctv14rnr60.25.
- [10] "Reglamento del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica." [Online]. En: <https://www.tec.ac.cr/reglamento-centro-investigacion-biotecnologia-instituto-tecnologico-costa-rica>
- [11] MICITT, *Estrategia Nacional de Bioeconomía Costa Rica 2020-2030*. 2020.
- [12] PROCOMER, "Mapeo de biotecnología: caracterización de la industria," Costa Rica, 2020.

Marco regulatorio de Biotecnología moderna y edición génica agropecuaria de Costa Rica


Costa Rican agriculture and livestock modern Biotechnology and genome editing legal framework

Jason Pérez¹, Giovanni Garro-Monge², Luis Barboza-Fallas³,
Alejandro Hernández-Soto⁴, Andrés Gatica-Arias⁵

Pérez, J; Garro-Monge, G; Barboza-Fallas, L; Hernández-Soto, A; Gatica-Arias, A. Marco regulatorio de biotecnología moderna y edición génica agropecuaria de costa rica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 20-37.


 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7607>

1 Centro de investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 jasperez@itcr.ac.cr


 <https://orcid.org/0000-0002-8267-4978>

2 Centro de investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 ggarro@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0001-7578-1938>

3 Centro de investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 lubarboza@tec.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0003-1669-3764>

4 Centro de investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 alhernandez@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0001-9435-5117>

5 Escuela de Biología (EB), Universidad de Costa Rica (UCR). Costa Rica.

 andres.gatica@ucr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0002-3841-0238>

Palabras clave

Legislación; Biotecnología; agricultura; organismo vivo modificado; edición génica.

Resumen

La biotecnología es un motor de desarrollo global para el sector agropecuario, influyendo en la economía mundial y el avance de las metas de desarrollo sostenible. El control biológico, la seguridad alimentaria y el secuestro de carbono, son solo algunas de las áreas de mayor impacto. En este contexto, Costa Rica se destaca en la región gracias a sus desarrollos e investigaciones en biotecnología, contando con 87 empresas, 42 centros de investigación y generación de empleos, lo que equivale al 1,05% del PIB nacional. Desde 1998, el país ha establecido el marco legal que regula el uso de organismos convencionales, orgánicos, organismos vivos modificados (OVM) y editados, fomentando así el desarrollo económico basado en biotecnología. Este marco incluye mecanismos que aseguran la gestión de los OVMs y la coordinación interinstitucional para evaluar y otorgar permisos de uso. El presente artículo detalla la normativa de biotecnología moderna y edición génica. Gracias a estos esfuerzos, se han establecido manuales, instructivos y documentos, que orientan a los usuarios en el uso de OVMs. En cuanto a la edición génica, la normativa costarricense guarda similitudes con otras normas internacionales. Los organismos resultantes de esta tecnología son comparados y definidos como equivalentes a los obtenidos por métodos convencionales. La percepción positiva de la tecnología en el sector agrícola fortalece aún más este panorama para un desarrollo económico. De esta manera, Costa Rica se posiciona como un entorno amistoso para el desarrollo económico e inversiones impulsadas por biotecnología, en línea con las metas de desarrollo sostenible.

Keywords

Legislation; Biotechnology; agriculture; living modified organism; genome editing.

Abstract

Biotechnology catalyzes development in the agricultural and livestock sectors, exerting significant influence on the world economy and advancing sustainable development goals. Examples of its considerable impacts include biocontrol, food security, and carbon sequestration. Costa Rica stands out in the region for its extensive research and development efforts in biotechnology, boasting 87 companies and 42 research centers and creating jobs equivalent to 1.05% of the national GDP. Since 1998, the country has established a legal framework to regulate the use of conventional, organic, living-modified organisms (LMOs) and gene-edited organisms, promoting economic growth rooted in biotechnology. This legal framework includes mechanisms for managing LMOs and facilitating inter-institutional coordination for evaluating and granting use permits. The present article elaborates on Costa Rica's modern biotechnology and genome editing regulatory framework, encompassing manuals, guidelines, and forms to assist users in using LMOs. Regarding genome editing, Costa Rican legislation shares similarities with current legislation in several countries. Genome Editing breed organisms are compared and defined as equivalent to those obtained from conventional methods. The agricultural sector's favorable perception of this technology further enhances the country's prospects for economic development. Consequently, Costa Rica provides a friendly environment for biotechnology-driven economic growth and investment, aligning with sustainable development goals.

Introducción

La biotecnología es un motor de desarrollo a nivel mundial en el sector agropecuario debido a que ofrece soluciones sostenibles para el control de patógenos, la conservación del suelo, reducción del desperdicio, seguridad alimentaria, secuestro de carbono, preservación del agua y reducción de emisiones [1]. En particular, la biotecnología moderna se traduce en beneficios que superaron los 261.3 billones de dólares entre 1996 al 2020, con una adopción del 53% de agricultores en países desarrollados, donde tienen un retorno de inversión de 5.22 USD por dólar invertido [2].

En Costa Rica, el sector de biotecnología actual está integrado por 87 empresas y emprendimientos, 42 centros de investigación y genera 6 821 empleos, así como ingresos por USD \$629M, lo que corresponde a un 1.05% del Producto Interno Bruto del país [3]. El potencial de Costa Rica para el desarrollo de investigaciones y atracción de inversiones dispone de un fuerte componente de regulación y soporte jurídico. El país dispone de un marco jurídico que permite el uso de organismos convencionales, orgánicos, organismos vivos modificados y editados; todos ellos integran el ecosistema de biotecnología convencional y moderna [1].

En el caso de los Organismos Vivos Modificados (OVM), se utilizan en el mundo de manera comercial desde 1995 sin que exista reportes de daños [4], [5], [6], [7], [8]. Costa Rica fue uno de los primeros países en Latinoamérica en contar con normas para el uso regulado de Organismos Vivos Modificados, previo a la existencia del Protocolo de Cartagena, por lo que dispone de experiencia en el uso seguro de la tecnología desde 1991 en convivencia con otras tecnologías [9].

Costa Rica también es pionero en investigación en la región centroamericana usando edición génica mediada por CRISPR-Cas9 gracias a los esfuerzos del Espacio de Estudios Avanzados de la Universidad de Costa Rica (UCR) (UCREA; Proyecto 801-B7-294) para la edición de genoma de arroz, con participación del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) y con producción científica [10], [11], [12], [13]. El proyecto UCREA permitió adicionalmente compartir experiencias en el foro centroamericano Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos y Animales (PCCMCA) en el 2023 [14]; la colaboración con investigadores de Alemania [15]; la expansión del uso de las herramientas para levadura [13], arroz [16], [17], [18] y café [19]; así como tesis de posgrado [20], [21]. Adicionalmente, en el marco de la colaboración interinstitucional entre el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), el ITCR y la UCR, se realizaron tres versiones de cursos prácticos sobre edición de génica (2021, 2022 y 2024) con 38 personas capacitadas de nueve países.

El presente artículo compila la normativa costarricense relacionada con biotecnología moderna agropecuaria, lo que incluye el sistema normativo para la edición génica. La regulación se encuentra dispersa en distintas leyes, decretos, políticas e instructivos lo que representa un reto para la comprensión de un sistema integrado. Es por ello que el presente artículo presenta la normativa en tres etapas. La primera etapa donde se presenta el cuerpo normativo, la segunda etapa donde se aclara cómo funciona el sistema, y la tercera trata sobre edición génica.

Cuerpo normativo

El marco jurídico actual comprende la Ley Fitosanitaria N° 7664, el Reglamento N° 26921-MAG que cuenta con los procedimientos de Edición de Genomas, el Reglamento de Auditorías N° 32486-MAG, el Protocolo de Cartagena Ley N° 8537, Ley de Salud Animal 8495, la Ley de Biodiversidad N° 7788 y la Ley de Agricultura Orgánica N° 8591. En esta última Ley se define como orgánica aquella “actividad agropecuaria y su agroindustria que se sustente en sistemas

naturales para mantener y recuperar la fertilidad de los suelos, la diversidad biológica y el manejo adecuado del recurso hídrico, y que propicie los ciclos biológicos en el suelo”; la Ley N° 8591 excluye del sistema el uso de “agroquímicos sintéticos” y “transgénicos”; y la Ley N° 8591 indica en su artículo 22 las medidas para lograr esta convivencia con lo que denomina “transgénicos”. La Sala Constitucional de Costa Rica reconoce en resolución N° 2014015017 que la legislación regula de manera suficiente el tema de biotecnología moderna [22]. Asimismo, el Servicio Fitosanitario del Estado indica que el país tiene 23 eventos, 16 apilamientos, siete especies y 14 000 ha cultivadas de organismos vivos modificados en los 26 años de operación que tiene el sistema a partir de 1998. Todo lo anterior es evidencia de un sistema normativo que permite el uso regulado de la biotecnología de forma segura y en convivencia con otras tecnologías catalizado con una política del Ministerio de Agricultura y Ganadería que promueve la adopción de tecnologías (cuadro 1).

Un elemento adicional de la legislación costarricense es el sólido cuerpo normativo que favorece la innovación. Lo anterior está plasmado en la protección de datos mediante normas de información no divulgable (Ley de Información No Divulgada N° 7975 y su reglamento), la protección de derechos de obtentor en caso de nuevas variedades (Ley de Convenio Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales N° 8635 y su reglamento) y la normativa interna en instituciones públicas que promueven la innovación como las universidades e institutos de investigación. Se destaca que el país fue muy activo en la construcción e implementación de leyes en el período del 2006 al 2013 con más de una norma implementada por año (cuadro 1). También es notable que del período de 2013 al 2023 existió poca actividad en materia de legislación que reforzara la adopción de biotecnologías en beneficio del sector agropecuario (cuadro 1).

En términos del sector académico, el marco jurídico respeta la autonomía universitaria pública y aclara los mecanismos para facilitar la investigación y docencia en espacios confinados según el Artículo 117 inciso d, el Artículo 119 inciso a, y el Artículo 119bis inciso a, del Reglamento N° 26921-MAG (cuadro 1).

Cuadro 1. Marco Jurídico de Costa Rica relacionado con la Biotecnología Moderna.

| Norma | Número | Año de ratificación o implementación | Observaciones |
|--|-----------|--------------------------------------|--|
| Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología | 8537 | 2006 | Acuerdo internacional que deriva del Convenio de Diversidad Biológica. |
| Ley de Protección Fitosanitaria | 7664 | 1997 | Artículos 40-42. Declara al Servicio Fitosanitario como entidad competente en temas agrícolas y crea la Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad. |
| Reglamento a la Ley Fitosanitaria | 26921-MAG | 1998 | Artículos 111- 134. Reglamenta la Ley 7664 para Biotecnología Agrícola. Nótese los artículos de exclusión a las Universidades Públicas en virtud de la autonomía universitaria en 117.d, 119.a. y 119bis.a |
| Ley General del Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) | 8495 | 2006 | Art 6.b, 6h, Declara al SENASA como entidad competente en temas Biotecnología Animal. |
| Ley de Biodiversidad | 7788 | 1998 | Ar. 46 y 48. En particular relacionados a los permisos de acceso a los elementos bioquímicos y genéticos, bioprospección y manipulación genética. Nótese que en Dictamen PGR-C-42-2022[23] y PGR-C-183-2022 [24] se aclara la facultad de revocar de manera concreta los permisos que habilitan actividades de manipulación genética o de acceso a la biodiversidad. |

| Norma | Número | Año de ratificación o implementación | Observaciones |
|---|------------------------|--------------------------------------|---|
| Reglamento a la Ley de Biodiversidad | 34433 | 2008 | Art 76. Presenta la opción de acceso y transferencia tecnológica relacionada con biotecnología. |
| Ley de Desarrollo, Promoción y Fomento de la Actividad Agropecuaria Orgánica | 8591 | 2007 | Art 22. Medidas de convivencia con Agricultura Orgánica- Biotecnológica. |
| Aprobación del Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales | 8635 | 2008 | Protección de las obtenciones vegetales. |
| Reglamento a la Ley de Protección de las Obtenciones Vegetales | 35677-MAG | 2009 | Reglamento para la protección de obtenciones vegetales. |
| Ley de información no divulgada | 7975 | 2000 | Aplica de manera general y protege la información no divulgada referente a los secretos comerciales e industriales, incluyendo aquella que se presente en instituciones públicas con carácter confidencial. |
| Reglamento a la Ley de información no divulgada | 34927-J-COMEX-S-MAG | 2009 | Artículo 6.1 Se refiere a información presentada a una autoridad administrativa. Se protege la información no divulgable necesaria para el registro ante las autoridades, y sin que resulte en pérdida de novedad ante una eventual solicitud de patente. |
| Reglamento de la Estructura Organizativa del Servicio Fitosanitario del Estado | 36801-MAG | 2006 | Artículo 37. Crea el Departamento de Biotecnología conformado por tres unidades, incluyendo la Unidad de Organismos Genéticamente Modificados (UOGM). |
| Sistema Digital para el Manejo de Organismos Vivos Modificados (OVMs) | Edicto Solicitud 27956 | 2013 | Comunica el "Sistema Digital para el Manejo de Información de Organismos Vivos Modificados (OVM's)", el cual se encuentra en la página web www.ovm.go.cr . Gaceta 113, 2013. |
| Política Pública para el Sector Agropecuario Costarricense 2023-2032 [25] | Política | 2023 | Inciso 6.6. La interacción entre la informática y la biología (en particular herramientas de mejoramiento genético, biotecnologías) abren importantes oportunidades para las personas productoras de incorporarse activamente al uso y aplicación de esas nuevas tecnologías. Línea de acción 9.3.5. En el ámbito de la ciencia, tecnología e innovación (CTI), se hace necesario la planificación a largo plazo y la coordinación desde el nivel político para impulsar la generación de tecnologías apropiadas que respondan a la demanda del sector y avanzar en aspectos relacionados con la biotecnología y desarrollar metodologías que permitan su aprovechamiento por parte de todas las personas productoras y empresas agroindustriales. |

Fuente: [26]

Funcionamiento del sistema jurídico en Costa Rica

El sistema jurídico de Costa Rica es consecuente con los tres grandes pilares que conforman el análisis de riesgos en biotecnología. El primero es la evaluación de riesgos, el segundo es el control en campo, también llamado gestión de riesgos, y el tercero es la comunicación de riesgos, según se describe a continuación.

Evaluación de Riesgos

En la etapa de Evaluación de Riesgos, el Servicio Fitosanitario del Estado (SFE) del Ministerio de Agricultura y Ganadería aplica el Procedimiento DB-OGM-PO-06 en congruencia con el Acuerdo Fundamentado Previo del Protocolo de Cartagena (Artículo 7). La Evaluación de Riesgos está basada en criterios científico-técnico que están descritos en el Artículo 15 y en los anexos del Protocolo de Cartagena. El usuario presenta la información al SFE quien realiza un primer análisis y lo somete a la Comisión Nacional de Bioseguridad según se detalla a continuación. La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) dispone de guías sobre la Evaluación de Riesgos [27] y los métodos que históricamente Costa Rica usa para la toma de decisiones tales como la formulación de problema, el abordaje comparativo, la familiaridad, las metas de protección, los puntos finales de valoración, el análisis de efecto adverso basado en la ruta al daño, el planteamiento de hipótesis y la determinación de riesgo [27], [28], [29].

La Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad (CTNBio) tiene una función asesora según el artículo 111 del Decreto Ejecutivo N° 26921-MAG y está conformado por el Artículo 112 de la misma norma. La integración de la CTNBio es la siguiente: a) El Ministerio Agricultura y Ganadería, b) El Servicio Fitosanitario del Estado, c) El Servicio Nacional de Salud Animal, d) La Oficina Nacional de Semillas, e) El Ministerio de Ambiente y Energía, f) El Ministerio de Salud, g) La Academia Nacional de Ciencias, h) La Federación para la Conservación de la Naturaleza, i) La Cámara Nacional de Agricultura y Agroindustria.

El rol de la CTNBio es reconocido no solo por las Leyes N° 7664, N° 8495 y la N° 7788, sino también por la Sala Constitucional que indica en su resolución N° 2014015017 que *“En el caso que nos ocupa, la función de la Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad cumple un rol esencial en todo esto, porque el abordaje es multidisciplinario del sector público que vela por el interés público y de la sociedad civil que coadyuva en la observancia de ese interés. Así sus miembros son aquellos llamados a contrarrestar los sesgos que se podría considerar provienen de los patentados o de sus detractores, al analizar los datos de las autoridades nacionales del exportador, así como otras evidencias científicas que respaldan la certificación del producto transgénico, todo mediante la aplicación del procedimiento de acuerdo fundamentado previo. Este conocimiento científico reduce el grado de opiniones personales o la libertad de criterio en una determinada materia, para llegar a resultados más exactos en la actuación del Estado, regla que puede aparejarse al artículo 16.1 de la Ley General de la Administración Pública cuando establece que en ningún caso podrán dictarse actos contrarios a las reglas unívocas de la ciencia o de la técnica”*.

La normativa y procedimiento (Cuadro 2) de obtención de permisos para el uso de cultivos biotecnológicos se basa en un dictamen técnico. Este dictamen brinda los elementos de razonabilidad y proporcionalidad mediante la evaluación de riesgos, que es el instrumento de especialización jurídica que corresponde según lo validó el pronunciamiento de la Sala Constitucional en Resolución N° 2014015017. Es importante señalar que el principio de precaución es el que da origen al Protocolo de Cartagena, por lo que la Sala Constitucional indicó en Resolución N° 2014015017 que el mismo plasmado en la Ley N° 7788, no alcanza el grado de especialización jurídica que tiene el Protocolo de Cartagena sobre Organismos Vivos Modificados en la Ley N° 8537 de Costa Rica, y por tanto prevalece el Protocolo.

Cuadro 2. Procedimiento para la obtención de un Certificado de Liberación al Ambiente (CLA) para uso experimental, producción de semillas o uso comercial en Costa Rica.

| Pasos | Gobierno días hábiles | Solicitante días naturales | Observación |
|---|-----------------------|----------------------------|--|
| Revisión de Expediente | 15 | - | Primera Revisión del Expediente por parte de la Unidad punto 6.2 Procedimiento DB-OGM-PO-06. |
| Si la autoridad solicita más información, debe completar | - | 60 | Depende del solicitante. |
| Prórroga | 5 | - | En caso de que la empresa no responda a tiempo, punto 6.5 Procedimiento DB-OGM-PO-06, el SFE puede otorgar una prórroga. |
| Revisión de Edicto por parte de la UOGM | 5 | - | El SFE-UOGM dispone de 5 días para revisar el edicto. |
| Publicación en Diario de circulación nacional | - | 5 | Publicación en Periódico del primer Edicto. |
| Oposición fundada | 15 | - | Según 6.12 del Procedimiento DB-OGM-PO-06 existe la ventana de oposición fundada. |
| | | | Recursos de revocatoria, apelación 6.14. |
| Reenvío de expediente a CTNBio | - | - | Unidad envía el expediente a cada miembro junto con la oposición fundada. |
| CTNBio revisa el expediente | 30 | - | Cada miembro tiene 30 días para revisar según 6.17 del Procedimiento DB-OGM-PO-06. |
| Presidente compila los dictámenes y las consultas | 10 | - | Se compilan los dictámenes y las consultas se remiten al solicitante, 6.18 del Procedimiento DB-OGM-PO-06. |
| Solicitante contesta las consultas | - | 30 | El solicitante dispone de 30 días para contestar, 6.18 del Procedimiento DB-OGM-PO-06. |
| Presidente- CTNBio somete a análisis final del expediente | 5 | - | Reunión de CTNBio para votación, lo que se lleva a acuerdo en firme para siguiente sesión. |
| Miembros que pidieron más información | 30 | - | Tienen 30 días para analizar la información de respuesta (6.19 6.12 del DB-OGM-PO-06). |
| Presidente- CTNBio | 10 | - | Votación en firme. |
| Decisión se publica en GACETA | 7 | - | Publicación en GACETA. |
| Oposición fundada | 15 | - | Oposición fundada. |
| Entrega del Certificado | 1 | - | Entrega del Certificado. |
| TOTAL | 148 | 95 | |

Gestión de Riesgos

Las autoridades de gobierno cuentan con facultades para dar seguimiento y control. Estas facultades están tipificadas en los procedimientos; por ejemplo, el registro de cada proyecto que se ejecuta según el procedimiento DB-OGM-PO-04. El control por medio de este procedimiento permite el registro de las coordenadas de georreferenciación de cada proyecto, así como la coordinación en caso de ser necesario de la convivencia con otros cultivos. La convivencia consiste en la posibilidad de sembrar cultivos destinados a diferentes mercados en la misma vecindad, sin que se mezclen y, por lo tanto, sin que se puedan comprometer el valor

económico. Para ello existe una guía de buenas prácticas agrícolas elaborada por el SFE con el apoyo de Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) [30]. Algunas de las recomendaciones de la guía de buenas prácticas agrícolas son mostradas en la Figura 1.



Figura 1. Gestión de Riesgo mediante protocolos de limpieza de equipos y maquinaria utilizados en las labores de manipulación de los Organismos Vivos Modificados en Cañas, Costa Rica. A: Limpieza de las llantas de un tractor con agua a presión; B: Personal realizando la limpieza de una máquina cosechadora; C: Extracción minuciosa de semilla en una deslintadora de algodón; D: Encargado de la planta de equipo utilizado para desmotar algodón; nótese que en su mano tiene un registro. Fotografías de gira de campo del curso Seguridad de la Biotecnología IB-3403 (Bioseguridad) 2023 de la carrera de Ingeniería en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Prof. Giovanni Garro.

Una vez autorizado el proyecto, el control en campo es realizado por el Servicio Fitosanitario del Estado y la Oficina Nacional de Semillas como entidades de gobierno, así como un auditor externo establecido por el Reglamento de Auditorías N° 32486-MAG. El auditor funciona como un tercer validador del sistema, realiza informes mensuales, dispone de una bitácora, y es responsable de mantener una estrecha comunicación con la Unidad de Organismos Genéticamente Modificados del SFE y la empresa que desarrolla el proyecto. El SFE cuenta con un funcionario que funge como supervisor de los auditores, por ende, la empresa auditora y el auditor funcionan como una extensión adicional de monitoreo y control de gobierno [31]. De igual manera, el SFE es quien acepta o rechaza una candidatura de auditor según el procedimiento DB-OGM-PO-03. Una vez con el proyecto y el auditor, cada importación de material reproductivo es además autorizado según el formulario DB-OGM-PO-10_F-01.

Los funcionarios del SFE realizan además una labor de validación del auditor y pueden revisar a las entidades auditadas y a las empresas auditoras. En suma, la bitácora e informes son digitales según lo publicado en la Gaceta 113 del 1 de junio del 2012, en el “Sistema Digital para el Manejo de Información” (Cuadro 1). Adicionalmente, el SFE está facultado para tomar muestras en áreas fuera de los sitios autorizados mediante el formulario DB-OGM-PO-09, de tal manera que se controla el uso no autorizado de tecnologías.

La Ley N° 7664 y la Ley N° 8495 le brinda las herramientas al Estado mediante el Servicio Fitosanitario y el Servicio de Salud Animal para actuar con base en evidencia científica, técnica y de seguridad. Adicionalmente, la Ley de Agricultura Orgánica N° 8591 indica en su artículo 22 que, para otorgar los permisos de organismos genéticamente modificados y, en casos en los

que “*exista duda razonable sobre los efectos adversos que pueda tener el material transgénico en la solicitud sobre cultivos orgánicos presentes en la zona, el Estado le solicitará al productor que ha pedido permiso para sembrar transgénicos, la evidencia técnica correspondiente para minimizar el riesgo de dichos efectos*”. Lo anterior significa las medidas de gestión de riesgo que aplicará el agricultor que se encuentra utilizando la tecnología.

Comunicación de Riesgos

El SFE dispone de tres herramientas de comunicación de riesgo (cuadro 3) creadas por la normativa nacional e internacional.

Cuadro 3. Sitios web disponibles en Costa Rica para el manejo de los Organismos Vivos Modificados que permiten el intercambio de información y la comunicación de riesgo.

| Herramienta | Hipervínculo y Referencia | Información Disponible |
|--|--|---|
| Sitio web oficial del SFE | https://www.sfe.go.cr/SitePages/OVM/InicioOVM.aspx | Trámites, actas de la CTNBio, procedimientos y normativa. |
| Sistema Digital para el Manejo de Información | www.ovm.go.cr . Gaceta 113, del 1 de junio del 2012 | Información regulatoria, procesos, procedimientos, acceso a expedientes vía digital. |
| Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología | Sitio web creado por el Protocolo de Cartagena en su artículo 20 http://bch.cbd.int/about/countryprofile.shtml?country=cr El sitio web nacional está disponible en http://bch.go.cr/Views/default.aspx | Autoridades competentes, decisiones, guías, noticias, puntos focales, reportes de cumplimiento. |

De igual manera, durante las etapas de revisión de los expedientes, existen dos publicaciones en un periódico de circulación nacional y en La Gaceta según el formulario DB-OGM-PO-06_F-02. Lo anterior facilita los espacios de participación ciudadana en caso de que existan dudas técnicas sobre las tecnologías en evaluación.

Sistema detallado de procedimientos, formularios e instructivos

Los anteriores tres pilares del análisis de riesgos están claramente documentados mediante procedimientos, formularios e instructivos. El sistema regulatorio para organismos vivos modificados se rige por los procedimientos del SFE-MAG, DB-OGM-PO-01, DB-OGM-PO-02, DB-OGM-PO-03, DB-OGM-PO-04, DB-OGM-PO-05, DB-OGM-PO-06, DB-OGM-PO-07, DB-OGM-PO-08, DB-OGM-PO-09 y DB-OGM-PO-10 (Cuadro 4). De igual manera cada procedimiento dispone de formularios que están claramente indicados con el mismo número más la indicación con la letra “f”, como se puede notar en el Cuadro 5. Finalmente, también se dispone de dos instructivos para casos específicos (Cuadro 6) [26].

Cuadro 4. Procedimientos de Costa Rica de la Unidad de Organismos Genéticamente Modificados del Servicio Fitosanitario del Estado relacionados con la regulación de Organismos Vivos Modificados de uso agrícola.

| Código | Nombre | Propósito |
|--------------|---|--|
| DB-OGM-M-01 | Manual interno de organización y operación de la Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad. | Establecer los lineamientos de organización interna y el alcance de las operaciones de la CTNBio. |
| DB-OGM-PO-01 | Inscripción y actualización de personas físicas y jurídicas que realizan actividades con OVM de uso agrícola. | Establecer los pasos requeridos para inscribir o actualizar personas físicas y jurídicas que desean realizar actividades relacion con OVMs de uso agrícola. |
| DB-OGM-PO-02 | Autorización y actualización de empresas auditoras en bioseguridad agrícola. | Establecer los pasos requeridos para autorizar o actualizar personas jurídicas que cumplan con los requisitos establecidos en la normativa nacional vigente para fungir como empresa auditora en bioseguridad agrícola. |
| DB-OGM-PO-03 | Presentación de candidatos para fungir como auditores en bioseguridad agrícola de una empresa auditora. | Establecer los pasos requeridos para acreditar auditores en bioseguridad agrícola presentados como candidatos por las empresas auditoras en bioseguridad. |
| DB-OGM-PO-04 | Registro y seguimiento de proyectos con organismos vivos modificados de uso agrícola. | Este procedimiento orienta y guía a las personas físicas o jurídicas que deseen importar, investigar, exportar, experimentar, movilizar, liberar al ambiente, multiplicar y comercializar OVM de uso en la agricultura, producidos dentro o fuera del país, para cumplir con los requisitos necesarios para la correcta aprobación, planificación y gestión de los proyectos con dichos organismos. |
| DB-OGM-PO-05 | Solicitud de autorización de apilados de organismos genéticamente modificados en el que sus eventos individuales cuentan con Certificado de Liberación al Ambiente (CLA). | Establecer los pasos requeridos para autorizar apilados de organismos genéticamente modificados en el que sus eventos individuales cuentan con su respectivo Certificado de Liberación al Ambiente (CLA). |
| DB-OGM-PO-06 | Solicitud del certificado de liberación al ambiente para la importación, liberación y/o movilización de organismos genéticamente modificados de uso agrícola. | Establecer los pasos para emitir, cuando proceda, el Certificado de Liberación al Ambiente (CLA) de Organismos Vivos Modificados, con base en la revisión y análisis de aspectos e información técnica-científica presentes en el formato Bio-02: DB-OGM-PO-06_F-01 "Solicitud de Certificado de Liberación al Ambiente (CLA) para la importación, liberación y/o movilización de organismos genéticamente modificados de uso agrícola". |
| DB-OGM-PO-07 | Procedimiento para el respaldo de Información Institucional en formato electrónico de la UOGM. | Aplica a todo el personal de la Unidad de Organismos Genéticamente Modificados (UOGM) del Servicio Fitosanitario del Estado que tramite información electrónica. |
| DB-OGM-PO-08 | Manejo del Centro de Intercambio de Información sobre la Seguridad de la Biotecnología (BCH). | Establecer los pasos requeridos para mantener actualizado el Centro de Intercambio de Información sobre la Seguridad de la Biotecnología (BCH). |
| DB-OGM-PO-09 | Procedimiento inspecciones y toma de muestras de OGM. | Eventual cultivo de Organismos Vivos Modificados (OVM) fuera de los proyectos autorizados oficialmente y en áreas no reguladas para tal fin, sea por motivo de sospecha, denuncia o seguimiento de incidentes previos, así como para la toma y custodia de muestras de tejidos bajo sospecha de ser OVM para el análisis de presencia de indicadores de modificación genética. |

Fuente: [26]

Cuadro 5. Formularios de Costa Rica de la Unidad de Organismos Genéticamente Modificados del Servicio Fitosanitario del Estado relacionados con la regulación de Organismos Vivos Modificados de uso agrícola.

| Código | Nombre |
|-------------------|--|
| DB-OGM-PO-01_F-01 | Registro de personas físicas o jurídicas que desean utilizar organismos producto de la biotecnología moderna. |
| DB-OGM-PO-02_F-01 | Autorización y actualización de empresas auditoras en bioseguridad agrícola. |
| DB-OGM-PO-03_F-01 | Presentación de candidatos para fungir como auditores en bioseguridad agrícola. |
| DB-OGM-PO-04_F-01 | Registro de proyectos con organismos vivos modificados de uso agrícola. |
| DB-OGM-PO-04_F-02 | Declaración de no conflicto de interés. |
| DB-OGM-PO-04_F-03 | Plan y programa de inspección para la valoración técnica del sitio propuesto para la ejecución de proyectos con OVM de uso agrícola. |
| DB-OGM-PO-04_F-04 | Plantilla de Resolución Técnica – Administrativa. |
| DB-OGM-PO-04_F-05 | Plan y programa de inspección de proyectos con OVM de uso agrícola. |
| DB-OGM-PO-04_F-06 | Formato BIO-08. Registro de proyectos de investigación o desarrollo que apliquen la biotecnología moderna para manipular el genoma de un organismo de uso en la agricultura. |
| DB-OGM-PO-05_F-01 | Formato BIO-06. Solicitud de autorización de apilados de organismos vivos modificados de uso agrícola en el que sus eventos individuales cuentan con el Certificado de Liberación al Ambiente, uso confinado o comercialización. |
| DB-OGM-PO-06_F-01 | Formato Bio-02. Solicitud del Certificado de Liberación al Ambiente, uso confinado o comercialización. |
| DB-OGM-PO-06_F-02 | Formato Bio-05. Edicto a publicar en un diario de circulación nacional o en el diario oficial La Gaceta. |
| DB-OGM-PO-06_F-03 | Formato BIO-03. Plantilla del Certificado de liberación al ambiente, uso confinado o comercialización. |
| DB-OGM-PO-06_F-04 | Formato BIO-04. Boleta de identificación de OVM para movilización, almacenamiento o comercialización. |
| DB-OGM-PO-06_F-05 | Formato BIO-07. Solicitud del uso de organismos producto de las nuevas técnicas de mejoramiento genético, incluida la edición del genoma. |
| DB-OGM-PO-08_F-01 | Información solicitada para la publicación en el CIISB-BCH Costa Rica. |
| DB-OGM-PO-09_F-01 | Actividades de divulgación de políticas y normas sobre la siembra de OVMs fuera de proyectos autorizados. |
| DB-OGM-PO-09_F-02 | Denuncia de posibles siembras de OVMs fuera de los proyectos autorizados y en áreas no reguladas. |
| DB-OGM-PO-09_F-03 | Acta de Inspección por investigación de posibles siembras de OVMs fuera de los proyectos autorizados y en áreas no reguladas. |
| DB-OGM-PO-09_F-04 | Identificación de muestras de material vegetativo tomadas para análisis de presencia de indicadores de modificación genética. |
| DB-OGM-PO-09_F-05 | Cadena de Custodia de Muestras de material vegetativo tomadas para análisis de presencia de indicadores de modificación genética. |
| DB-OGM-PO-10_F-01 | Solicitud de importación de organismos vivos modificados de uso agrícola. |

Fuente: [26]

Cuadro 6. Instructivos de Costa Rica de la Unidad de Organismos Genéticamente Modificados del Servicio Fitosanitario del Estado relacionados con la regulación de Organismos Vivos Modificados de uso agrícola.

| Código | Nombre |
|-------------------|--|
| DB-OGM-PO-04_I-01 | Instructivo para la valoración técnica del sitio propuesto para la ejecución de proyectos con OVM de uso agrícola. |
| DB-OGM-PO-09_I-01 | Instructivo para la toma de muestras de presunto material OVM. |

Fuente: [26]

Otros elementos jurídicos

Los pronunciamientos de la Procuraduría General de la República (PGR) son útiles en la interpretación de la norma costarricense. Existen dos tipos de pronunciamientos que son ampliamente informativos y aclaran la aplicación de la norma en este tema específico.

El primero está relacionado con el criterio que solicita la Asamblea Legislativa a la PGR a los proyectos de Ley tales como el expediente del Protocolo de Cartagena N° 14800 criterio OJ-054-2005 y los expedientes N° 18941 criterio OJ-055-2016, expediente N° 19477 criterio OJ-085-2017, expediente N° 21376 criterio OJ-092-2021 y expediente N° 22789 criterio OJ-164-2022 (Cuadro 7). En todos ellos, la Procuraduría General de la República, respetuosa de la Asamblea Legislativa, le aclara la importancia del Protocolo de Cartagena y recuerda que la Sala Constitucional llama a un análisis de razonabilidad y proporcionalidad en la resolución N° 2014015017. Nótese que la Sala Constitucional llama al uso de las herramientas descritas en el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología para el correspondiente análisis de razonabilidad y proporcionalidad. Lo anterior debido a que en el Anexo III inciso (2) del Protocolo de Cartagena se indica que las autoridades competentes utilizarán la evaluación de riesgos para adoptar decisiones fundamentadas en relación con los Organismos Vivos Modificados, según los principios y metodología que el mismo Anexo III tipifica en los incisos 2 al 9.

El segundo pronunciamiento está relacionado con las competencias de la Oficina Técnica de la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad descritas en la Ley N° 7788, en comparación con las competencias del Servicio Fitosanitario del Estado dadas en la Ley N° 7664. La PGR aclara que le corresponden competencias distintas: la primera corresponde al acceso a elementos de la biodiversidad para crear un nuevo OVM, y la segunda al acceso de OVMs que ya existen que son sujetos de control y seguimiento (Cuadro 7).

Cuadro 7. Dictámenes de la Procuraduría General de la República sobre proyectos de prohibición de OVMs que fueron archivados.

| Dictamen | Detalle |
|--|---|
| OJ-054-2005 al proyecto "Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología". Expediente N° 14.800 | <i>"El protocolo de Cartagena, según lo visto, establece disposiciones tendientes a proteger el ambiente, en particular la biodiversidad, en relación con el peligro que los OVM o OGM pueden significar para este y la salud pública. Ambos son bienes jurídicos tutelados en la constitución (artículo 50 y 21). En consecuencia, el protocolo, una vez aprobado por la Asamblea Legislativa y ratificado por el Estado costarricense, se convertirá en un instrumento jurídico de desarrollo de los principios constitucionales que obligan al estado a proteger y tutelar dichos bienes."</i> |
| OJ-055-2016 al Proyecto N° 18.941 Ley de moratoria nacional a la liberación y cultivo de organismos vivos modificados (transgénicos) | <i>"En razón de lo anterior, la aprobación o no del proyecto se enmarca dentro del ámbito de la política legislativa, donde ha de observarse el Derecho de la Constitución, la razonabilidad y proporcionalidad de la medida."</i> |
| OJ-085-2017 al Proyecto N° 19.477 Ley para la restricción de la liberación al ambiente de organismos vivos modificados | <i>"La aplicación del principio precautorio, mediante el dictado de moratorias de actividades como la que se pretende, deben pasar primero por un análisis de proporcionalidad y razonabilidad, tal y como lo dispuso la Sala Constitucional en el voto recién transcrito"</i> |
| OJ-092-2021 al Proyecto N° 21.376 Ley de moratoria a la liberación al ambiente de organismos vivos modificados | <i>"Tal y como lo dispuso la Sala Constitucional en el voto recién transcrito, la aplicación del principio precautorio, mediante el dictado de moratorias de actividades como la que se pretende, deben pasar primero por un análisis de proporcionalidad y razonabilidad"</i> |

| Dictamen | Detalle |
|--|---|
| OJ-164-2022 al Proyecto N° 22.789 Ley reguladora de los organismos genéticamente modificados de polinización abierta | <i>“La decisión del legislador de dictar una moratoria como la propuesta requiere valorar los intereses y derechos fundamentales en juego y determinar la razonabilidad y proporcionalidad de la medida.”</i> |
| PGR-C-42-2022 [23] | Aclara competencias distintas del SFE regulatorias y de CONAGEBIO que brinda permisos de acceso a la biodiversidad. Sobre los organismos que se producen con base en ese acceso tendría competencia CONAGEBIO. <i>“En materia de uso y gestión de la biodiversidad, las competencias de CONAGEBIO están dirigidas al ámbito de la conservación, el uso ecológicamente sostenible y la restauración de la biodiversidad y el acceso a los elementos bioquímicos y genéticos, bioprocección y manipulación genética. La Ley de Protección Fitosanitaria y la Ley de Biodiversidad marcan un reparto de competencias diferenciado entre el SFE y CONAGEBIO y su Oficina Técnica, pues las autorizaciones que otorga el SFE están referidas a distintas actividades relacionadas con el uso de organismos genéticamente modificados ya creados u organismos ya producidos con fines agrícolas, mientras que, los permisos de acceso que corresponde otorgar a la Oficina Técnica de CONAGEBIO son los que se requieren para llevar a cabo actividades de acceso a los elementos bioquímicos y genéticos, bioprospección y manipulación genética”.</i> |
| PGR-C-183-2022 [24] | <i>“Se aclara y adiciona, de oficio, el dictamen PGR-C42-2022 de 25 de febrero de 2022 en el sentido de que aun en los casos en que medie un peligro inminente o situaciones imprevisibles, la Oficina Técnica de la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad, no puede revocar las autorizaciones que haya otorgado el Servicio Fitosanitario para la importación, investigación, exportación, experimentación, movilización y liberación al ambiente de organismos modificados genéticamente para uso agrícola.”</i> |

Edición génica

La norma costarricense es similar a otras normas internacionales que regulan el tema de edición génica [10], [32], [33]. Los organismos que resultan de la edición génica representan una oportunidad dado que proveen soluciones equivalentes a los de mejora convencional pero en menor tiempo de desarrollo, con una alta precisión [34], [35] y, en el país, la percepción de la tecnología es favorable para el sector agrícola [11]. La norma plantea que los productos de la edición génica sean analizados en comparación con la mejora convencional para definir si son equivalentes a un organismo convencional o si disponen de información genética adicional lo que los haría sujetos de las regulaciones de Organismos Vivos Modificados. La discriminación se basa en la presencia de una *“nueva combinación de material genético”* (Figura 2). El término *“nueva combinación de material genético”* tiene su origen en las normas internacionales como el Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología, que define como organismo vivo modificado, cualquier organismo vivo que posea una *“nueva combinación de material genético”* que se haya obtenido mediante biotecnología moderna. El acuerdo centroamericano RT 65.06.01:18 GT-HN-SV define lo que se entiende como *“nueva combinación de material genético”* en su artículo 4.6 y que en esencia corresponde a una secuencia genética adicional que no podría ser obtenida por mejoramiento convencional o no se encuentra en la naturaleza (Figura 3).

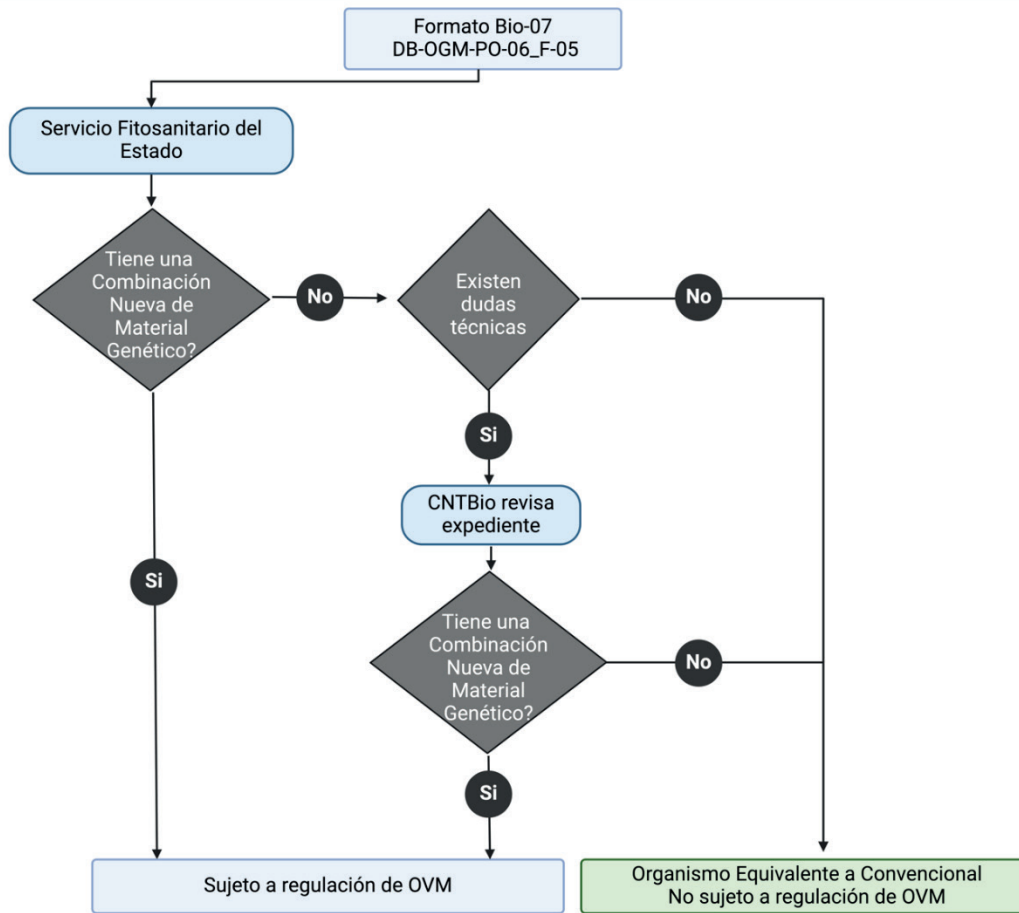


Figura 2. Proceso de decisiones del Servicio Fitosanitario del Estado para discriminar si un organismo producido por biotecnología moderna está sujeto a la regulación de OVM o es equivalente a un convencional según la norma costarricense. Fuente: Reglamento N° 26921-MAG. Imagen creada con BioRender.com

La norma costarricense dispone de cuatro elementos clave para poder establecer la discriminación y que corresponden a elementos jurídicos y técnicos según se presentan a continuación (ver Figura 3 para detalles). El primer criterio aclara que los “organismos producto de la biotecnología moderna” son muy amplios y corresponden a los indicados en otras normas como la Ley de Biodiversidad y la Ley Fitosanitaria. A partir del uso de la biotecnología moderna se puede o no obtener un Organismo Vivo Modificado. El Reglamento N° 26921-MAG lo define como “*Organismo vivo de uso agrícola obtenido a partir de las técnicas de biotecnología moderna, incluida la edición del genoma, el cual podría resultar en un organismo vivo modificado o, por el contrario, ser equivalente, de acuerdo con sus características fenotípicas y genéticas, de un organismo producido a partir de técnicas convencionales de mejoramiento. Comprende lo definido como organismo genéticamente modificado según la Ley de Biodiversidad, Ley N° 7788, del 30 de abril de 1998, en su artículo 7 inciso 24 y la Ley de Protección Fitosanitaria, Ley N° 7664, del 08 de abril de 1997, en su artículo 5 inciso q.*”

El segundo criterio define el concepto de Organismo Vivo Modificado a la luz de la normativa internacional, esto es el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología Ley N° 8537. Esto es, Organismo Vivo Modificado es definido como “*Cualquier organismo vivo que posea una nueva combinación de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna.* Esta definición es idéntica a la del Protocolo de Cartagena y se

aclara que comprende lo denominado como: “organismo alterado o manipulado”, “organismo transgénico”, “material transgénico”, “vegetales transgénicos” o “producto manipulado o transgénico”.

El tercer elemento define “nueva combinación de material genético” como “Inserción estable en el genoma, de uno o más genes o secuencias de ADN, que codifique ADN de doble hebra, ARN, proteínas, péptidos de señalización o secuencias regulatorias, que no podría ser obtenida por mejoramiento convencional”. Esta aclaración es consecuente con normativa internacional de referencia como lo es el Acuerdo Centroamericano de Biotecnología RT 65.06.01:18 HN-GT-SV y es consecuente a los indicado por normas de ADN de otros países en donde también se le denomina “ADN foráneo”.

El cuarto elemento es una aclaración sobre la equivalencia con mejoramiento convencional. Las técnicas modernas de mejoramiento genético permiten que se realicen ajustes en el material genético que son comparables a las que se obtienen con el mejoramiento convencional, de ahí que en las definiciones de la norma N° 26921-MAG se indica esa equivalencia.

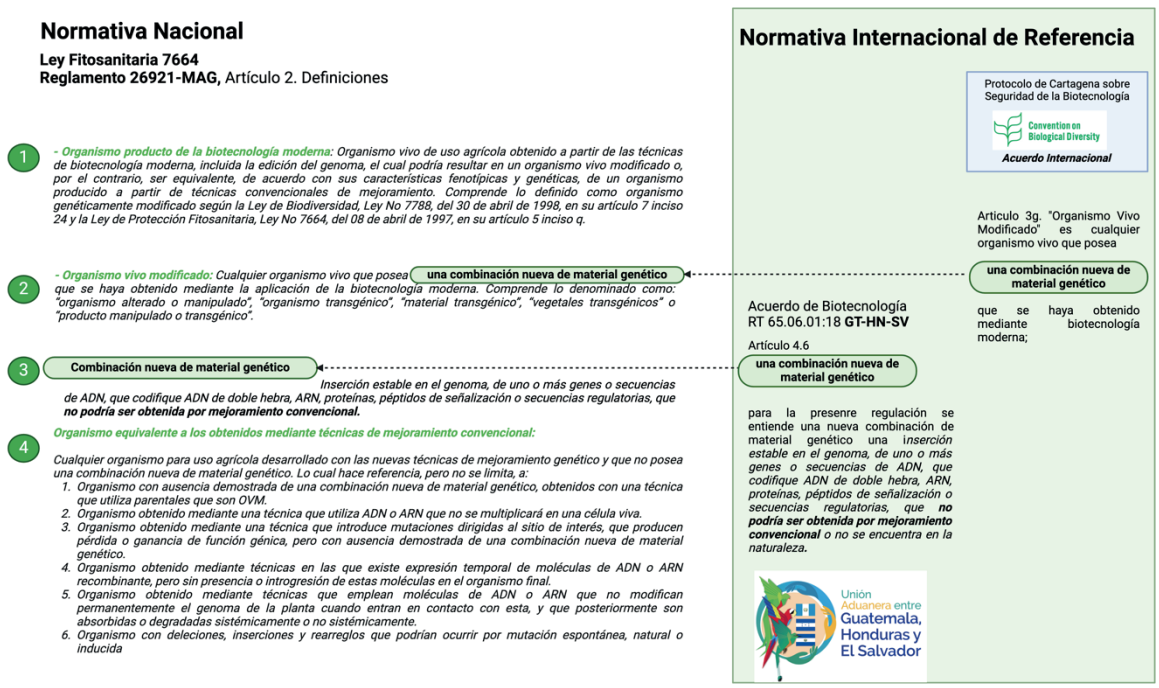


Figura 3. Comparación de la normativa nacional con la internacional de referencia que aclara las definiciones de “organismo producto de la biotecnología moderna”, “Organismo Vivo Modificado”, “combinación nueva de material genético” y “organismo equivalente a los obtenidos por técnicas de mejoramiento convencional”. Imagen creada con BioRender.com

Conclusiones y recomendaciones

Costa Rica se destaca en la región por su notable inversión en educación y en investigación científica y tecnológica, especialmente en el ámbito de la biotecnología agrícola. Esta inversión ha dado lugar a una estructura especializada y a un equipo humano preparado para la transferencia de conocimientos y la producción continua de nuevas variedades vegetales adaptadas a los desafíos del cambio climático. Estas variedades son requeridas para reducir la dependencia de agroquímicos y aumentar la productividad.

El apoyo político y legal ha sido fundamental para asegurar que los resultados de estas investigaciones lleguen a los usuarios finales. Gracias al robusto marco normativo y a los proyectos de acción social implementados, se han despejado dudas y mitos en torno a la biotecnología moderna, lo que ha contribuido a una mayor aceptación por parte de la sociedad de los productos biotecnológicos.

Costa Rica ha establecido diversos mecanismos, manuales, instructivos, formularios y guías para regular y orientar el uso seguro de los OVMs, lo que también ha generado confianza en la población. La experiencia acumulada, la investigación continua y la rica biodiversidad convierten a Costa Rica en un país con amplio potencial para la producción económica mediante el uso de la biotecnología vegetal.

Aunque los avances mencionados han permitido a nuestros productores agrícolas ser competitivos, aún queda mucho por hacer y existen numerosas oportunidades de mejora que se irán identificando a medida que se adopten más ampliamente estas biotecnologías.

Agradecimientos

Este artículo es posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Rectores (CONARE), proyecto “New plant breeding technologies (NPBTs) strengthening research capacities between Costa Rica and Germany using rice as a model” (111-C3-655); al proyecto “Desarrollo de líneas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) producidas por mutagénesis radioinducida para una agricultura más resiliente y productiva” (CF 1510186) adscrito a la Vicerrectoría de Investigación (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica; y al proyecto «Implementación de un protocolo para la identificación de Organismos Genéticamente Modificados en Piña Rosé, algodón y soya de interés comercial de Costa Rica» (CF 1510179) de la VIE, ITCR.

Referencias

- [1] M. A. Steinwand, P. C. Ronald, “Crop biotechnology and the future of food,” *Nat Food*, vol. 1, no. 5, pp. 273–283, May 2020, doi: 10.1038/s43016-020-0072-3.
- [2] G. Brookes, “Farm income and production impacts from the use of genetically modified (GM) crop technology 1996–2020,” *GM Crops Food*, vol. 13, no. 1, pp. 171–195, Dec. 2022, doi: 10.1080/21645698.2022.2105626.
- [3] E. Mora-Álvarez, “Mapeo de Biotecnología: Caracterización de la industria,” 2019. [En línea]. Disponible en: <http://sistemas.procomer.go.cr/DocsSEM/603DD5ED-88F2-4A4E-A819-74FA70D19CA6.pdf>
- [4] R. E. Goodman, “Twenty-eight years of GM Food and feed without harm: why not accept them?,” *GM Crops Food*, vol. 15, no. 1, pp. 40–50, Dec. 2024, doi: 10.1080/21645698.2024.2305944.
- [5] G. Garro-Monge, “Inocuidad de cultivos y alimentos biotecnológicos, ‘20 años de comercialización,’” *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 30, no. 2, p. 75, 2017, doi: 10.18845/tm.v30i2.3198.
- [6] A. Vega Rodríguez, C. Rodríguez-Oramas, E. Sanjuán Velázquez, A. Hardisson de la Torre, C. Rubio Armendáriz, C. Carrascosa Iruzubieta, “Myths and Realities about Genetically Modified Food: A Risk-Benefit Analysis,” *Applied Sciences*, vol. 12, no. 6, p. 2861, Mar. 2022, doi: 10.3390/app12062861.
- [7] J. E. Ibarra, Ma. C. Del Rincón Castro, “Myths and realities on insect-resistant transgenic plants,” *Acta Univ*, vol. 25, no. NE-3, pp. 13–23, 2015, doi: 10.15174/au.2015.905.
- [8] National Academies of Sciences Engineering and Medicine, *Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects*. Washington, D.C.: National Academies Press, 2016. doi: 10.17226/23395.
- [9] G. Macaya, “Towards the Implementation of Biosafety Regulations in Costa Rica”, in *Biosafety for Sustainable Agriculture: Sharing Biotechnology Regulatory Experiences of the Western Hemisphere* (Krattiger, A.F. and A. Rosemarin, eds.). ISAAA: Ithaca & SEI: Stockholm. 1994.
- [10] A. Gatica-Arias, “The regulatory current status of plant breeding technologies in some Latin American and the Caribbean countries,” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 141, no. 2, pp. 229–242, 2020, doi: 10.1007/s11240-020-01799-1.



- [11] D. M. Macall, J. Madrigal-Pana, S. J. Smyth, and A. Gatica Arias, "Costa Rican consumer perceptions of gene editing," *Heliyon*, vol. 9, no. 8, p. e19173, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e19173.
- [12] A. Gatica-Arias, M. Valdez-Melara, G. Arrieta-Espinoza, F. J. Albertazzi-Castro, J. Madrigal-Pana, "Consumer attitudes toward food crops developed by CRISPR/Cas9 in Costa Rica," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 139, no. 2, pp. 417–427, 2019, doi: 10.1007/s11240-019-01647-x.
- [13] A. Hernández-Soto, J. P. Delgado-Navarro, M. Benavides-Acevedo, S. A. Paniagua, A. Gatica-Arias, "NTH2 1271_1272delTA Gene Disruption Results in Salt Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*," *Fermentation*, Vol. 8, Page 166, vol. 8, no. 4, p. 166, Apr. 2022, doi: 10.3390/FERMENTATION8040166.
- [14] A. Gatica-Arias, A. Hernández-Soto, "Mini Curso de Edición génica," in *LXV Reunión Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos y Animales (PCCMA)*, Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación (MAGA), Ed., Guatemala, 2023.
- [15] A. Hernández-Soto, F. Echeverría-Beirute, A. Abdelnour-Esquivel, M. Valdez-Melara, J. Boch, A. Gatica-Arias, "Rice breeding in the new era: Comparison of useful agronomic traits," *Curr Plant Biol*, vol. 27, no. June, p. 100211, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.cpb.2021.100211.
- [16] F. M. Romero, A. Gatica-Arias, "CRISPR/Cas9: Development and Application in Rice Breeding," *Rice Sci*, vol. 26, no. 5, pp. 265–281, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.rsci.2019.08.001.
- [17] R. Rojas-Vásquez, A. Gatica-Arias, "Use of genome editing technologies for genetic improvement of crops of tropical origin," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 140, no. 1, pp. 215–244, 2020, doi: 10.1007/s11240-019-01707-2.
- [18] C. Aguilar-Bartels, P. Quirós-Segura, A. García-Piñeres, A. Gatica-Arias, G. Arrieta-Espinoza, "Key aspects for the genetic transformation of rice (*Oryza sativa* L.) subspecies indica by *Agrobacterium tumefaciens*," *Agronomía Mesoamericana*, vol. 32, no. 3, pp. 764–778, 2021, doi: 10.15517/AM.V32I3.44978.
- [19] J. Villalta-Villalobos, A. Gatica-Arias, "A look back in time: Genetic improvement of coffee through the application of biotechnology," *Agronomía Mesoamericana*, vol. 30, no. 2, pp. 577–599, 2019, doi: 10.15517/am.v30i2.34173.
- [20] R. Rojas Vásquez, "Edición del gen de la enzima trehalasa mediante CRISPR-Cas9 en arroz subsp. indica var. CR-5272," Universidad de Costa Rica, 2022. [En línea]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10669/87766>
- [21] A. Sebiani-Calvo, "Desarrollo de un sistema de edición genética CRISPR/CAS9 in planta en embriones maduros de arroz (*Oryza sativa* L.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*," Universidad de Costa Rica, 2023. [En línea]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10669/90585>
- [22] Corte Suprema de Justicia, "Res. N° 2014015017," *BOLETIN JUDICIAL*, vol. 55, pp. 1–25, 2015.
- [23] Procuraduría General de la República (PGR), "PGR-C-42-2022," p. 19, 2022, [En línea]. Disponible en: <https://www.pgr.go.cr/servicios/pronunciamentos-pgr/pronunciamentos-2022/dictámenes-2022/>
- [24] Procuraduría General de la República (PGR), *PGR-C-183-2022*. 2022, p. 15p. [En línea]. Disponible en: <https://www.pgr.go.cr/servicios/pronunciamentos-pgr/pronunciamentos-2022/dictámenes-2022/>
- [25] Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), "Política Pública para el Sector Agropecuario Costarricense 2023-2032," 2023. [En línea]. Disponible en: www.mag.go.cr
- [26] Servicio Fitosanitario del Estado (SFE), "Procedimientos de la Unidad de Organismos vivos modificados del SFE (UOGM)." [En línea]. Disponible en: <https://www.sfe.go.cr/SitePages/OVM/Procedimientos.aspx>
- [27] OECD Working Group, *Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 10*, vol. 10. in Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, vol. 10. OECD, 2023. doi: 10.1787/62ed0e04-en.
- [28] Y. Devos *et al.*, "Using problem formulation for fit-for-purpose pre-market environmental risk assessments of regulated stressors," *EFSA Journal*, vol. 17, no. S1, pp. 1–31, 2019, doi: 10.2903/j.efsa.2019.e170708.
- [29] A. Raybould, "Hypothesis-Led Ecological Risk Assessment of GM Crops to Support Decision-Making About Product Use," A. Chaurasia, D. L. Hawksworth, and M. Pessoa de Miranda, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2020, pp. 305–342. doi: 10.1007/978-3-030-53183-6_14.
- [30] Servicio Fitosanitario del Estado (SFE), *Convivencia entre cultivos que utilizan diferentes tecnologías de producción agrícola*. San José, Costa Rica, 2013.
- [31] Servicio Fitosanitario del Estado (SFE), *Orientación y Guía para el cumplimiento del Reglamento de Auditorías en Bioseguridad Agrícola N° 32486-MAG y normativa relacionada*. San José, Costa Rica: Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), 2014. [En línea]. Disponible en: <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F30-10650.pdf>

- [32] A. Hernández-Soto, F. Echeverría-Beirute, A. Abdelnour-Esquivel, M. Valdez-Melara, J. Boch, A. Gatica-Arias, "Rice breeding in the new era: Comparison of useful agronomic traits," *Current Plant Biology*, vol. 27. Elsevier B.V., Sep. 01, 2021. doi: 10.1016/j.cpb.2021.100211.
- [33] D. Fernández Ríos, N. Benítez Candía, M. C. Soerensen, M. F. Goberna, A. A. Arrúa, "Regulatory landscape for new breeding techniques (NBTs): insights from Paraguay," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 12, no. January, pp. 1–6, Jan. 2024, doi: 10.3389/fbioe.2024.1332851.
- [34] T. Tsanova, L. Stefanova, L. Topalova, A. Atanasov, I. Pantchev, "DNA-free gene editing in plants: a brief overview," *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 35, no. 1, pp. 131–138, 2021, doi: 10.1080/13102818.2020.1858159.
- [35] S. J. Smyth, "Contributions of Genome Editing Technologies Towards Improved Nutrition, Environmental Sustainability and Poverty Reduction," *Front Genome Ed*, vol. 4, no. March, pp. 1–9, 2022, doi: 10.3389/fgeed.2022.863193.

Microalgae as expression systems for recombinant protein production


Microalgas como sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes

Luis Muñoz-Solórzano¹, Kate Willis-Ureña², Sebastián Valverde-Rojas³, Montserrat Jarquín-Cordero⁴, Luis Barboza-Fallas⁵

Muñoz-Solórzano, L; Willis-Ureña, K; Valverde-Rojas, S; Jarquín-Cordero, M; Barboza-Fallas, L. Microalgae as expression systems for recombinant protein production. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 38-53.


 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7608>


1 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 luismunoz@estudiantec.cr


 <https://orcid.org/0000-0002-6960-377X>


2 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 kate.willisu@estudiantec.cr

 <https://orcid.org/0000-0002-6971-2204>

3 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 2020sebas@estudiantec.cr


 <https://orcid.org/0009-0002-1254-8244>


4 Centro de investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 mocordero@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0001-7926-7290>

5 Centro de investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 lubarboza@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0003-1669-3764>

Keywords

Genetic transformation; genetic engineering; recombinant protein; microalgae.

Abstract

In the field of biotechnology, recombinant proteins have revolutionized many industries, including pharmaceuticals, agriculture, and bioenergy. By producing high-value proteins in heterologous hosts, cell factories may offer a more efficient, cost-effective, scalable, and environmentally friendly solution to traditional protein production and extraction methods, which can be highly laborious and resource intensive. Microalgae have emerged as attractive hosts due to their Generally Recognized as Safe (GRAS) status, versatile metabolism, genetic diversity between species, ease of cultivation and scale-up, and general cost-effectiveness. For genetic engineering, their capability for complex protein synthesis and post-translational modifications and ease of transformation in comparison with chassis outside of their category make microalgae an advantageous solution on many fronts. Microalgae can be transformed to enable efficient protein expression, most commonly in the nucleus and the chloroplast, each with their specific advantages and limitations. The present literature review compiles some of the techniques, features, and latest advances related to recombinant protein production in microalgae, exploring different genetic transformation techniques and their limitations. Recombinant protein production is only one of the many processes that can become more sustainable and efficient by using microalgae as a platform.

Palabras clave

Transformación genética; ingeniería genética; proteína recombinante; microalgas.

Resumen

En el campo de la biotecnología, las proteínas recombinantes han revolucionado muchas industrias, incluyendo la farmacéutica, la agricultura y la bioenergía. Al producir proteínas de alto valor en huéspedes heterólogos, las fábricas celulares pueden ofrecer una solución más eficiente, rentable, escalable y amigable con el ambiente, en comparación con la producción de proteínas y métodos de extracción tradicionales, que pueden exigir muchos recursos y mano de obra. Las microalgas han emergido como huéspedes atractivos debido a su estatus como organismos Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS), su metabolismo versátil, diversidad genética entre especies, facilidad de cultivo y escalabilidad y su rentabilidad general. Para la ingeniería genética, su capacidad para síntesis compleja de proteínas y modificaciones post-traduccionales y su relativa facilidad de transformación hacen a las microalgas una solución ventajosa en muchos aspectos. Las microalgas pueden ser transformadas para permitir la expresión eficiente de proteína, más comúnmente en el núcleo y el cloroplasto, cada uno con sus ventajas y limitaciones. La presente revisión de literatura compila algunas de las técnicas, características y últimos avances relacionados con la producción de proteínas recombinantes en microalgas, explorando diferentes técnicas de transformación genética y sus limitaciones. La producción recombinante de proteínas es solo uno de los muchos procesos que se pueden convertir más sostenibles y eficientes al usar microalgas como una plataforma.

Introduction

Prior to the advent of recombinant proteins, proteins of interest were extracted from their natural sources through expensive processes and poor yields. With the arrival and development of this technology, proteins can now be expressed in a variety of hosts, making the yields much higher and the costs much lower, thus allowing the production of these proteins on an industrial scale [1], [2]. The production of these proteins has a wide spectrum of uses in the pharmaceutical industry; recombinant approaches have been used to produce monoclonal antibodies, antigens, therapeutic proteins, and enzymes [3]. They are also implemented in the nutritional, environmental, industrial, bioenergetics, and biomaterials sectors [4].

Amongst the most popular hosts for recombinant protein expression are bacteria, yeasts, insect cell lines, plants, mammalian cell lines, and transgenic animals, each with their strengths and limitations [5]. Some of these hosts are limited by lacking the ability to generate complex molecules, their high costs, or their difficult scalability; as a result, in recent years, microalgae have emerged as an alternative with valuable capabilities to produce complex proteins due to their great genetic diversity [6], genetic modification possibilities, and ease of management, including biomedical applications in tissues [7].

Microalgae are unicellular organisms characterized by their versatile metabolism, representing efficient and economic platforms to gather organic compounds like proteins, lipids, pigments, sterols, and carbohydrates for several commercial applications such as nutraceuticals, pharmaceuticals, and biofuels [5]. They have a short doubling time when compared with other microorganisms, are inexpensive to grow due to their basic nutrient requirements and have the potential to express high value recombinant proteins using synthetic biology [8], [9]. Furthermore, proteins of microalgal origin tend to be more biocompatible with humans; this is because, unlike bacterial expression systems, eukaryotic microalgae can carry out complex protein folding, glycosylation, and extensive post-translational modifications (PTMs). In fact, many eukaryotic algal species produce proteins with minimal changes to the universal core glycosylation pattern also present in human proteins and are generally considered safe, as they do not share any common pathogens with humans [8], [10].

Through an updated review of literature, this work aims to analyze microalgae as versatile, efficient, and sustainable biofactories, highlighting their usefulness to produce complex proteins of recombinant origin.

Methodology

The sources used for this review were selected to highlight the use of microalgal platforms to achieve efficient and complete production of recombinant proteins. The search was based on a criterion of no more than five years since the publication of the submission to showcase current trends, apart from standout older case studies. When using databases, only indexed publications were selected using search terms such as “microalgae”, “cyanobacteria”, “protein expression”, “chloroplast”, “genetic transformation techniques”, “recombinant proteins”, and “heterologous gene expression”.

Heterologous protein production systems

Recombinant protein technology is based on the expression of modified genes, originally from a different species, in a host cell [10]. Due to their extensive applications in various fields, there is a demand for large-scale and cost-effective production [11]. One of the most important decisions is an appropriate expression system [10]. This decision must consider factors like the physicochemical and structural properties of a protein, the structural need for glycosylations

and post-translational modifications, projected costs of production, yield and time to market, biosafety, plasticity of the organism, and the effect of cellular degradative processes such as proteolysis and autophagy [4], [10], [12], [13]. Limitations in various expression systems include the inability to carry on certain molecular modifications, lack of genetic tools and techniques, and toxic by-products [11]. If an organism lacks the required protein processing machinery, the stability and functionality of the resulting protein will be negatively affected [4].

Recombinant proteins can be expressed in a wide variety of hosts, including bacteria, yeast, insect cells, mammalian cells, plants, and microalgae [10]. In general terms, prokaryotic expression systems are less expensive and have short processing times and overall relative genetic and physiological simplicity; however, these systems are unable to produce extensive post-transcriptional and post-translational modifications, such as intron splicing, multimeric protein assembly and glycosylation [10], [14], [15]. On the other hand, eukaryotic systems can produce complex proteins, but they are generally more expensive, complex, highly sensitive to their environment, and have lower expression levels [10]. Biopharmaceuticals production is commonly developed in mammalian Chinese hamster ovary (CHO) cells, followed by expression systems such as *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Pichia pastoris* [4].

Characteristics of non-microalgae recombinant protein expression systems

Bacteria

Common bacterial species used as expression systems include *E. coli*, *Lactobacillus sp.*, and *Bacillus subtilis*. *E. coli* is a widely used model organism in genetic engineering [10]. Usually, bacteria have low production costs, low protein quality, medium recombinant product yield, high immunogenicity, and short production times [10], [16]. They are characterized by the lack of specific molecular machinery to perform PTMs such as N-glycosylation during protein biosynthesis [14]. Other drawbacks of choosing bacteria cells as hosts include the unintended production of inclusion bodies as insoluble aggregated forms of recombinant protein, toxic accumulation of protein in the periplasm, and general inability to assemble multidomain, complex proteins [4], [10], [16].

Yeast

The most used yeast species in genetic engineering and industrial biotechnology include *S. cerevisiae* and *P. pastoris* [10]. These eukaryotic microorganisms are characterized by low production cost, low protein quality, high recombinant product yield, high immunogenicity, and short-to-medium production times [10], [16]. Yeast presents distinct advantages such as the secretion of proteins to culture media, cellular machinery to perform PTMs and assemble complex proteins, and general cost-effectiveness [16]. However, some drawbacks of using these expression systems include their preference for highly glycosylated recombinant proteins, which are immunogenic to humans [4], [10], [16], limited enzymatic reactions to support proper folding [10], and occasionally incorrect PTMs [4].

Insect cells

Insect cells are characterized by low production cost, low protein quality, medium-to-high recombinant product yield, high immunogenicity, and varying production times [10], [16]. Baculovirus-infected insect cells are an often-used expression system for recombinant proteins [16], [17], [18], [19]. These cells allow for the assembly of oligomeric, complex proteins, as well as various PTMs like glycosylation, phosphorylation, formation of disulfide bonds, and

myristylation [16]. Some drawbacks of using insect cells include their high sensitivity to stress, their non-status as GRAS organisms, and potential degradation of proteins as a result of cell lysis by late stages of baculovirus infection [10], [16], [19].

Mammalian cells

Mammalian cells are preferred expression systems due to the resemblance of their processing machinery to human cells. Currently, CHO cells are a reliable and relatively well-established technology for biopharmaceutical production in the global market [10]. Mammalian cells are characterized by high production cost, high protein quality, medium-to-high recombinant product yield, low immunogenicity, and long production times [10], [16]. Some of the drawbacks of these expression systems include low levels of expression, highly immunogenic murine glycosylation, difficulty to scale-up, sensitivity to contamination by prions and human viruses, general instability due to being highly sensitive, and overall lengthy and laborious downstream processing [4], [10], [16], [20], [21].

Plant cells

Like microalgae, plants hold an advantage regarding cultivation and medium costs. Both organisms are photosynthetic and have lower initial investment costs, contrary to bacteria and mammalian cells [4]. They are characterized by an overall high production cost, high protein quality, high recombinant product yield, high immunogenicity, and very long production times [10], [16]. The main limitations of these expression systems include concerns for allergic reactions, slow growth cycles, less uniform production due to the presence of functional parts, and significant differences in N-glycosylation processes [4], [11], [16], [22].

Given the disadvantages of the previously discussed expression systems, unicellular eukaryotes constitute a well-founded alternative that combines the high productivity and simplicity of the bacteria and yeast with the advanced cellular machinery mechanisms of insect, mammalian, and plant cells [10].

Characteristics of microalgae as recombinant protein expression systems

Microalgae are unicellular photosynthetic microorganisms that inhabit saline, freshwater, and terrestrial ecosystems [4], [16], [23]. These microorganisms constitute an emerging platform to produce recombinant proteins [4], [10], [11], [13], [24].

In general terms, microalgae are known for their cost-effectiveness [4], [10], [11], [12], [16]. The previously discussed expression systems are mostly heterotrophic naturally and have higher cultivation costs; meanwhile, microalgae can generate biomass on carbon dioxide and light, lowering the carbon footprint in commercial processes [4]. Lower production costs are also associated with their rapid photoautotrophic growth rates [4], [11], [25]; easy maintenance and cultivation requirements, such as the lack of need for growth regulators or complex media [4], [11], [23], [26]; and reduced investment in downstream processing protocols such as isolation and purification [10].

Normally, downstream processing costs can account for up to 80% of total costs in industrial bioprocesses [10]. The reduction of downstream processing costs is related to microalgae's general biocompatibility, given their classification as GRAS by the Food and Drug Administration (FDA); this means they are safe for human consumption as they are free of pathogens, endotoxins, human viruses, and prion-like contaminants [4], [10], [11], [12], [23]. Additionally, microalgae have a large-scale growing capacity and are easily grown in isolated bioreactors and large areas; these characteristics facilitate the implementation of good manufacturing practices (GMP) and protect the environment from the flow of transgenes [4], [11], [23], [26]. Compared to plants,

they lack functional parts such as roots and therefore allow for uniform batch production and aren't restricted by seasonal-environmental conditions [4], [10]. On the other hand, compared to mammalian cells, they are easily adapted to more extreme environments and are not as sensitive to stress factors [12], [25].

Eukaryotic microalgae are known to offer distinctive advantages in comparison with traditional expression systems. Recently, they have gained relevance due to their potential commercialization in the biomedical industry [10]. In principle, they can perform extensive PTMs and complex protein synthesis and maturation, including the capability of glycosylation and disulfide bond formation [10], [11], [12], [23], [26]. Compared to mammalian cells, this can be advantageous as microalgae are more easily scalable at lower costs [10].

Despite the promising prospects of large-scale microalgae production, there are still relevant bottlenecks to defeat for advancing their proper commercialization. Limitations are currently tested by a series of genetic engineering and scaling techniques [24]. The main challenges are associated with insufficient yields and physiobiological barriers, such as thick cell walls; additional cellular membranes; inconsistent glycosylation patterns in different eukaryotic microalgae; interference by immune responses at mucosal surfaces; and gaps in knowledge regarding microalgae genetics [4], [10], [11]. It is worth noting that microalgae protein-based drugs have yet to pass Phase III clinical trials due to deficiencies in yield [10], [27]. A relevant bottleneck reported is the drying stage, for which spray drying has been proposed as an alternative to developing microalgae-based oral vaccines [26].

If these issues are solved and research gaps are filled, microalgae hold as potential cell bio factories to produce different bioactive compounds, including protein-based drugs in the pharmaceutical industry. This could potentially address issues with the high consumer prices that are associated with biopharmaceutical proteins [10].

***Chlamydomonas reinhardtii* as a model organism for protein production**

The microalgal species *Chlamydomonas reinhardtii* is a model organism for genetic engineering and to produce different recombinant proteins and metabolites. It has been employed in metabolic engineering methods for over 100 recombinant proteins [28]. Its characteristics favor its extensive use, such as its unicellular morphology; growth in simple media; autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic growth ability; haploid genome; and sexual mating for genetic complexity [13]. *C. reinhardtii* is commonly used for recombinant protein production due to its high protein content with minimal nutrient requirements [11]. It can be easily cultivated in bioreactors, minimizing contamination risk in laboratory settings and facilitating its biocontainment, ensuring the security of transgenes from the environment [11]. The species is also among the first engineered algal species to be studied in commercial settings, which allows academic and industrial researchers to understand the challenges involved in scale-up and product recovery using genetically modified microalgae for commercial-scale production [29].

C. reinhardtii was the first microalgal species with complete sequencing available for all three genomes: nuclear, mitochondrial, and chloroplastic (ctDNA), all of which are amenable to multiple transformation methods [30]. It has a prominent molecular toolkit for plastome engineering among photoautotrophs, serving as a convenient chassis for recombinant protein expression [31]. Another unique advantage is the availability of an easily accessible, near-complete mutant library for *C. reinhardtii* [28].

The *C. reinhardtii* chloroplast genome was the first ctDNA to be manipulated by transgenesis [32]. The number of resources available for the *C. reinhardtii* manipulation has increased exponentially since then. These include well-defined protocols for growth, sexual propagation, and mutagenesis, as well as numerous published biochemical, analytical and reporter assays.

Supporting the *C. reinhardtii* research are important collections such as the *Chlamydomonas* Resource Center, a collection by the University of Minnesota with stock centers, and practical protocols; a collection of photosynthesis mutants is provided by Chlmy Station, hosted by the National Centre for Scientific Research with the Sorbonne University; and The Chlmy Sequence Optimizer is another publicly available tool for sequence optimization in *C. reinhardtii* chloroplasts [33]. Resources for *C. reinhardtii* use are under consistent growth and development, which promotes the development of new studies related to heterologous engineering in *C. reinhardtii* [34], [35].

Genetic transformation methods in microalgae

In the past two decades, genetic transformation methods have been reported for over 40 different microalgae species [23], [36]. Common subjects of study include *C. reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Volvox cartieri*, and *Haematococcus pluvialis* [23]. The method of choice can depend on factors such as the target organelle; for instance, electroporation is often used for nuclear transformation, while biolistics is preferred when transforming the chloroplast genome [13]. Table 1 summarizes some reported microalgae transformation methods.

Table 1. Summary of reported cases of microalgae transformation.

| Transformation method | Microalgae species | Reported efficiency | Expression site | Reference |
|---|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------|-----------|
| Microparticle bombardment | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 10-20 TF/ μ g DNA | Chloroplast | [37] |
| | <i>Haematococcus pluvialis</i> | 8.5-9.5 TF/ μ g DNA | Chloroplast | [38] |
| | <i>Porphyridium purpureum</i> | NR | Chloroplast | [39] |
| | <i>Volvox carteri</i> | 2.5×10^{-5} | Nucleus | [40] |
| | <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | NR | | [41] |
| Agrobacterium-mediated transformation | <i>Dunaliella salina</i> | 4.0×10^{-5} TF/cells | Nucleus | [42] |
| | <i>Dictyosphaerium pulchellum</i> | 6.5×10^4 TF/mL | Nucleus | [43] |
| | <i>Parachlorella kessleri</i> | 2.5×10^{-5} TF/cells | Nucleus | [44] |
| <i>E. coli</i> -mediated transformation | <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | 1.0×10^{-5} TF/cells | Nucleus | [45] |
| Electroporation | <i>Neochloris oleoabundans</i> | 5.2×10^{-4} TF/ μ g DNA | Nucleus | [46] |
| | <i>Schizochytrium</i> sp. TIO1101 | NR | Nucleus | [47] |
| | <i>Dunaliella salina</i> | $0.7-19.1 \times 10^{-4}$ | Nucleus | [48] |
| | <i>Nannochloropsis limnetica</i> | $10-11 \times 10^{-6}$ | Nucleus | [49] |
| | <i>Acutodesmus obliquus</i> | 125 TF/ μ g DNA | Nucleus | [50] |
| Glass beads | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | NR | Chloroplast | [26] |
| | <i>Platymonas subcordiformis</i> | 1×10^{-5} | Nucleus | [51] |

TF = transformants (transformed colony forming units), NR = Not reported.

Microparticle bombardment

Microparticle bombardment (or biolistics, short for “biological ballistics”) consists of using DNA-coated particles as delivery systems for exogenous genetic material; these particles pierce through the cell wall and algal membrane at high speeds and are usually made of gold or tungsten [10], [11], [23]. Tungsten binds to DNA more efficiently, but it can inhibit cell growth and damage DNA integrity [52]. This method is said to be effective for nuclear and chloroplast genome transformation [13]. It has been widely adopted for microalgae transformation due to its simplicity and efficiency [24]. The success of this method is determined by the type of microparticle used, distance from target cells, release pressure, and microalgae species [13]. It is also reported to be highly reproducible and does not significantly damage the cell wall [23].

This method is particularly effective for DNA insertion into the chloroplast because it can pierce through the chloroplast membrane, even after penetrating the cell wall and membrane, due to its ballistic motion and speed [13], [24]. The earliest report of particle bombardment for chloroplast genome editing was done in order to restore photosynthetic capacity in *C. reinhardtii* mutants [37]. Some examples of this method include the transformation of *H. pluvialis* to increase production of astaxanthin, a commercially valuable carotenoid [38]; the introduction of the CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein (RNP) delivery system into *Tetraselmis* sp. to enhance lipid productivity through a gene knockout [53]; and the transformation of *Porphyridium purpureum* for the chloroplast-expression of antimicrobial peptides [39]. Other species that have been transformed through biolistics include *Chlorella vulgaris* [24], *Dunaliella salina* [54], *Volvox carteri* [40], and *Cylindrotheca fusiformis* [55].

Bacteria-mediated transformation

Agrobacterium tumefaciens is a phytopathogenic bacterium used to transfer DNA into plant cells [10], [13]. Through modification, *A. tumefaciens* has also been used to infect microalgae for transferring exogenous DNA [10], [11]. This method is known to be fast and non-laborious [23]. One disadvantage is the inability to formulate oral products based on microalgae transformed through *Agrobacterium*; this drawback is mainly due to the possible presence of residual bacteria [23]. Some examples of *Agrobacterium*-mediated transformation in microalgae include the insertion of a β -carotene hydroxylase gene into *D. salina* to enhance the production of violaxanthin and zeaxanthin [42], and the modification of *Dictyosphaerium pulchellum* to produce erythropoietin, a therapeutic protein for anemia-related disorders [43]. Other species that have been transformed through this method include *Parachlorella kessleri* [44], *Dunaliella bardawil* [56], *Dunaliella tertiolecta* [57], *Euglena gracilis* [58], and *Scenedesmus almeriensis* [59].

Additionally, there have been at least three reports of genetic modification through bacterial conjugation using *E. coli* [13], [45], [60], [61]. In the case of *Phaeodactylum tricornutum*, conjugation through *E. coli* was reported to be significantly more efficient than microparticle bombardment transformation [45].

Electroporation

Electroporation consists of applying electric pulses of high intensity to allow exogenous DNA to enter the cell through the creation of temporary micropores in the membrane [10], [13], [16], [23]. An optimized electroporation protocol balances the membrane permeability and cell survival rate [13], [16]. Successful electroporation protocols are usually established empirically, and their effectiveness can vary depending on factors such as growth phase, electroporation conditions, pretreatment of cells, membrane and cell wall composition, organism size, and microalgae species [13], [23]. However, it remains a routine method utilized for microalgae and

microalgal nuclear transformation [10], [16], [23]. Some cases of successful electroporation protocols include the modification of *Neochloris oleoabundans* to enhance its lipid content and usage as diesel feedstock [46], the transformation of *Chlorella* sp. DT to enhance hydrogen production [62], and the transformation of *Schizochytrium* sp. TIO1101 to improve growth rates previously limited by the accumulation of acetate content [47]. Other species that have been transformed through this method include *Nannochloropsis salina* [63], *Dunaliella salina* [48], *Nannochloropsis limnetica* [49], and *Scenedesmus obliquus* [64].

Other notable transformation methods

Other less common transformation methods have been reported for microalgae. For example, glass bead disruption is a fast and practical method for transgenesis, where beads induce cell permeabilization and DNA transfer through agitation [10], [23]. This method was used in *C. reinhardtii* to produce a vaccine against salmonoid alphavirus (SAV) [26]. The agitation with glass beads is limited due to microalgae's rigid cell wall, and low survival rates are associated with this method [16]. On the other hand, the use of viral vectors to insert genetic material is a promising technology but is not yet widely used in microalgae [10]. Common viruses used for eukaryotic microalgae infection include *Chlorella* viruses (PBCV-1, OSy-NE5, ATCV-1); *Chaetoceros* viruses (CdebDNAV and ClorDNAV); and *Tetraselmis* viruses (TetV and Tsv-N1) [65]. Other methods that are used in microalgal genetic engineering include chemically induced transformation [66], [67] and lipid-based transfection methods [68].

Limitations for the genetic transformation of microalgae

A very significant limitation when it comes to the genetic transformation of microalgae is the cell wall. This component consists of a thick, complex, and highly recalcitrant structure that usually ensures cell viability and stability [11], [13], [69]. The algal cell wall composition depends on the genus, species, and strain of microalgae; it is usually a heteropolymer composed of a series of carbohydrates, lipids, proteins, and hydrocarbons [13], [69], [70]. As an example, the cell wall of *Chlorella* sp. is composed of irregular stereo-polysaccharides, chitin, chitin-like polysaccharides, rhamnose, and galactose [71]. Even so, complete cell wall disruption is not needed for transformation; instead, this structure needs to remain in a damaged but recoverable state to produce viable cells [13].

Another limitation associated with microalgae is genomic ploidy. When there is more than one copy of the genome, there is a higher chance of unintended repair of transgenes due to the presence of a repair template; this has been the case for diploid and polyploid microalgae species [13].

Thirdly, some microalgae are particularly resistant to antibiotics. This can influence the growth of untransformed microalgae in selection plates. Therefore, antibiotics must be used in very high concentrations [13].

Other limitations that are linked to low levels of expression in microalgae for heterologous proteins include nuclease activity, codon bias, silencing of transformants, requirement for special equipment (e.g., for microparticle bombardment), and low efficiencies related to temperature and consistent light source [16], [23].

Organelle-directed protein expression in microalgae

The demand for high-value molecules has been the driving force behind the engineering of eukaryotic microbial platforms, whether in their nuclear, mitochondrial, or chloroplastic genome. All three systems can be transformed for organelle-directed protein expression in microalgae [72], each with their unique advantages and disadvantages, which will be explored further.

Nuclear protein expression

In microalgae, modifications in the nuclear genome are more common than chloroplast-directed engineering efforts [73]. One advantage of nucleus-directed expression is the protein availability for PTMs and intracellular targeting, such as the endoplasmic reticulum or the Golgi apparatus for export and localization to the cell membrane [10], [16]. In the case of chloroplast expression, the proteins are retained within the organelle, limiting PTMs [74]. Although chloroplast expression may permit other bioactivity-dependent modifications such as the formation of disulfide bonds [73], PTMs like N-glycosylations are necessary in many proteins to ensure stability, correct folding, protein localization, and may impact functions such as immunogenicity, pharmacokinetics, and catalytic activity [75].

However, compared to chloroplast-targeted expression, relatively few methods, regulatory elements, and transformation vectors have been identified for the nucleus. Significant efforts are being made to expand a molecular toolbox, allowing an efficient and robust expression of transgenes from microalgal nuclear genomes [30], [76]. Another limitation of nucleus-directed heterologous protein expression is the consistently lower yields compared to protein accumulation in the chloroplast; in fact, gene expression in the nucleus can occupy up to 9% of the total soluble protein content, whereas chloroplasts can reach up to 21% of the total soluble protein content [10]. This phenomenon is likely due to nuclear silencing mechanisms, which have been a challenge to engineer out of the system because it is hypothesized that they evolved as a protective measure against intracellular pathogens or viruses [77]. These mechanisms can cause excising, truncating, or rearrangement of the gene of interest, and random integration in the nucleus can result in variable expression among clones [13]. Avoiding gene silencing will represent a principal barrier before recombinant proteins can be expressed in the nucleus at commercially viable levels [24].

New methods have helped overcome this problem, such as the development of strains with impaired transgene silencing by using UV mutagenesis and selection and media that permit higher antibiotic tolerance proportional to higher expression of the exogenous product for selecting strains with improved protein accumulation [78], [79]. The development of CRISPR-Cas9 systems in microalgae may also offer a solution for targeting transgenes into specific sites in the nuclear genome, which can help avoid random integration events [32].

Protein expression in the chloroplast

In the model organism *C. reinhardtii*, plastid genes are arranged on a circular chromosome with high polyploidy, around 83 copies, which is uniparentally inherited [73]. Algal plastomes are displayed in a quadripartite structure with small and large single-copy regions, divided by two large, inverted repeat regions [73]. The high copy number in chloroplast expression can enable efficient expression of recombinant proteins, and chloroplasts have their own ribosomes and translation elements for this process [24], [32]. Another advantage is that the proteins synthesized and reserved within the chloroplast, come to show higher effectiveness of cell transformation and consequently greater yields than those proteins released to the extracellular

medium from the nucleus [4]. In the case of *C. reinhardtii*, there is a single large chloroplast, which allows it to accumulate high amounts of expressed proteins with high homogeneity [16], [73].

The use of chloroplast transformation can integrate exogenous genes at specific sites in the chloroplast genome via homologous recombination [72]. One significant advantage of chloroplast transformation is that transgenes can be easily directed to integrate via homologous recombination, whereas nuclear transformation of microalgae usually results in random integration events [80]. Homologous recombination has been successfully accomplished in the *C. vulgaris* chloroplast genome using the 16S-*tml/tmA*-23S as the flanking fragments in the inverted repeat region [24].

Many methods have been well established for *C. reinhardtii* chloroplast transformation, and over 100 different proteins have been successfully produced [81]. In almost all reported cases, the complexity of the genetic engineering is low and typically involves introduction into the plastome of just a single transgene together with a selectable marker [81]. Chloroplast transformation systems have been established for various microalgae species, such as *C. reinhardtii*, *H. pluvialis*, and *Tetraselmis subcordiformis* to express industrially valuable biomaterials and recombinant therapeutic proteins as oral vaccines [24], [82].

Protein expression in the mitochondria

Targeted expression in the mitochondria is the least common of all three transformation systems. Due to each cell possessing multiple mitochondria, the maintenance of genetic engineering stability is limited [13]. However, mitochondria could be an attractive target for modification towards energy, biomass production, and manipulation of oxidative stress [83]. Few cases have been reported of successful recombinant protein expression in mitochondria, however, *C. reinhardtii* mitochondria have been transformed to revert a mutation involved in the biosynthesis of cytochrome b, via biolistics and homologous recombination [84].

Conclusions

The use of microalgae for the biomanufacturing of therapeutic recombinant proteins has great potential, even though its development has not been sufficient. The microalgae-based expression also offers real potential for cost savings, thus making it an alternative to increase production yields. Moreover, different transformation techniques have been exploited in microalgae, and some of them must be selected according to each species' characteristics to guarantee a successful transformation. Microalgal platforms consist of promising sources for treatments, industrial products, and services. Therefore, it is important to focus efforts on research and development for optimized protocols to enhance recombinant protein production in microalgae. At the Biotechnology Research Center of the Costa Rica Institute of Technology, researchers such as *Dr.rer.nat.* Montserrat Jarquín-Cordero and Master Luis Barboza-Fallas conduct studies in this field, such as the expression of human pro-angiogenic growth factors [7] and the production of a bioherbicide in microalgae.

Author Contributions

Luis Muñoz-Solórzano: Conceptualization, Writing – Original Draft, Project Administration; Kate Willis-Ureña: Conceptualization, Writing – Original Draft, Project Administration; Sebastián Valverde-Rojas: Writing – Original Draft; Montserrat Jarquín-Cordero: Writing – Review & Editing; Luis Barboza-Fallas: Conceptualization, Writing – Review & Editing, Supervision

Acknowledgments

The authors would like to thank the Biotechnology Research Centre at the Costa Rica Institute of Technology for the Scientific Article Writing Workshop, which provided the skills and the support for this review, and from which the conception for this review began.

Conflicts of interest

The authors declare no competing interests. Luis Barboza Fallas is the CEO of Hemoalgae, a startup company using microalgae as technological platforms to produce high-value compounds.

References

- [1] N. K. Tripathi and A. Shrivastava, "Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, p. 420, Dec. 20, 2019, doi: 10.3389/fbioe.2019.00420.
- [2] L. Gifre, A. Arís, À. Bach, and E. Garcia-Fruitós, "Trends in recombinant protein use in animal production," *Microbial Cell Factories*, vol. 16, no. 40, Mar. 04, 2017, doi: 10.1186/s12934-017-0654-4.
- [3] B. Owczarek, A. Gerszberg, and K. Hnatuszko-Konka, "A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals," *BioMed Research International*, 2019, doi: 10.1155/2019/4216060.
- [4] L. Barolo *et al.*, "Perspectives for glyco-engineering of recombinant biopharmaceuticals from microalgae," *Cells*, vol. 9, no. 3, Mar. 05, 2020, doi: 10.3390/cells9030633.
- [5] D. Castiglia, S. Landi, and S. Esposito, "Advanced applications for protein and compounds from microalgae," *Plants*, vol. 10, no. 8, Aug. 01, 2021, doi: 10.3390/plants10081686.
- [6] R. J. Leonardi, I. Niizawa, H. A. Irazoqui, and J. M. Heinrich, "Modeling and simulation of the influence of fractions of blue and red light on the growth of the microalga *Scenedesmus quadricauda*," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 129, pp. 16–25, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.bej.2017.10.014.
- [7] M. Jarquín-Cordero *et al.*, "Towards a biotechnological platform for the production of human pro-angiogenic growth factors in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 104, no. 2, pp. 725–739, Jan. 2020, doi: 10.1007/s00253-019-10267-6.
- [8] A. Banerjee and V. Ward, "Production of recombinant and therapeutic proteins in microalgae," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 78, Dec. 01, 2022, doi: 10.1016/j.copbio.2022.102784.
- [9] A. E. Sproles, F. J. Fields, T. N. Smalley, C. H. Le, A. Badary, and S. P. Mayfield, "Recent advancements in the genetic engineering of microalgae," *Algal Research*, vol. 53, Mar. 01, 2021, doi: 10.1016/j.algal.2020.102158.
- [10] Z. Xie, J. He, S. Peng, X. Zhang, and W. Kong, "Biosynthesis of protein-based drugs using eukaryotic microalgae," *Algal Research*, vol. 74, Jul. 01, 2023, doi: 10.1016/j.algal.2023.103219.
- [11] A. Malla, S. Rosales-Mendoza, W. Phoolcharoen, and S. Vimolmangkang, "Efficient transient expression of recombinant proteins using DNA viral vectors in freshwater microalgal species," *Frontiers in Plant Science*, vol. 12, Apr. 2021, doi: 10.3389/fpls.2021.650820.
- [12] I. de Grahl and S. Reumann, "Stramenopile microalgae as "green biofactories" for recombinant protein production," *World journal of microbiology & biotechnology*, vol. 37, no. 9, p. 163, Aug. 2021, doi: 10.1007/s11274-021-03126-y.
- [13] M. Mosey, D. Douchi, E. P. Knoshaug, and L. M. L. Laurens, "Methodological review of genetic engineering approaches for non-model algae," *Algal Research*, vol. 54, Elsevier B.V., Apr. 01, 2021, doi: 10.1016/j.algal.2021.102221.
- [14] A. Watts, S. Sankaranarayanan, A. Watts, and R. K. Raipuria, "Optimizing protein expression in heterologous system: strategies and tools," *Meta Gene*, vol. 29, p. 100899, 2021, doi: 10.1016/j.mgene.2021.100899.
- [15] M. R. Mallu, S. R. Golamari, S. R. C. K. Kotikalapudi, and R. Vemparala, "Overview of bacterial and yeast systems for protein expression," *Journal of Pharmaceutical Research International*, vol. 33, no. 32A, pp. 113–118, Jun. 2021, doi: 10.9734/jpri/2021/v33i32A31722.
- [16] J. Dehghani, K. Adibkia, A. Movafeghi, H. Maleki-Kakelar, N. Saeedi, and Y. Omid, "Towards a new avenue for producing therapeutic proteins: microalgae as a tempting green biofactory," *Biotechnology Advances*, vol. 40, May 01, 2020, doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107499.



- [17] Z. Schemczssen-Graeff *et al.*, "Description of a serpin toxin in *Loxosceles* (Brown spider) venoms: cloning, expression in baculovirus-infected insect cells and functional characterization," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 183, pp. 1607–1620, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.129.
- [18] E. De-Bona *et al.*, "Production of a novel recombinant brown spider hyaluronidase in baculovirus-infected insect cells," *Enzyme and microbial technology*, vol. 146, p. 109759, 2021, doi: 10.1016/j.enzmictec.2021.109759.
- [19] C. Grose, Z. Putman, and D. Esposito, "A review of alternative promoters for optimal recombinant protein expression in baculovirus-infected insect cells," *Protein expression and purification*, vol. 186, p. 105924, 2021, doi: 10.1016/j.pep.2021.105924.
- [20] H. Dahodwala and K. H. Lee, "The fickle CHO: a review of the causes, implications, and potential alleviation of the CHO cell line instability problem," *Current opinion in biotechnology*, vol. 60, pp. 128–137, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.copbio.2019.01.011.
- [21] B. Bachhav, J. de Rossi, and L. Llanos Carlos D and Segatori, "Cell factory engineering: challenges and opportunities for synthetic biology applications," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 120, no. 9, pp. 2441–2459, Mar. 2023. doi: 10.1002/bit.28365.
- [22] X. Zhu *et al.*, "Synthetic biology of plant natural products: from pathway elucidation to engineered biosynthesis in plant cells," *Plant Communications*, vol. 2, no. 5, p. 100229, 2021, doi: 10.1016/j.xplc.2021.100229.
- [23] O. C. Bolaños-Martínez, G. Mahendran, S. Rosales-Mendoza, and S. Vimolmangkang, "Current status and perspective on the use of viral-based vectors in eukaryotic microalgae," *Marine Drugs*, vol. 20, no. 7, Jun. 2022, doi: 10.3390/md20070434.
- [24] K. Wang *et al.*, "The chloroplast genetic engineering of a unicellular green alga *Chlorella vulgaris* with two foreign peptides co-expression," *Algal Research*, vol. 54, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.algal.2021.102214.
- [25] N. Shahar, T. Elman, R. Williams-Carrier, O. Ben-Zvi, I. Yacoby, and A. Barkan, "Use of plant chloroplast RNA-binding proteins as orthogonal activators of chloroplast transgenes in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*," *Algal Research*, vol. 60, p. 102535, 2021, doi: 10.1016/j.algal.2021.102535.
- [26] A. Vilatte, X. Spencer-Milnes, H. O. Jackson, S. Purton, and B. Parker, "Spray drying is a viable technology for the preservation of recombinant proteins in microalgae," *Microorganisms*, vol. 11, no. 2, Feb. 2023, doi: 10.3390/microorganisms11020512.
- [27] S. O. Bachurin, E. V Bovina, and A. A. Ustyugov, "Drugs in clinical trials for Alzheimer's Disease: the major trends," *Medicinal research reviews*, vol. 37, no. 5, pp. 1186–1225, Jan. 2017, doi: 10.1002/med.21434.
- [28] K. Ma, L. Deng, H. Wu, and J. Fan, "Towards green biomanufacturing of high-value recombinant proteins using promising cell factory: *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 9, no. 1, Dec. 01, 2022, doi: 10.1186/s40643-022-00568-6.
- [29] A. Masi, F. Leonelli, V. Scognamiglio, G. Gasperuzzo, A. Antonacci, and M. A. Terzidis, "*Chlamydomonas reinhardtii*: a factory of nutraceutical and food supplements for human health," *Molecules*, vol. 28, no. 3, Feb. 01, 2023, doi: 10.3390/molecules28031185.
- [30] D. P. Weeks, "Genetic transformation of *Chlamydomonas* nuclear, chloroplast, and mitochondrial genomes," in *The Chlamydomonas Sourcebook: Volume 1: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*, vol. 1, pp. 325–343, 2023, doi: 10.1016/B978-0-12-822457-1.00018-2.
- [31] E. Cutolo, M. Tosoni, S. Barera, L. Herrera-Estrella, L. Dall'Osto, and R. Bassi, "A chimeric hydrolase-PTXD transgene enables chloroplast-based heterologous protein expression and non-sterile cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii*," *Algal Research*, vol. 59, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.algal.2021.102429.
- [32] P. A. Salomé and S. S. Merchant, "A series of fortunate events: introducing *Chlamydomonas* as a reference organism," *Plant Cell*, vol. 31, no. 8, pp. 1682–1707, Aug. 01, 2019, doi: 10.1105/tpc.18.00952.
- [33] I. Weiner, Y. Feldman, N. Shahar, I. Yacoby, and T. Tuller, "CSO – A sequence optimization software for engineering chloroplast expression in *Chlamydomonas reinhardtii*," *Algal Research*, vol. 46, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.algal.2019.101788.
- [34] T. Z. Emrich-Mills *et al.*, "A recombineering pipeline to clone large and complex genes in *Chlamydomonas*," *Plant Cell*, vol. 33, no. 4, pp. 1161–1181, Apr. 2021, doi: 10.1093/plcell/koab024.
- [35] I. K. Blaby, M. J. Soto, and C. E. Blaby-Haas, "Functional genomics of *Chlamydomonas reinhardtii*," in *The Chlamydomonas Sourcebook: Volume 1: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*, vol. 1, pp. 65–84, 2023, doi: 10.1016/B978-0-12-822457-1.00013-3.
- [36] S. Jareonsin and C. Pumas, "Advantages of heterotrophic microalgae as a host for phytochemicals production," *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 9, p. 628597, 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.628597.

- [37] J. Boynton *et al.*, "Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles," *Science*, vol. 240, no. 4858, pp. 1534-1538, Jun. 1988, doi: 10.1126/science.2897716.
- [38] J. I. Galarza, J. A. Gimpel, V. Rojas, B. O. Arredondo-Vega, and V. Henríquez, "Over-accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* through chloroplast genetic engineering," *Algal Research*, vol. 31, pp. 291-297, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.algal.2018.02.024.
- [39] S. Han *et al.*, "Two foreign antimicrobial peptides expressed in the chloroplast of *Porphyridium purpureum* possessed antibacterial properties," *Mar Drugs*, vol. 20, no. 8, Jul. 2022, doi: 10.3390/md20080484.
- [40] B. Schiedlmeier *et al.*, "Nuclear transformation of *Volvox carteri*," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 11, pp. 5080-5084, May 1994, doi: 10.1073/pnas.91.11.5080.
- [41] D. Jallet *et al.*, "Mitochondrial fatty acid β -oxidation is required for storage-lipid catabolism in a marine diatom," *The new phytologist*, vol. 228, no. 3, pp. 946-958, 2020, doi: 10.1111/nph.16744.
- [42] D. P. Simon, N. Anila, K. Gayathri, and R. Sarada, "Heterologous expression of β -carotene hydroxylase in *Dunaliella salina* by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation," *Algal Research*, vol. 18, pp. 257-265, 2016, doi: 10.1016/j.algal.2016.06.017.
- [43] K. M. I. Bashir, M.-S. Kim, U. Stahl, and M.-G. Cho, "*Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Dictyosphaerium pulchellum* for the expression of erythropoietin," *Journal of Applied Phycology*, vol. 30, no. 6, pp. 3503-3518, 2018, doi: 10.1007/s10811-018-1483-5.
- [44] J. P. Rathod, G. Prakash, R. Pandit, and A. M. Lali, "*Agrobacterium*-mediated transformation of promising oil-bearing marine algae *Parachlorella kessleri*," *Photosynthesis Research*, vol. 118, no. 1, pp. 141-146, 2013, doi: 10.1007/s11120-013-9930-2.
- [45] A. K. Sharma, M. Nymark, T. Sparstad, A. M. Bones, and P. Winge, "Transgene-free genome editing in marine algae by bacterial conjugation – comparison with biolistic CRISPR/Cas9 transformation," *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, p. 14401, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-32342-0.
- [46] W. Chungjatupornchai, P. Kitraksa, and S. Fa-aroonawat, "Stable nuclear transformation of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* by electroporation," *Journal of Applied Phycology*, vol. 28, no. 1, pp. 191-199, 2016, doi: 10.1007/s10811-015-0594-5.
- [47] J. Yan *et al.*, "Overexpression of acetyl-CoA synthetase increased the biomass and fatty acid proportion in microalga *Schizochytrium*," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 97, no. 5, pp. 1933-1939, Oct. 2012, doi: 10.1007/s00253-012-4481-6.
- [48] D. Geng, Y. Wang, P. Wang, W. Li, and Y. Sun, "Stable expression of hepatitis B surface antigen gene in *Dunaliella salina* (Chlorophyta)," *Journal of Applied Phycology*, vol. 15, no. 6, pp. 451-456, 2003, doi: 10.1023/B:JAPH.0000004298.89183.e5.
- [49] Y. Chen and H. Hu, "High efficiency transformation by electroporation of the freshwater alga *Nannochloropsis limnetica*," *World journal of microbiology & biotechnology*, vol. 35, no. 8, p. 119, 2019, doi: 10.1007/s11274-019-2695-9.
- [50] C. F. Muñoz *et al.*, "Improved DNA/protein delivery in microalgae – A simple and reliable method for the prediction of optimal electroporation settings," *Algal Research*, vol. 33, pp. 448-455, 2018, doi: 10.1016/j.algal.2018.06.021.
- [51] Y. Cui, J. Wang, P. Jiang, S. Bian, and S. Qin, "Transformation of *Platymonas (Tetraselmis) subcordiformis* (Prasinophyceae, Chlorophyta) by agitation with glass beads," *World journal of microbiology & biotechnology*, vol. 26, no. 9, pp. 1653-1657, 2010, doi: 10.1007/s11274-010-0342-6.
- [52] I. I. Ozyigit and K. Yucebilgili Kurtoglu, "Particle bombardment technology and its applications in plants," *Molecular biology reports*, vol. 47, no. 12, pp. 9831-9847, Nov. 2020, doi: 10.1007/s11033-020-06001-5.
- [53] K. S. Chang, J. Kim, H. Park, S.-J. Hong, C.-G. Lee, and E. Jin, "Enhanced lipid productivity in AGP knockout marine microalga *Tetraselmis* sp. using a DNA-free CRISPR-Cas9 RNP method," *Bioresource Technology*, vol. 303, p. 122932, 2020, doi: 10.1016/j.biortech.2020.122932.
- [54] C. Tan, S. Qin, Q. Zhang, P. Jiang, and F. Zhao, "Establishment of a micro-particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*," *Journal of microbiology*, vol. 43, no. 4, pp. 361-365, Aug. 2005. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16145551/>
- [55] H. Fischer, I. Robl, M. Sumper, and N. Kröger, "Targeting and covalent modification of cell wall and membrane proteins heterologously expressed in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae)," *Journal of Phycology*, vol. 35, no. 1, pp. 113-120, Feb. 1999, doi: 10.1046/j.1529-8817.1999.3510113.x.



- [56] N. Anila, A. Chandrashekar, G. A. Ravishankar, and R. Sarada, "Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation in *Dunaliella bardawil*," *European Journal of Phycology*, vol. 46, no. 1, pp. 36–44, Feb. 2011, doi: 10.1080/09670262.2010.550386.
- [57] C. D. Norzagaray-Valenzuela, L. J. Germán-Báez, M. A. Valdez-Flores, S. Hernández-Verdugo, L.M. Shelton, and A. Valdez-Ortiz, "Establishment of an efficient genetic transformation method in *Dunaliella tertiolecta* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*," *Journal of microbiological methods*, vol. 150, pp. 9–17, May 2018, doi: 10.1016/j.mimet.2018.05.010.
- [58] B. Khatiwada, L. Kautto, A. Sunna, A. Sun, and H. Nevalainen, "Nuclear transformation of the versatile microalga *Euglena gracilis*," *Algal Research*, vol. 37, pp. 178–185, 2019, doi: 10.1016/j.algal.2018.11.022.
- [59] Y. Dautor, P. Úbeda-Mínguez, T. Chileh, F. García-Maroto, and D. L. Alonso, "Development of genetic transformation methodologies for an industrially-promising microalga: *Scenedesmus almeriensis*," *Biotechnology letters*, vol. 36, no. 12, pp. 2551–2558, Sep. 2014, doi: 10.1007/s10529-014-1641-z.
- [60] J. George, T. Kahlke, R. M. Abbriano, U. Kuzhiumparambil, P. J. Ralph, and M. Fabris, "Metabolic engineering strategies in diatoms reveal unique phenotypes and genetic configurations with implications for algal genetics and synthetic biology," *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 8, p. 513, Jun. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00513.
- [61] C. F. Muñoz, M. H. J. Sturme, S. D'Adamo, R. A. Weusthuis, and R. H. Wijffels, "Stable transformation of the green algae *Acutodesmus obliquus* and *Neochloris oleoabundans* based on *E. coli* conjugation," *Algal Research*, vol. 39, p. 101453, 2019, doi: 10.1016/j.algal.2019.101453.
- [62] D.-W. Yang, J.-W. Syn, C.-H. Hsieh, C.-C. Huang, and L.-F. Chien, "Genetically engineered hydrogenases promote biophotocatalysis-mediated H₂ production in the green alga *Chlorella* sp. DT," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 44, no. 5, pp. 2533–2545, 2019, doi: 10.1016/j.ijhydene.2018.11.088.
- [63] X. Ma, L. Yao, B. Yang, Y. K. Lee, F. Chen, and J. Liu, "RNAi-mediated silencing of a pyruvate dehydrogenase kinase enhances triacylglycerol biosynthesis in the oleaginous marine alga *Nannochloropsis salina*," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 11485, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-11932-4.
- [64] S.-L. Guo *et al.*, "Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*," *Journal of Biotechnology*, vol. 163, no. 1, pp. 61–68, 2013, doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.10.020.
- [65] S. D'Adamo, R. Kormelink, D. Martens, M. J. Barbosa, and R. H. Wijffels, "Prospects for viruses infecting eukaryotic microalgae in biotechnology," *Biotechnology Advances*, vol. 54, p. 107790, 2022, doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107790.
- [66] H. Endo, M. Yoshida, T. Uji, N. Saga, K. Inoue, and H. Nagasawa, "Stable nuclear transformation system for the coccolithophorid alga *Pleurochrysis carterae*," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 22252, 2016, doi: 10.1038/srep22252.
- [67] R. L. Hawkins and M. Nakamura, "Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*," *Current Microbiology*, vol. 38, no. 6, pp. 335–341, Jun. 1999, doi: 10.1007/PL00006813.
- [68] F. Akbari, A. Yari Khosroushahi, and H. Yeganeh, "Quaternary ammonium salt containing soybean oil: an efficient nanosize gene delivery carrier for halophile green microalgal transformation," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 225, pp. 80–89, 2015, doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.006.
- [69] O. Spain and C. Funk, "Detailed characterization of the cell wall structure and composition of nordic green microalgae," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 70, no. 31, pp. 9711–9721, Aug. 2022, doi: 10.1021/acs.jafc.2c02783.
- [70] O. Spain, M. Plöhn, and C. Funk, "The cell wall of green microalgae and its role in heavy metal removal," *Physiologia Plantarum*, vol. 173, no. 2, pp. 526–535, Oct. 2021, doi: 10.1111/ppl.13405.
- [71] I. C. F. Sampaio *et al.*, "Microalgae cell wall hydrolysis using snailase and mechanical sand milling," *Algal Research*, vol. 78, p. 103425, 2024, doi: 10.1016/j.algal.2024.103425.
- [72] A. Siddiqui, Z. Wei, M. Boehm, and N. Ahmad, "Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 67, no. 1. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, pp. 30–40, Jan. 01, 2020, doi: 10.1002/bab.1823.
- [73] S. E. Carrera-Pacheco, B. Hankamer, and M. Oey, "Environmental and nuclear influences on microalgal chloroplast gene expression," *Trends in Plant Science*, vol. 28, no. 8. Elsevier Ltd, pp.955–967, Aug. 01, 2023, doi: 10.1016/j.tplants.2023.03.013.
- [74] P. Ahmad and F. Bano, "Posttranslational modifications in algae: role in stress response and biopharmaceutical production," in *Protein Modificomics: From Modifications to Clinical Perspectives*, Elsevier, 2019, pp. 313–337. doi: 10.1016/B978-0-12-811913-6.00012-6.

- [75] Q. Zhou and H. Qiu, "The mechanistic impact of N-glycosylation on stability, pharmacokinetics, and immunogenicity of therapeutic proteins," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 108, no. 4. Elsevier B.V., pp. 1366-1377, Apr. 01, 2019, doi: 10.1016/j.xphs.2018.11.029.
- [76] S. Y. Kim, K. W. Kim, Y. M. Kwon, and J. Y. H. Kim, "mCherry protein as an *in vivo* quantitative reporter of gene expression in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*," *Molecular biotechnology*, vol. 62, no. 5, pp. 297-305, May 2020, doi: 10.1007/s12033-020-00249-9.
- [77] R. Beauchemin *et al.*, "Successful reversal of transgene silencing in *Chlamydomonas reinhardtii*," *Biotechnology Journal*, vol. 19, no. 1, Jan. 2024, doi: 10.1002/biot.202300232.
- [78] A. Suttangkakul *et al.*, "Evaluation of strategies for improving the transgene expression in an oleaginous microalga *Scenedesmus acutus*," *BMC Biotechnology*, vol. 19, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1186/s12896-018-0497-z.
- [79] P. Dementyeva *et al.*, "A novel, robust and mating-competent *Chlamydomonas reinhardtii* strain with an enhanced transgene expression capacity for algal biotechnology," *Biotechnology Reports*, vol. 31, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.btre.2021.e00644.
- [80] E. A. Cutolo, G. Mandalà, L. Dall'osto, and R. Bassi, "Harnessing the algal chloroplast for heterologous protein production," *Microorganisms*, vol. 10, no. 4. MDPI, Apr. 01, 2022, doi: 10.3390/microorganisms10040743.
- [81] M. Larrea-Alvarez and S. Purton, "Multigenic engineering of the chloroplast genome in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*," *Microbiology (United Kingdom)*, vol. 166, no. 6, pp. 510-515, 2020, doi: 10.1099/mic.0.000910.
- [82] K. C. Kwon, A. Lamb, D. Fox, and S. J. Porphy Jegathese, "An evaluation of microalgae as a recombinant protein oral delivery platform for fish using green fluorescent protein (GFP)," *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 87, pp. 414-420, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.01.038.
- [83] F. Colina, M. Carbó, M. Meijón, M. J. Cañal, and L. Villedor, "Low UV-C stress modulates *Chlamydomonas reinhardtii* biomass composition and oxidative stress response through proteomic and metabolomic changes involving novel signalers and effectors," *Biotechnology for Biofuels*, vol. 13, no. 1, Jun. 2020, doi: 10.1186/s13068-020-01750-8.
- [84] C. Fajardo, M. De Donato, R. Carrasco, G. Martínez-Rodríguez, J. M. Mancera, and F. J. Fernández-Acero, "Advances and challenges in genetic engineering of microalgae," *Reviews in Aquaculture*, vol. 12, no. 1. Wiley-Blackwell, pp. 365-381, Feb. 01, 2020, doi: 10.1111/raq.12322.

Advances in microalgal biotechnology in Costa Rica: contributions from the Costa Rica Institute of Technology


Avances en biotecnología microalgal en Costa Rica: contribuciones del Instituto Tecnológico de Costa Rica


Francinie Murillo-Vega¹, Margie Faith-Vargas², Mauricio Chicas-Romero³, Karla Meneses-Montero⁴, Fabián Villalta-Romero⁵

Murillo-Vega, F; Faith-Vargas, M; Chicas-Romero, M; Meneses-Montero, K; Villalta-Romero, F. Advances in microalgal biotechnology in Costa Rica: contributions from the Costa Rica Institute of Technology. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 54-68.


 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7609>


1 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.

 frmurillo@itcr.ac.cr


 <https://orcid.org/0000-0002-2751-8390>


2 Centro de Investigación en Administración, Economía y Gestión Tecnológica, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.

 mfaith@itcr.ac.cr


 <http://orcid.org/0000-0002-8750-8100>

3 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.

 mchicas@itcr.ac.cr


 <https://orcid.org/0000-0002-5046-1740>

4 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.

 kmeneses@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0009-0008-4062-7728>

5 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.

 fvillalta@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0001-7484-8125>

Keywords

Biotechnology; environment; agriculture; food; biofuels; microalgae.

Abstract

Microalgal biotechnology in Costa Rica is a constantly growing field of research. The Microalgae research group of the Biotechnology Research Center (CIB) at Costa Rica Institute of Technology (ITCR) carries out research with microalgae in different areas, including environmental and agricultural applications, and food and biofuel development. In these fields, microalgae have been used to develop solutions to various national needs. This review addresses the main applications of microalgae in four key areas: environment, food, agriculture and bioenergy, at the national level, highlighting the contribution of this research group in the country. In addition, the challenges and opportunities that microalgal biotechnology must face for its effective integration in society and its potential to contribute to the environmental, social and economic development of Costa Rica are discussed.

Palabras clave

Biología; ambiente; agrícola; alimenticio; biocombustible; microalgas.

Resumen

La biotecnología microalgal en Costa Rica es un campo de investigación en constante crecimiento. El grupo de investigación en Microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) realiza investigaciones con microalgas en distintas áreas, incluyendo aplicaciones ambientales y agrícolas, y desarrollo de alimentos y biocombustibles. En estos campos, las microalgas se han utilizado para desarrollar soluciones a diversas necesidades nacionales. Esta revisión aborda las principales aplicaciones de las microalgas en cuatro áreas clave: ambiente, alimentación, agricultura y biocombustibles, a nivel nacional, destacando el aporte de este grupo de investigación en el país. Además, se discuten los desafíos y oportunidades que la biotecnología microalgal debe de enfrentar para su integración efectiva en la sociedad y su potencial para contribuir al desarrollo ambiental, social y económico de Costa Rica.

Introducción

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos y pueden crecer en diversos ambientes acuáticos y terrestres. Son productoras primarias, aportando nutrientes a las cadenas alimenticias y afectando los ciclos del carbono, nitrógeno y otros elementos. Se han cultivado en estanques abiertos y fotobiorreactores, y aunque son productivas, el cultivo en estanques presenta desafíos como la autolimitación de la luz y las plagas. Por su parte, los fotobiorreactores ofrecen una producción más controlada, pero mayores costos [1]. Su capacidad para capturar CO₂ y degradar sustratos diversos las convierten en una herramienta valiosa para combatir el cambio climático y en procesos de biorremediación [1]; por su diverso metabolismo y perfil nutricional presentan aplicaciones en la elaboración de alimentos [2]; por su rol en los ecosistemas pueden utilizarse en agricultura sostenible [3]; y por el contenido lipídico de algunas especies, son útiles en la producción de biocombustibles [4]. Sin embargo, los avances en el uso y aplicación de las microalgas son limitados por la falta de financiamiento para la investigación, operaciones a pequeña escala y en su implementación [6].

Desde el 2020, el ITCR es contraparte nacional a la Red RENUWAL, una colaboración multidisciplinaria que impulsa el uso sostenible de microalgas para el reciclaje de residuos en la industria y el medio ambiente, en concordancia con la Economía Circular (Figura 1). Esta red reúne a 35 grupos, incluidos centros de investigación y desarrollo (I+D) y empresas de nueve países iberoamericanos —entre ellos Costa Rica—, además de entidades de Portugal, Brasil y España, todos comprometidos con el objetivo de desarrollar estrategias innovadoras para la valorización de la biomasa algal [14].

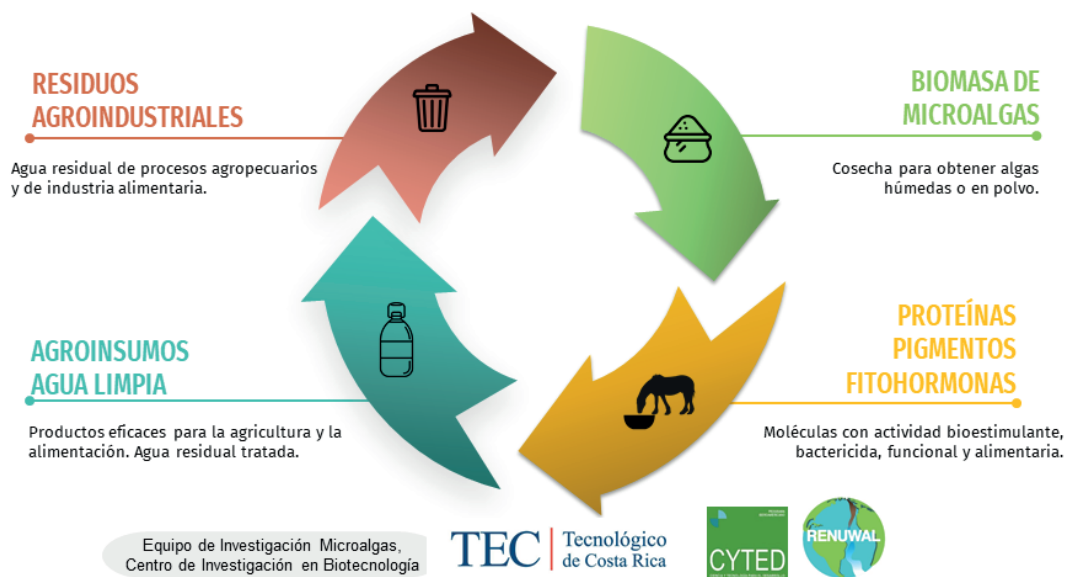


Figura 1. Revalorización de efluentes agroindustriales y producción de microalgas bajo un modelo de economía circular desarrollado en el Instituto Tecnológico de Costa Rica (Adaptado de Faith y Ferreira, 2022) [15].

En la actualidad, el ITCR cuenta con un prototipo de modelo del montaje de tanquetas y estanques para el escalamiento del cultivo microalgal, con el fin de obtener biomasa para diferentes aplicaciones (Figura 2).

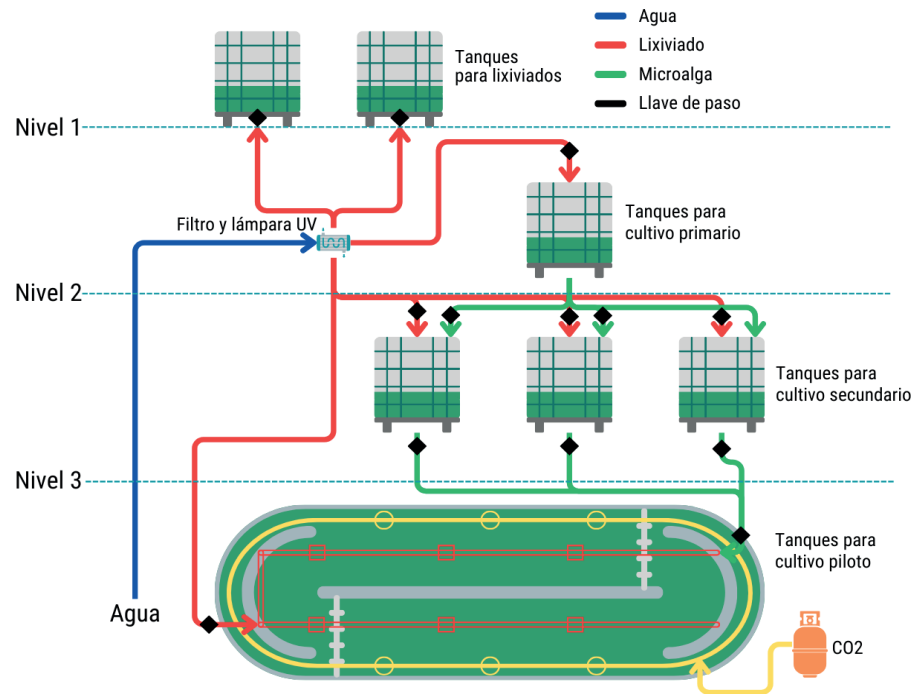


Figura 2. Prototipo modelo del montaje de las tanquetas y estanques para el escalamiento del cultivo de microalgas implementado en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Aplicaciones de las microalgas en el campo ambiental

La eficiencia en la captura de CO_2 de las microalgas es notablemente alta con respecto a las plantas terrestres; en comparación, se estima que las microalgas pueden capturar hasta 10 veces más CO_2 que las plantas; por ejemplo, 280 toneladas/ha/año de microalgas secuestran 514 toneladas de CO_2 consumiendo un 10% de energía solar [7]. Esta alta eficiencia se debe a varios factores, incluyendo su rápida tasa de crecimiento, y su capacidad para crecer en condiciones adversas y para utilizar diferentes fuentes de carbono, como el CO_2 atmosférico, el bicarbonato, y el dióxido de carbono disuelto en el agua [8]. Por lo anterior, pueden emplearse en sistemas de captura y almacenamiento de carbono, donde aprovechan CO_2 de emisiones industriales o de combustión y lo convierten en biomasa que puede ser utilizada para la producción de biocombustibles o productos químicos [1]. También son útiles en sistemas de tratamiento de aguas residuales para eliminar contaminantes y nutrientes como el nitrógeno y el fósforo [9] y, durante este proceso, capturan CO_2 y producen oxígeno, lo que ayuda a mejorar aún más la calidad del agua y reducir la huella de carbono del proceso de tratamiento de aguas residuales en general [10].

La capacidad única de las microalgas para degradar una amplia gama de contaminantes orgánicos e inorgánicos, como hidrocarburos, metales pesados y pesticidas [11], las convierte en una herramienta eficaz para la biorremediación de aguas y suelos contaminados. Además, producen enzimas y compuestos bioactivos, que las hacen ideales para la recuperación de entornos contaminados porque aceleran los procesos naturales de restauración [12].

El grupo de investigación en microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR inició sus investigaciones estudiando las propiedades de algunas microalgas nativas de Costa Rica. Las aplicaciones ambientales (Cuadro 1) iniciaron en el año 2013, cuando se inició el

primer proyecto enfocado en el aprovechamiento de residuos, en donde se aprovechó parte del efluente de un biodigestor y un emisor de CO₂. Algunos de los proyectos más recientes desarrollados en esta área se han centrado en la disminución de las huellas de carbono en la producción de peces de cultivo. Los resultados preliminares han mostrado que el uso de microalgas acoplado a un aprovechamiento de los efluentes del cultivo puede reducir la huella de carbono de la producción de tilapia a valores cercanos a cero cuando se comercializan las tilapias en comunidades cercanas al sitio de producción.

Por otro lado, el proyecto “Desarrollo de una estrategia interinstitucional para la reducción de contaminantes emergentes en cuerpos de agua de la GAM, Costa Rica” busca aprovechar las capacidades de las microalgas para la recuperación de cuerpos de agua urbanos. Los resultados preliminares del proyecto muestran que las aguas de cuerpos de agua urbanos analizados presentan toxicidad a pesar de que no se detecten contaminantes comunes o emergentes conocidos. Se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas más de 80 compuestos relacionados con contaminación por aire, plaguicidas, fármacos y otros, sin encontrar ninguno en niveles elevados, por lo que se considera que las cantidades están por debajo de límites de alerta o detección; sin embargo, es posible que la acción conjunta de varios compuestos genere toxicidad, que se evidenció mediante la prueba de inhibición del crecimiento según directrices de la OCDE para el ensayo de sustancias químicas, sección 2, prueba 201 “Algas de Agua Dulce y Cianobacterias”. A pesar de que el origen certero de la toxicidad se desconoce, el cultivo de microalgas eliminó el efecto tóxico, evaluado como inhibición del crecimiento, de las muestras de cuerpos de agua urbanos, y se están realizando pruebas de ajustes de dosis en condiciones de campo variables, con lo cual se busca generar una guía para la implementación de procesos de biorremediación en cuerpos de agua contaminados.

Cuadro 1. Proyectos desarrollados en el campo ambiental por el Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR).

| Proyecto | Productos | Financiamiento | Vigencia y estado actual |
|---|--|--|-------------------------------|
| Biorrefinería de microalgas: Desarrollo de un proceso integral sostenible para la producción de compuestos bioactivos a base de microalgas para la agricultura, ganadería y acuicultura | Sistema de cultivo de microalgas mediante consorcios. Artículo publicado “Advances in the Development of Biofertilizers and Biostimulants from Microalgae” [13] | Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT); Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) | 2021-2023 Finalizado |
| Acuicultura Descarbonizada: Mitigación de carbono mediante la generación de suplementos alimenticios con microalgas nativas | Modelos de producción y aprovechamiento de biomasa microalgal con muy baja huella de carbono | Ministerio de Planificación Nacional y Política Económica (MIDEPLAN)-Unión Europea | 2022 - 2023 Finalizado |
| Desarrollo de una estrategia interinstitucional para la reducción de contaminantes emergentes en cuerpos de agua de la GAM, Costa Rica | Desarrollo de procesos de biorremediación con microalgas en cuerpos de agua contaminados | Vicerrectoría de Investigación y Extensión, ITCR | 2023 - 2024 En proceso |

Aplicaciones de las microalgas en el campo alimenticio

Las aplicaciones de las microalgas en la alimentación humana y animal son campos en auge en Costa Rica, siendo más diversos los reportes en el sector agropecuario y más recientemente dirigidos a la alimentación humana.

Productos alimenticios en el sector agropecuario

El primer proyecto del ITCR en este tema realizó un estudio de factibilidad para la producción de la microalga espirulina y su utilización en el concentrado para cerdos en el año 2019 [16]. La colaboración entre el ITCR y Grupo Zamora concluyó en el diseño del proceso e infraestructura requerida para el aprovechamiento de las microalgas para el tratamiento de aguas residuales, la captura de carbono y como fuente de alimento rico en proteínas para animales. La inversión proyectada para una producción en 1 ha de terreno fue de aproximadamente USD 1.3 millones para operar durante 5 años, lo cual se considera un valor promedio para proyectos de esta dimensión. Además, se resaltó que el costo del recurso humano es elevado, debido a la mano de obra intensiva necesaria por la falta de tecnología especializada.

En 2017, se estudiaron dietas con y sin microalgas para pollos de engorde y se evaluó la conversión alimenticia de la progenie resultante. Tras el análisis de la penetración espermática durante 24 semanas, se encontró una mayor fertilidad en las aves tratadas con microalgas [17]. Una investigación subsiguiente desarrollada conjuntamente por el Laboratorio de Microalgas del ITCR y la escuela de Zootecnia de la Universidad de Costa Rica (UCR) reveló el potencial de *Arthrospira maxima* como aditivo en alimento para gallinas ponedoras. La inclusión de 4% de microalgas en las dietas no afectó el rendimiento productivo, mientras que un 6% de microalgas generó un color de yema aceptable para el mercado local sin necesidad de colorantes en el concentrado [18].

En el campo acuícola se emplea el fitoplancton cultivado para satisfacer necesidades nutricionales en fases larvianas de peces y especies marinas; el fitoplancton se utiliza en forma de pasta preservada congelada o incorporada en los alimentos formulados [19]. En esta línea, el Laboratorio de Fitoplancton de la Universidad Nacional (UNA), ubicado en la Estación de Biología Marina en Puntarenas, suministra *Isochrysis sp.* para alimentar ostras [20]. En colaboración con este laboratorio, el ITCR investigó los efectos de la longitud de onda de luz, el fotoperiodo y la salinidad en la producción de *Isochrysis galbana*[21].

El ITCR, en colaboración con el Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura (INCOPESCA), ha progresado en la investigación del potencial de la microalga *A. maxima* como suplemento en dietas acuícolas, lo que resultó en el desarrollo de un alimento suplementado que reduce el factor de conversión alimenticia en tilapia de 2.3 a 1.67 en ejemplares de 141 días de edad. Además, se ha proporcionado capacitación en este tema a 87 productores, con el apoyo de la Unión Europea y la Promotora Costarricense de Innovación e Investigación [22].

Investigación y aplicaciones para el consumo humano

Más allá de la alimentación animal, las microalgas son reconocidas por sus beneficios nutricionales en la dieta humana. Ricas en proteínas, hierro, vitamina B, ácidos grasos y antioxidantes, las microalgas se consideran alimentos de alto valor nutricional y un complemento ideal de las dietas basadas en plantas. A nivel nutraceutico, se ha evidenciado el efecto positivo del consumo de cápsulas de espirulina en la reducción de ansiedad y reducción de tejido graso en mujeres universitarias [23]. Investigaciones recientes han identificado isómeros de α -tocomonoenol en microalgas [24], subrayando el valor nutricional que aportan estos microorganismos. Tales hallazgos apuntan hacia las microalgas como una fuente prometedora de compuestos esenciales beneficiosos para la salud y la nutrición.

La investigación del ITCR sobre tecnologías de cultivo y procesamiento ha sido sumamente importante para obtener biomasa microalgal de alta calidad, que conserve sus propiedades nutricionales y sensoriales, con miras al uso de las microalgas como materia prima de diversos alimentos, en porcentajes mayores a una dosis nutraceútica.

En esta línea, el Laboratorio de Microalgas del ITCR ha gestado varios proyectos (Cuadro 2) para buscar soluciones tecnológicas para incorporarlas en alimentos, con un enfoque centrado en el consumidor, para satisfacer las necesidades nutricionales y maximizar la aceptación sensorial. El proyecto “Desarrollo de un producto alimenticio a partir de biomasa microalgal de *Arthrospira maxima* con alto valor nutricional”, con la participación del ITCR, la UCR y el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), permitió desarrollar una metodología de procesamiento de la biomasa de *A. maxima* y la creación de una fórmula cítrica de una bebida con espirulina. Por su parte, en el proyecto “Alimentómica de microalgas”, se investigó la producción de biomasa de diversas microalgas enriquecida con oligoelementos, y posteriormente la incorporación en prototipos de alimento animal y humano. En este mismo proyecto Corrales [26], investigó diversos tratamientos de desodorización de la biomasa del alga *A. maxima* con miras a la incorporación en una barra de cereal; entre estos, se probó la fermentación de la biomasa microalgal con levaduras y bacterias, y la adición de esencias naturales previas al secado. Los resultados mostraron el potencial de la fermentación alcohólica para mejorar el aroma, así como el aumento de la aceptabilidad general de la biomasa seca con la adición de esencia de menta [26].

Cuadro 2. Proyectos desarrollados en el campo alimenticio por el Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR).

| Proyecto | Productos | Financiamiento | Vigencia y Estado |
|---|---|--|---------------------------|
| Desarrollo de un producto alimenticio a partir de biomasa microalgal de <i>Arthrospira maxima</i> con alto valor nutricional | Proceso para producción/ cosecha/secado y caracterización fisicoquímica de <i>A. maxima</i> Producto mínimo viable de una bebida verde fuente de proteína microalgal de <i>A. maxima</i> | Consejo Nacional de Rectores (CONARE) | 2020 - 2023 Finalizado |
| Alimentómica de microalgas: determinación de metabolitos primarios y secundarios en biomazas microalgales para la elaboración de alimentos funcionales | Protocolo de producción de microalgas suplementadas con Manganeso y Selenio Protocolo para obtención de nibs de <i>A. maxima</i> suplementada y deodorizada Fórmula de una barra de cereal suplementada con <i>I. galbana</i> | Vicerrectoría de Investigación y Extensión, ITCR | 2020 - 2023 Finalizado |
| Caracterización del contenido proteico y lipídico de biomazas obtenidas de las microalgas <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Arthrospira maxima</i> como fuente potencial en alimentos funcionales (FASE I) | Caracterización físico química de las biomazas microalgales | Vicerrectoría de Investigación y Extensión, ITCR | 2018- 2019 Finalizado |
| Desarrollo sostenible en acuicultura: Nutrición de alevines con nuevo suplemento microalgal rico en proteína | Un producto mínimo viable de alimento extrusado para tilapia, suplementado con <i>A. maxima</i> | Vicerrectoría de Investigación y Extensión, ITCR | 2021-2022 Finalizado |

Aplicaciones de las microalgas en el campo agrícola

Las microalgas juegan un papel importante ante los retos de la agricultura, que garantizan la seguridad alimentaria y, a la vez, de hacerlo con prácticas sostenibles. Diversas investigaciones han demostrado el efecto de las microalgas como fijadoras de nitrógeno [28], participantes del ciclo del fósforo [29], efectos moduladores en las comunidades microbiológicas [30], promotoras de crecimiento de otras especies, reciclaje de nutrientes, liberación de fitohormonas, efectos biocontroladores [31], [32] y de estabilización del suelo [31], [33]. Las microalgas tienen también la capacidad de fijar el dióxido de carbono CO_2 [34] y producir carbohidratos simples o exopolisacáridos que ayudan a mejorar la estructura del suelo [35].

Las microalgas incluyen a un diverso grupo de microorganismos fotosintéticos que incluye Cianobacterias (organismos procariontes) y eucariotas. Las cianobacterias pueden utilizarse como biofertilizantes porque pueden fijar nitrógeno atmosférico (N_2) y solubilizar el fósforo que se encuentra inmovilizado en el suelo [36].

También se pueden utilizar las microalgas como bioestimulantes, en donde diversas investigaciones han mostrado efectos positivos en cultivos agrícolas, como incremento en la longitud de las raíces, aumento en las cosechas, mejora en la calidad de los frutos, tolerancia a la salinidad, aumento en la actividad fotosintética y resistencia al ataque de patógenos.

En el ITCR se ha desarrollado la investigación en el uso de las microalgas en la agricultura en diversos proyectos (Cuadro 3); desde el año 2017 se inició con el proyecto “Evaluación del potencial biofertilizante de la biomasa de especies de microalgas nativas de Costa Rica” el cual tenía como objetivo determinar el potencial biofertilizante de la biomasa microalgal utilizando tres especies de microalgas nativas de Costa Rica. En este primer abordaje fue posible demostrar el efecto positivo de la aplicación de las microalgas en cultivos como chile dulce, alcanzando incrementos en la producción de hasta un 20%. Posteriormente, por medio del proyecto “Determinación de las características fisicoquímicas y evaluación de la viabilidad económica de un prototipo de biofertilizante a base de microalgas costarricenses (Fase II)” se logró avanzar en el desarrollo de microalgas como bioinsumo agrícola mediante una formulación que permitió mantener la viabilidad de las microalgas a temperatura ambiente. Posteriormente se inició el proyecto “NanoBiofertilizantes: Uso de arcillas en la preparación de Emulsiones de *Pickering* para formulados agrícolas a partir de biomasa microalgal de *Arthrospira máxima*”, en el cual se combinaron los beneficios de las arcillas con las microalgas, en este caso como agentes surfactantes para la generación de bioinsumos en los que se reduce el uso de ingredientes derivados del petróleo.

Con estos avances a nivel académico, se detectó la necesidad de poder llevar estas tecnologías a los agricultores, por lo que actualmente se trabaja en propuestas de proyectos de extensión para poder validar y transferir la implementación de las microalgas en los programas de manejo de diversos cultivos en Costa Rica.

Cuadro 3. Proyectos desarrollados en el campo agrícola por el Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR).

| Proyecto | Productos | Financiamiento | Vigencia y estado |
|---|---|--|---------------------------|
| Evaluación del potencial biofertilizante de la biomasa de especies de microalgas nativas de Costa Rica | Resultados de campo del efecto de las microalga en hortalizas. Artículo publicado "Biotecnología microalgal en Costa Rica: Oportunidades de negocio para el sector productivo nacional" [37] | Vicerrectoría de Investigación y Extensión, ITCR | 2017 – 2018 Finalizado |
| Determinación de las características fisicoquímica y evaluación de la viabilidad económica de un prototipo de biofertilizante a base de microalgas costarricenses (Fase II) | Formulación de bioestimulantes con biomasa de microalga (secreto industrial) | Vicerrectoría de Investigación y Extensión, ITCR | 2019- 2021 Finalizado |
| NanoBiofertilizantes: Uso de arcillas en la preparación de Emulsiones de <i>Pickering</i> para formulados agrícolas a partir de biomasa microalgal de <i>Arthrospira máxima</i> | Formulación de emulsiones Pickering | Vicerrectoría de Investigación y Extensión, ITCR | 2020 –2023 Finalizado |

Aplicaciones de las microalgas en el campo de los biocombustibles

Desde hace unos años, Costa Rica ha estado promocionando el uso de biocombustibles como una alternativa sostenible a los combustibles fósiles. En el país la principal fuente de biocombustibles es el etanol derivado de los cultivos de la caña de azúcar [38] y el biodiesel obtenido de los cultivos de aceite de palma [39] y de *Jatropha* [40]. La producción de biocombustibles se realiza principalmente a nivel local, lo que contribuye a la seguridad energética y al desarrollo económico rural. En el sector de transportes los biocombustibles derivados de los cultivos de la caña de azúcar y de la palma aceitera [41], se mezclan con la gasolina y el diésel convencionales [42] para reducir las emisiones de carbono [43] y mejorar la calidad del aire.

En Costa Rica el uso de microalgas como materia prima para elaborar biocombustible, es un área de investigación y desarrollo que ha ganado interés en los últimos años, por su potencial para ofrecer una fuente de energía renovable y sostenible [35],[44]. El país posee ecosistemas adecuados para el cultivo de microalgas, incluyendo estanques, lagunas y áreas costeras. La alta radiación solar y las condiciones climáticas idóneas en algunas regiones del país también favorecen el crecimiento de microalgas [45], [46], [47]. Estos microorganismos pueden ser una fuente prometedora de biocombustibles debido a su alta productividad en la fotosíntesis [48] y a su capacidad para acumular lípidos [49], [50], que pueden ser convertidos en biodiesel [51], [52]. El cultivo de microalgas para biocombustibles ofrece varios beneficios ambientales, incluyendo la captura de dióxido de carbono (CO₂) atmosférico durante la fotosíntesis [44], [53] y la capacidad de crecer en aguas residuales, lo que podría contribuir a la depuración de estas [54].

El ITCR ha estado investigando de forma proactiva el uso de microalgas para la producción de biocombustibles como parte de su compromiso con la investigación en energías renovables y sostenibles. El Laboratorio de Microalgas ha realizado proyectos de investigación para estudiar el cultivo de microalgas para producir biocombustibles (Cuadro 4). Estos proyectos se han centrado tanto en identificar regiones del país donde las condiciones climatológicas favorezcan el cultivo de las microalgas, así como en identificar cepas de microalgas adecuadas para optimizar las condiciones de cultivo localmente y en desarrollar métodos eficientes de cultivo y extracción de lípidos.

Cuadro 4. Proyectos desarrollados en el campo de los biocombustibles por el Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR).

| Proyecto | Productos | Financiamiento | Vigencia y estado actual |
|--|---|---|--------------------------|
| Desarrollo de un sistema integrado de microalgas para la producción de aceites, acoplado a un biodigestor y a un emisor de CO ₂ | Prototipo modelo del montaje de las tanquetas y estanques para el escalamiento del cultivo microalgal | Vicerrectoría de Investigación y Extensión, ITCR Banco Interamericano de Desarrollo (BID) \$185,000 USD | 2013 –2015 Finalizado |
| Caracterización de actividad lipasa endógena de especies de microalgas y desarrollo de transesterificación <i>in situ</i> para la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos, como materia prima para biocombustibles | Perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) determinados mediante análisis por cromatografía de gases de una transesterificación <i>in situ</i> por medio de catálisis enzimática de <i>I. galbana</i> . | Vicerrectoría de Investigación y Extensión, ITCR | 2020–2023 Finalizado |

Durante la ejecución del proyecto “Desarrollo de un sistema integrado de microalgas para la producción de aceites, acoplado a un biodigestor y a un emisor de CO₂” se instalaron estanques de producción microalgal acoplados a biodigestores, utilizados por las industrias para mitigar la contaminación por desechos sólidos; además, se les integraron a los cultivos de microalgas fuentes emisoras de CO₂. Los tres sistemas integrados funcionan sosteniéndose uno al otro. Las microalgas necesitan CO₂ para su crecimiento que viene de la industria emisora, y nutrientes que fueron extraídos de los fluidos desechados en el proceso final de la descomposición orgánica del biodigestor, y la energía producida por el biodigestor se utiliza para mover el sistema microalgal (Figura 2). Los tres procesos son de bajo costo, lo que permitió que se lograran instaurar en diversos sitios del país. La producción de biomasa y lípidos a partir de *Chlorella vulgaris* en este sistema generó 0.16 g/L/día de biomasa y 0.025 g/L/día de lípidos, lo cual es comparable con otros estudios con *Chlorella* que han obtenido entre 0.01 – 0.20 g/L/día de biomasa y entre 0.004 – 0.037 g/L/día de lípidos [55], [56], [57]. Por su parte, el proyecto “Caracterización de actividad lipasa endógena de especies de microalgas y desarrollo de transesterificación *in situ* para la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos, como materia prima para biocombustibles” tuvo como objetivo principal investigar las lipasas endógenas presentes en las microalgas, y caracterizar su actividad enzimática. Estas enzimas tienen la capacidad de catalizar la hidrólisis de lípidos en ácidos grasos y glicerol; esto es fundamental para producir biocombustibles (ácidos grasos que pueden transformarse en biodiesel) a partir de materiales biológicos [58]; también pueden utilizarse aceites vegetales o grasas animales como sustratos.

El trabajo desarrollado en el Laboratorio de Microalgas del ITCR sobre biocombustibles de microalgas no se ha limitado a la investigación académica, sino que se ha enfocado en la transferencia de tecnología y en la promoción de aplicaciones industriales. A su vez, se mantiene el objetivo del desarrollo de proyectos piloto o la colaboración con empresas públicas o privadas interesadas en la producción comercial de biocombustibles a partir de microalgas. A medida que avanza la investigación y el desarrollo en esta área, se espera que las microalgas jueguen un papel importante en la transición hacia una economía más sostenible y respetuosa con el ambiente.

Desafíos y oportunidades de las aplicaciones microalgales en Costa Rica

El uso de microalgas para la producción de biocombustibles representa una prometedora alternativa ambiental y económica ya que son productoras de aceites, carbohidratos [59] (materia prima para biocombustibles); o bien comprimida la biomasa en forma de pellets para producción de calor y energía [60], [61]; además, a partir de esta biomasa es posible obtener enzimas, proteínas, pigmentos o producir biofertilizantes [62]; producción de compuestos bioactivos para usos terapéuticos bajo modelos sostenibles [27]; y alimento para humanos y animales, lo que permitiría aplicar el concepto de bioeconomía [63].

Entre los desafíos que deben abordarse para que el uso de microalgas como biocombustible sea viable en Costa Rica, se señalan la selección de cepas adecuadas, la optimización de las condiciones de cultivo, la maximización de la productividad y la viabilidad económica de la producción a gran escala.

A nivel ambiental y alimentario, a pesar de los reconocidos beneficios y aplicaciones de las microalgas, la limitada capacidad de producción local para satisfacer la demanda de alimentos y piensos, especialmente para acuicultura, ha requerido la importación de microalgas. Esta dependencia resalta la oportunidad para el desarrollo e investigación y subraya la necesidad de inversiones en capacidades de producción local. Además, la expansión de las microalgas en los sectores agrícola y de alimentos enfrenta desafíos como la aceptación del mercado, limitaciones tecnológicas para el cultivo a gran escala, y la competencia con fuentes de proteínas ya establecidas. Incentivos para la investigación, el desarrollo y la comercialización de productos basados en microalgas podrían catalizar avances en este sector.

En los análisis y estudios de factibilidad realizados para los proyectos de microalgas en el ITCR, se ha determinado que los costos de producción son superiores a los comparados con el uso de materias primas convencionales debido a las economías de escala y requerimientos de mano de obra especializada, entre otros. Los proyectos resultan viables, con indicadores financieros favorables, como la tasa interna de retorno (TIR) y valor actual neto (VAN), donde se ha determinado que se recupera la inversión inicial y se proyectan ganancias adicionales, lo que indica una viabilidad financiera de los proyectos y potencial económico a futuro.

Además, se han identificado limitaciones para llevar los productos al mercado, sobre todo relacionados con la transferencia de tecnología y conocimientos al sector productivo desde la universidad, ya que no hay un modelo para la transferencia de resultados de investigación ni mecanismos de apoyo que favorezcan el proceso.

Conclusiones

Las investigaciones en el tema de biotecnología microalgal en el ITCR han mostrado que estos organismos pueden ser utilizados para resolver necesidades en áreas como la ambiental, la alimenticia, la agrícola y la de los biocombustibles. Pese a las bondades de estos microorganismos, hay retos; entre ellos, la selección adecuada de cepas, direccionadas

para las diferentes aplicaciones, mejorar los rendimientos productivos en sistemas abiertos de cultivo y disminuir los costos de producción. También se requiere aumentar la conciencia sobre los beneficios nutricionales y ambientales de las microalgas entre consumidores y partes interesadas para impulsar la demanda y la aceptación de estos productos y aplicaciones.

Los 20 años de estudios del ITCR en diversas microalgas autóctonas y las aplicaciones más recientes que aprovechan las propiedades de las microalgas para captura de CO₂ y para biorremediación, han trazado una ruta hacia la sostenibilidad y la mitigación del cambio climático. En el futuro, se espera que la investigación en microalgas continúe avanzando en el ITCR, explorando nuevas aplicaciones y optimizando los procesos existentes. Además, es fundamental continuar fomentando la colaboración entre la academia, la industria y el gobierno para impulsar el desarrollo y la implementación de tecnologías basadas en microalgas. Estas colaboraciones pueden facilitar la transferencia de conocimientos, acelerar la adopción de tecnologías sostenibles y promover el crecimiento económico y ambientalmente responsable.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por financiar y apoyar la Investigación desarrollada en el Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR. También agradecen al INCOPECSA por el apoyo técnico hacia el ITCR en la investigación acuícola desarrollada conjuntamente con el Laboratorio de Microalgas; a la Unión Europea-MIDEPLAN por financiar el proyecto “Acuicultura descarbonizada (2022-2023)”, y al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo-CYTED (a través de la Red RENUWAL 320rt0005).

Referencias

- [1] E. S. J. Thoré, K. Muylaert, M. G. Bertram, y T. Brodin, «Microalgae», *Current Biology*, vol. 33, n.º 3, pp. R91-R95, 2023, doi: 10.1016/j.cub.2022.12.032.
- [2] L. E. Rioux *et al.*, «Commercial and industrial applications of micro algae – A review», *J Appl Phycol*, vol. 5, n.º 1, pp. 52-63, 2014, doi: 10.1021/jf901070g.
- [3] N. Renuka, A. Guldhe, R. Prasanna, P. Singh, y F. Bux, «Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges», *Biotechnol Adv*, vol. 36, n.º 4, pp. 1255-1273, 2018, doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.04.004.
- [4] B. A. Abdulmajeed y A. R. Ibrahim, «Potential of Microalgae Cultivation in Dairy Wastewater as a Step in Low-Cost Biofuel Production», *Journal of Engineering*, vol. 24, n.º 4, p. 58, 2018, doi: 10.31026/j.eng.2018.04.04.
- [5] Y. Su, K. Song, P. Zhang, Y. Su, J. Cheng, y X. Chen, «Progress of microalgae biofuel's commercialization», *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 74, pp. 402-411, jul. 2017, doi: 10.1016/J.RSER.2016.12.078.
- [6] P. Loke Show, «Global market and economic analysis of microalgae technology: Status and perspectives», *Bioresour Technol*, vol. 357, p. 127329, ago. 2022, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2022.127329.
- [7] M. Hasnain *et al.*, «Utilization of microalgal-bacterial energy nexus improves CO2 sequestration and remediation of wastewater pollutants for beneficial environmental services», *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 267, n.º October, p. 115646, 2023, doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.115646.
- [8] Y. Yang, S. Tang, y J. P. Chen, «Carbon capture and utilization by algae with high concentration CO2 or bicarbonate as carbon source», *Science of the Total Environment*, vol. 918, n.º January, p. 170325, 2024, doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.170325.
- [9] L. N. Nguyen *et al.*, «Nutrient Removal by Algae-Based Wastewater Treatment», *Curr Pollut Rep*, vol. 8, n.º 4, pp. 369-383, 2022, doi: 10.1007/s40726-022-00230-x.
- [10] A. Abdelfattah *et al.*, «Microalgae-based wastewater treatment: Mechanisms, challenges, recent advances, and future prospects», *Environmental Science and Ecotechnology*, vol. 13, p. 100205, 2023, doi: 10.1016/j.ese.2022.100205.
- [11] H. E. S. Touliabah, M. M. El-Sheekh, M. M. Ismail, y H. El-Kassas, «A Review of Microalgae-and Cyanobacteria-Based Biodegradation of Organic Pollutants», *Molecules*, vol. 27, n.º 3, 2022, doi: 10.3390/molecules27031141.



- [12] L. M. Gonzalez-Gonzalez y L. E. De-Bashan, «The Potential of Microalgae–Bacteria Consortia to Restore Degraded Soils», *Biology (Basel)*, vol. 12, n.º 5, p. 693, may 2023, doi: 10.3390/biology12050693.
- [13] A. M. Miranda, F. Hernandez-Tenorio, F. Villalta, G. J. Vargas, y A. A. Sáez, «Advances in the Development of Biofertilizers and Biostimulants from Microalgae», *Biology (Basel)*, vol. 13, n.º 3, pp. 1-19, 2024, doi: 10.3390/biology13030199.
- [14] «CYTED». Accedido: 7 de abril de 2024. [En línea]. Disponible en: RENUWAL - Red iberoamericana para el tratamiento de efluentes con microalgas
- [15] M. Faith y A. Ferreira, «Infografías RED RENUWAL - CYTED». Accedido: 9 de abril de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.cytmed.org/assets/img/redes/108/publicacao/Infografías Red Renuwal - 1 Edición.pdf>
- [16] J. Umaña Venegas, «Es factible producir microalgas para alimento animal y a la vez ayudar al ambiente», Hoy en el TEC. Accedido: 2 de abril de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.tec.ac.cr/hoyeneltec/2019/09/11/factible-producir-microalgas-alimento-animal-vez-ayudar-ambiente>
- [17] N. Rojas Araya, «Efecto de la suplementación con harina de microalgas sobre el desempeño de reproductores pesados», Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica, 2017.
- [18] G. Poveda-Viquez, F. Villalta-Romero, F. Murillo-Vega, M. Guerrero-Barrantes, y C. Salas-Durán, «Effect of inclusion of *Arthrospira maxima* microalgae in laying hen diets on production parameters and egg characteristics», *Revista Brasileira de Ciencia Avícola / Brazilian Journal of Poultry Science*, vol. 25, n.º 4, 2023, doi: 10.1590/1806-9061-2022-1753.
- [19] R. Mariculture, «INSTANT ALGAE® | SINGLE SPECIES FEEDS – Reed Mariculture». Accedido: 4 de abril de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://reedmariculture.com/collections/instant-algae-feeds>
- [20] Michelle Soto, «Ostras comen dos toneladas de microalgas cada día | La Nación», San José, 8 de julio de 2017. [En línea]. Disponible en: <https://www.nacion.com/ciencia/medio-ambiente/ostras-comen-dos-toneladas-de-microalgas-cada-dia/LBC46R62TFAZNDVAIBXPF5RCAA/story/>
- [21] S. Ramírez-Flores, M. Guerrero-Barrantes, F. Murillo-Vega, y F. Villalta-Romero, «Efectos de la longitud de onda de luz, el fotoperiodo y la salinidad en los parámetros de producción de *Isochrysis galbana*», *Revista Tecnología en Marcha*, 2023, doi: 10.18845/TM.V3711.6693.
- [22] J. Umaña Venegas, «Alimento con microalgas mejora sustancialmente la producción en tilapias», Hoy en el TEC. Accedido: 2 de abril de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.tec.ac.cr/hoyeneltec/2023/10/09/alimento-microalgas-mejora-sustancialmente-produccion-tilapias>
- [23] M. M. Beltranena Falla de Enríquez, L. F. Aragón Vargas, y W. Salazar Rojas, «III Simposio Internacional en Ciencias del Deporte y la Salud», en *III simposio Internacional en Ciencias del Deporte y la Salud*, 1996, pp. 24-31.
- [24] A. Montoya-Arroyo, K. Lehnert, P. E. Lux, y others, «11'- α -Tocomonoenol is the major α -tocomonoenol isomer in cyanobacteria and microalgae from Costa Rica», *Journal of Food Composition and Analysis*, 2022, [En línea]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157521005251>
- [25] F. Bolaños Quirós y A. M. Quiros Blanco, «Desarrollo de un prototipo de bebida verde utilizando espirulina (*Arthrospira* sp.) como ingrediente», 2023.
- [26] C. Corrales Picado, «Establecimiento de un pretratamiento de desodorización óptimo para alterar el perfil organoléptico de *Arthrospira maxima* antes de su adición como suplemento alimenticio en barras de cereal.», Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2023.
- [27] K. Núñez-Montero, M. Guerrero-Barrantes, y O. Gómez-Espinoza, «Microalgae-based approaches to overcome the effects of the COVID-19 pandemic», *Tecnología en Marcha*, vol. 35, n.º May, pp. 84-93, 2022.
- [28] J. S. Singh, A. Kumar, A. N. Rai, y D. P. Singh, «Cyanobacteria: A precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability», *Front Microbiol*, vol. 7, n.º APR, pp. 1-19, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00529.
- [29] N. Siebers *et al.*, «Towards phosphorus recycling for agriculture by algae: Soil incubation and rhizotron studies using ^{33}P -labeled microalgal biomass», *ALGAL RESEARCH-BIOMASS BIOFUELS AND BIOPRODUCTS*, vol. 43, 2019, doi: 10.1016/j.algal.2019.101634.
- [30] X. Song *et al.*, «Potential applications for multifunctional microalgae in soil improvement», *Front Environ Sci*, vol. 10, n.º October, pp. 1-10, 2022, doi: 10.3389/fenvs.2022.1035332.
- [31] J. A. V Costa, B. C. B. Freitas, C. G. Cruz, J. Silveira, M. G. Morais, y A. L. Gonçalves, «The Use of Microalgae and Cyanobacteria in the Improvement of Agricultural Practices: A Review on Their Biofertilising,

- Biostimulating and Biopesticide Roles», *APPLIED SCIENCES-BASEL*, vol. 11, n.º 5, pp. 366-375, 2021, doi: 10.1080/03601234.2019.1571366.
- [32] J. A. V Costa, B. C. B. Freitas, C. G. Cruz, J. Silveira, y M. G. Morais, «Potential of microalgae as biopesticides to contribute to sustainable agriculture and environmental development», *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH PART B-PESTICIDES FOOD CONTAMINANTS AND AGRICULTURAL WASTES*, vol. 54, n.º 5, pp. 366-375, 2019, doi: 10.1080/03601234.2019.1571366.
- [33] A. L. Alvarez, S. L. Weyers, H. M. Goemann, B. M. Peyton, y R. D. Gardner, «Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture», *ALGAL RESEARCH-BIOMASS BIOFUELS AND BIOPRODUCTS*, vol. 54, 2021, doi: 10.1016/j.algal.2021.102200.
- [34] V. E. J. Jassey *et al.*, «Contribution of soil algae to the global carbon cycle», *New Phytologist*, vol. 234, n.º 1, pp. 64-76, 2022, doi: 10.1111/nph.17950.
- [35] B. Ramakrishnan, N. R. Maddela, K. Venkateswarlu, y M. Megharaj, «Potential of microalgae and cyanobacteria to improve soil health and agricultural productivity: a critical view», *Environmental Science: Advances*, vol. 2, n.º 4, pp. 586-611, 2023, doi: 10.1039/d2va00158f.
- [36] A. L. Alvarez, S. L. Weyers, H. M. Goemann, B. M. Peyton, y R. D. Gardner, «Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture», *Algal Res*, vol. 54, p. 102200, abr. 2021, doi: 10.1016/J.ALGAL.2021.102200.
- [37] F. Villalta-Romero, F. Murillo-Vega, B. Martínez-Gutiérrez-, J. Valverde-Cerdas, A. Sánchez-Kopper, y M. Guerrero-Barrantes, «Microalgal biotechnology in Costa Rica : Business opportunities to the national productive sector Biotecnología microalgal en Costa Rica : Oportunidades de negocio para el sector productivo nacional», *Tecnología en Marcha*, vol. 32, pp. 85-93, 2019.
- [38] RECOPE, «Estudio de factibilidad del proyecto de mezcla de gasolina con etanol a nivel nacional», 2020. [En línea]. Disponible en: <https://www.recope.go.cr/wp-content/uploads/2020/02/ESTUDIO-FACTIBILIDAD.pdf>
- [39] L. P. Vega, K. T. Bautista, H. Campos, S. Daza, y G. Vargas, «Biofuel production in Latin America: A review for Argentina, Brazil, Mexico, Chile, Costa Rica and Colombia», *Energy Reports*, vol. 11, n.º October 2023, pp. 28-38, 2024, doi: 10.1016/j.egyr.2023.10.060.
- [40] E. Arnáez-Serrano *et al.*, «Establecimiento de cultivos bioenergéticos como fuente de energías alternativas, mediante el desarrollo de materiales de siembra en tres sitios de Costa Rica», *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 32, pp. 25-34, 2019, doi: 10.18845/tm.v32i6.4225.
- [41] Ministerio de Ambiente y Energía MINAE, *VII Plan Nacional de Energía 2015-2030*. 2015.
- [42] Ministerio de Ambiente y Energía ; Ministerio de Agricultura y Ganadería, *Reglamento de Biocombustibles líquidos y sus mezclas. Gobierno de la República de Costa Rica*. http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=83579&nValor3=107514&strTipM=TC, 2016. [En línea]. Disponible en: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=83579&nValor3=107514&strTipM=TC
- [43] M. Antar, D. Lyu, M. Nazari, A. Shah, X. Zhou, y D. L. Smith, «Biomass for a sustainable bioeconomy: An overview of world biomass production and utilization», *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 139, p. 110691, abr. 2021, doi: 10.1016/J.RSER.2020.110691.
- [44] M. Cordoba-Perez y H. de Lasa, «CO₂-derived carbon capture using microalgae and sodium bicarbonate in a photobioCREC unit: Kinetic modeling», *Processes*, vol. 9, n.º 8, 2021, doi: 10.3390/pr9081296.
- [45] G. Allorent *et al.*, «UV-B photoreceptor-mediated protection of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*», *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, n.º 51, pp. 14864-14869, 2016, doi: 10.1073/pnas.1607695114.
- [46] Y. Wu, F. Yue, J. Xu, y J. Beardall, «Differential photosynthetic responses of marine planktonic and benthic diatoms to ultraviolet radiation under various temperature regimes», *Biogeosciences*, vol. 14, n.º 22, pp. 5029-5037, 2017, doi: 10.5194/bg-14-5029-2017.
- [47] C. Y. Wong, M. L. Teoh, S. M. Phang, P. E. Lim, y J. Beardall, «Interactive effects of temperature and uv radiation on photosynthesis of chlorella strains from polar, temperate and tropical environments: Differential impacts on damage and repair», *PLoS One*, vol. 10, n.º 10, pp. 1-14, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0139469.
- [48] Q. T. Gao y N. F. Y. Tam, «Growth, photosynthesis and antioxidant responses of two microalgal species, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*, to nonylphenol stress», *Chemosphere*, vol. 82, n.º 3, pp. 346-354, 2011, doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.010.
- [49] L. Li, J. Cui, Q. Liu, Y. Ding, y J. Liu, «Screening and phylogenetic analysis of lipid-rich microalgae», *Algal Res*, vol. 11, pp. 381-386, 2015, doi: 10.1016/j.algal.2015.02.028.

- [50] I. Rawat, R. Ranjith Kumar, T. Mutanda, y F. Bux, «Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production», *Appl Energy*, vol. 103, pp. 444-467, 2013, doi: 10.1016/j.apenergy.2012.10.004.
- [51] S. Isah y G. Ozbay, «Valorization of Food Loss and Wastes: Feedstocks for Biofuels and Valuable Chemicals», *Front Sustain Food Syst*, vol. 4, n.º June, 2020, doi: 10.3389/fsufs.2020.00082.
- [52] P. Maheshwari *et al.*, «A review on latest trends in cleaner biodiesel production: Role of feedstock, production methods, and catalysts», *J Clean Prod*, vol. 355, n.º November 2021, 2022, doi: 10.1016/j.jclepro.2022.131588.
- [53] M. Adamczyk, J. Lasek, y A. Skawińska, «CO₂ Biofixation and Growth Kinetics of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis gaditana*», *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 179, n.º 7, pp. 1248-1261, 2016, doi: 10.1007/s12010-016-2062-3.
- [54] A. Carrasquilla-Batista, A. Chacón-Rodríguez, F. Murillo-Vega, K. Núñez-Montero, O. Gómez-Espinoza, y M. Guerrero-Barrantes, «Characterization of biomass pellets from *Chlorella vulgaris* microalgal production using industrial wastewater», *Energy and Sustainability in Small Developing Economies, ES2DE 2017 - Proceedings*, 2017, doi: 10.1109/ES2DE.2017.8015352.
- [55] O. K. Agwa, S. N. Ibe, y G. O. Abu, «Economically effective potential of *Chlorella sp.* for biomass and lipid production», *J Microbiol Biotechnol Res*, vol. 2, n.º 1, pp. 35-45, 2012.
- [56] L. Rodolfi *et al.*, «Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor», *Biotechnol Bioeng*, vol. 102, n.º 1, pp. 100-112, ene. 2009, doi: 10.1002/BIT.22033.
- [57] Y. Liang, N. Sarkany, y Y. Cui, «Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions», *Biotechnol Lett*, vol. 31, n.º 7, pp. 1043-1049, jul. 2009, doi: 10.1007/S10529-009-9975-7.
- [58] R. R. Philippini *et al.*, «Agroindustrial Byproducts for the Generation of Biobased Products: Alternatives for Sustainable Biorefineries», *Front Energy Res*, vol. 8, n.º July, pp. 1-23, 2020, doi: 10.3389/fenrg.2020.00152.
- [59] M. Vigani *et al.*, «Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU», *Trends Food Sci Technol*, vol. 42, n.º 1, pp. 81-92, 2015, doi: 10.1016/j.tifs.2014.12.004.
- [60] M. K. Awasthi *et al.*, «Refining biomass residues for sustainable energy and bio-products: An assessment of technology, its importance, and strategic applications in circular bio-economy», *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 127, n.º May, p. 109876, 2020, doi: 10.1016/j.rser.2020.109876.
- [61] B. Khiari, M. Jeguirim, L. Limousy, y S. Bennici, «Biomass derived chars for energy applications», *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 108, n.º November 2018, pp. 253-273, 2019, doi: 10.1016/j.rser.2019.03.057.
- [62] Y. Lu y J. Xu, «Phytohormones in microalgae: A new opportunity for microalgal biotechnology?», *Trends Plant Sci*, vol. 20, n.º 5, pp. 273-282, 2015, doi: 10.1016/j.tplants.2015.01.006.
- [63] Ç. Yarkent, C. Gürlek, y S. S. Oncel, «Potential of microalgal compounds in trending natural cosmetics: A review», *Sustain Chem Pharm*, vol. 17, n.º July, 2020, doi: 10.1016/j.scp.2020.100304.

Efecto de azitromicina sobre el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*

Effect of azithromycin on the growth of *Chlorella sorokiniana*


Yariela Núñez-Salazar¹, Karina Rodríguez-Mora²,
Eddy Jirón-García³, Fabián Villalta-Romero⁴

Núñez-Salazar, Y; Rodríguez-Mora, K; Jirón-García, E; Villalta-Romero, F. Efecto de azitromicina sobre el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 69-78.


 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7610>

1 Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, Sede Caribe, Costa Rica.

 yari8952@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0002-0030-5109>


2 Unidad de Recursos Forestales, Instituto de Investigaciones en Ingeniería, Universidad de Costa Rica. Costa Rica.

 karina.rodriguez mora@ucr.ac.cr


 <https://orcid.org/0000-0001-9660-4623>

3 Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, Sede Caribe. Costa Rica.

 eddy.jiron@ucr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0002-7524-9033>

4 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 fvillalta@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0001-7484-8125>

Palabras clave

Biotecnología; cinética; microalga; microorganismo; antibióticos.

Resumen

Mediante cultivos mixotróficos se analizó el efecto de la Azitromicina como contaminante en el medio de cultivo, para esto, se evaluó la cinética de crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana*. Se evaluaron tres concentraciones de azitromicina en el medio de cultivo: 10, 15 y 25 ppm. Para la evaluación de la cinética se calculó la tasa de crecimiento exponencial, tiempo de duplicación y tasas de rendimiento. Aunque la viabilidad de *Chlorella sorokiniana* fue significativamente reducida por la presencia de azitromicina, esta microalga logró crecer hasta por 18 días en concentraciones de azitromicina (< 25 ppm) superiores a las reportadas en plantas de tratamiento de aguas, lo cual demuestra su potencial para ser empleada en estrategias de biorremediación de este antibiótico. Hasta donde es de nuestro conocimiento, este es el primer reporte de la cinética de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en concentraciones de azitromicina de 10 a 25 ppm.

Keywords

Kinetics, microalgae, microorganism, antibiotics, biotechnology.

Abstract

By employing mixotrophic cultures, the effect of Azithromycin as a contaminant in the culture medium was analyzed, evaluating the growth kinetics of the microalga *Chlorella sorokiniana*. Three concentrations of azithromycin were evaluated in the culture medium: 10, 15, and 25 ppm. Growth kinetics were assessed by calculating the exponential growth rate, doubling time, and yield rates. Although the viability of *Chlorella sorokiniana* was significantly reduced by the presence of azithromycin, this microalga managed to grow for up to 18 days in azithromycin concentrations (< 25 ppm) higher than those reported in water treatment plants, which demonstrates its potential to be used in bioremediation strategies. To the best of our knowledge, this is the first report of the growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* at azithromycin concentrations of 10 to 25 ppm.

Introducción

La microalga *Chlorella sorokiniana* es un alga verde de agua dulce, de la familia de las *Chlorophyta* [1]. El género *Chlorella* es cosmopolita, por lo tanto, es capaz de adaptarse a diversas condiciones ambientales y nutricionales [1], [2]; además, se caracteriza por poseer células esféricas, con un cloroplasto en forma de copa y pirenoide [3].

C. sorokiniana puede desarrollarse en condiciones heterotróficas, fototróficas y mixotróficas; estas últimas involucran dos procesos simultáneamente, la fotosíntesis (fijación del CO₂ inorgánico) y la fosforilación oxidativa, en donde se da la asimilación del carbono orgánico [4], [5]. Esto le permite a *C. sorokiniana* ser una alternativa prometedora dentro de las microalgas, ya que puede aprovechar simultáneamente el CO₂ y otras fuentes de carbono orgánico como acetatos, glicerol o azúcares [6].

Las aguas residuales son una fuente de carbono abundante y económica que se puede utilizar como medio para el cultivo de microalgas, con el beneficio asociado de que estos microorganismos pueden ayudar en la remediación de efluentes y el secuestro de CO₂ [7]. Además de lograr la biodegradación de contaminantes, el cultivo de microalgas utilizando aguas residuales permite también producción de biomasa para otros usos [8].

Las microalgas también pueden utilizar los antibióticos como fuentes de carbono y energía [9], y pueden realizar la descomposición de antibióticos mediante distintos procesos, tales como la biodegradación. Este proceso puede describirse como una catálisis enzimática de dos fases; en la primera etapa, los antibióticos son metabolizados en compuestos más hidrofílicos; en la segunda fase, estos compuestos pueden ser catalizados por otro grupo de enzimas para producir moléculas más pequeñas con distintos efectos biológicos [9], [10].

La azitromicina es un antibiótico ampliamente utilizado en infecciones del tracto respiratorio, oídos y transmisión sexual; debido a sus aplicaciones variadas y a un mal manejo de los desechos médicos, se ha reportado la presencia de azitromicina en plantas de tratamiento de agua residual (PTAR), alcantarillados y en otros cuerpos de agua [11], [12], [13], [14]. En América Latina, la azitromicina se ha identificado como un contaminante emergente en aguas residuales, donde se cuantificó con una concentración de 6000 a 11000 ngL⁻¹ [15].

En Costa Rica, el Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR) de la Universidad de Costa Rica (UCR), tras realizar un estudio en muestras de agua superficial de 86 cantones a nivel nacional, detectó la presencia de antibióticos macrólidos, grupo al que pertenece la azitromicina [16]. Además, según el Centro de Investigaciones en Contaminación Ambiental (CICA) de la UCR, en 2020 se determinó que la azitromicina era uno de los contaminantes mayoritarios en los efluentes tomados en 11 regiones alrededor del país [17].

La azitromicina puede tener un efecto dual en el crecimiento de las microalgas. En *Chlorella pyrenoidosa*, concentraciones de azitromicina de 0.005 a 0.1 ppm inhibieron el crecimiento, pero lo aumentaron a 0.0005 y 0.001 ppm [18]. Por su parte, en *Chlorella vulgaris* la azitromicina mostró alta toxicidad desde concentraciones desde 0.35 ppm, aunque esta microalga logró biodegradar hasta el 100% de la azitromicina [19].

Tomando lo anterior en consideración, debido a que la microalga *Chlorella sorokiniana* posee una gran adaptabilidad en su crecimiento, se evaluó la cinética de crecimiento de esta microalga en cultivos mixotróficos con diferentes concentraciones de azitromicina, con el fin de determinar la tolerancia de esta microalga a dicho antibiótico.

Materiales y métodos

Reactivos y microalgas. Los materiales empleados fueron: agua destilada; medio de cultivo BG11, PhytoTechnology Laboratories [20]; azitromicina 96,6% pura (C₃₈H₇₂N₂O₁₂·2H₂O), grado analítico, CAS 117772-70-0, Sigma Aldrich; y metanol 99,5%, grado reactivo, CAS 67-56-1, Sigma Aldrich. La microalga *Chlorella sorokiniana* pertenece a la colección del Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigación de Biotecnología del Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. No se realizaron accesiones bioquímicas ni genéticas al material biológico empleado en este estudio.

Cultivo de *Chlorella sorokiniana* utilizando azitromicina en el medio de cultivo. Se utilizó un inóculo inicial de 5.0 x 10⁶ células mL⁻¹. Se realizó una prueba preliminar a una temperatura de 25°C y 1135 Luxes en agitación por 72 h utilizando concentraciones de azitromicina de 25, 50, 75 y 100 ppm en el medio de cultivo ($n = 3$), tomando como referencia el rango de concentraciones propuesto por El-Yazbi *et al.* [21]. Con los resultados obtenidos, se realizaron curvas de crecimiento de la microalga en las mismas condiciones durante 18 días, con

concentraciones de azitromicina de 0 (control), 10, 15 y 25 ppm ($n = 3$), y manteniendo un flujo de aire en los matraces de manera constante. Por otra parte, se realizó un punto de comparación máxima entre tratamientos al día 14, con el fin de analizar la productividad en relación con la concentración de azitromicina.

Quantificación del crecimiento microalgal y la viabilidad. En cada iteración experimental se extrajo 1 mL de muestra diariamente durante el período de cultivo, donde se determinó la concentración celular y la viabilidad celular con el citómetro de flujo Muse Cell Analyzer para cuantificar la proporción de células vivas y muertas presentes en el cultivo. Este análisis se realizó mediante el protocolo de ensayos denominado "Muse Algae Count & Viability Kit" según las recomendaciones del fabricante (Luminex Corporation).

Análisis de la cinética de crecimiento microalgal. Primeramente, se analizó el comportamiento de la concentración celular con respecto al tiempo, para así definir la fase exponencial, ya que la tasa de crecimiento específico de células por unidad de tiempo (r) es proporcional al número de células presentes en el cultivo (N) en un intervalo de tiempo (t) [20]. Siguiendo las ecuaciones propuestas por [20], se tiene:

$$\frac{dn}{dt} = r \cdot N$$

Donde la solución corresponde a:

$$N_t = N_0 \cdot e^{rt}$$

Despejando la ecuación para r , se tiene:

$$r = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\Delta t}$$

Cuando el tiempo (t) se expresa en días, la tasa de crecimiento específico puede ser expresada en términos de duplicaciones por día (k), de la siguiente forma:

$$k = \frac{r}{\ln(2)}$$

El tiempo de duplicación (T_2), para el cultivo, expresado en las mismas unidades de tiempo que r , se puede calcular a partir de una estimación de r con el uso de la ecuación:

$$T_2 = \frac{\ln(2)}{r}$$

La tasa de rendimiento (Y) del cultivo, se determinó calculando la diferencia entre la concentración del inóculo inicial y la concentración después de algún intervalo de crecimiento, dividido entre este mismo intervalo de tiempo:

$$Y = \frac{N_t - N_0}{\Delta t}$$

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño de ANOVA de un factor con un 95% de confiabilidad para determinar el efecto de la dosis de azitromicina en el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*. Se evaluaron las variaciones en la concentración utilizando diferentes dosis de azitromicina, con tres réplicas por tratamiento. El análisis estadístico se realizó con el software STATGRAPHICS Centurion versión XIX, utilizando el método ANOVA de un solo factor. Se establecieron diferencias estadísticas a un nivel de confianza del 95,0% mediante el método de la diferencia menos significativa (LSD) de Fisher para evaluar el efecto de la concentración de azitromicina en

la concentración celular, con las barras de desviación estándar en las gráficas representando el error para cada tratamiento. Se determinó el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) de las curvas de crecimiento de microalga en presencia de diferentes concentraciones de azitromicina, para ello se utilizó el programa Graph Pad Prism (versión 10.2 para Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA).

Resultados y discusión

Con el fin de determinar un rango de concentración para la evaluación de la microalga, se evaluó primero el porcentaje de viabilidad de *Chlorella sorokiniana* en presencia de azitromicina en un rango de 25 a 75 ppm (Cuadro 1). A una concentración de 50 ppm la viabilidad se redujo hasta un 58.8%; por lo cual, se decidió realizar las evaluaciones posteriores en un rango de trabajo de 10 a 25 ppm de azitromicina.

Cuadro 1. Porcentaje de células viables de la microalga *Chlorella sorokiniana* luego de cultivo durante 72 horas empleando diferentes concentraciones de azitromicina.

| Concentración de azitromicina (ppm) | Concentración de algas vivas (células mL ⁻¹) | Concentración de algas muertas (células mL ⁻¹) | Porcentaje de viabilidad (%) |
|-------------------------------------|--|--|------------------------------|
| 25 | 4.12 x 10 ⁶ | 7.50 x 10 ⁵ | 84.6 |
| 50 | 2.28 x 10 ⁶ | 1.60 x 10 ⁶ | 58.8 |
| 75 | 5.00 x 10 ⁴ | 2.53 x 10 ⁶ | 1.9 |
| 100 | 0.00 x 10 ⁰ | 1.72 x 10 ⁶ | 0 |

Al evaluar la curva de crecimiento de *C. sorokiniana* en medios de cultivo con concentraciones crecientes de azitromicina, se observó la ausencia de la etapa de latencia en todos los tratamientos, ya que se observa un crecimiento exponencial desde los primeros días de cultivo (Figura 1). Por otra parte, se muestra una disminución de la concentración de microalgas con respecto al control, esta diferencia aumenta de manera proporcional a la concentración de azitromicina. Esto se comprobó mediante el análisis del área bajo la curva (AUC), donde se observó que al aumentar la concentración de azitromicina disminuyó el valor del área con respecto al control (Cuadro 2). Además, a los 14 días con 15 ppm de azitromicina se obtuvo la mayor concentración celular, por lo que esto se utilizó como punto de referencia para realizar las comparaciones de concentración máxima.

Por otra parte, se realizó un análisis de tendencia del área bajo la curva vs la concentración de azitromicina (Figura 2) mediante una regresión no lineal de modelo inhibidor vs respuesta ($r^2 = 0.999$); donde se demuestra gráficamente que la concentración de microalgas disminuye de forma proporcional al aumentar la concentración de azitromicina en comparación con el control.

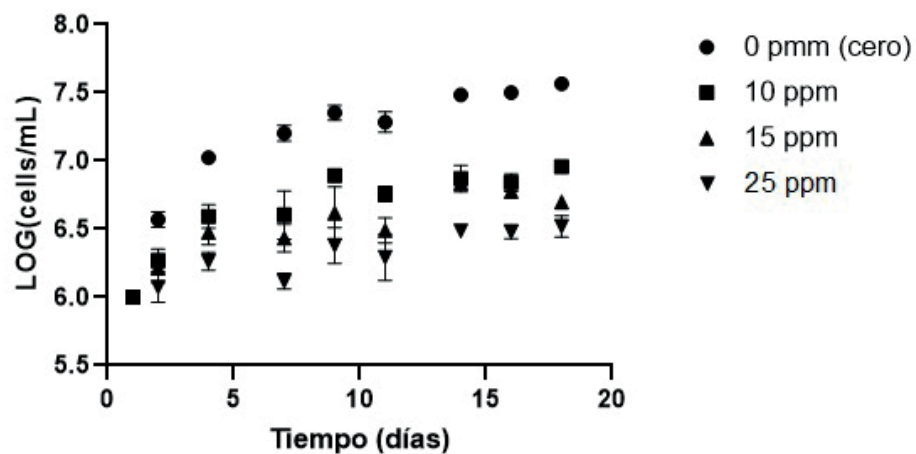


Figura 1. Curvas de crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en respuesta a diferentes concentraciones de azitromicina durante 18 días (promedio \pm desviación estándar, $n = 3$).

Cuadro 2. Análisis de correlación AUC de tiempo máximo vs LOG de concentración celular máxima de la microalga *Chlorella sorokiniana* al emplear diferentes dosis de azitromicina (promedio \pm desviación estándar, $n = 3$).

| Concentración de azitromicina (ppm) | Área bajo la curva (AUC) | LOG concentración celular máxima (células mL ⁻¹) | Tiempo máximo (días) |
|-------------------------------------|--------------------------|--|----------------------|
| 0 | 122.6 \pm 0.22 | 7.57 | 18 |
| 10 | 113.9 \pm 0.44 | 6.96 | 18 |
| 15 | 111.4 \pm 0.43 | 6.84 | 14 |
| 25 | 107.3 \pm 0.43 | 6.52 | 18 |

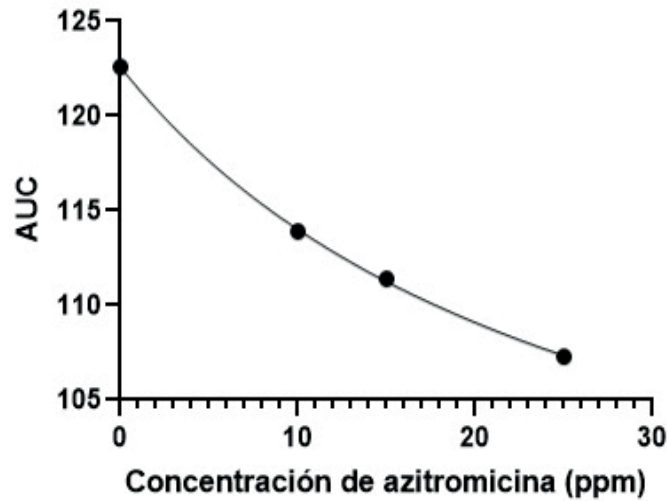


Figura 2. Crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* (AUC) en respuesta a diferentes concentraciones de azitromicina en el medio de cultivo durante 18 días (promedio, $n = 3$).

Con base en las curvas de crecimiento se calcularon los valores de tasa de crecimiento y duplicaciones por día (Cuadro 3). Al aumentar la concentración de azitromicina se redujo la tasa de crecimiento y las duplicaciones al día, demostrando con ello la sensibilidad de la microalga a los cambios de concentración del fármaco. Además, a los 14 días de comparación máxima, los resultados confirmaron que todos los tratamientos con azitromicina causaron concentraciones celulares significativamente reducidas respecto al control (Cuadro 4). Estos resultados muestran que *Chlorella sorokiniana* puede crecer a concentraciones de azitromicina superiores a las reportadas en plantas de tratamiento de aguas (2.8×10^{-3} ppm) [10], por lo cual tendría potencial para tolerar estas concentraciones y ser empleada en estrategias de biorremediación.

Cuadro 3. Tasas de crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en medios de cultivo con diferentes concentraciones de azitromicina (promedio \pm desviación estándar, $n = 3$).

| Concentración azitromicina (ppm) | Tasa de crecimiento exponencial r (días ⁻¹) | Concentración celular en un intervalo de tiempo N_t (células mL ⁻¹) | Duplicaciones por día (día) | Tiempo de duplicación T_2 (días ⁻¹) | Tasa de rendimiento Y (células mL)/ (días) |
|----------------------------------|---|---|-----------------------------|---|--|
| 0 | 0.785 ± 0.010 | $5.7732e^{0.0511 t}$ $r^2: 0.957$ | 1.13 ± 0.015 | 0.88 ± 0.012 | 3.18×10^6 |
| 10 | 0.458 ± 0.021 | $5.8515e^{0.0307 t}$ $r^2: 0.976$ | 0.66 ± 0.031 | 1.51 ± 0.085 | 9.9×10^5 |
| 15 | 0.369 ± 0.014 | $5.8782e^{0.0250 t}$ $r^2: 0.977$ | 0.53 ± 0.020 | 1.88 ± 0.061 | 6.8×10^5 |
| 25 | 0.205 ± 0.024 | $5.9126e^{0.0145 t}$ $r^2: 0.999$ | 0.30 ± 0.035 | 3.38 ± 0.493 | 2.8×10^5 |

Cuadro 4. Concentración celular (promedio \pm desviación estándar, $n = 3$) de *Chlorella sorokiniana* alcanzada en el día 14 a diferentes concentraciones de azitromicina. Las letras iguales, corresponden a grupos estadísticamente homogéneos según el método LSD de Fisher, con un nivel de confianza el 95%.

| Concentración azitromicina (ppm) | Concentración celular promedio (células mL ⁻¹) | Viabilidad (% células vivas) | Tratamientos estadísticamente homogéneos |
|----------------------------------|--|------------------------------|--|
| 0 | $3.04 \times 10^7 \pm 1.12 \times 10^6$ | 98.04 ± 0.29 | a |
| 10 | $7.58 \times 10^6 \pm 7.62 \times 10^5$ | $94.46.67 \pm 2.01$ | b |
| 15 | $6.87 \times 10^6 \pm 3.46 \times 10^5$ | 91.67 ± 1.19 | b |
| 25 | $3.07 \times 10^6 \pm 1.22 \times 10^5$ | 85.82 ± 0.66 | c |

La comparación estadística entre los resultados de concentración celular alcanzados a los 14 días empleando las diferentes dosis de azitromicina (Cuadro 4) indican que no existe diferencia significativa al emplear 15 ppm o 25 ppm, pero estas dosis son significativamente diferentes a 10 ppm; por otra parte, todos los tratamientos empleando azitromicina son estadísticamente diferentes al control (Cuadro 4). Con esto se logra demostrar que la microalga *Chlorella sorokiniana* es capaz de crecer en concentraciones de azitromicina mayor a las reportadas anteriormente, potenciando así su aplicación en biorremediación.

Adicionalmente, se realizó microscopía electrónica de barrido (MEB) para verificar posibles daños estructurales inducidos por azitromicina en la microalga *Chlorella sorokiniana*. A una concentración de 10 ppm de azitromicina se observó que las microalgas sobrevivientes presentan una morfología muy similar a las microalgas no tratadas, conservando la forma esférica característica de la microalga (Figura 3).

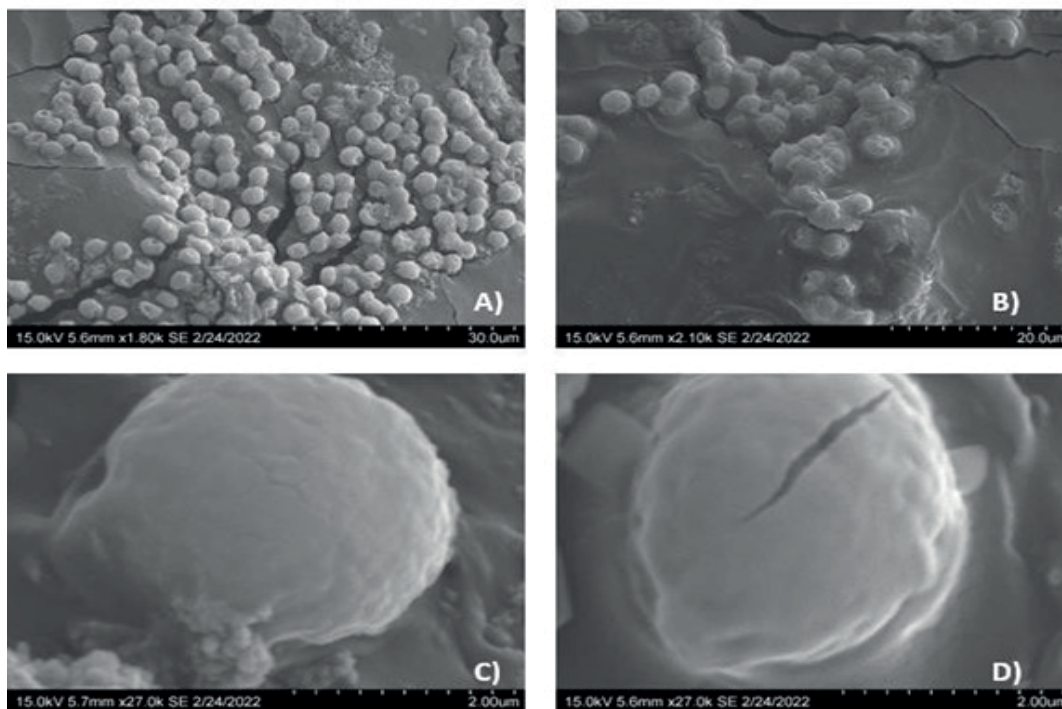


Figura 3. Muestras de la microalga *Chlorella sorokiniana* en ausencia y presencia de azitromicina en una concentración de 10 ppm. A) muestra sin azitromicina (30.0 μ m); B) muestra con azitromicina (20.0 μ m); C) muestra sin azitromicina (2,0 μ m) y D) muestra con azitromicina (2,0 μ m).

Conclusiones

Los resultados mostraron que, aunque la viabilidad de *Chlorella sorokiniana* fue significativamente reducida por la presencia de azitromicina, esta microalga puede crecer hasta por 18 días en concentraciones de azitromicina (< 25 ppm) superiores a las reportadas en plantas de tratamiento de aguas, lo cual demuestra su potencial para ser empleada en estrategias de biorremediación. Hasta donde es de nuestro conocimiento, este es el primer reporte de la cinética de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en concentraciones de azitromicina de 10 a 25 ppm. En investigaciones futuras será necesario evaluar la concentración de azitromicina durante el tiempo de incubación con la microalga, con el fin de estudiar el metabolismo del antibiótico.

Referencias

- [1] D. M. Ribeiro, L. F. Roncaratti, G. C. Possa, L. C. Garcia, L. J. Cançado, T. C. R. Williams y & d. S. A. Figueiredo, "A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers," *Bioresource Technology Reports*, vol. 9, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100354>
- [2] J. Wehr, R. Sheath, Kocielek y J. Patrick, "Freshwater Algae of North America: ecology and classification", Academic Press, Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-66664-8>
- [3] Ortiz-Moreno Martha L., Cortés-Castillo Caroll E., Sánchez-Villarraga Julian, Padilla Jorge, Otero-Paternina Angélica M. Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas," *Universidad de los Llanos*, pp. 11-20, 2012. [Online] http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-37092012000100002&lng=en.
- [4] L. Yu, T. Li, J. Ma, Q. Zhao, P. Wensel, J. Lian y S. Chen, "A kinetic model of heterotrophic and mixotrophic cultivation of the potential biofuel organism microalgae *Chlorella sorokiniana*," *Algal Research*, vol. 64, pp. 1-11, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102701>
- [5] A. León-Vaz, R. León, E. Díaz-Santos, J. Vigara y S. & Raposo, "Using agro-industrial wastes for mixotrophic growth and lipids production by the green microalga *Chlorella sorokiniana*," *New Biotechnology*, vol. 51, p. 31-38, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.02.001>
- [6] L. Leng, L. Wei, Q. Xiong, S. Xu, W. Li, S. Lv, Q. Lu, L. Wan, Z. Wen y W. & Zhou, "Use of microalgae based technology for the removal of antibiotics from wastewater: A review," *Chemosphere*, vol. 238, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124680>
- [7] Y. Chong, L. Chi, Z. Ying, D. Xiang, W. Jing-Han, C. Zhan-You y Z. Qian, "Effects of environment-relevant concentrations of antibiotics on seawater *Chlorella* sp. biofilm in artificial mariculture effluent," *Algal Research*, vol. 70, pp. 2211-9264, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103008>
- [8] A. Hom-Díaz, A. Jaén, S. Rodríguez, D. Barceló, T. Vicent y P. Blánquez, "Insights into removal of antibiotics by selected microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana*, *Dunaliella tertiolecta* and *Pseudokirchneriella subcapitata*)," *Algal Research*, vol. 61, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102560>
- [9] C. Kiki, A. Rashid, Y. Wang, Y. Li, Q. Zeng, C. P. Yu y Q. & Sun, "Dissipation of antibiotics by microalgae: Kinetics, identification of transformation products and pathways," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 387, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121985>
- [10] Li, Y., Ma, Y., Yang, L., Duan, S., Zhou, F., Chen, J., ... & Zhang, B, "Effects of azithromycin on feeding behavior and nutrition accumulation of *Daphnia magna* under the different exposure pathways," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 197, pp. 1-7, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110573>
- [11] S. Aydin, M. Emin Aydin, A. Ulvi y H. & Kilic, "Antibiotics in hospital effluents: occurrence, contribution to urban wastewater, removal in a wastewater treatment plant, and environmental risk assessment," *Environ Sci Pollut Res*, vol. 26, p. 544-558, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3563-0>
- [12] Collado, N., Rodriguez-Mozaz, S., Gros, M., Rubirola, A., Barceló, D., Comas, J., ... & Buttiglieri, G., "Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system," *Environmental Pollution*, pp. 202- 212, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.040>
- [13] C. E. Santos, R. N. de Coimbra, S. P. Bermejo, A. I. G. Pérez, and M. O. Cabero, "Comparative Assessment of Pharmaceutical Removal from Wastewater by the Microalgae *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*," *Biological Wastewater Treatment and Resource Recovery*". InTech, Mar. 29, 2017. <https://doi.org/10.5772/66772>.

- [14] Senta, I., Kostanjevecki, P., Krizman-Matasic, I., Terzic, S., & Ahel, M., "Occurrence and behavior of macrolide antibiotics in municipal wastewater treatment: possible importance of metabolites, synthesis byproducts, and transformation products," *Environmental Science and Technology*, vol. 53, pp. 7463-7472, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01420>
- [15] Peña-Guzmán, C., Ulloa-Sánchez, S., Mora, K., Helena-Bustos, R., Lopez-Barrera, E., Alvarez, J., & Rodríguez-Pinzón, M., "Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature". *Journal of Environmental Management*, 237, 408–423 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>
- [16] Spongberg, A. L., Witter, J. D., Acuña, J., Vargas, J., Murillo, M., Umaña, G., ... & Perez, G., "Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters," *Water research*, 45(20), 6709-6717, 2011 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.004>
- [17] Ramírez-Morales, D., Masís-Mora, M., Montiel-Mora, J. R., Cambroner-Henrichs, J. C., Briceño-Guevara, S., Rojas-Sánchez, C. E., ... & Rodríguez-Rodríguez, C. E., "Occurrence of pharmaceuticals, hazard assessment and ecotoxicological evaluation of wastewater treatment plants in Costa Rica," *Science of The Total Environment*, vol. 746, p. 141200, Dec. 2020,. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141200>
- [18] Mao, Y., Yu, Y., Ma, Z., Li, H., Yu, W., Cao, L., & He, Q. "Azithromycin induces dual effects on microalgae: Roles of photosynthetic damage and oxidative stress," *Ecotoxicology and environmental safety*, 222, 112496. 2021 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112496>.
- [19] Kiki, C., Rashid, A., Zhang, Y., Li, X., Chen, T. Y., Adéoye, A. B. E., ... & Sun, Q. "Microalgal mediated antibiotic co-metabolism: Kinetics, transformation products and pathways," *Chemosphere*, 292, 133438, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133438>
- [20] Stein-Taylor, J. R. , "Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements.," *Cambridge University Press*, pp. 289–312., 1973.
- [21] A. F. El-Yazbi, E. F. Khamis, R. M. Youssef, M. A. El-Sayed y F. M. & Aboukhalil, "Green analytical methods for simultaneous determination of compounds having relatively disparate absorbance; application to antibiotic formulation of azithromycin and levofloxacin," *Heliyon*, vol. 6, n° 9, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04819>

Bacteriocinas y sus aplicaciones: mini-revisión

Bacteriocins and its applications: mini-review

Plamen José Cubillo-Komarovova¹, Roberto Enrique Ledezma-Acevedo², Valeria Salazar-Cedeño³, Daniela Murillo-Rodríguez⁴, Dylan Stern-Flores⁵

Cubillo-Komarovova, P.J; Ledezma-Acevedo, R.E; Salazar-Cedeño, V; Murillo-Rodríguez, D; Stern-Flores, D. Bacteriocinas y sus aplicaciones: mini-revisión. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 79-89.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7613>

- 1 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 plamen.cubillo@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0000-0001-9800-3119>
- 2 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 robear99cr@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0000-0001-9754-2639>
- 3 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 vsalazar@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0000-0001-8928-8079>
- 4 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 danielarodri2001@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0000-0003-2391-1555>
- 5 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 dylan.stern@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0009-0001-1464-9594>

Palabras clave

Antibióticos; antimicrobianos; biotecnología.

Resumen

Las bacteriocinas son moléculas con actividad antibacteriana, lo cual las convierte en herramientas importantes para uso humano. Actualmente, estas moléculas son promisorias para la preservación de alimentos sin aditivos químicos y para el tratamiento clínico de infecciones bacterianas. Dentro de las características favorables de las bacteriocinas destacan la sinergia con otras bacterias y su actividad contra biopelículas. La aplicación de estrategias biotecnológicas como la activación de grupos biosintéticos de genes, la inducción por ingeniería genética o co-cultivos, y la incorporación en bioprocesos, hacen que cada vez sea más cercano el uso de estas moléculas en distintas industrias. El objetivo de esta mini revisión de literatura es ofrecer información reciente y actualizada sobre las aplicaciones de las bacteriocinas en los ámbitos de salud, agronomía e industria, desde una perspectiva biotecnológica.

Keywords

Antibiotics; antimicrobial; biotechnology.

Abstract

Bacteriocins are molecules with antibacterial activity, which makes them important tools for human use. Currently, these molecules show promise for food preservation without chemical additives and for the clinical treatment of bacterial infections. Some favorable characteristics of bacteriocins are their synergy with other bacteria and their activity against biofilms. Biotechnological strategies such as the activation of biosynthetic groups of genes, induction by genetic engineering or co-cultures, and incorporation in bioprocesses, can make the use of these molecules in different industries increasingly closer. The objective of this mini literature review is to offer recent and updated information on the applications of bacteriocins in the fields of health, agronomy and industry, from a biotechnological perspective.

Introducción

La resistencia antimicrobiana (RA) es la capacidad de algunos microorganismos de adquirir mecanismos varios que les confieren resistencia a moléculas antimicrobianas (AMB) como los antibióticos [1]. La emergencia continua de patógenos multirresistentes, principalmente por el uso indebido de los antibióticos disponibles [2], así como la amenaza creciente que esto representa para la humanidad [3], [4], hacen necesaria la búsqueda de terapias alternativas. Este escenario se ve empeorado por la baja tasa de descubrimiento de nuevas moléculas antimicrobianas en las últimas décadas [5], [6], [7], aunado a la falta de comprensión sobre los mecanismos de adquisición de RA.

Ante esto, una alternativa promisorio para combatir la RA son las bacteriocinas [8] (Cuadro 1). Las bacteriocinas son péptidos o proteínas con actividades antibacterianas, las cuales son secretadas por ciertas bacterias en contextos de estrés; por ejemplo, cuando existe competencia por recursos en los hábitats de las comunidades microbianas [9].

Cuadro 1. Principales tipos de bacteriocinas y sus características.

| Definición | Características |
|---------------|--|
| Bacteriocinas | Proteínas bacterianas con capacidad de inhibir el crecimiento o de causar la muerte de otras bacterias, usualmente contra parientes cercanos de la bacteria que las produce. Actualmente se clasifican en dos grupos principales: Clase I, péptidos modificados post-traduccionalmente (RiPPs, por sus siglas en inglés); y Clase II, péptidos no modificados. |
| Colicinas | Péptidos termolábiles grandes. Su modo de acción es principalmente mediante la formación de poros en la membrana, actividad nucleasa contra ADN, ARNr 16S y ARNt, e inhibición de la síntesis de peptidoglicano. Se han encontrado codificadas sólo en plásmidos. |
| Microcinas | “Bacteriocinas pequeñas”; péptidos más termoestables pequeños (< 10 kDa) secretados principalmente por <i>Enterobacteriaceae</i> , con capacidad de inhibir a otras bacterias. Están codificadas en plásmidos o en el cromosoma bacteriano. Tienen múltiples mecanismos de acción (ver Cuadro 2). |

Fuentes: [10], [11].

Las bacteriocinas suelen ser moléculas catiónicas, lo que facilita su interacción con las cargas negativas de la pared celular bacteriana; además, son hidrofóbicas, para facilitar la ruptura de la membrana celular; generalmente actúan bajo un alto rango de pH; y son menos termolábiles que los antibióticos [12]. Poseen múltiples mecanismos inhibitorios (Cuadro 2), tales como formación de poros en la membrana, actividad anti-*biofilm*, inhibición en la síntesis de pared celular, y disrupción del metabolismo celular [13]. Además, las bacteriocinas y sustancias inhibitorias similares a bacteriocinas (BLIS, por sus siglas en inglés) han mostrado baja toxicidad en humanos [14] y, debido a que son altamente específicas, pueden inhibir patógenos sin alterar la homeostasis del microbioma local [11].

La mayor parte de las bacterias producen al menos una bacteriocina [11]. Firmicutes y Bacteroidetes, los filos de bacterias más comunes en la microbiota humana, producen la mayor cantidad de bacteriocinas estudiadas a la fecha; sin embargo, las bacteriocinas producidas por las Proteobacterias son ricas en cargas catiónicas y hélices alfa, por lo que podrían tener mayor efecto antibacteriano [10].

La diversidad y variabilidad de las bacteriocinas, el contexto de su ocurrencia (competencia intraespecífica e interespecífica), y su naturaleza molecular, hace que estas moléculas sean candidatas promisorias para atacar la crisis de RA. Por eso, el objetivo de la presente mini revisión de literatura es ofrecer información reciente y actualizada sobre las aplicaciones de las bacteriocinas en los ámbitos de salud, agronomía e industria, desde una perspectiva biotecnológica.

Cuadro 2. Algunas bacteriocinas y sus características.

| Bacteriocina | Modo de acción | Organismo(s) productor(es) | Blanco(s) |
|------------------|--|--|---|
| Nisina | Formación de poros en la membrana | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> |
| Mutacina 1140 | Desestabiliza membrana celular, inhibiendo el transporte de aminoácidos y la síntesis de ATP | <i>Streptococcus mutans</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| Pediocina PA-1 | Formación de poros en la membrana | <i>Pediococcus acidilactici</i> | <i>L. monocytogenes</i> |
| Enterocina CRL35 | Interfiere con replicación viral | <i>Enterococcus mundtii</i> , <i>Enterococcus faecium</i> | Herpes virus |
| Garvicina | Formación de poros en la membrana | <i>Lactobacillus garvieae</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Plantaricina | Formación de poros en la membrana | <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>L. monocytogenes</i> |
| Microcina B17 | Inhibición de la ADN girasa, causando rompimientos en el ADN | <i>E. coli</i> | <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>E. coli</i> |
| Microcina C | Inhibición de ARNt sintetasa, esencial para síntesis de proteínas | <i>E. coli</i> | <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Morganella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Yersinia</i> |
| Microcina E492 | Formación de poros en la membrana | <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> | Anticáncer (mama, colon) |
| Microcina H47 | Bloqueo del canal de protones celular o de la ATP sintetasa | <i>E. coli</i> | Enterobacteriaceae |
| Microcina J25 | Impide la transcripción e inhibe la respiración celular | <i>E. coli</i> | <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i> |
| Microcina S | Desconocido | <i>E. coli</i> , <i>Citrobacter freundii</i> | Letal contra <i>E. coli</i> enterohemorrágica y enteropatógena |
| Microcina V | Formación de poros en la membrana | <i>E. coli</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Salmonella enterica</i> | <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> |

Fuentes:[10], [11], [15], [16], [17].

Aplicaciones farmacológicas y biomédicas

En la práctica clínica, se ha sugerido que las bacteriocinas podrían utilizarse en combinación con otros agentes antimicrobianos ya existentes, lo cual podría reducir la probabilidad de desarrollo de resistencia como resultado de la participación de dos mecanismos antimicrobianos distintos [18]. Adicionalmente, la actividad sinérgica antimicrobiana podría reducir los costos de tratamiento por medio de la reducción en la concentración de antimicrobianos más costosos o al utilizarlos junto con otros más económicos. Asimismo, estas combinaciones podrían ampliar el espectro de acción [19], así como reducir los efectos secundarios y toxicidad asociados al uso de antibióticos en altas dosis [20].

Algunas microcinas (bacteriocinas pequeñas, compuestas por sólo unos pocos aminoácidos) [10] bacterianas se podrían utilizar para regular la colonización de agentes patógenos en el intestino y reducir la inflamación intestinal [21]. Por ejemplo, se ha demostrado que la bacteria *Escherichia coli* Nissle 1917 limita la expansión de bacterias del género Enterobacteriaceae, incluyendo *E. coli* comensal, *E. coli* adherente-invasiva y *Salmonella enterica* [21]. Esta actividad se da en medios limitados en hierro, donde las bacterias secretan sideróforos para captar este metal, posteriormente se da la captación bacteriana de sideróforos unidos al hierro a través de receptores de membrana [21]. En estas condiciones, *E. coli* Nissle 1917 es capaz de secretar sideróforos conjugados con microcinas que pueden atacar otras bacterias a través de dichos receptores, en un mecanismo que se conoce como “caballo de Troya”. De modo que, en condiciones de limitación de hierro, como ocurre en el intestino inflamado, estas bacterias son capaces de competir gracias a las bacteriocinas [21].

Otro de los retos que existe es el combate de las biopelículas (o *biofilm*), donde las bacterias están inmersas en una matriz polimérica compleja, que las hace resistentes a los antibióticos por la imposibilidad que tienen los mismos de penetrar los estratos más profundos [22]. Por ejemplo, la nisina, un péptido antimicrobiano producido por *Lactococcus lactis* y usado como preservante en alimentos [23] ha mostrado actividad anti-*biofilm* contra patógenos de importancia médica y veterinaria como *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, enterococos resistentes a la vancomicina, y *Staphylococcus* y *Streptococcus* asociados a mastitis bovina [22], [24]. También se han identificado derivados de nisina que son capaces de interferir con la formación de las biopelículas, así como de reducir la densidad de biopelículas previamente establecidas [22].

Por otro lado, las bacteriocinas no solamente pueden servir como moléculas antimicrobianas, sino que también se han encontrado bacteriocinas con posible capacidad antitumoral [25]. Por ejemplo, la microcina MccE492, producida por *Klebsiella pneumoniae*, ha mostrado toxicidad contra células de adenocarcinoma colorrectal (HT29), mientras que la nisina ha mostrado actividad citotóxica contra células de cáncer de colon (SW620) [25].

Aplicaciones agronómicas

En el ámbito agronómico, las bacteriocinas han permitido la protección de cultivos ante fitopatógenos de relevancia como *Erwinia* o *Ralstonia* [26]. Las tailocinas, bacteriocinas multiproteicas derivadas de fagos codificadas por regiones genómicas que se activan cuando se daña el ADN [27], [28] han protegido contra la infección del fitopatógeno *Pseudomonas syringae* en plantas de *Nicotiana benthamiana* [29]. *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*, además de producir bacteriocinas en contra de fitopatógenos, también pueden inducir resistencia sistémica y promover el crecimiento de las plantas [30]. La bacteriocina Bac IH7 de *Bacillus subtilis* IH7 tiene actividad bactericida contra *Agrobacterium tumefaciens*, *Candida tropicalis* y otros patógenos de transmisión a partir de las semillas; y esta bacteriocina también contribuye al aumento de brotes, longitud de raíces y porcentaje de germinación [31].

Destacan las bacteriocinas de bacterias fijadoras de nitrógeno en la rizósfera. Por ejemplo, *Bacillus thuringiensis* NEB17 elimina a competidores de su nicho en el fitomicrobioma, pero no afecta a las bacterias fijadoras de nitrógeno, necesarias para el crecimiento de plantas como las leguminosas [26]. Por su parte, *Gluconacetobacter diazotrophicus* produce una bacteriocina conocida como gluconacina, la cual se ha logrado expresar, purificar y ha mantenido su actividad de manera heteróloga en *E. coli* de manera *in silico* contra fitopatógenos

como *Xanthomonas axonopodis* o *Acidovorax vasculorum* [32]. Esto puede funcionar como un mecanismo de control biológico, el cual puede servir para eliminar patógenos, a la vez que se favorece el crecimiento de las plantas [33], [34], [35].

Por otra parte, se ha reportado que algunas bacterias productoras de bacteriocinas se pueden utilizar para producir Extractos Fermentados de Plantas (FPE), los cuales se han asociado con posibles beneficios para la salud humana [36]. Los FPE son alimentos de origen vegetal, usualmente plantas medicinales, cereales o frutas, las cuales se inoculan con organismos como levaduras o bacterias ácido lácticas para obtener bebidas o alimentos funcionales [37], [38]. Los FPE son también una fuente de bacteriocinas, producidas por bacterias como *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* y *Leconostoc lactis*, las cuales han logrado inhibir el crecimiento de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus* spp. [39].

Aplicaciones en la industria alimentaria

Los alimentos pueden deteriorarse a través de la contaminación por microorganismos como bacterias, virus, protozoos, hongos y parásitos, lo que afecta las propiedades organolépticas y la calidad del producto alimentario; además, los alimentos pueden servir como vehículos para la transmisión de enfermedades gastrointestinales, ya sea intoxicaciones o infecciones, lo cual incide en la morbilidad y mortalidad, así como la generación de pérdidas económicas [40].

A pesar de que el empleo de conservantes químicos y el tratamiento térmico han funcionado en el pasado para reducir posibilidades de intoxicación alimentaria, estas técnicas tienen un impacto en las propiedades organolépticas de los alimentos debido a la secreción de lipasas y proteasas que cambian la composición química de los productos [41]. Asimismo, existe la creciente preferencia de los consumidores por ingerir alimentos más seguros, de alta calidad y mínimamente procesados, lo que ha generado un interés por el uso de bacteriocinas para controlar patógenos transmitidos por alimentos [18], [41].

En este sentido, la incorporación de bacterias productoras de bacteriocinas en alimentos aumenta su vida en anaquel [36], [42]. Recientemente, se ha reportado la utilización de la nisina producida por *Lactococcus lactis* para reemplazar el uso de conservantes químicos en alimentos como carne, productos lácteos, pescado, bebidas alcohólicas, ensaladas y vegetales fermentados. Otro ejemplo es la pediocina PA₁, producida por *Pediococcus*, la cual se ha comercializado como conservante de alimentos para la aplicación en industria [14], [41].

La incorporación de bacteriocinas para la conservación de alimentos se puede realizar de varias formas: a) inoculando el alimento con la cepa productora de bacteriocinas, b) adicionando la bacteriocina purificada o semipurificada como aditivo alimentario, y c) la fermentación previa del producto con una cepa productora de bacteriocinas como ingrediente en el procesamiento del alimento [41].

Las bacteriocinas se han utilizado en la industria alimentaria solas o en combinación con otros métodos de conservación. Destaca especialmente su actividad contra *Salmonella*, debido a que es un patógeno usual en la industria alimenticia [21].

Tendencias actuales y perspectivas futuras

Se deben mejorar las tecnologías y herramientas disponibles para producir bacteriocinas que sean seguras para su uso en humanos. Una opción consiste en utilizar estrategias similares a las que se utilizan en el descubrimiento de antibióticos, tales como la activación de grupos de genes biosintéticos (BGCs, por sus siglas en inglés), metagenómica, co-cultivo, bioprospección en ambientes inusuales, y nuevas técnicas de ingeniería genética y química

[43]. Cabe destacar que ya se han aislado e identificado un gran número de bacteriocinas a partir de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, de los cuales se han creado bases de datos con toda la información útil para detectar de forma automatizada los genes de bacteriocinas [41].

Algunas bacteriocinas suelen estar en grupos de genes biosintéticos (BGCs), es decir, genes relacionados entre sí, pero los cuales no se suelen expresar juntos [44]. Una técnica para la activación de (BGCs) son los co-cultivos con microorganismos productores e inductores de bacteriocinas, ya que se ha encontrado que el “quorum sensing” (percepción de cuórum o autoinducción) es un mecanismo que puede inducir la producción de estas moléculas antimicrobianas [45]. Esta estrategia ha permitido un aumento en la producción de bacteriocinas conocidas, tales como la nisina [46], así como el descubrimiento de inducciones poco usuales como las sustancias inhibitoras similares a bacteriocinas (BLIS) entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, en particular con actividad contra *Aeromonas* [47]. La combinación de estas técnicas con transcriptómica y proteómica llevó también a la identificación de la plantaricina, una bacteriocina inducida en el co-cultivo entre *Lactiplantibacillus paraplantarum* y *Wickerhamomyces anomalus* [48].

La inducción de moléculas bioactivas también se puede realizar de manera física. Por ejemplo, la irradiación con luz azul puede promover la producción de bacteriocinas; además, este tipo de luz puede ser beneficiosa para el crecimiento de algunas especies de bacterias productoras de bacteriocinas de uso alimenticio como las *Lactobacillus lactis* [49].

También, se puede hacer la inducción de BGCs por medio de técnicas más novedosas, como la edición genética por CRISPR, al alterar promotores, activadores y diferentes secuencias reguladoras [50].

Otro punto por destacar es la necesidad de aumentar la rentabilidad y la sostenibilidad de los procesos para la producción de bacteriocinas. Para esto se han dado diferentes avances en el área de los bioprocesos y el enfoque OSMAC (en inglés, *One Strain Many Compounds*) para determinar diferentes respuestas según el tipo de medio que se use [50]. Un ejemplo es el uso de fermentación en sustrato sólido (en inglés, *Solid Substrate Fermentation*) a partir de arroz para la producción de bacteriocinas de *Bifidobacterium* [51], así como el uso de subproductos de otros procesos productivos como sustrato en bioprocesos con el objetivo de obtener bacteriocinas como la nisina o la termofilina [52]. También es necesario desarrollar mecanismos de administración adecuados, debido a que la actividad de las bacteriocinas puede verse afectada por la digestión proteolítica en la vía oral [13], [53].

La expresión heteróloga es una alternativa promisoriosa para la producción de bacteriocinas. Por ejemplo, *E. coli* se ha utilizado para la expresión de sakacina P de *Lactobacillus sakei* o para producir enterocina A [54], [55]; *Lactococcus lactis* para producir enterocina A [55]; y *Saccharomyces* spp. para la expresión de leucocina C proveniente de *Leuconostoc* y plantaricina 423 proveniente de *Lactobacillus plantarum* [56], [57]. Gracias a los avances en expresión heteróloga, se pueden lograr mayores rendimientos en la producción de bacteriocinas a partir de estas técnicas [58].

Por otro lado, el uso de las bacteriocinas podría ser una estrategia viable para el futuro control y prevención de pandemias [59]. Se ha observado que algunas bacteriocinas tienen actividad contra cápsidas virales; por lo tanto, es importante investigar su actividad frente a diferentes cepas de virus. Otra alternativa es tratar posibles zoonosis con bacteriocinas antes de que el patógeno sea capaz de infectar humanos, y así reducir la probabilidad de un salto zoonótico a futuro [59]. Cabe mencionar que ya se han identificado bacterias resistentes a bacteriocinas [15].

Conclusiones

A pesar de los grandes esfuerzos en la ampliación en el conocimiento de bacteriocinas, aún es necesario realizar más estudios para la aplicación efectiva de las bacteriocinas en distintas áreas. Es necesario conocer la posibilidad de la implementación de las bacteriocinas en conjunto con otras herramientas tecnológicas. Para lograr el uso seguro de estas moléculas aún se debe ampliar la investigación relacionada a su toxicidad tanto en la industria alimentaria como farmacéutica, así como mejorar los métodos de administración para que las bacteriocinas puedan alcanzar el sitio de acción sin ser degradadas.

Actualmente, en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica se realizan investigaciones para la identificación de sustancias con potencial antimicrobiano a partir de distintos orígenes, tales como microorganismos comensales presentes en el ecosistema de las avispas sociales, así como microorganismos de ambientes extremos, y se promueve para el futuro próximo la aplicación de estrategias biotecnológicas como la ingeniería genética, la biología sintética, y los bioprocesos, para la producción de bacteriocinas y otras moléculas.

Referencias

- [1] K. W. K. Tang, B. C. Millar, and J. E. Moore, "Antimicrobial Resistance (AMR)," *Br J Biomed Sci*, vol. 80, p. 11387, 2023, doi: 10.3389/BJBS.2023.11387.
- [2] T. Singhal, "Antimicrobial Resistance: The 'Other' Pandemic!: Based on 9th Dr. I. C. Verma Excellence Award for Young Pediatricians Delivered as Oration on 19th Sept. 2021," *Indian J Pediatr*, vol. 89, no. 6, pp. 600–606, Jun. 2022, doi: 10.1007/S12098-021-04008-9.
- [3] F. Prestinaci, P. Pezzotti, and A. Pantosti, "Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon," *Pathog Glob Health*, vol. 109, no. 7, p. 309, Oct. 2015, doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030.
- [4] P. Shinu et al., "Progress report: antimicrobial drug discovery in the resistance era," *Pharmaceutics* 2022, vol. 15, no. 4, p. 413, Mar. 2022, doi: 10.3390/PH15040413.
- [5] M. A. Cook and G. D. Wright, "The past, present, and future of antibiotics," *Sci Transl Med*, vol. 14, no. 657, Aug. 2022, doi: 10.1126/SCITRANSLMED.ABO7793.
- [6] J. D. Hegemann, J. Birkelbach, S. Walesch, and R. Müller, "Current developments in antibiotic discovery," *EMBO Rep*, vol. 24, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.15252/EMBR.202256184
- [7] C. Årdal et al., "Antibiotic development — economic, regulatory and societal challenges," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 18, no. 5, pp. 267–274, Nov. 2019, doi: 10.1038/s41579-019-0293-3.
- [8] G. Gradisteanu Pircalabioru et al., "Bacteriocins in the era of antibiotic resistance: rising to the challenge," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 2, p. 196, Feb. 2021, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13020196.
- [9] L. Ghazaryan, L. Tonoyan, A. Al Ashhab, M. I. M. Soares, and O. Gillor, "The role of stress in colicin regulation," *Arch Microbiol*, vol. 196, no. 11, pp. 753–764, Oct. 2014, doi: 10.1007/S00203-014-1017-8.
- [10] F. Baquero, V. F. Lanza, M. R. Baquero, R. del Campo, and D. A. Bravo-Vázquez, "Microcins in enterobacteriaceae: peptide antimicrobials in the eco-active intestinal chemosphere," *Front Microbiol*, vol. 10, p. 473968, Oct. 2019, doi: 10.3389/FMICB.2019.02261.
- [11] R. C. Reuben and C. Torres, "Bacteriocins: potentials and prospects in health and agrifood systems," *Archives of Microbiology*, vol. 206, p. 233, 2024, doi: 10.1007/s00203-024-03948-y.
- [12] A. W. Negash and B. A. Tsehail, "Current applications of bacteriocin," *Int J Microbiol*, vol. 2020, no. 1, p. 4374891, Jan. 2020, doi: 10.1155/2020/4374891.
- [13] D. Lahiri et al., "Bacteriocin: a natural approach for food safety and food security," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, p. 1005918, Oct. 2022, doi: 10.3389/FBIOE.2022.1005918.
- [14] Z. Pilevar, H. Hosseini, S. Beikzadeh, E. Khanniri, and A. M. Alizadeh, "Application of bacteriocins in meat and meat products: an update," *Curr Nutr Food Sci*, vol. 16, no. 2, pp. 120–133, Oct. 2018, doi: 10.2174/1573401314666181001115605.

- [15] R. Kumariya, A. K. Garsa, Y. S. Rajput, S. K. Sood, N. Akhtar, and S. Patel, "Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria," *Microb Pathog*, vol. 128, pp. 171–177, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.MICPATH.2019.01.002.
- [16] M. L. Chikindas, J. Novak, A. J. M. Driessen, W. N. Konings, K. M. Schilling, and P. W. Caufield, "Mutacin II, a bactericidal antibiotic from *Streptococcus mutans*," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 39, no. 12, pp. 2656–2660, 1995, doi: 10.1128/AAC.39.12.2656.
- [17] M. Zimina et al., "Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins," *Antibiotics*, vol. 9, no. 9, p. 553, Aug. 2020, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS9090553.
- [18] P. M. O'Connor, T. M. Kuniyoshi, R. P. Oliveira, C. Hill, R. P. Ross, and P. D. Cotter, "Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective," *Curr Opin Biotechnol*, vol. 61, pp. 160–167, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.COPBIO.2019.12.023.
- [19] S. Soltani, E. Biron, L. Ben Said, M. Subirade, and I. Fliss, "Bacteriocin-based synergetic consortia: a promising strategy to enhance antimicrobial activity and broaden the spectrum of inhibition," *Microbiol Spectr*, vol. 10, no. 1, Feb. 2022, doi: 10.1128/SPECTRUM.00406-21.
- [20] S. Soltani et al., "Gastrointestinal stability and cytotoxicity of bacteriocins from gram-positive and gram-negative bacteria: a comparative in vitro study," *Front Microbiol*, vol. 12, p. 780355, Jan. 2022, doi: 10.3389/FMICB.2021.780355.
- [21] Anjana and S. K. Tiwari, "Bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria in controlling dysbiosis of the gut microbiota," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 12, p. 851140, May 2022, doi: 10.3389/FCIMB.2022.851140.
- [22] M. Pérez-Ibarreche, D. Field, R. P. Ross, and C. Hill, "A bioengineered nisin derivative to control *Streptococcus uberis* biofilms," *Appl Environ Microbiol*, vol. 87, no. 16, pp. 1–14, Jul. 2021, doi: 10.1128/AEM.00391-21.
- [23] J. M. Shin, J. W. Gwak, P. Kamarajan, J. C. Fenno, A. H. Rickard, and Y. L. Kapila, "Biomedical applications of nisin," *J Appl Microbiol*, vol. 120, no. 6, p. 1449, Jun. 2016, doi: 10.1111/JAM.13033.
- [24] A. Angelopoulou, D. Field, M. Pérez-Ibarreche, A. K. Warda, C. Hill, and R. Paul Ross, "Vancomycin and nisin A are effective against biofilms of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* isolates from human milk," *PLoS One*, vol. 15, no. 5, p. e0233284, May 2020, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0233284.
- [25] M. A. Varas et al., "Exploiting zebrafish xenografts for testing the in vivo antitumorigenic activity of microcin E492 against human colorectal cancer cells," *Front Microbiol*, vol. 11, p. 492896, Mar. 2020, doi: 10.3389/FMICB.2020.00405.
- [26] O. I. Balko, O. B. Balko, and L. V. Avdeeva, "Bacteriocins of some groups of gram-negative bacteria," *Mikrobiol Zh*, vol. 82, no. 3, pp. 71–84, May 2020, doi: 10.15407/MICROBIOLJ82.03.071.
- [27] M. G. K. Ghequire and R. De Mot, "The tailocin tale: peeling off phage tails," *Trends Microbiol*, vol. 23, no. 10, pp. 587–590, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.tim.2015.07.011.
- [28] M. Fernandez, A. Godino, A. Príncipe, G. M. Morales, and S. Fischer, "Effect of a *Pseudomonas fluorescens* tailocin against phytopathogenic *Xanthomonas* observed by atomic force microscopy," *J Biotechnol*, vol. 256, pp. 13–20, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2017.07.002.
- [29] D. A. Baltrus, M. Clark, K. L. Hockett, M. Mollico, C. Smith, and S. Weaver, "Prophylactic application of tailocins prevents infection by *Pseudomonas syringae*," *Phytopathology*, vol. 112, no. 3, pp. 561–566, Mar. 2022, doi: 10.1094/PHYTO-06-21-0269-R.
- [30] M. Nazari and D. L. Smith, "A PGPR-produced bacteriocin for sustainable agriculture: a review of thuricin 17 characteristics and applications," *Front Plant Sci*, vol. 11, p. 547681, Jul. 2020, doi: 10.3389/FPLS.2020.00916.
- [31] I. Hammami, M. A. Triki, and A. Rebai, "Purification and characterization of the novel bacteriocin BAC IH7 with antifungal and antibacterial properties," *Journal of Plant Pathology*, vol. 93, no. 2, pp. 443–454, 2011, [Online]. Available: <http://www.jstor.org/stable/41999016>
- [32] M. M. Oliveira, E. T. A. Ramos, M. M. Drechsel, M. S. Vidal, S. Schwab, and J. I. Baldani, "Gluconacin from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 is an active bacteriocin against phytopathogenic and beneficial sugarcane bacteria," *J Appl Microbiol*, vol. 125, no. 6, pp. 1812–1826, Dec. 2018, doi: 10.1111/JAM.14074.
- [33] R. J. Dorosky, L. S. Pierson, and E. A. Pierson, "*Pseudomonas chlororaphis* produces multiple R-tailocin particles that broaden the killing spectrum and contribute to persistence in rhizosphere communities," *Appl Environ Microbiol*, vol. 84, no. 18, Sep. 2018, doi: 10.1128/AEM.01230-18.
- [34] K. Rachwal, A. Boguszewska, J. Kopcinska, M. Karas, M. Tchórzewski, and M. Janczarek, "the regulatory protein *rosr* affects *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii protein profiles, cell surface properties, and symbiosis with clover," *Front Microbiol*, vol. 7, no. AUG, p. 1302, Aug. 2016, doi: 10.3389/FMICB.2016.01302.

- [35] A. Yajima, A. A. N. Van Brussel, J. Schripsema, T. Nukada, and G. Yabuta, "Synthesis and stereochemistry-activity relationship of small bacteriocin, an autoinducer of the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*," *Org Lett*, vol. 10, no. 10, pp. 2047–2050, May 2008, doi: 10.1021/OL8005198
- [36] H. Gadhomi, E. L. A. Hayouni, E. Martinez-Rojas, W. Yeddes, and M. S. Tounsi, "Biochemical composition, antimicrobial and antifungal activities assessment of the fermented medicinal plants extract using lactic acid bacteria," *Arch Microbiol*, vol. 204, no. 7, pp. 1–12, Jul. 2022, doi: 10.1007/S00203-022-02985-9.
- [37] Y. Feng, M. Zhang, A. S. Mujumdar, and Z. Gao, "Recent research process of fermented plant extract: A review," *Trends Food Sci Technol*, vol. 65, pp. 40–48, Jul. 2017, doi: 10.1016/J.TIFS.2017.04.006.
- [38] A. Blandino, M. E. Al-Aseeri, S. S. Pandiella, D. Cantero, and C. Webb, "Cereal-based fermented foods and beverages," *Food Research International*, vol. 36, no. 6, pp. 527–543, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0963-9969(03)00009-7.
- [39] S. D. Todorov, "Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from Bulgaria," *Food Control*, vol. 21, no. 7, pp. 1011–1021, Jul. 2010, doi: 10.1016/J.FOODCONT.2009.12.020.
- [40] K. Kirtonia et al., "Bacteriocin: a new strategic antibiofilm agent in food industries," *Biocatal Agric Biotechnol*, vol. 36, p. 102141, Sep. 2021, doi: 10.1016/J.BCAB.2021.102141.
- [41] V. A. Vincent Volpane et al., "Applications of bacteriocin and protective cultures in dairy products: a mini-review," *Asian J Biol Life Sci*, vol. 10, doi: 10.5530/ajbls.2021.10.36.
- [42] L. Zhang, M. Zhang, and A. S. Mujumdar, "New technology to overcome defects in production of fermented plant products- a review," *Trends Food Sci Technol*, vol. 116, pp. 829–841, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.TIFS.2021.08.014.
- [43] A. A. Baranova, V. A. Alferova, V. A. Korshun, and A. P. Tyurin, "Modern trends in natural antibiotic discovery," *Life*, vol. 13, no. 5, 2023, doi: 10.3390/life13051073.
- [44] R. Fernández-Fernández et al., "Genomic analysis of bacteriocin-producing Staphylococci: high prevalence of lanthipeptides and the micrococcin P1 biosynthetic gene clusters," *Probiotics Antimicrobial Proteins*, pp. 1-16, 2023, doi: 10.1007/S12602-023-10119-W.
- [45] P. Chanos and T. Mygind, "Co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 100, no. 10, pp. 4297–4308, May 2016, doi: 10.1007/S00253-016-7486-8.
- [46] W. Liu, J. Zhou, F. Tan, H. Yin, C. Yang, and K. Lu, "Improvement of nisin production by using the integration strategy of co-cultivation fermentation, foam fractionation and pervaporation," *LWT*, vol. 142, May 2021, doi: 10.1016/J.LWT.2021.111093.
- [47] D. Promrug et al., "Cocultures of *Enterococcus faecium* and *Aeromonas veronii* Induce the Secretion of Bacteriocin-like Substances against *Aeromonas*," *J Agric Food Chem*, vol. 71, no. 43, pp. 16194–16203, Nov. 2023, doi: 10.1021/ACS.JAFC.3C04019.
- [48] R. Nie, Z. Zhu, Y. Qi, Z. Wang, H. Sun, and G. Liu, "Bacteriocin production enhancing mechanism of *Lactiplantibacillus paraplantarum* RX-8 response to *Wickerhamomyces anomalus* Y-5 by transcriptomic and proteomic analyses," *Front Microbiol*, vol. 14, p. 1111516, Feb. 2023, doi: 10.3389/FMICB.2023.1111516.
- [49] A. V. Diachkova, A. A. Nogina, S. L. Tikhonov, N. V. Tikhonova, D. G. Popova, and L. S. Kudryashov, "Biotechnology for bacteriocin synthesis using photostimulation," *BIO Web Conf*, vol. 23, p. 02003, 2020, doi: 10.1051/BIOCONF/20202302003.
- [50] M. Gasperek, H. Steel, and A. Papachristodoulou, "Deciphering mechanisms of production of natural compounds using inducer-producer microbial consortia," *Biotechnol Adv*, vol. 64, p. 108117, May 2023, doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2023.108117.
- [51] S. Priyanka, S. K. R. Namasivayam, S. Sudha, M. Lavanya, and T. Abiraamavalli, "Potential biological active bacteriocin production by Bifidobacterium via eco-friendly, low-cost solid state fermentation principle," *Environmental Quality Management*, vol. 34, no. 1, p. e22210, Sep. 2024, doi: 10.1002/TQEM.22210.
- [52] A. L. Miller et al., "Bacteriocin production by lactic acid bacteria using ice cream co-product as the fermentation substrate," *J Dairy Sci*, vol. 107, pp. 3468–3477, 2024, doi: 10.3168/jds.2023-24249.
- [53] D. F. Benítez-Chao, A. León-Buitimea, J. A. Lerma-Escalera, and J. R. Morones-Ramírez, "Bacteriocins: an overview of antimicrobial, toxicity, and biosafety assessment by in vivo models," *Front Microbiol*, vol. 12, Apr. 2021, doi: 10.3389/FMICB.2021.630695.
- [54] H. Chen, F. Tian, S. Li, Y. Xie, H. Zhang, and W. Chen, "Cloning and heterologous expression of a bacteriocin sakacin P from *Lactobacillus sakei* in *Escherichia coli*," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 94, no. 4, pp. 1061–1068, May 2012, doi: 10.1007/S00253-012-3872-Z.

- [55] J. J. Jiménez et al., "Cloning strategies for heterologous expression of the bacteriocin enterocin A by *Lactobacillus sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475," *Microb Cell Fact*, vol. 14, no. 1, pp. 1–11, Oct. 2015, doi: 10.1186/S12934-015-0346-X.
- [56] R. Li, X. Wan, T. M. Takala, and P. E. J. Saris, "Heterologous Expression of the *Leuconostoc* Bacteriocin Leucocin C in Probiotic Yeast *Saccharomyces boulardii*," *Probiotics Antimicrob Proteins*, vol. 13, no. 1, pp. 229–237, Feb. 2021, doi: 10.1007/S12602-020-09676-1.
- [57] C. A. Van Reenen, M. L. Chikindas, W. H. Van Zyl, and L. M. T. Dicks, "Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*," *Int J Food Microbiol*, vol. 81, no. 1, pp. 29–40, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0168-1605(02)00164-2.
- [58] J. M. Rodríguez, M. I. Martínez, N. Horn, and H. M. Dodd, "Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria," *Int J Food Microbiol*, vol. 80, no. 2, pp. 101–116, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0168-1605(02)00153-8.
- [59] D. Dey et al., "Antiviral effects of bacteriocin against animal-to-human transmittable mutated SARS-COV-2: a systematic review," *Front Agric Sci Eng*, vol. 8, no. 4, pp. 603–622, Dec. 2021, doi: 10.15302/J-FASE-2021397.

Los insectos como aliados de la biotecnología: siete años de exploración en avispas sociales para la búsqueda nuevos compuestos antibióticos


Insects as allies in biotechnology: a seven-years exploration of neotropical social wasps for novel antibiotic compounds

Laura Chavarría-Pizarro¹, Kattia Núñez-Montero²

Chavarría-Pizarro, L; Núñez-Montero, K. Los insectos como aliados de la biotecnología: siete años de exploración en avispas sociales para la búsqueda nuevos compuestos antibióticos . *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 90-99.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7614>

1 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 laura.chavarria@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0002-7630-1104>

2 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 knunez@itcr.ac.cr

Facultad de Ciencias de La Salud, Instituto de Ciencias Aplicadas de la Universidad Autónoma de Chile.

 kattia.nunez@uautonoma.cl

 <https://orcid.org/0000-0002-8629-5107>

Palabras clave

Actinobacterias; antibióticos; avispas sociales; celdas de cría; obreras.

Resumen

Los insectos son de los organismos más importantes en los ecosistemas terrestres, pero también son indispensables en aquellos ambientes modificados por el hombre como los cultivos y las ciudades. Los insectos han sido estudiados desde hace mucho tiempo pero, con el surgimiento de la biotecnología, el enfoque que se le ha dado a los estudios está cambiando. Por ejemplo, los insectos sociales están siendo investigados debido a las relaciones simbióticas que mantienen con microorganismos productores de sustancias antimicrobianas. Es por este motivo que en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) se han realizado investigaciones para determinar la presencia de actinobacterias en colonias de avispas sociales, y probar su actividad antibiótica. Este manuscrito tiene como objetivo realizar una revisión de los resultados obtenidos hasta el momento a partir de los proyectos de investigación realizados en el CIB. De los diferentes proyectos se consolidó una colección de 60 actinobacterias, que también inhibieron el crecimiento de cepas relacionadas con patógenos humanos y de insectos. Debido a los resultados obtenidos, actualmente se están desarrollando dos proyectos de investigación para analizar el genoma de las cepas con mayor inhibición, y para caracterizar los metabolitos secundarios. A partir de las investigaciones realizadas, se ha demostrado que las avispas de la tribu Epiponini mantienen asociaciones con diversos géneros de actinobacterias que presentan actividad antibiótica, además de que estas poseen una variedad de genes asociados a la producción de compuestos bioactivos. Los resultados demuestran que estos organismos tienen un gran potencial para la obtención de nuevos productos naturales antimicrobianos.

Keywords

Actinobacteria; antibiotics; breed cells; social wasps; workers.

Abstract

Insects are one of the most significant organisms in terrestrial ecosystems, but they are also crucial in human-modified environments such as crops and cities. Insects have been the subject of study for a long time, but with the advent of biotechnology, the focus of these studies is shifting. For instance, social insects are being researched due to the symbiotic relationships they maintain with microorganisms that produce antimicrobial substances. For this reason, the Biotechnology Research Center (CIB) of the Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) has conducted two studies to determine the presence of actinobacteria in colonies of social wasps and to test their antibiotic activity. The main objective of this paper was to perform a review of the results obtained from the research projects conducted at the Biotechnology Research Center (CIB). As a result of these studies, a collection of 60 actinobacteria has been established, which also inhibited the growth of strains related to human and insect pathogens. Due to these findings, two research projects are being conducted to analyze the genome of the strains with the highest inhibition, and to characterize the secondary metabolites. The findings have shown that wasps belonging to the Epiponini tribe maintain associations with several genera of actinobacteria that exhibit antibiotic activity, and that these strains possess a variety of genes associated with the production of bioactive compounds. The results demonstrate the great potential of these organisms for the discovery of new natural antimicrobial products.

Introducción

Los insectos son los organismos más diversos y abundantes [1] de los ecosistemas terrestres, representan aproximadamente dos tercios del total de especies que hay en el planeta [2]. Su diversidad y abundancia se debe a la gran capacidad adaptativa que han desarrollado, ya que pueden vivir bajo diferentes condiciones de temperatura, humedad y luz, lo que ha permitido la colonización de una gran variedad de hábitats (con excepción de la Antártida). Además, tienen diversos tipos de dieta, algunos son saprófagos, detritívoros, herbívoros, carnívoros, entre otros.

Al ser los insectos organismos clave en los ecosistemas, las poblaciones humanas dependemos de muchos de los servicios ecosistémicos que ofrecen, tales como la polinización, dispersión de semillas, y la descomposición y reciclaje de nutrientes; además, muchas especies mantienen bajo control otras poblaciones de insectos, y también son fuente de alimento para otras especies de animales. Adicionalmente, las poblaciones humanas han domesticado algunos grupos de insectos para su beneficio, como es el caso de las abejas para la producción de miel y sus derivados, los gusanos de seda, así como una gran cantidad de especies que son utilizadas como fuente de alimento para animales domésticos y humanos [3]. Unas pocas especies también tienen importancia debido a sus efectos negativos en las actividades agrícolas y la salud humana como transmisores de enfermedades [4].

Es por estas razones que los científicos han estudiado los insectos desde hace muchos años; sin embargo, con el surgimiento de áreas como la biotecnología, el enfoque que se le ha dado a los estudios ha ido cambiando por las múltiples aplicaciones que estos organismos tienen. Por ejemplo, en el campo de la agricultura se han aislado péptidos antimicrobianos de los insectos para proteger cultivos, y se ha aplicado la tecnología del ARN de interferencia y organismos transgénicos para combatir insectos plagas [5], [6]. En biomedicina, los insectos están siendo utilizados como organismos modelo para estudiar diferentes infecciones y sus tratamiento, como es el caso del uso del gusano o polilla de la cera (*Galleria mellonella*) como un hospedero para el estudio de patógenos que afectan los humanos y la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) como modelo en investigación biomédica asociada al asma y muchas otras patologías [7], [8]. Así también, se ha reportado la obtención de compuestos antibióticos producidos por los mismos insectos o por los microorganismos asociados a ellos, pues estos funcionan como una defensa química y genética contra las enfermedades que pueden afectar a sus hospederos [9], [10], [11]. Por ejemplo, se han descrito especies endosimbiontes de *Streptomyces* en las antenas de las avispas solitarias cavadoras del género *Philanthus* [12]. Estos simbiosiontes de *Streptomyces* han demostrado un importante papel en la profilaxis antibiótica combinada para la descendencia de estas avispas [13].

Muchos grupos de insectos tienen un gran potencial para la obtención de compuestos antimicrobianos, como es el caso de los insectos sociales (abejas, hormigas, avispas y termitas), ya que varias características del ciclo de vida colonial pueden favorecer el desarrollo de microorganismos infecciosos. Por ejemplo, los insectos sociales comparten un espacio común (nido) con miles de individuos en donde se mantiene una temperatura y humedad confortable, y donde también se da la acumulación de desechos. Otro aspecto importante es que los individuos de una colonia tienen un alto grado de parentesco [14], lo que significa una menor variabilidad genética, y mayor probabilidad de transmisión de enfermedades. Dados estos argumentos, para mantener las colonias libres de parásitos, los insectos sociales han desarrollado estrategias para conservar los nidos limpios, incluyendo comportamientos para controlar y eliminar los parásitos, así como el establecimiento de relaciones simbióticas con microorganismos que producen sustancias antimicrobiana [15], [12]. Por ejemplo, es conocido que las hormigas cultivadoras de hongos utilizan bacterias que producen antibióticos para controlar los parásitos en sus jardines [16], entre ellas se han reportado cepas de *Burkholderia* sp. productoras de antibióticos presentes en sus colonias [15]. Por su parte, las hormigas

tejedoras, *Polyrhachis dives*, mostraron resistencia a enfermedades debido a sus glándulas productoras de antibióticos [17], [18]. Tanto hormigas cortadoras de hojas, como tejedoras, han demostrado utilizar esta producción de antibióticos para desinfectar sus nidos y defender a las crías de patógenos [10], [19], [20]. Otras actinobacterias con actividad antimicrobiana han sido aisladas también de avispas del género *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae, Polistini) [21].

En Costa Rica, investigadores de la Universidad de Costa Rica también evidenciaron la presencia de múltiples asociaciones de insectos del Neotrópico con actinobacterias, mostrando la presencia de estos microorganismos en hormigas, avispas sociales, abejas sin aguijón, abejas de la tribu Euglossini, y avispas solitarias de las familias Pompilidae y Crabronidae [22], [23]. Debido a la relevancia de los insectos para las poblaciones humanas y los ecosistemas, este manuscrito tiene como objetivo mostrar algunos de los resultados obtenidos en los proyectos de investigación realizados en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) sobre los microorganismos asociados a las avispas sociales Neotropicales (Epiponini) y su potencial para la obtención de nuevos compuestos antimicrobianos.

Actinobacterias asociadas a nidos de avispas

Dentro del grupo de los insectos sociales, se decidió trabajar con especies de avispas de la tribu Epiponini (Fig. 1A) ya que el grupo presenta un gran potencial para realizar estudios exploratorios sobre la presencia de actinobacterias y otros microorganismos productores de sustancias antibióticas, porque en las celdas de cría se acumulan desechos fecales (meconio) producidos por las larvas (Fig. 1B). Como en las avispas sociales hay reutilización de las celdas de cría, los organismos de estadios inmaduros (huevo, larvas y pupas) se desarrollan por encima de los desechos dejados por las larvas que ocuparon previamente la celda [24]. Dado que el meconio es un sustrato ideal para el desarrollo de parásitos, debería secretarse o producirse algún tipo de sustancia antimicrobiana para evitar infecciones en los inmaduros. Además, este grupo de avispas también fue seleccionado ya que hasta el momento se han realizado pocos estudios sobre los microorganismos asociados a las colonias [22], [23].

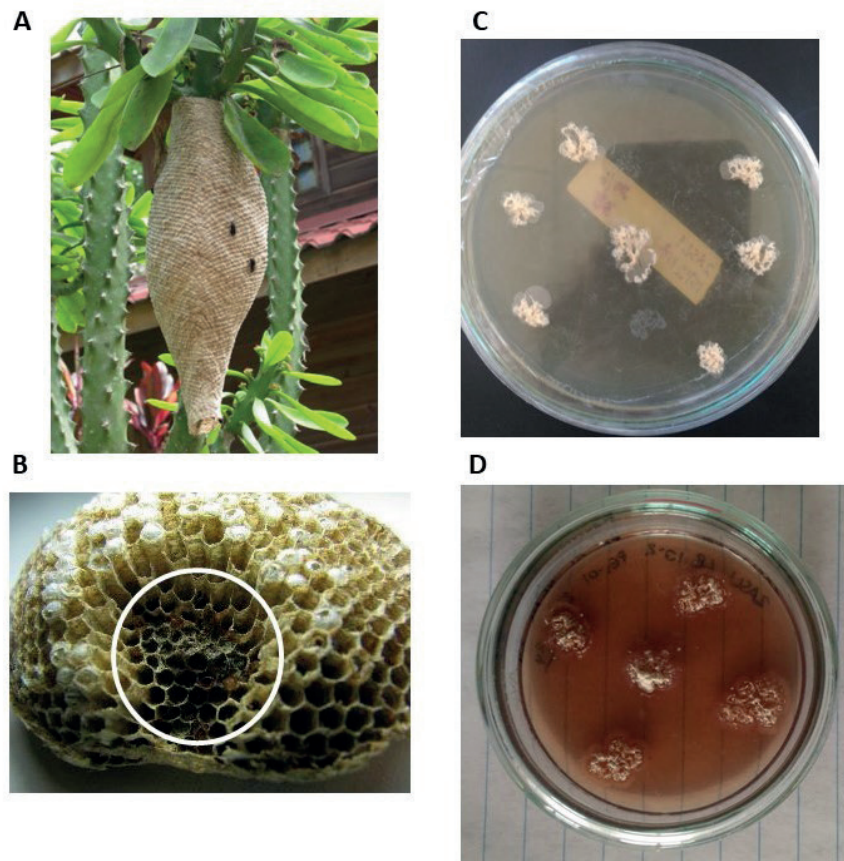


Figura 1. Nido de avispas Epiponini del género *Parachartergus* (A). Panal de un nido de avispas con detalle de meconia en círculo (B). Actinomicetos aislados de las celdas de cría *Amycolaptosis* (C) y *Streptomyces* (D).

Dentro de los microorganismos asociados a las avispas, se seleccionaron las actinobacterias ya que son un grupo con un gran valor económico y científico debido a que muchas especies producen sustancias antibióticas; además, se ha determinado su presencia en otros grupos de insectos sociales [21], [23], [25], [26]. En este contexto, en 2017 se inició el proyecto de investigación exploratorio “Evaluación de microorganismos con actividad antimicrobiana asociados a nidos de avispas sociales” que consistió en determinar la presencia de actinobacterias en las celdas de cría de los nidos. El proyecto fue desarrollado en el CIB, en colaboración con el Centro Nacional De Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), que estuvo encargado de realizar pruebas para determinar si las actinobacterias inhibían el crecimiento de cepas bacterianas no infecciosas relacionadas con patógenos humanos y de insectos (ATCC). Para esta investigación, se estudiaron muestras de cinco géneros de avispas, de donde se aislaron 28 cepas de actinobacterias (Cuadro 1; cepas A-5B) identificadas molecularmente, mostrando que las especies de Epiponini mantienen relaciones con diversas actinobacterias [27].

Cuadro 1. Cepas de actinobacterias con mayor actividad antibiótica aisladas de las celdas de cría y de las obreras de diferentes géneros de avispas sociales en Costa Rica.

| Género de Avispa | Actinobacteria | Cepa | Lugar de Colecta |
|----------------------------------|--------------------------|------|------------------|
| <i>Protopolybia</i> sp. | <i>Nocardiosis</i> | A | ITCR* |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Streptomyces</i> | R | ITCR |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 2R | SBG** |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Pseudonocardia</i> | 2W | SBG |
| <i>Parachartergus</i> sp. | <i>Amycolaptosis</i> | 2Y | SBG |
| <i>Chartergellus golfitensis</i> | <i>Pseudonocardia</i> | 3C | RFSG# |
| <i>Parachartergus</i> sp. | <i>Amycolaptosis</i> | 3E | SBG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Streptomyces</i> | 3L | SBG |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Pseudonocardia</i> | 3O | RFSG |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Pseudonocardia</i> | 3V | RFSG |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Streptomyces</i> | 3Y | RFSG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Pseudonocardia</i> | 4A | PND+ |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Streptomyces</i> | 4O | RFSG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 4R | PND |
| <i>Parachartergus</i> sp. | <i>Pseudonocardia</i> | 4S | SBG |
| <i>Parachartergus</i> sp. | <i>Kocuria</i> | 4V | SBG |
| <i>Parachartergus</i> sp. | <i>Kocuria</i> | 5B | SBG |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6A | SBG |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6B | SBG |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6F | SBG |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6G | SBG |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6I | SBG |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6J | SBG |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6K | SBG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6M | SBG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6N | SBG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6O | SBG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Brevibacterium</i> | 6P | SBG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6Q | SBG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6S | SBG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6T | SBG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6U | SBG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6V | SBG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6W | SBG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 6Z | SBG |
| <i>Metapolybia</i> sp. | <i>Nocardiosis</i> | 7B | SBG |
| <i>Protopolybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 7F | SBG |
| <i>Protopolybia</i> sp. | <i>Streptomyces</i> | 7G | OET++ |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Streptomyces</i> | 7K | ITCR |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Saccharopolyspora</i> | 7Z | SBG |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Tsukamurella</i> | 8F | RFSG |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Tsukamurella</i> | 8J | RFSG |

| Género de Avispa | Actinobacteria | Cepa | Lugar de Colecta |
|---------------------------|-----------------------|------|------------------|
| <i>Protopolybia</i> sp. | <i>Streptomyces</i> | 8L | RFSG |
| <i>Polybia</i> sp. | <i>Streptomyces</i> | 8X | RFSG |
| <i>Parachartergus</i> sp. | <i>Streptomyces</i> | MA | ITCR |
| <i>Parachartergus</i> sp. | <i>Kocuria</i> | MB | ITCR |
| <i>Parachartergus</i> sp. | <i>Microbacterium</i> | MN | ITCR |
| <i>Parachartergus</i> sp. | <i>Microbacterium</i> | MO | ITCR |
| <i>Parachartergus</i> sp. | <i>Streptomyces</i> | MP | ITCR |
| <i>Parachartergus</i> sp. | <i>Nocardiosis</i> | P1A | SBG |
| <i>Parachartergus</i> sp. | <i>Amycolaptosis</i> | P1P | SBG |
| <i>Parachartergus</i> sp. | <i>Amycolaptosis</i> | P1S | SBG |

*ITCR = Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 9° 51' 17.9" N, 83° 54' 33.9" O.

**SBG = Santa Bárbara, Santa Cruz, Guanacaste, 0° 10' 23.7" N, 85° 35' 38.5" O.

RFSG = Refugio de Fauna Silvestre Gofito, 8° 39' 15.8" N, 83° 10' 45.1" O.

+ PND = Parque Nacional Diría, Santa Cruz, Guanacaste, 10° 10' 23.7" N, 85° 35' 38.5" O.

++ OET = La Selva, Sarapiquí, Heredia, 10° 25' 19" N, 84° 00' 54" O.

Al finalizar este proyecto se concluyó que era importante determinar si las asociaciones se establecían solo entre los microorganismos y los estadios inmaduros de las avispas, o si también se podían establecer con los adultos. Esta suposición está basada en las observaciones que se han realizado sobre el comportamiento de los individuos dentro de las colonias, ya que cuando un nuevo adulto completamente desarrollado abandona una celda de cría, las obreras permanecen aproximadamente media hora insertando y sacando la cabeza de la misma [28], [29], [30]. Hasta el momento, no se ha logrado determinar exactamente qué es lo que hacen las obreras en las celdas, pero se cree que podrían estar desinfectando para evitar la propagación de microorganismos patógenos desde el meconia acumulado hacia el resto del nido y los inmaduros. Estas observaciones indican que probablemente los microorganismos productores de antibióticos establecen asociaciones con los adultos quienes son los encargados de limpiar las celdas y el nido en general.

Actinobacterias asociadas a adultos de avispas

En el proyecto titulado "Evaluación de microorganismos con actividad antimicrobiana asociados a adultos de avispas sociales (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae, Epiponini)" se aislaron actinobacterias a partir de la cutícula y glándulas salivales de obreras de cinco géneros. Con los aislamientos se realizaron pruebas de actividad antibiótica en el Laboratorio de Biocontrol del CIB. Como resultado de esta investigación se obtuvieron 48 cepas de actinobacterias (Cuadro 1; cepas 6A-P1S) [31]. Se determinó que la mayor parte de las cepas inhibía el crecimiento de cepas bacterianas no infecciosas relacionadas con patógenos humanos y de insectos [31]. Debido a la importante actividad antibiótica mostrada por las cepas se contó con la colaboración del Instituto Pasteur de París (Francia) para realizar preliminarmente la secuenciación del genoma de seis de las cepas que presentaron mayor grado de inhibición.

Identificación de elementos genéticos con potencial antimicrobiano

Los genomas de las actinobacterias aisladas fueron analizados para identificar elementos genéticos relacionados con la producción de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano; los detalles sobre los análisis bioinformáticos realizados se encuentran en [31], [32]. A partir de estas investigaciones se logró identificar clúster de genes biosintéticos

(BGCs) relacionados con la producción de moléculas antibióticas, además de definir que la mayor parte de las cepas de actinobacterias aisladas corresponde a nuevas especies según su comparación genómica [31].

Debido a los resultados obtenidos a partir del análisis preliminar de los genomas, se están desarrollando actualmente dos proyectos: “Genómica de actinobacterias asociadas a avispa social para estudio de elementos genéticos antimicrobianos”, donde se cuenta nuevamente con la colaboración del Instituto Pasteur (París, Francia), para analizar el genoma de todas las cepas que presentaron mayor actividad antibiótica e identificar los genes asociados con el potencial antimicrobiano observado, así como establecer las relaciones filogenéticas entre las cepas aisladas y otras asociadas a insectos sociales. Como resultado de este proyecto, se ha caracterizado el genoma de varias cepas [33], y se han identificado BGCs asociados con compuestos antimicrobianos (en desarrollo). Finalmente, el proyecto más reciente titulado “Metabolómica de compuestos antimicrobianos obtenidos de actinobacterias aisladas de avispa social” tiene como objetivo caracterizar la producción de metabolitos secundarios a partir de las cepas que presentaron mayor actividad antibiótica en distintas condiciones de cultivo, a través del estudio del metaboloma basado en detección por espectrometría de masas, lo cual se llevará a cabo en colaboración con la Universidad de Costa Rica (UCR).

Gracias a la colaboración recibida y los avances que obtuvimos en estos siete años de investigación, hemos logrado formar un grupo de trabajo que esperamos consolidar en los proyectos que están en desarrollo y en los que se espera realizar según nuestra planificación futura. Además, se espera contar con nuevas fuentes de colaboración nacional e internacional para estudiar todas las cepas obtenidas hasta el momento y caracterizar sus metabolitos, con el fin último de proponer uso a los compuestos obtenidos, y transmitir el conocimiento a la sociedad a través de una solución biotecnológica a base de compuestos derivados de simbiontes de las avispas sociales.

Conclusiones

Los insectos son organismos que tienen un gran potencial para realizar estudios biotecnológicos. Esto se ha demostrado en los estudios que se están desarrollando en el Centro de Investigación en Biotecnología, donde se encontraron varias cepas nuevas de actinobacterias asociadas a las celdas de cría y adultos de los nidos de diferentes especies de avispas sociales. La mayor parte de las cepas obtenidas han inhibido el crecimiento de cepas no infecciosas relacionadas con patógenos de humanos y de insectos, lo que demuestra que este grupo tiene un gran potencial para encontrar nuevos compuestos antimicrobianos. Los resultados obtenidos son muy prometedores debido al problema de la resistencia que un creciente número de microorganismos patógenos está desarrollando contra los medicamentos tradicionalmente utilizados. Por estos motivos, es importante continuar con esta investigación, ya sea utilizando otras especies de avispas e insectos para caracterizar los metabolitos que puedan estar produciendo los microorganismos asociados, así como realizar pruebas de inhibición contra otras cepas patógenas de humanos, animales y plantas de producción.

Agradecimientos

Se agradece a todos los colaboradores que han participado de los proyectos mencionados y que han permitido el avance en esta línea de investigación. Los diferentes proyectos que han conformado esta línea de investigación se han realizado con la colaboración de: CENIBiot; Dr. William Rivera y M.Sc. William Watson del Laboratorio de Biocontrol del CIB; Dr. Javier Pizarro Cerdá del Instituto Pasteur (París, Francia); y Dr. Jonathan Parra de la UCR. Además, cuatro tesis



de la carrera de Ingeniería en Biotecnología del ITCR fueron desarrolladas en el marco de los proyectos mencionados, por los estudiantes: Tania Esquivel, Mariela Gutiérrez y Pablo Jiménez. Finalmente se agradece a los estudiantes asistentes de investigación de la carrera de Ingeniería en Biotecnología que han aportado a las labores prácticas del proyecto. Los proyectos fueron realizados con los siguientes permisos otorgados por la Comisión Nacional de Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO): R-CM-ITCR-006-2017-OT, R-CM-ITCR-007-2017-OT, R-CM-ITCR-008-2017-OT, R-CM-ITCR-009-2017-OT, R-CM-ITCR-001-2019-OT, R-CM-ITCR-002-2019-OT, R-CM-ITCR-005-2022-OT-CONAGEBIO, R-CM-ITCR-006-2022-OT-CONAGEBIO, R-CM-ITCR-006-2023-OT-CONAGEBIO.

Referencias

- [1] Hölldobler, T.B. y Wilson, E.O., *The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies*, vol. 85. New York: W. W. Norton, 2009.
- [2] F. Sánchez-Bayo y K. A. G. Wyckhuys, «Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers», *Biol. Conserv.*, vol. 232, pp. 8-27, abr. 2019, doi: 10.1016/j.biocon.2019.01.020.
- [3] Arnold van Huis, Harmke Klunder, Esther Mertens, Afton Halloran, Giulia Muir, y Paul Vantomme, «Edible insects: future prospects for food and feed security». Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2013.
- [4] S. Belluco *et al.*, «Insects and Public Health: An Overview», *Insects*, vol. 14, n.º 3, Art. n.º 3, mar. 2023, doi: 10.3390/insects14030240.
- [5] C. Jansen y K.-H. Kogel, «Insect Antimicrobial Peptides as New Weapons Against Plant Pathogens», en *Insect Biotechnology*, A. Vilcinskas, Ed., Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 123-144. 2011 doi: 10.1007/978-90-481-9641-8_7.
- [6] J. Gatehouse y D. Price, «Protection of Crops Against Insect Pests Using RNA Interference», en *Insect Biotechnology*, vol. 2, pp. 145-168. 2011. doi: 10.1007/978-90-481-9641-8_8.
- [7] K. Mukherjee, E. Domann, y T. Hain, «The Greater Wax Moth *Galleria mellonella* as an Alternative Model Host for Human Pathogens», en *Insect Biotechnology*, A. Vilcinskas, Ed., Dordrecht: Springer Netherlands. pp. 3-14. 2011. doi: 10.1007/978-90-481-9641-8_1.
- [8] T. Roeder, K. Isermann, C. Wagner, y C. Warmbold, «Fruit Flies as Models in Biomedical Research – A *Drosophila* Asthma Model», en *Insect Biotechnology*, A. Vilcinskas, Ed., Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 15-27. 2011. doi: 10.1007/978-90-481-9641-8_2.
- [9] M. Kaltenpoth, «Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects?», *Trends Microbiol.*, vol. 17, n.º 12, pp. 529-535, dic. 2009, doi: 10.1016/j.tim.2009.09.006.
- [10] A. Stow y A. Beattie, «Chemical and genetic defenses against disease in insect societies», *Brain. Behav. Immun.*, vol. 22, n.º 7, pp. 1009-1013, oct. 2008, doi: 10.1016/j.bbi.2008.03.008.
- [11] S. Turillazzi, N. Meriggi, y D. Cavalieri, «Mutualistic Relationships between Microorganisms and Eusocial Wasps (Hymenoptera, Vespidae)», *Microorganisms*, vol. 11, n.º 5, Art. n.º 5, may 2023, doi: 10.3390/microorganisms11051340.
- [12] M. Kaltenpoth *et al.*, «'Candidatus *Streptomyces philanthi*', an endosymbiotic streptomycete in the antennae of *Philanthus digger* wasps», *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 56, n.º 6, pp. 1403-1411, 2006, doi: 10.1099/ij.s.0.64117-0.
- [13] J. Kroiss *et al.*, «Symbiotic streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring», *Nat. Chem. Biol.*, vol. 6, n.º 4, pp. 261-263, abr. 2010, doi: 10.1038/nchembio.331.
- [14] M. D. Hastings, D. C. Queller, F. Eischen, y J. E. Strassmann, «Kin selection, relatedness, and worker control of reproduction in a large-colony epiponine wasp, *Brachygastra mellifica*», *Behav. Ecol.*, vol. 9, n.º 6, pp. 573-581, ene. 1998, doi: 10.1093/beheco/9.6.573.
- [15] A. V. Santos, R. J. Dillon, V. M. Dillon, S. E. Reynolds, y R. I. Samuels, «Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*», *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 239, n.º 2, pp. 319-323, oct. 2004, doi: 10.1016/j.femsle.2004.09.005.
- [16] C. R. Currie, J. A. Scott, R. C. Summerbell, y D. Malloch, «Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites», *Nature*, vol. 398, n.º 6729, pp. 701-704, abr. 1999, doi: 10.1038/19519.

- [17] P. Graystock y W. O. H. Hughes, «Disease resistance in a weaver ant, *Polyrhachis dives*, and the role of antibiotic-producing glands», *Behav. Ecol. Sociobiol.*, vol. 65, n.º 12, pp. 2319-2327, dic. 2011, doi: 10.1007/s00265-011-1242-y.
- [18] E. B. Van Arnem *et al.*, «Selvamycin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, n.º 46, pp. 12940-12945, nov. 2016, doi: 10.1073/pnas.1613285113.
- [19] M. Poulsen, W. O. H. Hughes, y J. J. Boomsma, «Differential resistance and the importance of antibiotic production in *Acromyrmex echinatior* leaf-cutting ant castes towards the entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius*», *Insectes Sociaux*, vol. 53, n.º 3, pp. 349-355, ago. 2006, doi: 10.1007/s00040-006-0880-y.
- [20] C. Tranter, P. Graystock, C. Shaw, J. F. S. Lopes, y W. O. H. Hughes, «Sanitizing the fortress: protection of ant brood and nest material by worker antibiotics», *Behav. Ecol. Sociobiol.*, vol. 68, n.º 3, pp. 499-507, mar. 2014, doi: 10.1007/s00265-013-1664-9.
- [21] A. A. Madden, A. Grassetti, J.-A. N. Soriano, y P. T. Starks, «Actinomycetes with Antimicrobial Activity Isolated from Paper Wasp (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae) Nests», *Environ. Entomol.*, vol. 42, n.º 4, pp. 703-710, ago. 2013, doi: 10.1603/EN12159.
- [22] B. Matarrita-Carranza *et al.*, «*Streptomyces* sp. M54: an actinobacteria associated with a neotropical social wasp with high potential for antibiotic production», *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 114, n.º 4, pp. 379-398, abr. 2021, doi: 10.1007/s10482-021-01520-y.
- [23] B. Matarrita-Carranza, R. D. Moreira-Soto, C. Murillo-Cruz, M. Mora, C. R. Currie, y A. A. Pinto-Tomas, «Evidence for Widespread Associations between Neotropical Hymenopteran Insects and Actinobacteria», *Front. Microbiol.*, vol. 8, oct. 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.02016.
- [24] Jeanne RL, «The swarm founding Polistinae», en *The Social Biology of Wasps*, Ross KG, Matthews RW (eds.), Ithaca: Cornell University, 1991, pp. 7-29.
- [25] V. Corby-Harris, P. Maes, y K. E. Anderson, «The Bacterial Communities Associated with Honey Bee (*Apis mellifera*) Foragers», *PLOS ONE*, vol. 9, n.º 4, p. e95056, abr. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0095056.
- [26] S. Schmidt, S. Kildgaard, H. Guo, C. Beemelmans, y M. Poulsen, «The chemical ecology of the fungus-farming termite symbiosis», *Nat. Prod. Rep.*, vol. 39, n.º 2, pp. 231-248, feb. 2022, doi: 10.1039/D1NP00022E.
- [27] Chavarría-Pizarro, L, «Los insectos y la biotecnología: avisas sociales como fuente de nuevos compuestos antibióticos», *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 32, 2019, doi: <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4639>.
- [28] M. V. Baio, F. B. Noll, y R. Zucchi, «Shape differences rather than size differences between castes in the Neotropical swarm-founding wasp *Metapolybia docilis* (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini)», *BMC Evol. Biol.*, vol. 3, n.º 1, p. 10, may 2003, doi: 10.1186/1471-2148-3-10.
- [29] F. S. Nascimento, I. C. Tannure-Nascimento, y R. Zucchi, «Behavioral mediators of cyclical oligogyny in the Amazonian swarm-founding wasp *Asteloeca ujhelyii* (Vespidae, Polistinae, Epiponini)», *Insectes Sociaux*, vol. 51, n.º 1, pp. 17-23, feb. 2004, doi: 10.1007/s00040-003-0696-y.
- [30] L. Chavarría-Pizarro * y M. J. West-Eberhard, «The behavior and natural history of *Chartergellus*, a little-known genus of neotropical social wasps (Vespidae Polistinae Epiponini)», *Ethol. Ecol. Evol.*, vol. 22, n.º 4, pp. 317-343, nov. 2010, doi: 10.1080/03949370.2010.510035.
- [31] L. Chavarría-Pizarro, K. Núñez-Montero, M. Gutiérrez-Araya, W. Watson-Guido, W. Rivera-Méndez, y J. Pizarro-Cerdá, «Novel strains of Actinobacteria associated with neotropical social wasps (Vespidae; Polistinae, Epiponini) with antimicrobial potential for natural product discovery», *FEMS Microbes*, vol. 5, p. xtae005, ene. 2024, doi: 10.1093/femsmc/xtae005.
- [32] M. Gutiérrez-Araya, K. Núñez-Montero, J. Pizarro-Cerdá, y L. Chavarría-Pizarro, «Draft Genome Sequences of *Saccharopolyspora* sp. Strains and *Streptomyces* sp. Strains, Isolated from Social Wasps (Vespidae; Polistinae: Epiponini)», *Microbiol. Resour. Announc.*, vol. 11, n.º 1, pp. e00935-21, ene. 2022, doi: 10.1128/MRA.00935-21.
- [33] D. Rojas-Villalta, K. Núñez-Montero, J. Pizarro-Cerdá, y L. Chavarría-Pizarro, «Draft Genome Sequences of *Tsukamurella* sp. 8F and 8J Strains Isolated from Social Wasps (Vespidae; Polistinae: Epiponini)», *Microbiol. Resour. Announc.*, vol. 12, n.º 6, pp. e00237-23, may 2023, doi: 10.1128/mra.00237-23.

Estado actual de las cutinasas en la problemática de la degradación de plásticos de un solo uso


Current state of cutinases in addressing the issue of single-use plastic degradation

Marcel de Jesús Arrieta-Fonseca¹

Arrieta-Fonseca, M.J. Estado actual de las cutinasas en la problemática de la degradación de plásticos de un solo uso. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 100-108.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7615>

¹ Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 m.arrieta@estudiantec.cr

 <https://orcid.org/0009-0003-1056-8994>

Palabras clave

Biodegradación; enzimas; hidrolasas; polietileno.

Resumen

El consumo generalizado de plásticos de un solo uso ha ocasionado una crisis ambiental debido a su sobreacumulación en los ecosistemas. Este artículo explora el estado actual de las cutinasas, uno de los principales tipos de enzimas con potencial para degradar plásticos de un solo uso. Las cutinasas (EC 3.1.1.74) son serina hidrolasas del grupo de las hidrolasas α/β capaces de catalizar reacciones que degradan polímeros, principalmente tereftalato de polietileno (PET) y polibutilenadipato-co-tereftalato (PBAT), y son producidas por bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Cada enzima posee características diferentes según su microorganismo de origen, siendo las de hongos y levaduras más similares entre sí que las bacterianas. Las herramientas biotecnológicas, como la biología sintética, han demostrado ser estrategias innovadoras capaces de mejorar la eficiencia y estabilidad de las cutinasas en la degradación de plásticos, capaces de ofrecer una posible solución sostenible para la crisis ambiental causada por estos materiales.

Keywords

Biodegradation; enzymes; hydrolases; polyethylene.

Abstract

The widespread consumption of single-use plastics has caused an environmental crisis due to their overaccumulation in ecosystems. This article explores the current status of cutinases, one of the main types of enzymes with the potential to degrade single-use plastics. Cutinases (EC 3.1.1.74) are serine hydrolases of the group of α/β hydrolases capable of catalyzing reactions that degrade polymers, mainly polyethylene terephthalate (PET) and polybutylene adipate-co-terephthalate (PBAT), and are produced by bacteria, filamentous fungi and yeasts. Each enzyme has different characteristics depending on its microorganism of origin, with those of fungi and yeast being more similar to each other than those of bacteria. Biotechnological tools, such as synthetic biology, have proven to be innovative strategies capable of improving the efficiency and stability of cutinases in the degradation of plastics, capable of offering a possible sustainable solution to the environmental crisis caused by these materials.

Introducción

El plástico es un material polimérico sintético derivado del petróleo crudo, gas natural o carbón [1]. El empleo generalizado de plásticos de un solo uso surgió en el transcurso del siglo XX, con un incremento significativo a partir de la década de 1950, crecimiento que se le atribuye en gran medida al ser un material con amplia disponibilidad, versatilidad, durabilidad y resistencia al deterioro [2]. En el año 2014, solo en los Estados Unidos, fueron utilizadas más de 100 millones de bolsas de plástico que, con su potencial de reciclaje extremadamente bajo, pasan a ser en su mayoría fuente significativa de contaminación en ecosistemas terrestres y marinos [3]. Para el 2024, se estima que se han producido más de 9200 millones de toneladas métricas de plástico a nivel global [4]. Esto es equivalente a aproximadamente 1500 veces el volumen de la gran pirámide de Giza, o a cubrir la superficie entera del planeta con poco más de 60 cm de plástico. Las prácticas de gestión de residuos no son suficiente para lidiar con el impacto medioambiental que este material genera; datos del 2023 indican que del total de plástico

producido solamente se ha reciclado alrededor de un 9%, un 12% ha sido incinerado, y el 79% restante ha sido depositado en vertederos o liberado indiscriminadamente al medio ambiente [5].

En el escenario actual, el uso masivo de plásticos de un solo uso se ha convertido en una amenaza ambiental al representar un 95.3% de la contaminación en tierra [6]. A pesar de los esfuerzos para gestionar los residuos, las alternativas actuales de degradación suelen tener como producto final plásticos secundarios y microplásticos, los cuales corresponden a partículas con menor trazabilidad que de igual forma representan una amenaza para la vida marina y terrestre [7].

Bajo este contexto, es necesario investigar cómo mejorar las estrategias de degradación de plásticos de un solo uso con el fin de que no generen subproductos contaminantes adicionales ni aumenten la huella de carbono, al mismo tiempo que presenten efectividad en costos y tiempos [8]. En este ámbito, la degradación ejecutada por microorganismos mediante enzimas ha surgido como una solución prometedora ante la crisis medioambiental que afecta el mundo [9]. Estas moléculas biológicas, gracias a su capacidad catalítica específica, pueden llegar a ser una alternativa real para solucionar la crisis global de los plásticos y alcanzar una economía plástica circular [10].

Diversos microorganismos producen enzimas con capacidad de degradación de plásticos, tales como las PETasas (degradan tereftalato de polietileno) [11]; las MEHTasas (descomponen mono-(2-hidroxietil) tereftalato, un producto de la degradación del PET) [12]; las enzimas degradadoras de poliuretano [13]; la cutinasas (degradan polímeros vegetales pero también pueden degradar PET) [14]; y las lacasas (degradan compuestos fenólicos como la lignina y pueden degradar plásticos con estructuras fenólicas) [15]. El presente artículo científico tiene como objetivo principal compilar la información más reciente respecto al potencial enzimático de diversos tipos de cutinasas para la degradación de plásticos de un solo uso.

Metodología

Se seleccionaron Scopus y PubMed como bases de datos académicas. Fue incluido todo artículo de investigación, publicado en un rango temporal no mayor a 5 años y revisado por pares, que abordase el tema específico de la cutinasa en la biodegradación de plásticos de un solo uso. Fueron utilizadas como palabras clave: “plásticos o microplásticos”, “polietileno”, “biodegradación”, “enzima” y “cutinasa”. Se excluyeron todos los artículos que no cumplieron con los criterios. Fueron encontrados 41 artículos vía Scopus y 20 mediante PubMed, de los cuales 52 se descartaron, resultando en 9 artículos recuperados. Durante la revisión de estos artículos, se referenciaron además otros artículos relacionados relevantes.

Resultados y discusión

Enzimas degradadoras de plástico

Yoshida *et al.* documentaron en 2016 el primer mecanismo de hidrólisis *in vivo* de tereftalato de polietileno (PET), en un sistema de degradación desarrollado a partir de la bacteria *Ideonella sakaiensis* con las enzimas PETasa y MHETasa [10]. La primera enzima funcionó para hidrolizar parcialmente el PET hasta sus monómeros estructurales del ácido mono (2-hidroxietil) tereftálico (MHET), la segunda enzima degrada el MHET hasta ácido tereftálico (TPA) y etilenglicol (EG) [16]. Estos compuestos tienen la posibilidad de ser incorporados en el metabolismo de *I.*

sakaiensis y *Pseudomonas putida*; el TPA y el EG pueden ser transportados al interior de la célula y ser convertidos en PCA que se integra directamente al ciclo del ácido tricarboxílico [17, 18].

Algunas de las enzimas degradadoras de plástico que se destacan en los artículos más recientes son las enzimas hidrolizadoras de PET (EC 3.1.1.101), las enzimas lipasas de triacilglicerol (EC 3.1.1.3) destacadas por su potencial degradador de polímeros de polietileno, las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1.) y las cutinasas (EC 3.1.1.74.) [10, 19, 20, 21].

Las cutinasas

Inicialmente identificada en el año 1960, pero caracterizada a inicios de la década siguiente, la cutinasa proveniente del hongo filamentoso *Fusarium solani pisi* se convirtió en el primer modelo sistemático para el estudio de la estructura, la función y la reactividad de dicha enzima capaz de efectuar una respuesta por parte del microorganismo con el propósito de hidrolizar el polímero cutina presente como barrera protectora en organismos vegetales [22].

Las cutinasas (EC 3.1.1.74) son serina hidrolasas que pertenecen al gran conjunto de las hidrolasas α/β ; estas enzimas presentan una triada catalítica clásica SHD compuesta por Serina, Histidina y Aspartato; en la cual la serina actúa como catalizador en contacto con el sustrato (Figura 1) [23, 24]. A diferencia de las lipasas tradicionales, las cutinasas no cuentan con una cubierta hidrológica sobre la serina del sitio activo, sino que presenta un sitio activo amplio que le permite interactuar con sustratos de alto peso molecular, como lo es el caso de la cutina, e incluso con polímeros sintéticos [22]. Entre otras de sus capacidades, en sistemas acuosos pueden hidrolizar ésteres de bajo peso molecular y triacilgliceroles de cadena corta o larga; en sistemas no acuosos pueden catalizar procesos de esterificación o transesterificación [25].

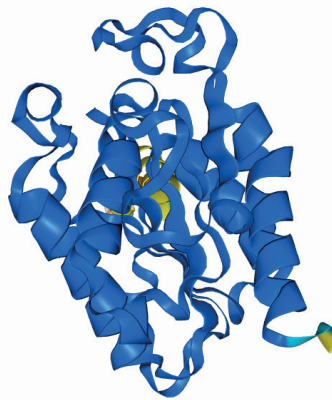


Figura 1. Estructura tridimensional de la enzima cutinasa de *F. solani pisi* (Elaborado en AlphaFold Server a partir del locus FSOCUT, accesión K02640, NCBI).

Según la información disponible en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), la enzima cutinasa de *F. solani pisi* se encuentra codificada a partir del locus FSOCUT (accesión K02640). Esta proteína se encuentra compuesta por 230 aminoácidos y 883 pares de bases; comienza con un péptido señal (de la base 79 a la 171) seguida del péptido maduro (de la base 172 a la 768); finalmente, la tríada catalítica de serina activa y un puente disulfuro (importante en el mantenimiento de la actividad catalítica) se encuentran presentes en los pares de bases 484 y 688, respectivamente [26, 27]. La cutinasa TfCut, proveniente de *Thermobifida fusca*, es estructuralmente similar con la cutinasa encontrada inicialmente en *F. Solani pisi*, pero posee mejor estabilidad [28].

Las cutinasas se podrían clasificar en dos grupos según sus temperaturas óptimas de actividad, a saber, las que trabajan a temperatura ambiente y las termofílicas. Por ejemplo, la TfCut2 de *T. fusca*, la HiC de *Humicola insolens*, y la LCC de compost de hojas (sintética), poseen termoestabilidad cercana a los 60 °C [28]. Por otro lado, se reportan variantes de la cutinasa que trabajan a temperatura ambiente, tales como la nueva cutinasa MtCut proveniente de *Marinactinospora thermotolerans*, un organismo que habita en el mar profundo y presenta una capacidad hidrolizante eficiente del PET a temperatura ambiente, de manera exotópica y que no posee afectación alguna ante la acumulación de producto [29].

El uso de las cutinasas abarca múltiples industrias: fabricación de detergentes, procesamiento de fibras textiles, tratamiento de cueros y fibras sintéticas; optimización de la producción de productos lácteos, deshidratación de frutas, extracción de ingredientes naturales a partir de la cutícula vegetal y recientemente sus aplicaciones han avanzado a la síntesis de productos químicos con centros quirales y la degradación de polímeros y moléculas tóxicas como los ésteres de ftalatos (ftalato de dimetilo, ftalato de bis(2-etilhexilo) y ftalato de bencilo butilo) [30].

Microorganismos productores de cutinasas con capacidad enzimática para la degradación de plásticos

Los principales microorganismos con capacidad degradadora de plástico son las bacterias, los hongos, y las levaduras, en ese orden de capacidad para la biodegradación (Figura 2) [1, 6, 7, 18, 28, 29].

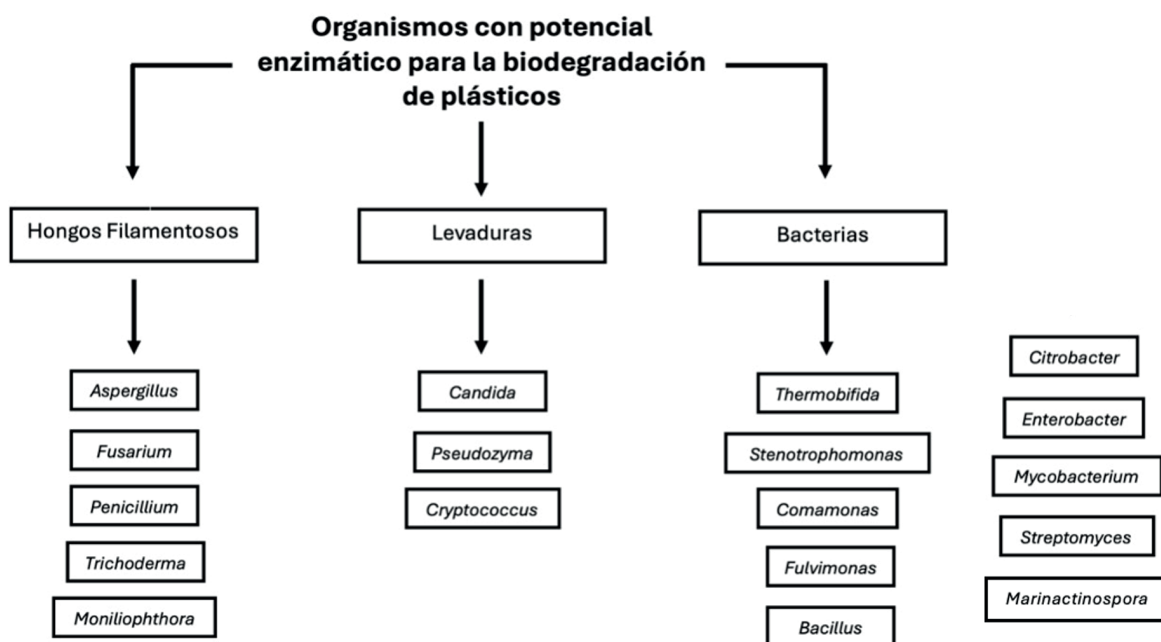


Figura 2. Algunos microorganismos que presentan potencial para la degradación de plásticos de un solo uso [1, 6, 7, 18, 28, 29].

Las cutinasas presentan diferencias estructurales según su origen. Las cutinasas de hongos y levaduras son más similares entre sí, con una menor proporción de hélices alfa respecto a las cutinasas bacteriana; estas diferencias estructurales reflejan adaptaciones específicas de cada enzima a su entorno natural (Figura 3) [24, 31, 32].

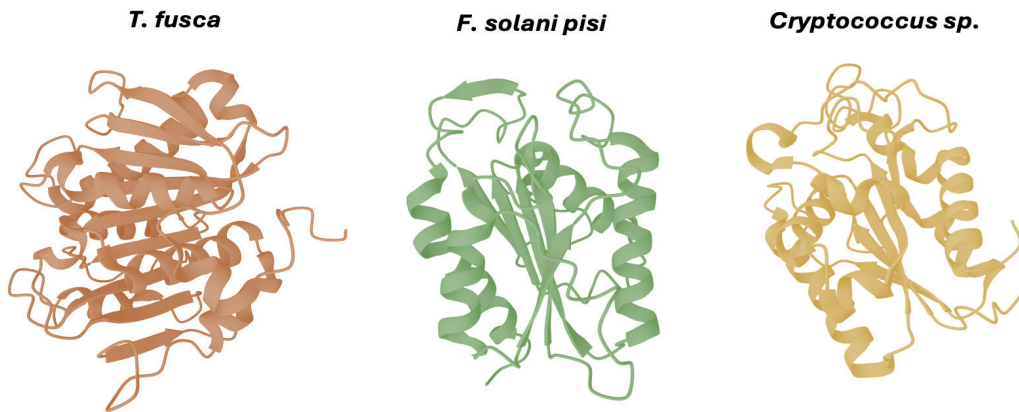


Figura 3. Comparación de la estructura tridimensional de algunas cutinasas según su microorganismo de origen. Adaptado de [19, 31, 32].

La plasticidad de estas enzimas para funcionar en diversas condiciones es esencial para obtener una degradación de plásticos eficiente; cada proteína posee cualidades específicas y diferentes entre sí que les permite actuar sobre distintos sustratos (Cuadro 1) [1].

Cuadro 1. Descripción de algunas cutinasas para la degradación de plásticos de un solo uso.

| Enzima | Especie | Tipo de Enzima | Plástico que degrada | Temperatura Óptima | Producto final | Fuente |
|--------|--|----------------|----------------------|--------------------|-----------------|----------|
| TfCut2 | <i>Thermobifida fusca</i> | Cutinasa | PET | ~60°C | TPA, MHET, BHET | [29] |
| MtCut | <i>Marinactinospora thermotolerans</i> | Cutinasa | PET | ~35°C | TPA, MHET | [29] |
| TfCut | <i>Thermobifida fusca</i> | Cutinasa | PBAT | ~65°C | TPA | [33] |
| AnCut2 | <i>Aspergillus nidulans</i> | Cutinasa | N/A | N/A | N/A | [1, 34] |
| FsC | <i>Fusarium solani pisi</i> | Cutinasa | PET | N/A | TPA - MHET | [35] |
| TcCut | <i>Thermobifida cellulolytica</i> | Cutinasa | PBS, PHBV, PET | ~60°C | TPA | [33, 36] |
| Cut | <i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126 | Cutinasa | PVAC, PCL | N/A | N/A | [36] |
| Cut | <i>Thermobifida alba</i> AHK119 | Cutinasa | PLA | N/A | N/A | [30] |
| Cut | <i>Amycolatopsis mediteranei</i> | Cutinasa | PBS, PCL | N/A | N/A | [30] |

PET, tereftalato de polietileno; PBAT, polibutileno adipato-co-tereftalato; PBS, succinato de polibutileno; PHBV, poli(3-hidroxi-butilato-co-3-hidroxi-valerato); PVAC, acetato de polivinilo; PCL, policaprolactona; PLA, ácido poliláctico; MHET, mono (2-hidroxi-etil) tereftálico; TPA, ácido tereftálico; BHET, ácido bis(2-hidroxi-etil) tereftálico.

Herramientas biotecnológicas para el uso de las cutinasas

La aplicación biotecnológica de la enzima cutinasa como una herramienta novedosa en el área de la biología sintética merece una mayor investigación, y el uso de herramientas relacionadas a la ingeniería genética puede ofrecer opciones valiosas para el mejoramiento de estas enzimas con la finalidad de obtener cutinasas más robustas, con mayor eficiencia y estabilidad [29].

Un ejemplo en este ámbito es la enzima ThcCut1 de *Thermomyces cellulosilytica*; esta cutinasa fue fusionada con dos módulos de unión para mejorar la adsorción y consecuentemente el proceso de hidrólisis, los módulos provenían de la enzima celobiohidrolasa I de *Hypocrea jecorina* (CBM) y de una polihidroxicanoato depolimerasa de *Alcaligenes faecalis* (PBM); las proteínas fueron expresadas en *Escherichia coli* [18].

Una de las dificultades es la localización que posee la enzima dentro de las células, lo que se advierte como un factor limitante para el contacto directo con el sustrato; afortunadamente, la solución radica en el desarrollo de sistemas donde la proteína se excrete fuera de las células [18].

También se han explorado estrategias de fusión de proteínas, como por ejemplo la fusión con el Dermaseptin SI (DSI) al extremo amino de TfCut2, lo cual resultó en una mejor actividad en la degradación del PET, de manera que se alcanza una tasa de descomposición con mayor efectividad al compararla con la presentada por la TfCut2 basal [37].

La TfCut basal también se ha utilizado para generar cepas mejoradas derivadas de *T. fusca* como la TFH, TfU_0882 y TfCut2, las cuales presentan una eficiencia superior en la degradación de PET en comparación a su enzima silvestre [38].

Conclusiones

El estudio de las cutinasas es crucial para avanzar en las tecnologías de degradación del plástico debido a su notable capacidad para descomponer los polímeros sintéticos, en particular el tereftalato de polietileno (PET), que prevalece en los desechos globales. Estas enzimas, originalmente desarrolladas para degradar la cutina natural en los tejidos vegetales, han demostrado una eficacia prometedora para romper los enlaces éster del PET y otros plásticos, lo que lleva a su descomposición en moléculas más pequeñas y manejables. Comprender y optimizar las cutinasas para la degradación del plástico no solo proporciona una posible solución biotecnológica para mitigar la contaminación ambiental, sino que también se alinea con prácticas sostenibles al promover el desarrollo de procesos de reciclaje ecológicos. En consecuencia, la exploración de las cutinasas representa un paso vital para abordar el apremiante problema de los residuos plásticos y mejorar la eficiencia del reciclaje de una manera más responsable con el medio ambiente.

Referencias

- [1] T. Anunobi, "Hazardous effects of plastic wastes on land biodiversity: A review", *The Zoologist*, vol. 20, no. 1, pp. 80–86, Nov. 2022, doi: 10.4314/tzool.v20i1.10.
- [2] Y. Chen, A. K. Awasthi, F. Wei, Q. Tan, y J. Li, "Single-use plastics: Production, usage, disposal, and adverse impacts", *Science of The Total Environment*, vol. 752, p. 141772, 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141772.
- [3] T. P. Wagner, "Reducing single-use plastic shopping bags in the USA", *Waste Management*, vol. 70, pp. 3–12, 2017, doi: 10.1016/j.wasman.2017.09.003.
- [4] N. Singh y T. R. Walker, "Plastic recycling: A panacea or environmental pollution problem", *npj Materials Sustainability*, vol. 2, no. 1, p. 17, 2024, doi: 10.1038/s44296-024-00024-w.

- [5] R. Prieto, "Contaminación ambiental por plásticos durante la pandemia y sus efectos en la salud humana", *Revista Colombiana de Cirugía*, vol. 38, no. 1, pp. 22–29, Jan. 2023, doi: 10.30944/20117582.2203.
- [6] M. J. Valarezo Ulloa y L. Ruiz Virgen, "El reciclaje de plásticos, un reto para lograr una economía circular", *CEDAMAZ*, vol. 12, no. 2, 2022, doi: 10.54753/cedamaz.v12i2.1265.
- [7] A. P. Singh y A. S. Devi, "Microplastics and single use plastics: A curse of over consumerism", *International Journal of Advanced Scientific Research and Management*, vol. 4, no. 4, pp. 384–388, 2019, ISSN: 2455-6378.
- [8] J. Sandoval y D. Bermúdez, "Degradación del polietilentereftalato por medio de microorganismos", *Informador Técnico*, vol. 85, no. 2, pp. 219–229, 2021, doi: 10.23850/22565035.3592.
- [9] N. Mohanan, Z. Montazer, P. K. Sharma, y D. B. Levin, "Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics", *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.580709.
- [10] V. Tournier *et al.*, "Enzymes' Power for Plastics Degradation", *Chemical Reviews*, vol. 123, no. 9, pp. 5612–5701, 2023, doi: 10.1021/acs.chemrev.2c00644.
- [11] S. Yoshida *et al.*, "A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)", *Science*, vol. 351, no. 6278, pp. 1196–1199, Mar. 2016, doi: 10.1126/science.aad6359.
- [12] S. Yoshida, K. Hiraga, I. Taniguchi, y K. Oda, "Chapter Nine - *Ideonella sakaiensis*, PETase, and MHETase: From identification of microbial PET degradation to enzyme characterization", *Methods in Enzymology*, vol. 648, pp. 187–205, 2021, doi: 10.1016/bs.mie.2020.12.007.
- [13] G. T. Howard, "Biodegradation of polyurethane: a review", *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 49, no. 4, pp. 245–252, 2002, doi: 10.1016/S0964-8305(02)00051-3.
- [14] T. F. Pio y G. A. Macedo, "Cutinases: properties and industrial applications", *Advances in Applied Microbiology*, vol. 66, pp. 77–95, 2009, doi: 10.1016/S0065-2164(08)00804-6.
- [15] K. Ramamurthy *et al.*, "Is Laccase derived from *Pleurotus ostreatus* effective in microplastic degradation? A critical review of current progress, challenges, and future prospects", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 276, p. 133971, 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.133971.
- [16] P. Pérez-García, D. Danso, H. Zhang, J. Chow, y W. R. Streit, "Exploring the global metagenome for plastic-degrading enzymes", *Methods in Enzymology*, vol. 648, pp. 137–157, 2021, doi: 10.1016/bs.mie.2020.12.022.
- [17] S. Hachisuka, J. F. Chong, T. Fujiwara, A. Takayama, Y. Kawakami, y S. Yoshida, "Ethylene glycol metabolism in the poly(ethylene terephthalate)-degrading bacterium *Ideonella sakaiensis*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 106, no. 23, pp. 7867–7878, 2022, doi: 10.1007/s00253-022-12244-y.
- [18] Y. Yang *et al.*, "Complete bio-degradation of poly(butylene adipate-co-terephthalate) via engineered cutinases", *Nature Communications*, vol. 14, no. 1, pp. 1645–023-37374–3, Mar. 2023, doi: 10.1038/s41467-023-37374-3.
- [19] F. Hasan, A. A. Shah, y A. Hameed, "Industrial applications of microbial lipases", *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, no. 2, pp. 235–251, 2006, doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.
- [20] A. Gricajeva, A. K. Nadda, y R. Gudiukaite, "Insights into polyester plastic biodegradation by carboxyl ester hydrolases", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 97, no. 2, pp. 359–380, 2022, doi: 10.1002/jctb.6745.
- [21] P. J. Baker, C. Poultney, Z. Liu, R. Gross, y J. K. Montclare, "Identification and comparison of cutinases for synthetic polyester degradation", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 93, no. 1, pp. 229–240, 2012, doi: 10.1007/s00253-011-3402-4.
- [22] S. Chen, L. Su, J. Chen, y J. Wu, "Cutinase: Characteristics, preparation, and application", *Biotechnology Advances*, vol. 31, no. 8, pp. 1754–1767, 2013, doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.09.005.
- [23] X. Liang y H. Zou, "Biotechnological Application of Cutinase: A Powerful Tool in Synthetic Biology", *SynBio*, vol. 1, no. 1, p. 64, 2023, doi: 10.3390/synbio1010004.
- [24] C. Martinez, P. De Geus, M. Lauwereys, G. Matthyssens and C. Cambillau, "'*Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent", *Nature*, vol. 356, no. 6370, pp. 615–618, 1992, doi: 10.1038/356615a0.
- [25] S.-J. Won, J. H. Yim, y H. K. Kim, "Synthesis of Short-Chain Alkyl Butyrate through Esterification Reaction Using Immobilized *Rhodococcus* Cutinase and Analysis of Substrate Specificity through Molecular Docking", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 33, no. 2, pp. 268–276, Feb. 2023, doi: 10.4014/jmb.2211.11022.
- [26] National Center for Biotechnology Information, "*F. solani pisi* (fungus) cutinase mRNA, complete cds, Accession No. K02640", *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, 1993, Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/K02640>.



- [27] National Center for Biotechnology Information, "Cutinase [*Fusarium solani*], Accession No. AAA33334", *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, 1993, Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA33334>.
- [28] B. Sui *et al.*, "Recent advances in the biodegradation of polyethylene terephthalate with cutinase-like enzymes", *Frontiers in Microbiology*, vol. 14, p. 1265139, Oct. 2023, doi: 10.3389/fmicb.2023.1265139.
- [29] Y. Liu *et al.*, "Catalytic Features and Thermal Adaptation Mechanisms of a Deep Sea Bacterial Cutinase-Type Poly(Ethylene Terephthalate) Hydrolase", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 10, 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.865787.
- [30] X. Liang y H. Zou, "Biotechnological Application of Cutinase: A Powerful Tool in Synthetic Biology", *SynBio*, vol. 1, no. 1, p. 64, 2023, doi: 10.3390/synbio1010004.
- [31] Y. Yang, P. Jiang, J. Huang, C. Chen, y R. Guo, "The structure of engineered TfCut S130A in complex with MHET", *Protein Data Bank (PDB)*, 2023, doi: 10.2210/pdb7xtt/pdb.
- [32] K. Masaki, N.R. Kamini, H. Ikeda, H. Iefuji, H. Kondo, M. Suzuki y S. Tsuda, "A novel cutinase-like protein from *Cryptococcus* sp.", *Protein Data Bank (PDB)*, 2006, doi: 10.2210/pdb2czq/pdb.
- [33] Y. Yang *et al.*, "Complete bio-degradation of poly(butylene adipate-co-terephthalate) via engineered cutinases", *Nature communications*, vol. 14, no. 1, p. 1645, 2023, doi: 10.1038/s41467-023-37374-3.
- [34] D. Castro-Ochoa *et al.*, "ANCUT2, an Extracellular Cutinase from *Aspergillus nidulans* Induced by Olive Oil", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 166, no. 5, pp. 1275–1290, 2012, doi: 10.1007/s12010-011-9513-7.
- [35] K. N. Hellesnes, S. Vijayaraj, P. Fojan, E. Petersen, y G. Courtade, "Biochemical Characterization and NMR Study of a PET-Hydrolyzing Cutinase from *Fusarium solani pisi*", *Biochemistry*, vol. 62, no. 8, pp. 1369–1375, 2023, doi: 10.1021/acs.biochem.2c00619.
- [36] D. Martín-González, C. de la Fuente Tagarro, A. De Lucas, S. Bordel, y F. Santos-Beneit, "Genetic Modifications in Bacteria for the Degradation of Synthetic Polymers: A Review", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 25, no. 10, p. 5536, May 2024, doi: 10.3390/ijms25105536.
- [37] Z. Liu, Y. Zhang, y J. Wu, "Enhancement of PET biodegradation by anchor peptide-cutinase fusion protein", *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 156, 2022, doi: 10.1016/j.enzmictec.2022.110004.
- [38] Q. Li *et al.*, "Computational design of a cutinase for plastic biodegradation by mining molecular dynamics simulations trajectories", *Computational and structural biotechnology journal*, vol. 20, pp. 459–470, 2022, doi: 10.1016/j.csbj.2021.12.042.

Diálogo entre hongos y plantas en la raíz y el suelo

Dialogue between fungi and plants in the root and soil


William Rivera-Méndez¹, William Watson-Guido²

Rivera-Méndez, W; Watson-Guido, W. Diálogo entre hongos y plantas en la raíz y el suelo. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 109-120.


 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7616>


1 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 wrivera@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0002-2065-6264>

2 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 wwatson@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0002-2704-5159>

Palabras clave

Endófitos; hifósfera; hongos; rizósfera; simbiosis; micorrizas.

Resumen

Los hongos son organismos presentes en todos los ecosistemas terrestres y cumplen diversos papeles ecológicos en los nichos que habitan. El suelo es una matriz de intenso intercambio de señales, que los hongos han aprovechado para establecer todo tipo de interacciones. Sus relaciones particulares con las raíces de las plantas están determinadas por procesos de comunicación que se establecen entre ambos organismos a nivel celular y tisular. Si bien el concepto de inteligencia en organismos que no sean animales es todavía un tema controversial, existen evidencias científicas que apuntan al menos a un nivel basal de inteligencia para guiar estos procesos de comunicación y respuesta. En este contexto se describen los conocimientos más recientes sobre los hongos rizosféricos, micorrícicos y endófitos; donde se destacan sus efectos en la regulación del crecimiento de las plantas, la nutrición y el intercambio de carbono y agua, la inducción o la supresión de la resistencia sistémica, la colonización celular y la producción de metabolitos secundarios, ya sea en relaciones simbióticas o patogénicas. Pese a los nuevos avances, existen grandes oportunidades de investigación básica y aplicada para el aprovechamiento de este diálogo molecular. El objetivo de esta revisión fue presentar algunos de los fenómenos descritos en la interacción hongo-planta en el suelo y mostrar su relevancia desde la perspectiva de una “comunicación inteligente”.

Keywords

Endofites; fungi; hyposphere; rhizosphere; symbiosis; mycorrhizae.

Abstract

Fungi are organisms present in all terrestrial ecosystems and play diverse ecological roles in the niches they inhabit. Soil is a matrix of intense signal exchange, which fungi have taken advantage of to establish all kinds of interactions. Their relationships with plant roots are determined by communication processes established between both organisms at the cellular and tissue level. Although the concept of intelligence in non-animal organisms is still a controversial issue, there is scientific evidence that points to at least a basal level of intelligence to guide these communication and response processes. In this context, the most recent knowledge on rhizospheric, mycorrhizal and endophytic fungi is described; where their effects on plant growth regulation, nutrition and carbon and water exchange, induction or suppression of systemic resistance, cell colonization and production of secondary metabolites, either in symbiotic or pathogenic relationships, are highlighted. Despite new advances, there are great opportunities for basic and applied research to exploit this molecular dialogue. The aim of this review was to present some of the phenomena described in fungal-plant interactions in soil and to show their relevance from the perspective of “intelligent communication”.

La raíz y el suelo: un universo de relaciones

En términos microscópicos, la matriz del suelo es un espacio de proporciones casi infinitas y de posibilidades para todas las formas orgánicas. El suelo puede ser visto como un biomaterial de alta complejidad pero también como un ecosistema en sí mismo o como parte del ecosistema terrestre total [1]. Las diferentes comunidades establecidas poseen sus propias características y dinámicas, por lo que su análisis ha cobrado relevancia [2]. Para efectos de investigación,

existen tres espacios en los que se ha centrado el análisis de las asociaciones de organismos del suelo: la rizósfera, la micorrizósfera y las partes más internas de la raíz de las plantas (Figura 1).

La rizósfera es el espacio inmediatamente cercano a los pelos radiculares. Algunos autores lo han definido como el espacio del suelo que rodea el tejido vegetal y donde se concentra la mayoría de los microorganismos [3], otras definiciones la consideran como el ecosistema que rodea cada pelo o raíz y que es afectado por la planta [4]. Suele, además, incluirse la superficie de la raíz y las primeras capas de células vegetales. Sin lugar a duda, es el sitio biológicamente más diverso del planeta y concentra los grupos más importantes de microorganismos en relación con las plantas [5]. Acá se desarrollan las poblaciones de fitopatógenos, biocontroladores, promotores del crecimiento vegetal, inductores de resistencia, fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo, ecto y endomicorrizas, simbioses de células vegetales, entre otros [5].

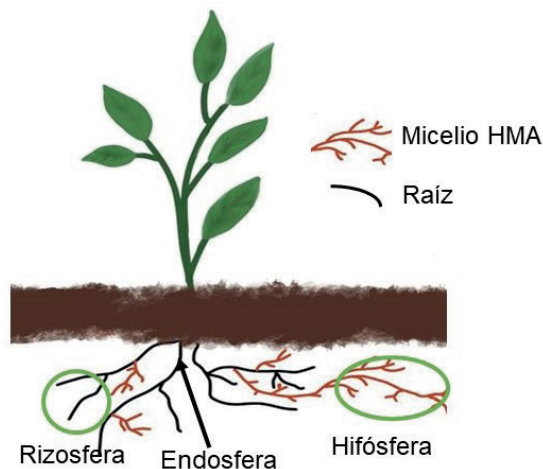


Figura 1. Espacios de influencia biológica en la relación plantas-hongos. Endósfera, espacio dentro la planta huésped que alberga microorganismos endosimbiontes; rizósfera, espacio de influencia exclusivo de la raíz e hifósfera, espacio de influencia de las hifas de hongos simbioses de la raíz.

A lo interno de la raíz, existe un ambiente para el desarrollo de organismos que guardan una relación muy estrecha con las funciones de las plantas. En términos de espacio, hablamos de las células vegetales que se ubican a lo interno del córtex y que pueden incluir los tejidos vasculares. Los organismos que han logrado colonizar este espacio han recibido el nombre de endófitos [6]. Estos microorganismos, a diferencia de los hongos patógenos, pueden vivir dentro de las células en sus tejidos internos sin causar daño o enfermedad [7]. Los endófitos son simbioses que pueden afectar la resistencia de la planta contra patógenos o promover el crecimiento [8], [9]. Muchos de estos organismos tienen una función desconocida hoy día, pero es evidente su capacidad de síntesis de metabolitos secundarios, lo que ha incentivado su investigación con fines industriales y farmacéuticos [10].

La micorrizósfera o hifósfera es el espacio inmediato que rodea las hifas extra-radicales de los hongos micorrízicos arbusculares [11]. Este espacio de vida es rico en diversas especies de hongos y bacterias que conforman comunidades particulares, donde el rol ecológico de casi todas estas especies asociadas es desconocido [12]. La hifósfera es un ecosistema bastante reciente en cuanto a investigación, pero las evidencias apuntan a que estas comunidades desempeñan importantes tareas para la nutrición y comunicación de las plantas, a nivel inter e intra-especies [13]. La hifósfera suele unir micorrizas de plantas distintas, por lo que se puede

establecer un tejido altamente complejo que engloba millones de especies de microorganismos, particularmente hongos, bacterias y nematodos; y ocupa grandes extensiones de terreno, formando redes muy complejas de tránsito [14].

Si bien, cada uno de estos tres espacios tiene sus características particulares, no existe claridad en los límites de cada uno, y tratar de delimitarlos es útil para el estudio de las comunidades del suelo y su relación con las plantas. En términos reales, el suelo es un enorme ecosistema con microorganismos que se integran en éste, aprovechando el potencial de beneficios que pueden encontrar, y las plantas, son un recurso más con el que han establecido relaciones de diversa índole [15], [16], [17]. Las plantas han desarrollado respuestas para cada una de estas relaciones y han aprovechado a los microorganismos de forma recíproca [18].

Diálogo inteligente entre hongos y plantas

El mantenimiento de la vida en la Tierra depende de una adecuada sincronía entre las plantas y los microorganismos. Las plantas son productores primarios que incorporan la energía solar en las cadenas tróficas, pero ninguno de los procesos biológicos actualmente conocidos sería posible sin la participación de los organismos que viven entre el suelo y están adheridos a las partículas de éste. En este caso, el suelo actúa como una matriz o como un material que posibilita la transferencia de biomasa, moléculas, energía y señales de todo tipo entre las diferentes poblaciones de microorganismos y plantas [19], [20].

En términos de tamaño, el suelo brinda un universo de posibilidades para las relaciones entre hongos, bacterias, nematodos, virus, protozoos, invertebrados y plantas. Los recursos disponibles, la variabilidad genética presente y los factores evolutivos han promovido el desarrollo de las comunidades de seres vivos en casi cualquier condición en respuesta a la dinámica del suelo [21], [22], [23].

El establecimiento exitoso de una comunidad en un ecosistema necesita de una intensa y clara comunicación entre todas las especies participantes, a fin de encontrar nichos suficientes y promover relaciones diversas [24], [25]. La comunicación o el “diálogo” inter-especies implica validar la posibilidad de la inteligencia para otros seres que no sean animales y que la comunicación se dé mediante elementos no verbales o de movimientos. Este concepto de inteligencia ha sido un tema de intenso debate en las últimas década [26], [27], [28].

La mirada tradicional de la inteligencia como una cualidad exclusiva de los animales ha sido cuestionada en numerosas oportunidades [29] [30], y se ha ido esbozando una definición de la inteligencia como la capacidad de responder a estímulos y transmitir información, sin que este proceso sea coordinado por un órgano central conocido (cerebro) [31], [32]. Bajo este nuevo enfoque, una gran cantidad de seres vivos podrían estar desarrollando comportamientos inteligentes.

En el caso de los hongos, desde hace algunas décadas, se han buscado respuestas acerca de posibles conductas inteligentes relacionadas con el crecimiento y la supervivencia [33]. Experimentos han mostrado que algunos hongos son capaces de mostrar actividad eléctrica de forma similar a las neuronas [34], en especies como *Ganoderma sp.*, *Psilocybe cubensis* y *Pleurotus djamor*, mediante las oscilaciones determinadas con electrodos de iridio. Además, los hongos son capaces de exhibir comportamientos y solucionar problemas de forma similar a algunas especies animales [35], [36], [37].

No obstante, hablar de diálogo entre especies supone una mayor complejidad y coordinación [38]. Involucra procesos de percepción, emisión y recepción de información entre organismos que pueden estar en dominios y reinos diferentes; tal es el caso de la comunicación entre hongos y plantas [39], [40]. Además, se deben considerar los aspectos ambientales, físicos,

químicos y estructurales del sistema suelo, y el espacio donde esa comunicación se desarrolla: la rizósfera, la micorrizósfera y probablemente más allá. Hoy en día, existen evidencias de procesos de comunicación inter-específicos en el suelo y sus consecuencias para la vida vegetal. Estas muestran como las plantas son capaces, mediante señales bioquímicas y la activación de rutas metabólicas, de memorizar y aprender de estímulos ambientales promovidos por microorganismos [41], [42].

Las micorrizas y la red de información, materia y energía

Los hongos micorrícicos son organismos edáficos que forman una estrecha relación simbiótica con las raíces de más del 90 % de especies vegetales, siendo una de las relaciones biológicas más antiguas de la Tierra, con registros fósiles desde hace 450 millones de años; es decir, han sido parte fundamental de la evolución de la vida en tierra firme [43].

Los hongos micorrícicos pueden agruparse de una forma simple en endomicorrizas y ectomicorrizas, dependiendo de las estructuras que forman durante el proceso simbiótico. Las endomicorrizas forman estructuras conocidas como arbusculos y vesículas, mientras que las ectomicorrizas forman estructuras en la epidermis radical, conocida como mantillo [44]. Actualmente, la clasificación de las micorrizas es más compleja que esto, pero en términos prácticos, estos dos tipos han centrado el interés de los investigadores por su potencial agrícola y ecológico.

Esta relación tan estrecha ha sido ampliamente estudiada desde hace unos 150 años, y se ha llegado a comprender que no se limita al intercambio de nutrientes, donde el hongo le brinda elementos de difícil acceso a la planta y esta le da fotosintatos al hongo. También involucra complejos procesos en un diálogo molecular que no se limita solo a su huésped, sino a toda la biota edáfica [45].

La comunicación entre el hongo y el hospedero se basa en la producción y reconocimiento de moléculas de señalización, conocidas como infoquímicos. Por parte de la planta se conoce la estrigolactona, y por parte del hongo, los oligómeros de quitina de cadena corta (Myc-Cos) son los más evidentes, pero se tienen evidencias de otras moléculas involucradas en estos procesos de comunicación, como NOPE1 (NO PERCEPTION1), DLK2 (DWARF14-LIKE2), SP7 (Secreted Protein7), la co-chaperona tipo II de HSP40 SIS1, entre otros [46], [47].

Las hifas de los hongos micorrícicos pueden llegar a asociarse a otras plantas distintas a su huésped inicial, inclusive de diferentes especies [48], formando una conexión entre ambos organismos por la cual pueden intercambiar nutrientes e infoquímicos mediante cinco vías descritas hasta el momento. Estas vías son mediante el citoplasma del hongo, usando el apoplasto y la mediación por transportadores de membrana, mediante la hifósfera, por el flujo de agua en la superficie de la hifa, y por un cordón micelar [49]. Existen otros mecanismos diferentes a las moléculas infoquímicas, como los impulsos eléctricos por polarización de la membrana plasmática por gradientes de Ca^{2+} y especies reactivas de oxígeno [50].

Los hongos micorrícicos también cumplen un papel importante en la ecodinámica edáfica, ya que logran modificar su ambiente mediante la producción de glomalinas y proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) que afectan la agregación de las partículas de suelo y disminuyen la toxicidad de metales pesados, generando así un ambiente estable para el desarrollo microbiano. Además, la red micorrícica sirve de “autopista” que permite la migración de microorganismos benéficos hacia la rizósfera de plantas aún no colonizadas [51], [52].

Los compuestos exudados por los hongos micorrícicos son capaces de favorecer el crecimiento de grupos específicos de bacterias en su hifósfera, tales como Betaproteobacteriales, Myxococcales, Fibrobacteriales, Cytophagales, Chloroflexales, y Cellvibrionales, donde los

Myxococcales y Fibrobacterales son los más comunes. Además, estos exudados son parte fundamental de los circuitos del *Quorum Sensing* (comunicación microbiana, denominada percepción de cuórum o autoinducción), ya que son capaces de inducir la síntesis de compuestos antibióticos en bacterias del género *Pseudomonas*, como el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) [52].

Además de la influencia en la población bacteriana, se han determinado interacciones micorrícicas con hongos como *Penicillium* sp., nematodos e insectos, mediante la inducción y producción de compuestos volátiles atrayentes o repelentes [53], [54], [55]. Estas interacciones han influenciado el que muchos autores sugieran que la correcta interacción entre la biota edáfica y la planta depende de la interacción física y química con los hongos micorrícicos [56].

Hongos rizosféricos y endófitos como inductores de resistencia sistémica

Las plantas poseen sistemas de defensa que pueden actuar de forma local en los puntos donde los patógenos atacan el tejido directamente, o de forma sistémica a través de mecanismos de memoria y respuesta química mediada por proteínas e inducción de genes de resistencia [57].

Los hongos que han logrado establecerse en la rizósfera y han atravesado las primeras capas de la corteza de la planta, incluso los que se consideran endófitos y viven en los tejidos más internos, son capaces de generar señales que activan o desactivan estos mecanismos de la resistencia sistémica [58]. Actualmente se reconocen al menos tres tipos de resistencia: la estimulada por organismos fitopatógenos, la mediada por microorganismos benéficos, y la que desencadenan los herbívoros en los ataques foliares [59].

Los hongos patógenos y sus plantas hospederas han co-evolucionado para maximizar sus opciones de supervivencia. La planta ha desarrollado mecanismos de reconocimiento de moléculas inductoras para disparar las reacciones de defensa y evitar el desarrollo de enfermedades [60]. El patógeno por su parte, ha buscado formas de evasión de estos sistemas de reconocimiento y defensa, lo que le permite infectar el tejido, crecer y dispersarse [61]. El fenómeno de patogénesis es la relación más estudiada entre plantas y hongos. Las reacciones de reconocimiento y resistencia entre un hongo patógeno y su hospedero forman parte de un mecanismo complejo denominado resistencia sistémica adquirida (SAR) [62].

En el caso de los hongos benéficos y los endófitos, éstos han desarrollado estrategias para desactivar los mecanismos de reconocimiento inicial por parte de la planta, de forma tal que estos organismos pueden penetrar dentro de los tejidos sin ocasionar una aparente reacción de defensa. Los organismos endófitos no activan señales de resistencia y pueden colonizar células en la parte más interior de los tejidos vegetales [63]. Los organismos benéficos son tolerados hasta cierto punto en los tejidos vegetales, pero vuelven a activar la resistencia de la planta una vez que han alcanzado ciertas capas de la corteza. Este tipo de resistencia se llama a resistencia sistémica inducida (RSI) [64].

Coordinar los eventos de reconocimiento y defensa por parte de una planta durante la interacción con la diversidad de microorganismos presentes en el suelo es una tarea compleja que involucra el manejo de una gran cantidad de información y de energía [65], [66]. A lo interno de la planta este flujo se realiza mediante cascadas moleculares de proteínas o intermediarios metabólicos, que en algunos casos son todavía desconocidos y que teóricamente pueden moverse de forma intercelular y entre los diferentes órganos de la planta [67]. Además, existe un nivel de comunicación entre plantas, la cual se lleva a cabo con la ayuda de compuestos volátiles (VOCs) en algunos casos, y mediante la red de micorrizas del suelo en otros casos [68] [38].

Crecimiento vegetal mediado por hongos del suelo

Existe una variedad de hongos que promueven el crecimiento vegetal mediante relaciones simbióticas en la raíz, donde el hongo le da a la planta acceso a recursos del suelo, como agua y nutrientes a los que las raíces no pueden llegar, o bien a modo de protección de la planta huésped del ataque de patógenos, o aumentando la adaptabilidad del hospedero a condiciones adversas [69], [70].

Dentro de estos hongos que promueven el crecimiento vegetal encontramos hongos micorrícicos y rizosféricos como *Trichoderma*, *Penicillium*, y *Fusarium* en *Taxuss baccata*, *Xylaria* en cítricos y canela, *Phomopsis* en *Allanmands cathartica* y *Plumeria*, *Botrytis* en *Ficus* sp., *Alternaria* sp. en pino y *Aspergillus* sp. en *Bauhinia*, entre otros [70], [71]. Así mismo, algunos géneros de hongos como *Gliocladium*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Talaromyces* mejoran el crecimiento en plantas como tomate, manzana, pera, zanahoria, pepino, entre otras [72].

Los hongos endófitos también han demostrado su capacidad para afectar el crecimiento del hospedero de manera positiva en su mayoría son ascomycetes, aunque se pueden encontrar representantes de basidiomicetes, zygomycetes y oomycetes [73]. Se ha reportado que *Phomopsis* sp. es capaz de secretar compuestos orgánicos volátiles con capacidad antifúngica como benceno, etanol, 2-propano y un monoterpene conocido como sabineno; compuestos similares han sido detectados en el hongo endófito *Penicillium decumbens*. Además de las capacidades antimicrobianas, muchos de los compuestos volátiles también presentan efectos benéficos sobre el crecimiento vegetal [71].

Los compuestos promotores del crecimiento vegetal producidos por hongos son fitohormonas como el ácido indolacético, ácido giberélico, el jasmonato, citoquininas, el ácido salicílico y una variedad de metabolitos secundarios y vitaminas. Estas biomoléculas son capaces de brindar una mayor capacidad de adaptación a las condiciones adversas, como el caso del hongo *Epichloë bromicola*, que es capaz de aumentar la tolerancia de la cebada silvestre al estrés salino [74].

Algunos otros hongos simbiotes, como es el caso de *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum* y *Penicillium chrysogenum*, además de proteger la raíz del ataque de patógenos, también han demostrado promover la transferencia y captación de amonio en plantas de maíz, y son capaces de aumentar el largo y peso de las raíces [74]. Casos similares se han reportado en otros cultivos como en Chile con el hongo *Xylaria regalis*, que incrementa la absorción de nitrógeno y la síntesis de clorofila [74]. También se ha descrito un aumento en la solubilización y absorción de fósforo, hierro di y trivalente, potasio, calcio, zinc, entre otros [74].

Los hongos fitopatógenos también pueden producir fitohormonas [75]. Una de las estrategias para facilitar la penetración de tejidos por parte de estos hongos es promover el crecimiento celular de forma localizada o en órganos completos para encontrar espacios donde la penetración sea más sencilla [76]. Mediante estas estrategias, el fitopatógeno puede lograr el adelgazamiento de paredes celulares o su desprendimiento, el aumento del volumen celular, el ensanchamiento de espacios intercelulares y aberturas entre capas de células, o la inactivación de señales de defensa [77], [78]. Además, al incrementar el tamaño de órganos infectados, estos organismos pueden tener mayor espacio para su reproducción y mayor oportunidad de diseminación o sobrevivencia.

Ya sea en relaciones simbióticas o patogénicas, los hongos del suelo son capaces de imitar la producción de compuestos que estimulan el crecimiento vegetal, y son los procesos de coevolución y sobrevivencia quienes dictan el resultado de la interacción entre ambos organismos en un ecosistema particular.

Conclusiones y Perspectivas

Las evidencias actuales señalan que las interacciones de las plantas y los hongos son muy variadas y muchas de sus causas y efectos son totalmente desconocidos, lo que abre grandes oportunidades de investigación básica y aplicada.

El estudio del diálogo entre estos dos reinos biológicos está en pleno auge y, aunque tiene grandes vacíos de conocimientos, ofrece enormes oportunidades, sobre todo en el sector agrícola de producción de alimentos. La idea de dirigir el crecimiento y la productividad vegetal a través de señales moleculares iniciadas por los hongos del suelo es apasionante y prometedora.

El Laboratorio de Biocontrol del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica tiene más de una década estudiando el diálogo molecular entre hongos y plantas, enfocado en las relaciones que se establecen en los agroecosistemas tropicales. Se ha puesto particular énfasis en dos áreas de trabajo: la resistencia sistémica promovida por hongos antagonistas, y los efectos de las micorrizas arbusculares en cultivos de exportación.

En el primer caso, se han buscado evidencias para relacionar el crecimiento, la defensa y la productividad con la inducción de resistencia sistémica vegetal de parte de hongos que han sido considerados antagonistas de fitopatógenos. Particularmente, se ha analizado la respuesta en el cultivo de cebolla y ajo a los patógenos *Setophoma terrestris*, *Fusarium oxysporum* y *Stromatinia cepivora* mediada por hongos del género *Trichoderma*. Los resultados han mostrado evidencias de estimulación de resistencia sistémica inducida (RSI) y resistencia mediada por ácido salicílico (SA-dependent), no así de resistencia sistémica adquirida (SAR), así como incrementos sensibles en la productividad al final de la estimulación [79], [80].

En cuanto a los efectos de las micorrizas arbusculares, se están buscando evidencias de la transferencia de señales entre plantas separadas, pero conectadas a través de redes de micorrizas previamente caracterizadas y clasificadas, usando los modelos del café y la piña como cultivos de interés en el Trópico. Con esto, se busca optimizar la elaboración de inoculantes de media y alta tecnología, cuyo uso pueda aportar en los esquemas de fertilización de estos cultivos y reducir la dependencia de fertilizantes sintéticos.

El estudio de la composición de las comunidades de microorganismos del suelo y del filoplano son elementos clave para avanzar en la comprensión del diálogo molecular y sus efectos fisiológicos en las plantas. Las técnicas de biología sintética y herramientas como CRISPR-Cas permitirán a muy corto plazo, incorporar los beneficios de la comunicación hongo-planta, dentro de sistemas agrícolas altamente eficientes.

La posibilidad de descifrar e imitar la comunicación que se da entre los organismos del suelo y las plantas, sumado a las nuevas herramientas de trabajo molecular (metagenómica, proteómica y transcriptómica), y con las potentes herramientas de análisis de datos, permitirá el desarrollo de insumos y tecnologías biológicas que colaboren con la sostenibilidad alimentaria y ambiental.

Referencias

- [1] K. Adhikari y A. E. Hartemink, «Linking soils to ecosystem services — A global review», *Geoderma*, vol. 262, pp. 101-111, ene. 2016, doi: 10.1016/j.geoderma.2015.08.009.
- [2] L. Philippot, C. Chenu, A. Kappler, M. C. Rillig, y N. Fierer, «The interplay between microbial communities and soil properties», *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 22, n.º 4, pp. 226-239, abr. 2024, doi: 10.1038/s41579-023-00980-5.
- [3] P. Hinsinger, A. G. Bengough, D. Vetterlein, y I. M. Young, «Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance», *Plant Soil*, vol. 321, n.º 1, pp. 117-152, ago. 2009, doi: 10.1007/s11104-008-9885-9.

- [4] R. L. Berendsen, C. M. J. Pieterse, y P. A. H. M. Bakker, «The rhizosphere microbiome and plant health», *Trends Plant Sci.*, vol. 17, n.º 8, pp. 478-486, ago. 2012, doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.001.
- [5] D. L. Jones y P. Hinsinger, «The rhizosphere: complex by design», *Plant Soil*, vol. 312, n.º 1, pp. 1-6, nov. 2008, doi: 10.1007/s11104-008-9774-2.
- [6] R. J. Rodriguez, J. F. White Jr, A. E. Arnold, y R. S. Redman, «Fungal endophytes: diversity and functional roles», *New Phytol.*, vol. 182, n.º 2, pp. 314-330, 2009, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.
- [7] R. Grabka *et al.*, «Fungal Endophytes and Their Role in Agricultural Plant Protection against Pests and Pathogens», *Plants*, vol. 11, n.º 3, Art. n.º 3, ene. 2022, doi: 10.3390/plants11030384.
- [8] M. Saleem, M. Arshad, S. Hussain, y A. S. Bhatti, «Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture», *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 34, n.º 10, pp. 635-648, oct. 2007, doi: 10.1007/s10295-007-0240-6.
- [9] M. Shores, G. E. Harman, y F. Mastouri, «Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents», *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 48, n.º Volume 48, 2010, pp. 21-43, sep. 2010, doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114450.
- [10] E. Martinez-Klimova, K. Rodríguez-Peña, y S. Sánchez, «Endophytes as sources of antibiotics», *Biochem. Pharmacol.*, vol. 134, pp. 1-17, jun. 2017, doi: 10.1016/j.bcp.2016.10.010.
- [11] F. Wang, L. Zhang, J. Zhou, Z. Rengel, T. S. George, y G. Feng, «Exploring the secrets of hyphosphere of arbuscular mycorrhizal fungi: processes and ecological functions», *Plant Soil*, vol. 481, n.º 1, pp. 1-22, dic. 2022, doi: 10.1007/s11104-022-05621-z.
- [12] M. Faghinihnia, J. Jansa, L. J. Halverson, y P. L. Staddon, «Hyphosphere microbiome of arbuscular mycorrhizal fungi: a realm of unknowns», *Biol. Fertil. Soils*, vol. 59, n.º 1, pp. 17-34, ene. 2023, doi: 10.1007/s00374-022-01683-4.
- [13] L. Wang, T. S. George, y G. Feng, «Concepts and consequences of the hyphosphere core microbiome for arbuscular mycorrhizal fungal fitness and function», *New Phytol.*, vol. n/a, n.º n/a, doi: 10.1111/nph.19396.
- [14] A. L. Castro-Delgado *et al.*, «Wood Wide Web: communication through the mycorrhizal network», *Rev. Tecnol. En Marcha*, vol. 33, n.º 4, pp. 114-125, dic. 2020, doi: 10.18845/tm.v33i4.4601.
- [15] E. Barrios, «Soil biota, ecosystem services and land productivity», *Ecol. Econ.*, vol. 64, n.º 2, pp. 269-285, dic. 2007, doi: 10.1016/j.ecolecon.2007.03.004.
- [16] M. Delgado-Baquerizo, J. Grinyer, P. B. Reich, y B. K. Singh, «Relative importance of soil properties and microbial community for soil functionality: insights from a microbial swap experiment», *Funct. Ecol.*, vol. 30, n.º 11, pp. 1862-1873, 2016, doi: 10.1111/1365-2435.12674.
- [17] L. C. Dincă, P. Grenni, C. Onet, y A. Onet, «Fertilization and Soil Microbial Community: A Review», *Appl. Sci.*, vol. 12, n.º 3, Art. n.º 3, ene. 2022, doi: 10.3390/app12031198.
- [18] S. Sharma *et al.*, «Multitrophic Reciprocity of AMF with Plants and Other Soil Microbes in Relation to Biotic Stress», en *Microbial Symbionts and Plant Health: Trends and Applications for Changing Climate*, P. Mathur, R. Kapoor, y S. Roy, Eds., Singapore: Springer Nature, 2023, pp. 329-366. doi: 10.1007/978-981-99-0030-5_13.
- [19] F. A. Dijkstra, B. Zhu, y W. Cheng, «Root effects on soil organic carbon: a double-edged sword», *New Phytol.*, vol. 230, n.º 1, pp. 60-65, 2021, doi: 10.1111/nph.17082.
- [20] D. Wipf, F. Krajinski, D. van Tuinen, G. Recorbet, y P.-E. Courty, «Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks», *New Phytol.*, vol. 223, n.º 3, pp. 1127-1142, 2019, doi: 10.1111/nph.15775.
- [21] E. Blagodatskaya y Y. Kuzyakov, «Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches», *Soil Biol. Biochem.*, vol. 67, pp. 192-211, dic. 2013, doi: 10.1016/j.soilbio.2013.08.024.
- [22] J. Hao *et al.*, «The Effects of Soil Depth on the Structure of Microbial Communities in Agricultural Soils in Iowa (United States)», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 87, n.º 4, pp. e02673-20, ene. 2021, doi: 10.1128/AEM.02673-20.
- [23] M.-C. Leewis *et al.*, «The influence of soil development on the depth distribution and structure of soil microbial communities», *Soil Biol. Biochem.*, vol. 174, p. 108808, nov. 2022, doi: 10.1016/j.soilbio.2022.108808.
- [24] E. Rolli, L. Vergani, E. Ghitti, G. Patania, F. Mapelli, y S. Borin, «'Cry-for-help' in contaminated soil: a dialogue among plants and soil microbiome to survive in hostile conditions», *Environ. Microbiol.*, vol. 23, n.º 10, pp. 5690-5703, 2021, doi: 10.1111/1462-2920.15647.
- [25] P. Nannipieri, «Soil Is Still an Unknown Biological System», *Appl. Sci.*, vol. 10, n.º 11, Art. n.º 11, ene. 2020, doi: 10.3390/app10113717.



- [26] A. Trewavas, «The foundations of plant intelligence», *Interface Focus*, vol. 7, n.º 3, p. 20160098, abr. 2017, doi: 10.1098/rsfs.2016.0098.
- [27] S. Mancuso, *The Revolutionary Genius of Plants: A New Understanding of Plant Intelligence and Behavior*. Simon and Schuster, 2018.
- [28] F. Cvrčková, H. Lipavská, y V. Žárský, «Plant intelligence: Why, why not or where?», *Plant Signal. Behav.*, vol. 4, n.º 5, pp. 394-399, may 2009, doi: 10.4161/psb.4.5.8276.
- [29] N. P. Money, «Hyphal and mycelial consciousness: the concept of the fungal mind», *Fungal Biol.*, vol. 125, n.º 4, pp. 257-259, abr. 2021, doi: 10.1016/j.funbio.2021.02.001.
- [30] P. Lyon, «The cognitive cell: bacterial behavior reconsidered», *Front. Microbiol.*, vol. 6, abr. 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00264.
- [31] A. Trewavas, *Plant Behaviour and Intelligence*. OUP Oxford, 2014.
- [32] J. Gao, B. Barzel, y A.-L. Barabási, «Universal resilience patterns in complex networks», *Nature*, vol. 530, n.º 7590, pp. 307-312, feb. 2016, doi: 10.1038/nature16948.
- [33] A. Adamatzky, J. Vallverdu, A. Gandia, A. Chiolerio, O. Castro, y G. Dodig-Crnkovic, «Fungal States of Minds». bioRxiv, p. 2022.04.03.486900, 3 de abril de 2022. doi: 10.1101/2022.04.03.486900.
- [34] A. Adamatzky, J. Vallverdu, A. Gandia, A. Chiolerio, O. Castro, y G. Dodig-Crnkovic, «Fungal Minds», en *Fungal Machines: Sensing and Computing with Fungi*, A. Adamatzky, Ed., Cham: Springer Nature Switzerland, 2023, pp. 409-422. doi: 10.1007/978-3-031-38336-6_26.
- [35] M. D. Fricker, L. L. M. Heaton, N. S. Jones, y L. Boddy, «The Mycelium as a Network», en *The Fungal Kingdom*, John Wiley & Sons, Ltd, 2017, pp. 335-367. doi: 10.1128/9781555819583.ch15.
- [36] J. Vallverdú *et al.*, «Slime mould: The fundamental mechanisms of biological cognition», *Biosystems*, vol. 165, pp. 57-70, mar. 2018, doi: 10.1016/j.biosystems.2017.12.011.
- [37] Y. Fukasawa, M. Savoury, y L. Boddy, «Ecological memory and relocation decisions in fungal mycelial networks: responses to quantity and location of new resources», *ISME J.*, vol. 14, n.º 2, pp. 380-388, feb. 2020, doi: 10.1038/s41396-019-0536-3.
- [38] G. Boyno y S. Demir, «Plant-mycorrhiza communication and mycorrhizae in inter-plant communication», *Symbiosis*, vol. 86, n.º 2, pp. 155-168, mar. 2022, doi: 10.1007/s13199-022-00837-0.
- [39] M. Saritha, P. Kumar, N. R. Panwar, y U. Burman, «Intelligent plant-microbe interactions», *Arch. Agron. Soil Sci.*, vol. 68, n.º 7, pp. 1002-1018, jun. 2022, doi: 10.1080/03650340.2020.1870677.
- [40] J. Ge, D. Li, J. Ding, X. Xiao, y Y. Liang, «Microbial coexistence in the rhizosphere and the promotion of plant stress resistance: A review», *Environ. Res.*, vol. 222, p. 115298, abr. 2023, doi: 10.1016/j.envres.2023.115298.
- [41] C. Pellegrin, F. Martin, y C. Veneault-Fourrey, «Molecular Signalling During the Ectomycorrhizal Symbiosis», en *Biology of the Fungal Cell*, D. Hoffmeister y M. Gressler, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 95-109. doi: 10.1007/978-3-030-05448-9_6.
- [42] S. W. Simard, «Mycorrhizal Networks Facilitate Tree Communication, Learning, and Memory», en *Memory and Learning in Plants*, F. Baluska, M. Gagliano, y G. Witzany, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 191-213. doi: 10.1007/978-3-319-75596-0_10.
- [43] A. Sportes *et al.*, «A historical perspective on mycorrhizal mutualism emphasizing arbuscular mycorrhizas and their emerging challenges», *Mycorrhiza*, vol. 31, n.º 6, pp. 637-653, nov. 2021, doi: 10.1007/s00572-021-01053-2.
- [44] G. Boyno y S. Demir, «Plant-mycorrhiza communication and mycorrhizae in inter-plant communication», *Symbiosis*, vol. 86, n.º 2, pp. 155-168, mar. 2022, doi: 10.1007/s13199-022-00837-0.
- [45] A. F. Figueiredo, J. Boy, y G. Guggenberger, «Common Mycorrhizae Network: A Review of the Theories and Mechanisms Behind Underground Interactions», *Front. Fungal Biol.*, vol. 2, 2021, Accedido: 11 de mayo de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/ffunb.2021.735299>
- [46] T. Ho-Plágaro y J. M. García, «Molecular Regulation of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, n.º 11, Art. n.º 11, ene. 2022, doi: 10.3390/ijms23115960.
- [47] J. Choi *et al.*, «The negative regulator SMAX1 controls mycorrhizal symbiosis and strigolactone biosynthesis in rice», *Nat. Commun.*, vol. 11, n.º 2114, Art. n.º 1, abr. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-16021-1.
- [48] C. Ding *et al.*, «Cadmium transfer between maize and soybean plants via common mycorrhizal networks», *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 232, n.º 113273, pp. 1-8, mar. 2022, doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113273.

- [49] N. Boutafa, «Interplant communication: The role of mycorrhizal networks concerning underground interactions», Degree Thesis, Ecole Polytechnique de l'Université de Tours, Francia, 2019. Accedido: 9 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: http://memoires.scd.univ-tours.fr/EPU_DA/LOCAL/2019PFE_Nina_Boutafa.pdf
- [50] L. O. Marmolejo, M. N. Thompson, y A. M. Helms, «Defense Suppression through Interplant Communication Depends on the Attacking Herbivore Species», *J. Chem. Ecol.*, vol. 47, n.º 12, pp. 1049-1061, 2021, doi: 10.1007/s10886-021-01314-6.
- [51] G. Santoyo, E. Gamalero, y B. R. Glick, «Mycorrhizal-Bacterial Amelioration of Plant Abiotic and Biotic Stress», *Front. Sustain. Food Syst.*, vol. 5, pp. 1-18, 2021.
- [52] J. Shi, X. Wang, y E. Wang, «Mycorrhizal Symbiosis in Plant Growth and Stress Adaptation: From Genes to Ecosystems», *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 74, n.º 1, pp. 569-613, 2023, doi: 10.1146/annurev-arplant-061722-090342.
- [53] L. Hao *et al.*, «Arbuscular mycorrhizal fungi alter microbiome structure of rhizosphere soil to enhance maize tolerance to La», *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 212, pp. 1-9, abr. 2021, doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.111996.
- [54] R. Kalamulla *et al.*, «Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Sustainable Agriculture», *Sustainability*, vol. 14, n.º 19, Art. n.º 19, ene. 2022, doi: 10.3390/su141912250.
- [55] J. Kaur, J. Chavana, P. Soti, A. Racelis, y R. Kariyat, «Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) influences growth and insect community dynamics in Sorghum-sudangrass (*Sorghum x drummondii*)», *Arthropod-Plant Interact.*, vol. 14, n.º 3, pp. 301-315, jun. 2020, doi: 10.1007/s11829-020-09747-8.
- [56] O. A. Lastovetsky *et al.*, «Molecular Dialogues between Early Divergent Fungi and Bacteria in an Antagonism versus a Mutualism», *mBio*, vol. 11, n.º 5, pp. 1-19, sep. 2020, doi: 10.1128/mBio.02088-20.
- [57] E. Kombrink y E. Schmelzer, «The Hypersensitive Response and its Role in Local and Systemic Disease Resistance», *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 107, n.º 1, pp. 69-78, ene. 2001, doi: 10.1023/A:1008736629717.
- [58] J. E. Vanderplank, *Disease Resistance in Plants*. Elsevier, 2012.
- [59] C. M. J. Pieterse, C. Zamioudis, R. L. Berendsen, D. M. Weller, S. C. M. V. Wees, y P. A. H. M. Bakker, «Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes», *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 52, n.º Volume 52, 2014, pp. 347-375, ago. 2014, doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
- [60] Z. M. Patel, R. Mahapatra, y S. S. M. Jampala, «Chapter 11 - Role of fungal elicitors in plant defense mechanism», en *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, V. Sharma, R. Salwan, y L. K. T. Al-Ani, Eds., Academic Press, 2020, pp. 143-158. doi: 10.1016/B978-0-12-818469-1.00012-2.
- [61] R. Maor y K. Shirasu, «The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens», *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 8, n.º 4, pp. 399-404, ago. 2005, doi: 10.1016/j.mib.2005.06.008.
- [62] Z. Q. Fu y X. Dong, «Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense», *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 64, n.º Volume 64, 2013, pp. 839-863, abr. 2013, doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105606.
- [63] D. C. Fontana *et al.*, «Endophytic Fungi: Biological Control and Induced Resistance to Phytopathogens and Abiotic Stresses», *Pathogens*, vol. 10, n.º 5, Art. n.º 5, may 2021, doi: 10.3390/pathogens10050570.
- [64] Y. Yu, Y. Gui, Z. Li, C. Jiang, J. Guo, y D. Niu, «Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes», *Plants*, vol. 11, n.º 3, Art. n.º 3, ene. 2022, doi: 10.3390/plants11030386.
- [65] I. A. Vos, L. Moritz, C. M. J. Pieterse, y S. C. M. Van Wees, «Impact of hormonal crosstalk on plant resistance and fitness under multi-attacker conditions», *Front. Plant Sci.*, vol. 6, ago. 2015, doi: 10.3389/fpls.2015.00639.
- [66] R. Hermosa, M. B. Rubio, R. E. Cardoza, C. Nicolás, E. Monte, y S. Gutiérrez, «The contribution of Trichoderma to balancing the costs of plant growth and defense», *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.*, vol. 16, n.º 2, pp. 69-80, jun. 2013, doi: 10.2436/20.1501.01.181.
- [67] N. Aerts, M. Pereira Mendes, y S. C. M. Van Wees, «Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense», *Plant J.*, vol. 105, n.º 2, pp. 489-504, 2021, doi: 10.1111/tj.15124.
- [68] V. Ninkovic, D. Markovic, y M. Rensing, «Plant volatiles as cues and signals in plant communication», *Plant Cell Environ.*, vol. 44, n.º 4, pp. 1030-1043, 2021, doi: 10.1111/pce.13910.
- [69] E. E. Quiñones-Aguilar, G. Rincón-Enríquez, L. López-Pérez, E. E. Quiñones-Aguilar, G. Rincón-Enríquez, y L. López-Pérez, «Hongos micorrízicos nativos como promotores de crecimiento en plantas de guayaba (*Psidium guajava* L.)», *Terra Latinoam.*, vol. 38, n.º 3, pp. 541-554, sep. 2020, doi: 10.28940/terra.v38i3.646.
- [70] C. J. U. Farro, M. A. G. Guerrero, C. R. C. Farfán, C. W. A. Sánchez, y G. E. Z. Valdera, «Hongos rizosféricos de *Echinopsis pachanoi* "San Pedro hembra" y su potencial como promotores de crecimiento en *Zea mays* L. bajo estrés salino», *UCV Hacer*, vol. 10, n.º 2, Art. n.º 2, jun. 2021, doi: 10.18050/RevUCVHACER.v10n2a2.



- [71] A. E. Fadiji y O. O. Babalola, «Exploring the potentialities of beneficial endophytes for improved plant growth», *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 27, n.º 12, pp. 3622-3633, dic. 2020, doi: 10.1016/j.sjbs.2020.08.002.
- [72] A. A. Adedayo y O. O. Babalola, «Fungi That Promote Plant Growth in the Rhizosphere Boost Crop Growth», *J. Fungi*, vol. 9, n.º 2, p. 239, feb. 2023, doi: 10.3390/jof9020239.
- [73] S. Gupta, P. Chaturvedi, y M. Kulkarni, «A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi», *Biotechnol. Adv.*, vol. 39, p. 107462, mar. 2020, doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107462.
- [74] J. Poveda, D. Eugui, P. Abril-Urías, y P. Velasco, «Endophytic fungi as direct plant growth promoters for sustainable agricultural production», *Symbiosis*, vol. 85, n.º 1, pp. 1-19, sep. 2021, doi: 10.1007/s13199-021-00789-x.
- [75] X. Han y R. Kahmann, «Manipulation of Phytohormone Pathways by Effectors of Filamentous Plant Pathogens», *Front. Plant Sci.*, vol. 10, jun. 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.00822.
- [76] E. Chanclud y J.-B. Morel, «Plant hormones: a fungal point of view», *Mol. Plant Pathol.*, vol. 17, n.º 8, pp. 1289-1297, 2016, doi: 10.1111/mpp.12393.
- [77] M. A. López, G. Bannenberg, y C. Castresana, «Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival», *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 11, n.º 4, pp. 420-427, ago. 2008, doi: 10.1016/j.pbi.2008.05.002.
- [78] R. N. Patkar y N. I. Naqvi, «Fungal manipulation of hormone-regulated plant defense», *PLOS Pathog.*, vol. 13, n.º 6, p. e1006334, jun. 2017, doi: 10.1371/journal.ppat.1006334.
- [79] L. A.-M. And y W. Rivera-Méndez, «Molecular Identification of *Trichoderma* spp. in Garlic and Onion Fields and *In Vitro* Antagonism Trials on *Sclerotium cepivorum*», *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, vol. 40, p. e0150454, abr. 2016, doi: 10.1590/18069657rbc20150454.
- [80] W. Rivera-Méndez, M. Obregón, M. E. Morán-Diez, R. Hermosa, y E. Monte, «*Trichoderma asperellum* biocontrol activity and induction of systemic defenses against *Sclerotium cepivorum* in onion plants under tropical climate conditions», *Biological Control*, vol. 141, p. 104145, feb. 2020, doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104145.

Exploración de las condiciones de cultivo del hongo *Ganoderma curtisii* para la producción de enzimas con actividad lignocelulósica

Exploring culture conditions of the fungus *Ganoderma curtisii* for the production of enzymes with lignocellulosic activity


Daniela Salas-Ciudad¹, Andrés Esquivel-Valerio², Catalina Rosales López³

Salas-Ciudad, D; Esquivel-Valerio, A; RosalesLópez, C. Exploración de las condiciones de cultivo del hongo *Ganoderma curtisii* para la producción de enzimas con actividad lignocelulósica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 121-131.


 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7617>

1 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 daniela.salasciudad@gmail.com


 <https://orcid.org/0009-0009-9070-9737>

2 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 andesquivel13@estudiantec.cr

 <https://orcid.org/0000-0002-0095-6905>

3 Centro de investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 crosales@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0001-8336-0498>



Palabras clave

Degradación lignocelulósica; hongo de pudrición blanca; lacasa; manganeso peroxidasa.

Resumen

Ciertos hongos de pudrición blanca, como *Ganoderma* sp., son capaces de secretar ligninasas, tales como las manganeso peroxidases y las lacasas. Estas enzimas tienen un alto valor económico debido a su potencial para la degradación de residuos agroindustriales, tales como los residuos de la actividad piñera, los cuales tienen graves impactos negativos a nivel medioambiental en Costa Rica, y se ha resaltado la necesidad de integrar esos desechos a algún proceso para convertirlos en productos con mayor valor agregado. El objetivo de esta investigación consistió en determinar las condiciones óptimas de una fermentación en estado líquido para la producción de enzimas del hongo *Ganoderma curtsii*. con el potencial para la degradación lignocelulósica. Para obtener la mayor actividad enzimática se requirió el uso de un medio bajo en nutrientes, con un pH ácido, en ausencia de fibras de piña, y al menos 12 días de incubación. Los resultados mostraron que es posible el aprovechamiento de residuos agrícolas, específicamente enfocado en la integración de rastrojos de la actividad piñera en Costa Rica, a un proceso de economía circular.

Keywords

Laccase; lignocellulosic degradation; manganese peroxidase; white rot fungus.

Abstract

Certain white rot fungi, such as *Ganoderma* sp., are capable of secreting ligninases, such as manganese peroxidases and laccases. These enzymes have a high economic value due to their potential for the degradation of agroindustrial waste, such as waste from the pineapple activity, which has serious negative environmental impacts in Costa Rica, and the need to integrate these wastes into products with greater added value has been highlighted. The objective of this research was to determine the optimal conditions of a liquid fermentation for the production of enzymes from the fungus *Ganoderma curtsii* with the potential for lignocellulosic degradation. To obtain the greatest enzymatic activity, the use of a medium low in nutrients, with an acidic pH, in the absence of pineapple fibers, and at least 12 days of incubation was required. The results showed that it was possible to use agricultural waste, specifically focused on the integration of stubble from the pineapple activity in Costa Rica, into a circular economy process.

Introducción

Actualmente, la actividad piñera en Costa Rica tiene una alta importancia debido a su impacto económico, social y ambiental [1]. Dicha relevancia se refleja en el crecimiento acelerado de esta industria, impulsado por la venta internacional de piña, según datos de la Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA) [2]. Sin embargo, la actividad piñera ha generado cuestionamientos sobre sus implicaciones negativas, específicamente a nivel ecológico y de salud pública [3], debido a los residuos lignocelulósicos que no han logrado ser integrados a algún proceso para convertirlos en productos con mayor valor agregado, como la alimentación animal o como abono [4] y que generan problemas de contaminación y proliferación de plagas [5].

La valorización de residuos agroindustriales se puede lograr a través de procesos biotecnológicos, particularmente mediante el uso de los residuos como sustrato [6]. Por ejemplo, se ha reportado el uso de hongos de pudrición blanca en residuos agroindustriales para la producción de enzimas [7]. Ciertos hongos de pudrición blanca, como *Ganoderma sp.*, son capaces de secretar ligninasas, enzimas con alto valor económico [8], como por ejemplo las manganeso peroxidasas y las lacasas [10], las cuales se podrían utilizar para el manejo de residuos de piña, entre otros residuos agroindustriales.

En esta investigación se buscó determinar las condiciones óptimas de una fermentación en estado líquido del hongo *Ganoderma curtisii* para la producción de enzimas con potencial lignocelulósico, con miras a la generación de alternativas para integrar los residuos de la actividad piñera en Costa Rica (rastros) a procesos de economía circular.

Materiales y métodos

Material vegetal. El proyecto se realizó en los laboratorios del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR). El hongo *Ganoderma curtisii* fue obtenido de la Colección de Hongos de la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica (accesión número CIIBI-007A; permiso de acceso a la biodiversidad CONAGEBIO N° R-CM-ITCR-002-2022).

Preparación de cultivo en placa de *G. curtisii*. El cultivo de *G. curtisii* en placa se realizó en medio agar papa-dextrosa (PDA) durante una semana a 30 °C [9].

Medios líquidos para el cultivo de *G. curtisii*. Se probaron dos medios de cultivo líquido a diferentes pH (pH 3.5 y pH 5.5), con el fin de determinar las condiciones óptimas para el cultivo del hongo y la producción enzimática: medio control reportado previamente [9] y un medio Sabouraud OXOID™ modificado para la producción enzimática (Cuadro 1). Además, ambos medios se probaron con 1 g de rastrojo de piña micronizada (3.35 mm, malla #6), como posible elicitor de actividad enzimática.

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo líquidos para el cultivo de *Ganoderma curtisii*.

| Componente | Medio Control [9] | Medio Modificado |
|--------------------------------------|-------------------|------------------|
| | Concentración | Concentración |
| Agua destilada | 1 L | 1 L |
| Glucosa | 30 g/L | 4 g/L |
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 g/L | - |
| KH ₂ HPO ₄ | 0.5 g/L | - |
| Peptona | 5 g/L | 0.8 g/L |
| Extracto de levadura | 5 g/L | 0.8 g/L |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.5 g/L | - |
| Tiamina | 0.05 g/L | - |
| Aceite de oliva | 4 mL | - |
| Caldo Sabouraud | - | 1 g/L |

Condiciones de crecimiento del hongo. En Erlenmeyers de 150 mL se montaron, por triplicado, cultivos con 75 mL medio (control y modificado) con tres gránulos de *G. curtisii* obtenido en placa y se incubaron a temperatura ambiente y agitación orbital a 100 rpm por 12 días. Se

probaron cuatro tratamientos en el medio control y cuatro tratamientos en el medio modificado, para evaluar los efectos del nivel de acidez (pH 3.5 y pH 5.5) y de la presencia y ausencia de fibra de piña micronizada (Cuadro 2) en la producción enzimática.

Cuadro 2. Nomenclatura asignada a los tratamientos empleados para el cultivo de *Ganoderma curtisii* con residuos del cultivo de piña.

| Nomenclatura | Composición del medio de cultivo |
|--------------|---|
| 1AX | Medio control con pH 3.5 sin fibra de piña |
| 1BX | Medio control con pH 5.5 sin fibra de piña |
| 1AC | Medio control con pH 3.5 con fibra de piña |
| 1BC | Medio control con pH 5.5 con fibra de piña |
| 2AX | Medio Sabouraud modificado con pH 3.5 sin fibra de piña |
| 2BX | Medio Sabouraud modificado con pH 5.5 sin fibra de piña |
| 2AC | Medio Sabouraud modificado con pH 3.5 con fibra de piña |
| 2BC | Medio Sabouraud modificado con pH 5.5 con fibra de piña |

Quantificación de actividad enzimática. Se evaluó la actividad enzimática de dos ligninasas, la manganeso peroxidasa (MnP) y la lacasa (Lac) en muestras de los medios de cultivo empleando la metodología descrita por Solano-Meza [10]. Se realizaron cuatro repeticiones en cada condición de cultivo. Cada cuatro días, durante 12 días se tomaron muestras de 1 mL de cada cultivo para su posterior análisis de cuantificación de actividad enzimática en espectrofotómetro.

La actividad enzimática de MnP se evaluó utilizando el método de oxidación de rojo fenol propuesto por Glenn y Gold [11]. La mezcla de reacción contenía lactato de sodio 25 mM, sulfato de manganeso 2 mM, albúmina de huevo al 0.1%, rojo fenol al 2%, amortiguador succinato-lactato (pH 4.5) 20 mM, y 150 μ L de muestra de medio de cultivo. La reacción se inició con peróxido de hidrógeno (2 mM) y se detuvo a los 5 min con hidróxido de sodio (2 N), midiendo la absorbancia a 431 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. La actividad del MnP (UI) es la cantidad de enzima requerida para transformar 1 μ mol de rojo fenol y es expresada como actividad específica volumétrica (UI/mL) en la fermentación líquida.

La actividad enzimática de Lac se basó en el método de oxidación del radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) descrito por More *et al.* [12]. La mezcla de reacción consistió en 5.0 mM de ABTS, 100 mM de amortiguador acetato de sodio a pH 4.5, y 150 μ L de muestra de medio de cultivo. El cambio en la absorbancia se midió a 420 nm. Una unidad de actividad Lac (UI) es definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μ mol de ABTS y se reporta como actividad específica (U/mL) en la fermentación líquida.

Cinética enzimática de *G. curtisii* bajo las condiciones óptimas. Luego de determinar los tratamientos con las mejores condiciones para la actividad enzimática de MnP y Lac, se evaluó la cinética enzimática de *G. curtisii* en términos de MnP y Lac bajo estas condiciones. En Erlenmeyers de 250 mL se montaron seis réplicas, con 75 ml del medio optimizado, con tres gránulos de *G. curtisii* obtenido en medio semisólido, a temperatura ambiente, en agitador orbital a 100 rpm, durante 12 días. Cada tres días, se tomaron muestras de 1 mL de cada cultivo, para su posterior análisis de MnP y Lac como se indicó previamente.

Microscopía electrónica de barrido. En el Laboratorio Institucional de Microscopía (LIM) del ITCR se analizaron muestras de rastrojo de piña micronizado, incubado en las condiciones óptimas con extracto de *G. curtisii* por 12 días y 62 días. Se utilizó un microscopio electrónico

de barrido (Hitachi TM3000) siguiendo la metodología descrita por [13] para el análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). Las muestras se fijaron al vacío por 30 min con fijador de Karnovsky, luego de 48 h se realizó un lavado con amortiguador Sorensen por 15 min, una post fijación con tetraóxido de osmio (concentración) por dos horas, y dos lavados con agua destilada, para su posterior deshidratación por 10 minutos utilizando etanol a diferentes concentraciones (30, 50, 70, 80, 90, 95, 100%) y por último, un secado de punto crítico con dióxido de carbono.

Análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de tres vías utilizando GraphPad Prism v. 10.1.1. a los datos obtenidos en la optimización de producción enzimática, donde se analizaron los factores “tipo de medio de cultivo”, “presencia o ausencia de fibra de piña en el medio de cultivo” y el “tipo de enzima producida” bajo circunstancias de pH a 3.5 y a 5.5, a partir de los resultados del área bajo la curva (AUC) en la cinética enzimática. Adicionalmente, se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) por el método de Tukey para concluir estadísticamente bajo cuáles condiciones se obtuvieron los mejores resultados en obtención de producción enzimática, a través del software MINITAB versión 2018®.

Resultados y discusión

Se analizaron las condiciones óptimas para la actividad enzimática de MnP y Lac producidas por *G. curtsii*. En todos los casos, se obtuvo mayor actividad enzimática de MnP respecto a Lac (Figuras 1, 2 y 3). La mejor actividad enzimática de MnP se obtuvo en los medios Sabouraud modificados a pH 3.5 y pH 5.5 sin fibra de piña (Figura 3A, medios 2AX y 2BX), mientras que la actividad enzimática de Lac fue muy similar en todas las condiciones, con pocas diferencias significativas, aunque con resultados levemente mejores en los medios control a pH 3.5 y pH 5.5 con fibra de piña (Figura 3A, medios 1AC y 1BC).

Se obtuvo poca diferencia significativa entre pH 3.5 y pH 5.5 para la actividad MnP y ningún efecto significativo del pH en la actividad Lac (Figura 3, Cuadro 3). Esto concuerda con estudios previos, que han mostrado máxima actividad enzimática para las lacasas fúngicas en valores de pH entre 2.5 y 6.0 [14], [15], [16], [17] y con un pH óptimo alrededor de 3 [18], [19], y máxima actividad enzimática para las manganeso peroxidases en valores de pH entre 4 y 6 con un pH óptimo alrededor de 5 [20], [21].

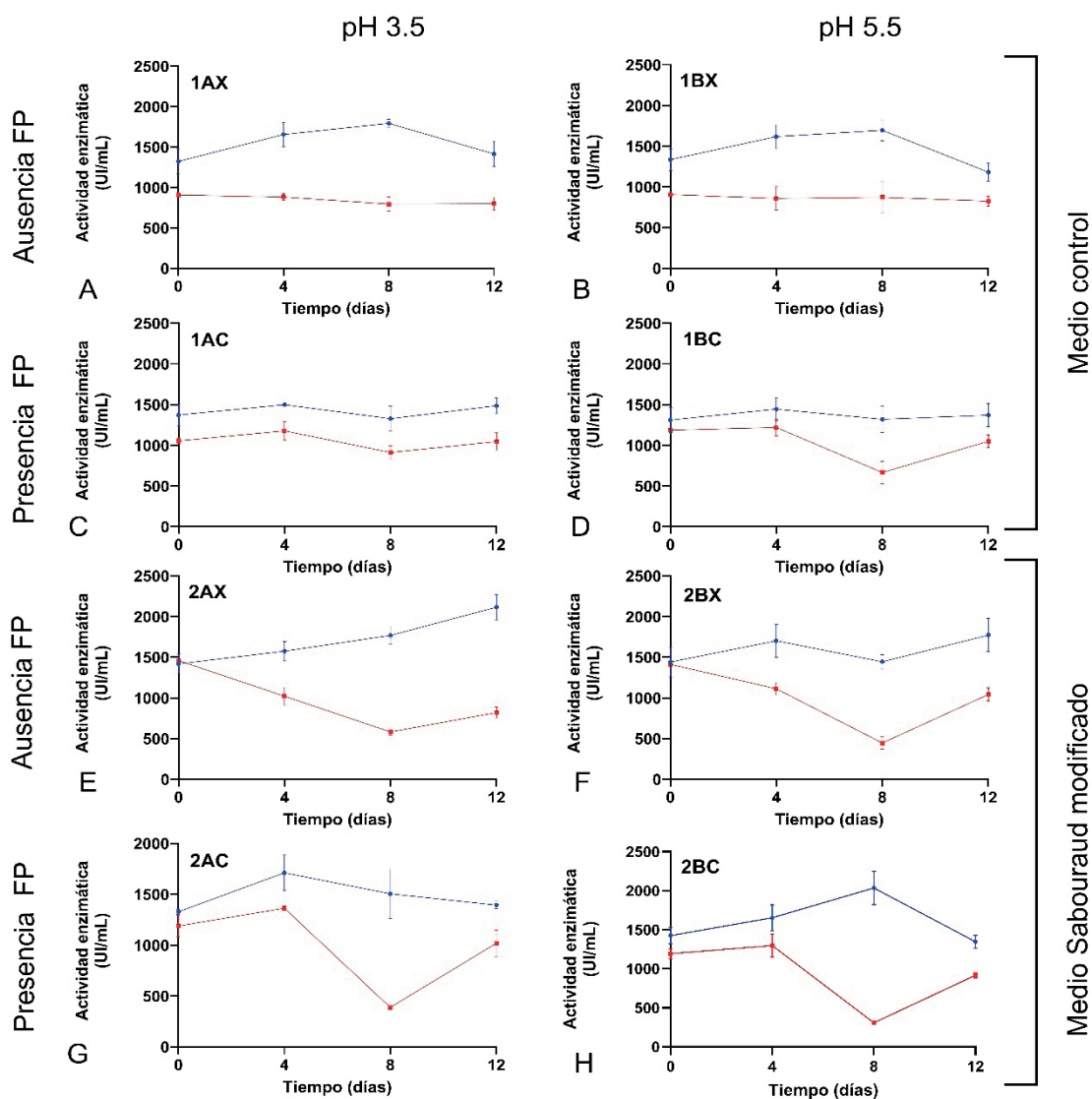


Figura 1. Cinética de las enzimas manganeso peroxidasa (MnP) (azul) y lacasa (Lac) (rojo) producidas por *G. curtsii* en dos medios de cultivo líquidos (medio control y medio Sabouraud modificado) a pH 3.5 y 5.5 cada uno, con y sin fibra de piña micronizada (FP), durante 12 días (promedio \pm desviación estándar, $n = 4$). A) 1AX B) 2AX C) 1BX D) 2BX E) 1AC F) 2AX G) 1BC H) 2BC. (GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

No hubo diferencia significativa en la actividad enzimática de MnP y Lac producidas por *G. curtsii* entre el medio de cultivo control y el medio Sabouraud modificado ($p > 0.05$) (Cuadro 3). Esto significa que el medio de cultivo por sí solo no influyó significativamente en la producción enzimática por parte del hongo, a pesar de que el medio control está más enriquecido con sales, vitaminas y nutrientes respecto al medio Sabouraud modificado, el cual tiene una composición más reducida en nutrientes (Cuadro 1).

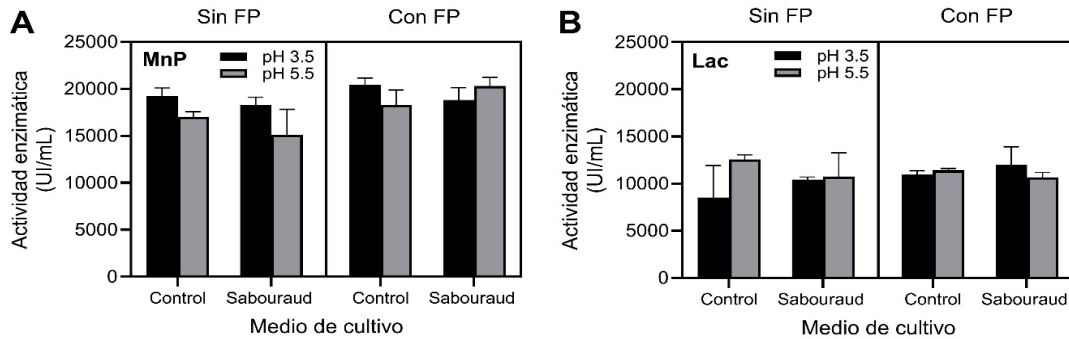


Figura 2. Área bajo la curva (promedio \pm desviación estándar, $n = 4$) de la actividad enzimática de manganeso peroxidasa (MnP; A) y lacasa (Lac; B) producidas por *G. curtisii* cultivado durante 12 días en medio control y medio Sabouraud modificado, con presencia y ausencia de fibra de piña (FP) micronizada, a pH de 3.5 y 5.5. (GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

Cuadro 3. Valor de significancia (p) del análisis de ANOVA de tres vías del área bajo la curva de la actividad enzimática de manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac) producidas por *G. curtisii* cultivado durante 12 días en medio control y medio Sabouraud modificado, con presencia y ausencia de fibra de piña (FP) micronizada, a pH de 3.5 y 5.5.

| Factores | Valor de p | |
|---|------------|-----|
| | MnP | Lac |
| Fibra de piña (presencia vs. ausencia) | 0.0008 | ns* |
| pH (3.5 vs. 5.5) | 0.0085 | ns* |
| Medio de cultivo (control vs. Sabouraud modificado) | ns* | ns* |
| Fibra de piña x pH x Medio de cultivo | 0.0409 | ns* |

*ns = no significativo con $p > 0.05$ (GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

La fibra de piña micronizada se agregó al medio de cultivo como un posible inductor de la actividad enzimática. Investigaciones previas [22] han demostrado que es posible desencadenar la inducción de actividad ligninolítica con la presencia de altos niveles de lignina proveniente de sustratos lignocelulósicos naturales, ya que funcionan como un inductor natural y fuente de carbono para la producción enzimática. Otros autores han mostrado que al añadir rastrojos de piña se ofrece mayor disponibilidad de carbohidratos solubles, compuestos aromáticos y microelementos, que sirven como promotores de la producción de enzimas [23].

Sin embargo, la mejor fuente de carbono para Lac y MnP es la glucosa [24]. En otros hongos de pudrición blanca, un nivel alto de glucosa en el medio de cultivo reprimió la síntesis de estas dos enzimas, posiblemente por la represión de catabolitos de carbono, donde los hongos asimilan glucosa antes de cambiarse a fuentes de carbono menos favorables, reprimiendo los genes que codifican las enzimas lignocelulolíticas para utilizar fuentes secundarias de carbono como la lignocelulosa [25]. Esto coincide con los resultados obtenidos, donde la presencia de fibra de piña no tuvo efectos significativos en la actividad Lac, y la actividad de la MnP fue significativamente mejor en los medios sin fibra de piña (Cuadro 3, Figura 3).

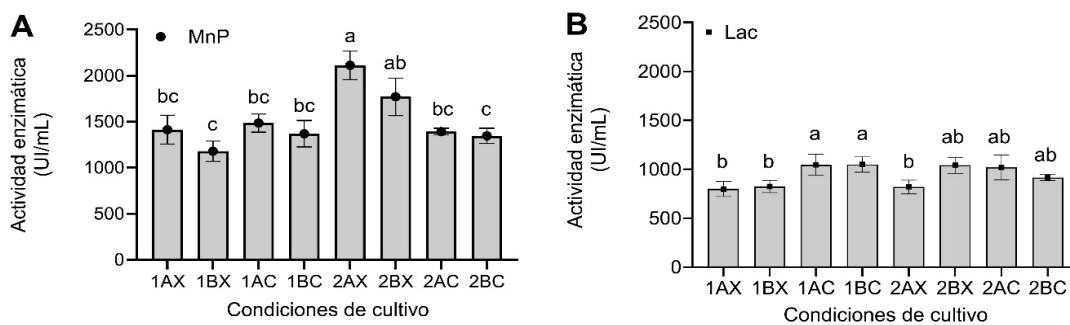


Figura 3. Actividad enzimática (promedio \pm desviación estándar, $n = 4$) de manganeso peroxidasa (MnP; A) y lacasa (Lac; B) producidas por *G. curtsii* a los 12 días de incubación en medio control y medio Sabouraud modificado, con presencia y ausencia de fibra de piña micronizada, a pH de 3.5 y 5.5. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$). (Análisis de varianza ANOVA con el método Tukey al 95% de confianza, MINITAB v. 2018; gráfico obtenido mediante GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

Para la elección del medio de cultivo optimizado, se eligió el medio 2AX (medio Sabouraud modificado, pH de 3.5 y sin fibra de piña). Se priorizó la actividad enzimática de MnP, ya que esta enzima se produjo en una cantidad considerablemente mayor que Lac. Además, la enzima MnP contribuye en gran manera a la obtención de biopulpa, que es de gran interés industrial para la elaboración de diversos productos [26], lo cual atribuye a su atractivo económico. Adicionalmente, la producción de ambas enzimas mostró una tendencia de aumento bajo este tratamiento (Figura 1). Además, el medio Sabouraud modificado presenta menos macro y micronutrientes que el medio control, abaratando los costos de eventuales fermentaciones (Cuadro 1).

Al evaluar la cinética de la actividad enzimática de *G. curtsii* en el tratamiento 2AX (medio Sabouraud modificado, pH 3.5 y sin fibra de piña) (Figura 4), la mayor actividad enzimática para MnP (1725 U/mL) se presentó a los 12 días, lo cual corresponde con lo reportado con otros autores [27], quienes indican que la actividad de MnP aumenta al llegar al 10 día y llega a su máximo en el día 15 al utilizar tres hongos de pudrición blanca en residuos lignocelulósicos. En el caso de la actividad enzimática de Lac de *G. curtsii*, se evidenció cómo desde el día 9 surge una tendencia a su disminución, lo cual coincide con otros estudios donde Lac llega a su máxima actividad (1059.2 U/L) en el día 10, después del cual empieza a reducirse [28].

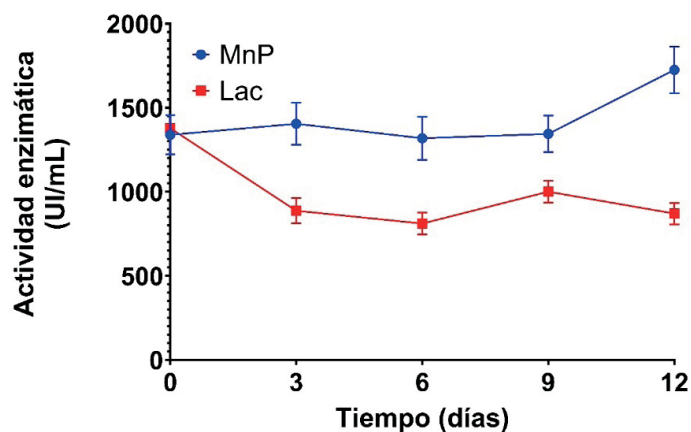


Figura 4. Cinética de las enzimas manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac) de *Ganoderma curtsii* en medio Sabouraud modificado a pH 3.5 durante 12 días (promedio \pm desviación estándar, $n = 6$). (GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

Finalmente, mediante microscopía electrónica de barrido, se observó la ultraestructura de un rastrojo de piña micronizado sin ningún tratamiento (Figura 5A y 5B) y de un rastrojo de piña sometido a un tiempo de incubación de 12 (Figura 5C y 5D) y de 62 días (Figura 5E y 5F) en las condiciones optimizadas de cultivo para *Ganoderma curtsii*. En las muestras control, los rastrojos de piña muestran solamente los efectos del tratamiento mecánico (la molienda de los rastrojos), donde se visualizan fibras definidas y pequeños bloques de hojas. Tras solamente 12 días de degradación, es posible visualizar erosión en la pared celular de las fibras piña así como las esporas del hongo *Ganoderma curtsii* colonizando la lámina celular. Luego de dos meses, se observa cómo el tejido vegetal ha sido colonizado por micelio de *Ganoderma curtsii*, el cual es posible reconocer por sus esporas de forma ovalada y su tamaño [29]. En un estudio similar de degradación por hongos de pudrición blanca en palma aceitera, estos cambios sugieren una modificación de la lignina [30]. Las cavidades microscópicas formadas dentro de los tejidos (Figura 5E) y la migración de las hifas fúngicas son signos de una avanzada degradación en tejidos vegetales [31].

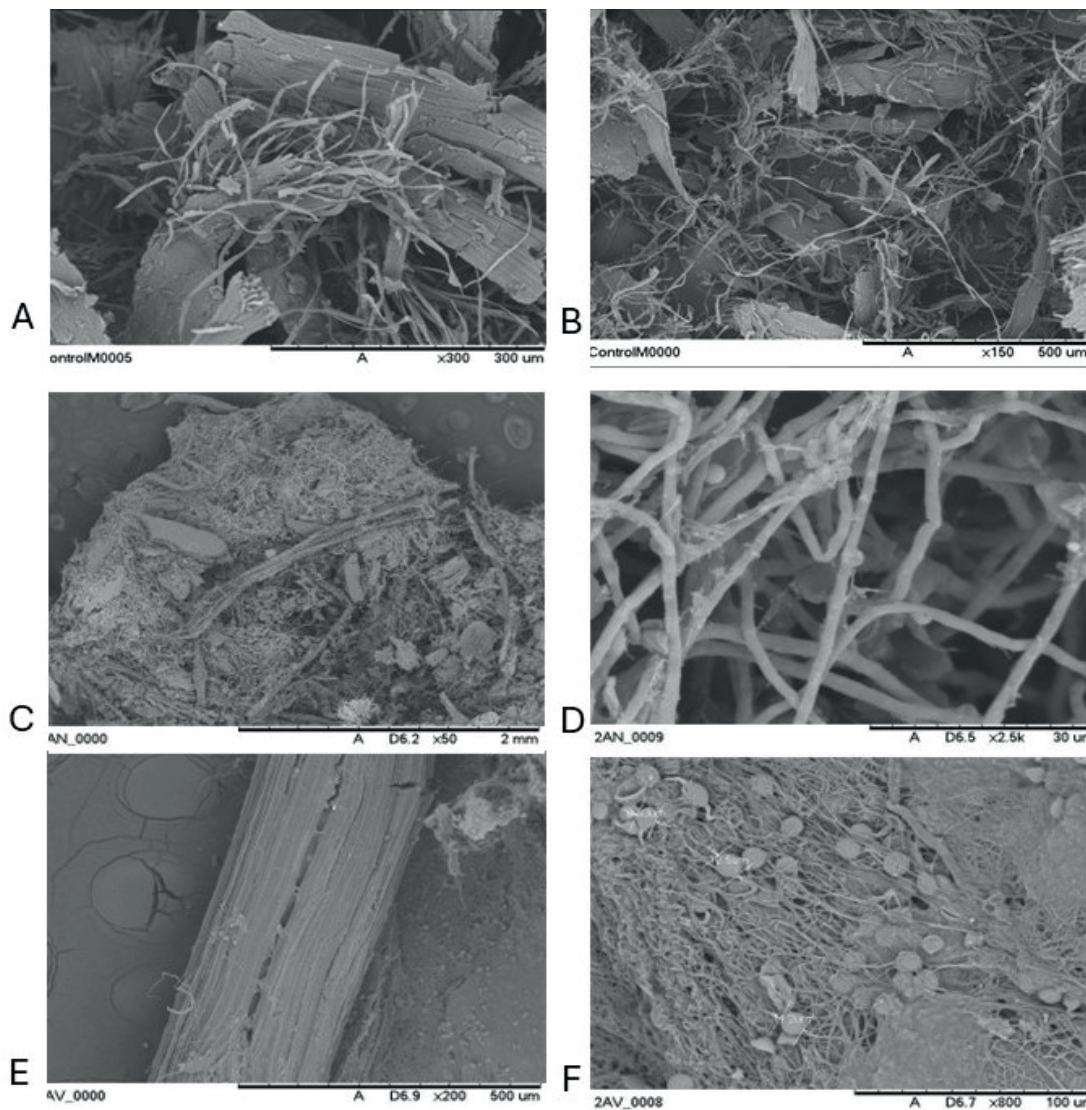


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de rastrojos de piña micronizada sin tratamiento (A y B), e incubada por 12 días (C y D) o 2 meses (E y F) con el hongo *Ganoderma curtsii* cultivado en medio líquido Sabouraud modificado a pH 3.5.

Conclusiones

Las condiciones óptimas para la producción enzimática de MnP de *G. curtsii* fueron las obtenidas a pH 3.5 en un medio Sabouraud modificado bajo en nutrientes durante un período de 12 días. La adición de fibras de piña no mejoró la producción de ninguna de las enzimas de interés (MnP y Lac); sin embargo, se verificó la capacidad de ambas enzimas para degradar rastrojos de piña. En experimentos futuros, se recomienda utilizar medios de cultivo con mínima o nula fuente de carbono en la forma de glucosa, lo cual podría mejorar la producción de estas enzimas.

Agradecimientos

Los resultados de este proyecto corresponden a un proyecto de investigación estudiantil financiado por la Vicerrectoría de Investigación del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Referencias

- [1] A. Obando Campos, "Acciones y omisiones del Estado costarricense en la expansión piñera: El caso de la Zona Norte-Norte de Costa Rica," *Anuario Centro de Investigación y Estudios Políticos*, no. 11, pp. 22–55, Nov. 2020, doi: 10.15517/aciep.v0i11.42226.
- [2] Ingrid Badilla Fallas, Eugenia Mora Monge, Ghiselle Rodríguez Muñoz, and Miriam Valverde Díaz, "Informe de gestión del Sector Agropecuario, Pesquero y Rural (Mayo 2019 - Abril 2020)," San José, Costa Rica, 2020. Accessed: Aug. 07, 2024. [Online]. Available: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/D10-11111.pdf>
- [3] Katzy O`neal Coto, "UCR investiga y aporta soluciones a polémico cultivo en Costa Rica," *Universidad de Costa Rica*, 2018. Accessed: Aug. 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2018/06/21/ucr-investiga-y-aporta-soluciones-a-polemico-cultivo-en-costa-rica.html>
- [4] R. Gómez-García, M. A. Medina-Morales, R. Rodríguez, B. Farruggia, G. Picó, and C. N. Aguilar, "Production of a xylanase by *Trichoderma harzianum* (*Hypocrea lixii*) in solid-state fermentation and its recovery by an aqueous two-phase system," *Canadian Journal of Biotechnology*, vol. 2, no. 2, pp. 108–115, Sep. 2018, doi: 10.24870/cjb.2018-000122.
- [5] Rodolfo A. Hernández-Chaverri and Lilia Arely Prado Barragán, "Impacto y oportunidades de biorrefinería de los desechos agrícolas del cultivo de piña (*Ananas comosus*) en Costa Rica," *Cuadros de Investigación UNED*, vol. 10, no. 2, pp. 455–468, 2018, doi: 10.22458/urj.v10i2.2059.
- [6] J. Kumla *et al.*, "Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production through the utilization of agro-industrial waste," Jun. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/molecules25122811.
- [7] G. Šelo, M. Planinić, M. Tišma, S. Tomas, D. Kočeva Komlenić, and A. Bucić-Kojić, "A comprehensive review on valorization of agro-food industrial residues by solid-state fermentation," May 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/foods10050927.
- [8] A. Zerva, N. Tsafantakis, and E. Topakas, "Evaluation of basidiomycetes wild strains grown in agro-industrial residues for their anti-tyrosinase and antioxidant potential and for the production of biocatalysts," *Fermentation*, vol. 7, no. 1, 2021, doi: 10.3390/fermentation7010019.
- [9] C. Rosales-López, A. Vargas-López, M. Monge-Artavia, and M. Rojas-Chaves, "Evaluation of Conditions to Improve Biomass Production by Submerged Culture of *Ganoderma* sp.," *Microorganisms*, vol. 10, no. 7, Jul. 2022, doi: 10.3390/microorganisms10071404.
- [10] A. V. Solano-Meza, "Efecto de los cultivos fúngicos de *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum* en la obtención de celulosa a partir de hojas de piña," Tesis de grado, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2021.
- [11] J. K. Glenn and M. H. Gold, "Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*," *Appl Environ Microbiol*, vol. 45, no. 6, pp. 1741–1747, 1983.
- [12] S. S. More, P. S. Renuka, K. Pruthvi, M. Swetha, S. Malini, and S. M. Veena, "Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp.," *Enzyme Res*, vol. 2011, no. 1, 2011, doi: 10.4061/2011/248735.
- [13] I. Vargas-Venegas, A. Medaglia-Mata, and L. Chavarría-Pizarro, "Desarrollo de un protocolo para producir quitosano a partir de la exuvia larval de *Tenebrio molitor*," *Tecnología en Marcha*, vol. 37, pp. 3–16, 2024, doi: 10.18845/tm.v37i2.6724.

- [14] J. Jordaan and W. D. Leukes, "Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus," *Enzyme Microb Technol*, vol. 33, no. 2–3, pp. 212–219, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0141-0229(03)00116-9.
- [15] L. Q. Guo, S. X. Lin, X. B. Zheng, Z. R. Huang, and J. F. Lin, "Production, purification and characterization of a thermostable laccase from a tropical white-rot fungus," *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 27, no. 3, pp. 731–735, Mar. 2011, doi: 10.1007/s11274-010-0502-8.
- [16] C. Galhaup, S. Goller, C. K. Peterbauer, J. Strauss, and D. Haltrich, "Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions," *Microbiology (N Y)*, vol. 148, pp. 2159–2169, 2002, doi: 10.1099/00221287-148-7-2159.
- [17] W. T. Huang, R. Tai, R. S. Hseu, and C. T. Huang, "Overexpression and characterization of a thermostable, pH-stable and organic solvent-tolerant *Ganoderma fornicatum* laccase in *Pichia pastoris*," *Process Biochemistry*, vol. 46, no. 7, pp. 1469–1474, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.procbio.2011.03.020.
- [18] D. Zhongyang *et al.*, "Production and characterization of thermostable laccase from the mushroom, *Ganoderma lucidum*, using submerged fermentation," *Afr J Microbiol Res*, vol. 6, no. 6, pp. 1147–1157, Feb. 2012, doi: 10.5897/ajmr11.1257.
- [19] E. M. Ko, Y. E. Leem, and H. T. Choi, "Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 57, no. 1–2, pp. 98–102, 2001, doi: 10.1007/s002530100727.
- [20] B. Muhammad, A. Muhammad, and R. Muhammad, "Purification and biochemical characterization of extracellular manganese peroxidase from *Ganoderma lucidum* IBL-05 and its application," *Scientific Research and Essays*, vol. 10, no. 14, pp. 456–464, Jul. 2015, doi: 10.5897/sre2015.6268.
- [21] S. Hariharan and P. Nambisan, "Optimization of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase, and Lac Production from *Ganoderma lucidum* Under Solid State Fermentation of Pineapple Leaf," *Bioresources*, vol. 8, no. 1, pp. 250–271, 2013.
- [22] H. Suryadi *et al.*, "Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi," *Heliyon*, vol. 8, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e08865.
- [23] J. Čilerdžić, M. Stajić, and J. Vukojević, "Activity of Mn-Oxidizing Peroxidases of *Ganoderma lucidum* Depending on Cultivation Conditions," *Bioresources*, vol. 11, no. 1, pp. 95–104, 2016, doi: 10.15376/biores.11.1.95-104.
- [24] W. D. H. Schneider, R. C. Fontana, S. Mendonça, F. G. de Siqueira, A. J. P. Dillon, and M. Camassola, "High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources," *Process Biochemistry*, vol. 69, pp. 1–11, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.procbio.2018.03.005.
- [25] P. Thamvithayakorn, C. Phosri, N. Pisutpaisal, S. Krajangsang, A. J. S. Whalley, and N. Suwannasai, "Utilization of oil palm decanter cake for valuable laccase and manganese peroxidase enzyme production from a novel white-rot fungus, *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33," *3 Biotech*, vol. 9, no. 11, Nov. 2019, doi: 10.1007/s13205-019-1945-8.
- [26] G. Janusz, K. H. Kucharzyk, A. Pawlik, M. Staszczak, and A. J. Paszczynski, "Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation," *Enzyme Microb Technol*, vol. 52, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.10.003.
- [27] A. K. Pandey, S. K. Vishwakarma, A. K. Srivastava, V. K. Pandey, S. Agrawal, and M. P. Singh, "Production of ligninolytic enzymes by white rot fungi on lignocellulosic wastes using novel pretreatments," *Cell Mol Biol*, vol. 60, no. 5, pp. 41–45, 2014, doi: 10.14715/cmb/2014.60.5.8.
- [28] A. Umar and S. Ahmed, "Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocon-textum* along with its phylogenetic relationship," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-06111-z.
- [29] Bhosle S, Ranadive K, Bapat G, Garad S, Deshpande G, and Vaidya J, "Taxonomy and Diversity of *Ganoderma* from the Western parts of Maharashtra (India)," *Mycosphere*, 2010, doi: 10.1128/jcm.00430-10.
- [30] P. Singh, O. Sulaiman, R. Hashim, L. C. Peng, and R. P. Singh, "Evaluating biopulping as an alternative application on oil palm trunk using the white-rot fungus *Trametes versicolor*," *Int Biodeterior Biodegradation*, vol. 82, pp. 96–103, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.ibiod.2012.12.016.
- [31] Y. Naidu *et al.*, "Consolidated evaluation of polysaccharide degradation after oil palm wood pretreatment with indigenous white-rot hymenomycetes," *Wood Sci Technol*, vol. 56, no. 2, pp. 409–435, Mar. 2022, doi: 10.1007/s00226-022-01366-1.

***Psilocybe cubensis*: potencial neuropsicofarmacéutico de la psilocibina y psilocina**

***Psilocybe cubensis*: neuropsychopharmaceutical potential of psilocybin and psilocin**

Frank Carlos Barrientos-Alfaro¹, Valeria Herrera-Rojas², Michelle Montero-Quesada³, Jose Julián Picado-Morales⁴, Magally María Sanabria-Brenes⁵

Barrientos-Alfaro, F.C; Herrera-Rojas, V; Montero-Quesada, M; Picado-Morales, J.J; Sanabria-Brenes, M.M. *Psilocybe cubensis*: potencial neuropsicofarmacéutico de la psilocibina y psilocina. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 132-142.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7618>

- 1 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 frankca37@gmail.com
 <https://orcid.org/0000-0001-8961-4110>
- 2 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 valeherrerarojas@hotmail.com
 <https://orcid.org/0000-0001-5857-8858>
- 3 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 michellemonteroq@gmail.com
 <https://orcid.org/0000-0003-4862-3680>
- 4 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 josejpicado@icloud.com
 <https://orcid.org/0000-0003-2116-8577>
- 5 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 magallymaria2001@gmail.com
 <https://orcid.org/0000-0002-9289-9548>

Palabras clave

Alcaloides psicoactivos; hongos; potencial biomédico; fármaco con fines médicos; fármaco alucinógeno.

Resumen

Los hongos juegan un papel clave en el mantenimiento de la vida en la tierra, ya que desempeñan múltiples funciones a nivel ecológico. Adicionalmente, son productores de diversos metabolitos secundarios, entre estos, los alcaloides, los cuales en ciertos casos pueden proveer propiedades alucinógenas. *Psilocybe cubensis* es una especie común de hongos alucinógenos conocida como “hongos mágicos”. Esta especie del filo Basidiomycota, originaria de Mesoamérica, produce alcaloides como la psilocibina y su derivado desfosforilado, la psilocina. Se ha estudiado el potencial de estos compuestos en el tratamiento contra distintas enfermedades como la depresión, la ansiedad, el trastorno de déficit de atención, el estrés postraumático y el trastorno obsesivo-compulsivo. Los hongos que acumulan psilocibina no suelen ser tóxicos para el consumo, pero sí pueden tener efectos colaterales como náuseas, vómito, dolor de cabeza, aumento del ritmo cardíaco y de la presión sanguínea. Dado esto y a limitaciones legales, este hongo y sus compuestos no se encuentran inmersos en el mercado; sin embargo, nuevas investigaciones demuestran su potencial y evidencian la necesidad de considerar su comercialización.

Keywords

Psicoactive alkaloid; fungi; biomedical potential; drug for medical purposes; hallucinogenic drug.

Abstract

Fungi play a key role in maintaining life on Earth, as they perform multiple ecological functions. Besides, they are producers of various secondary metabolites, among these, alkaloids, which in certain cases can provide hallucinogenic properties. *Psilocybe cubensis* is a common species of hallucinogenic mushrooms known as “magic mushrooms”. This species of the phylum Basidiomycota, native to Mesoamerica, produces alkaloids such as psilocybin and its dephosphorylated derivative, psilocin. The potential of these compounds in the treatment of various illnesses such as depression, anxiety, attention deficit disorder, post-traumatic stress disorder, and obsessive-compulsive disorder has been studied. Mushrooms that accumulate psilocybin are usually not toxic for consumption, but they can have side effects such as nausea, vomiting, headache, increased heart rate, and blood pressure. Given this and legal limitations, this mushroom and its compounds are not available in the market; however, new research demonstrates their potential and why their commercialization should be considered.

Introducción

Los hongos son los microorganismos eucariotas y heterótrofos que conforman el reino Fungi [1]. Las especies dentro de este reino se clasifican en los filos Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Mucoromycota, Glomeromycota, Zoopagomycota, Ascomycota y Basidiomycota [2]. De estos, sólo las especies de los dos últimos filos son capaces de producir cuerpos fructíferos [3]. Los hongos han sido utilizados por el ser humano para diversos fines, incluyendo la ingesta directa, la producción de diversos alimentos como el pan y distintas bebidas alcohólicas, y la producción de antibióticos y enzimas para procesos

químicos [4]. En el ecosistema, los hongos juegan un papel clave, debido a su alta producción de enzimas descomponedoras de materia orgánica [5]. Algunos desempeñan un rol simbiótico y otros, parasítico, tanto para plantas como animales [6]. También pueden ser utilizados como biocontroladores por la competencia natural que tienen con otros organismos [7].

Los hongos producen una amplia diversidad de metabolitos secundarios, incluyendo terpenos, indol alcaloides y policétidos [8]. En algunos casos, los alcaloides confieren propiedades alucinógenas, las cuales pueden causar ilusiones visuales y auditivas durante varias horas [9]. El género *Psilocybe*, perteneciente al filo Basidiomycota [10], agrupa hongos alucinógenos, utilizados ampliamente por sus características psicotrópicas [11]. En México se han descrito 57 especies de *Psilocybe* con estas cualidades, originalmente utilizadas para rituales en distintas culturas alrededor del mundo [12].

Psilocybe cubensis es una de las especies más comunes de hongos “psicodélicos” [13]. Los principales componentes activos de esta especie son la psilocibina y su derivado desfosforilado, la psilocina [12]. Recientemente, se ha determinado que dichos compuestos tienen potencial terapéutico en el tratamiento de diversas enfermedades neurológicas por sus propiedades neuropsico-farmacológicas [14]. Además, al igual que otros hongos, también producen compuestos con propiedades antibacterianas, antivirales, antiparasitarias, antitumorales, antioxidantes, antidiabéticas, cardiovasculares, hepatoprotectoras e inmunomoduladoras [15].

El objetivo de este artículo es sintetizar la información más reciente sobre *Psilocybe cubensis* y sus metabolitos secundarios, psilocibina y la psilocina, así como sus efectos, contradicciones, mercado y potencial neuropsico-farmacéutico. Para ello, se realizaron búsquedas de artículos científicos publicados en los últimos cinco años en Google Scholar y Pubmed.

***P. cubensis* a través de la historia**

La utilización de *P. cubensis* se puede rastrear a principios de los años 1500 en Mesoamérica [12]. Sin embargo, se cree que su consumo se extiende hasta hace aproximadamente 3000 años [16]. Las investigaciones con estos hongos iniciaron en la década de 1950, gracias a expediciones realizadas por R. Gordon Wasson [17]. Posteriormente, en 1957, múltiples especies del género *Psilocybe* fueron clasificadas sistemáticamente por Roger Heim [17]. La psilocibina y la psilocina fueron aisladas e identificadas por primera vez en 1958 y sintetizadas en 1959 [18].

Actualmente, el uso de *Psilocybe spp.* continúa en grupos autóctonos de la región mesoamericana como parte de ceremonias sagradas y para tratar enfermedades como ansiedad, reumatismo, dolor de muelas y estómago [12]. Los usuarios le atribuyen experiencias subjetivas y encuentros sobrenaturales, que han impactado positivamente su vida [17].

Descripción del hongo *Psilocybe cubensis*

Perteneciente a la familia Strophariaceae, *P. cubensis* es un hongo nativo de Mesoamérica, el cual se caracteriza por su naturaleza estercolera, coprofilica y gregaria, pues sus esporas germinan en el estiércol de mamíferos rumiantes durante los meses de mayo y junio, específicamente en la región centroamericana [19]. La mayoría de las especies de *Psilocybe* son hongos pequeños, de tallo delgado, largo y fibroso, los cuales presentan basidiosporas de color café oscuro en un sombrerillo convexo [12], [20]. *P. cubensis* presenta un anillo senescente y hematomas azules en el estipe, el píleo y el micelio (Figura 1), y se encuentran en una diversidad de sustratos, incluidos estiércol de herbívoros, pastos, raíces, madera y suelo [20].

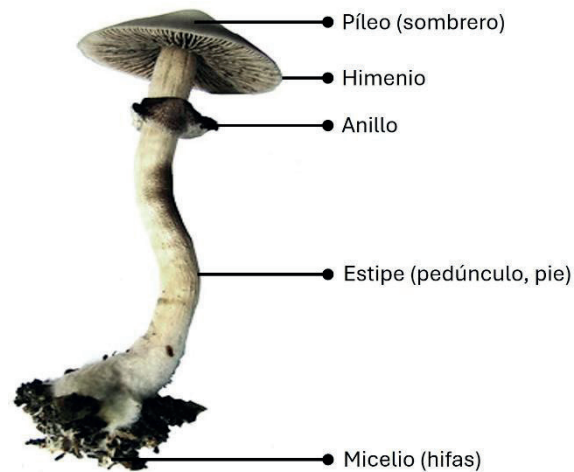


Figura 1. Morfología macroscópica de *P. cubensis*. Modificado de [21].

En extractos de *Psilocybe* se han encontrado alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas y carbohidratos [11]. Se han reportado distintas concentraciones por órgano de los alcaloides psilocina y psilocibina, entre las cuales se ha determinado que la concentración de psilocina es de 0.17% - 0.78% en el sombrerillo y 0.09% - 0.30% en el tallo [22]; mientras que de psilocibina se han reportado concentraciones de 0.44% - 1.35% en el sombrerillo y 0.05% - 1.27% en el tallo [22].

Descripción de la psilocibina

La psilocibina (Figura 2), 3-[2-(dimetilamino)etil]-1H-indol-4-ol dihidrógeno fosfato o 4-fosforiloxi-N,N-dimetiltriptamina ($C_{12}H_{17}N_2O_4P$), es un alucinógeno serotoninérgico y dopaminérgico, termolábil, fotosensible e hidrosoluble, perteneciente al grupo de las triptaminas [14], [15], [17]. La psilocibina es un compuesto derivado de la ruta del shikimato y, por ende, de la ruta de las pentosas fosfato, siendo el triptófano su principal precursor [12] [21].

En la biosíntesis de la psilocibina, el triptófano es descarboxilado a triptamina por acción de la enzima triptófano descarboxilasa (*PsiD*), compuesto que es hidroxilado por la psilocibina hidroxilasa (*PsiH*) para formar 4-hidroxitriptamina [12], [21]. Posteriormente, la 4-hidroxitriptamina sufre una fosforilación mediada por la psilocibina fosfotransferasa (*PsiK*), dando origen a la norbaeocistina, la cual, mediante una metilación por parte de la psilocibina *N*-metiltransferasa (*PsiM*), da origen a la baeocistina [12], [21]. Finalmente, la baeocistina es metilada por *PsiM*, obteniendo psilocibina como producto de dicha reacción [12], [21], [23].

Debido a su síntesis a partir de triptamina, la psilocibina comparte similitudes estructurales con neurotransmisores endógenos como la serotonina [24]. Sin embargo, es importante destacar que la psilocibina es rápidamente desfosforilada por una fosfatasa alcalina o esterases no específicas, produciendo psilocina [25], [26].

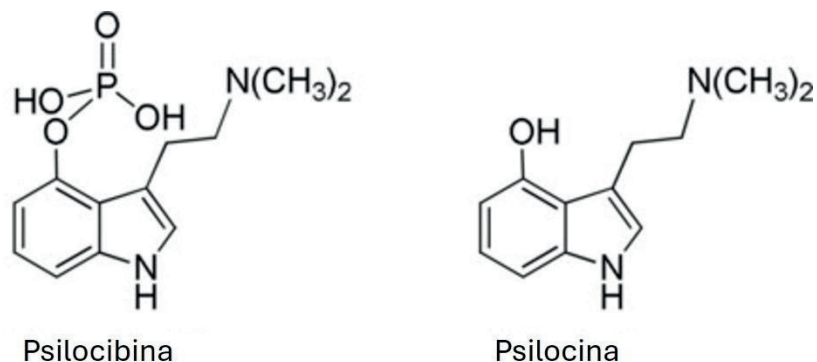


Figura 2. Estructura química de la psilocibina (izquierda) y la psilocina (derecha). *Modificado de [21].*

Descripción de la psilocina

La psilocina o 3-[2-(dimetilamino)etil]-1H-indol-4-ol, es una molécula que corresponde a la forma activa de la psilocibina [27]. Ambas moléculas pueden existir en equilibrio bioquímico a nivel metabólico en los hongos del género *Psilocybe* gracias a la enzima *PsiK* [27]. La psilocina presenta una hidrosolubilidad menor que la de la psilocibina; sin embargo, presenta una mayor liposolubilidad que su precursor [28]. Al igual que la psilocibina, la psilocina es un análogo estructural de la serotonina, razón por la cual, la psilocina es capaz de unirse a 15 receptores relacionados a la serotonina [26].

Mecanismo fisiológico de la psilocibina y psilocina

Posterior a ser ingerida, la psilocibina es rápidamente desfosforilada en las condiciones ácidas del estómago; o bien, por la acción de fosfatasa alcalinas y otras esterasas en la mucosa intestinal y el hígado, previo a ingresar al sistema circulatorio en forma de psilocina [29], [30]. Este último compuesto se caracteriza por poseer una mayor actividad metabólica y psicoactiva que su precursor [29], [30]. Además, su hidrosolubilidad facilita su paso a través de la barrera hematoencefálica [31].

De acuerdo con Dodd *et al.* [32], la concentración máxima de psilocina en sangre se alcanza 2-3 horas después de la ingesta. Sus efectos pueden durar entre 4 y 6 horas [31]. Metabólicamente, la psilocina es degradada en el hígado por acción de la monoamina oxidasa; o bien, de la aldehído deshidrogenasa [30]. Finalmente, los metabolitos producto de la degradación de la psilocina son eliminados vía urinaria, siendo el principal de estos, la psilocina-*O*-glucuronida [31]. Por otra parte, entre el 2% y el 4% de la psilocina es excretada sin haber sufrido ninguna modificación [31].

En el cerebro, la psilocina presenta una fuerte afinidad hacia los receptores de la familia 5-HT; especialmente, los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A} y 5-HT_{2B} [30], [32]. Producto de dicha interacción, se desencadena una cascada metabólica que finaliza con la movilización del calcio intracelular y la despolarización de la membrana de las neuronas [30], [33]. La despolarización de las neuronas incrementa la liberación de glutamato al medio extracelular [30]. Esta última molécula es considerada el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central (SNC) y posee un rol fundamental en diversas funciones cerebrales como la modulación de la plasticidad sináptica [34].

La activación de los receptores 5-HT_{2A} en la corteza prefrontal del cerebro genera cambios en las conexiones neuronales y en el flujo sanguíneo en regiones como el lóbulo parietal inferior, el hipocampo y la amígdala [30]. Estos cambios generan modificaciones en procesos como la cognición, el procesamiento de emociones y la percepción sensorial [30]. Adicionalmente, existe evidencia de cómo la activación de estos receptores puede influenciar la expresión y modulación de genes, lo cual podría causar cambios neuronales beneficiosos para las personas afectadas por un padecimiento mental [35].

Uso de la psilocibina y psilocina con fines terapéuticos

Los trastornos de la salud mental y la adicción al consumo de drogas representan una carga global importante [36]. Para el año 2020, se estimó que cerca de mil millones de personas podrían estar afectadas por alguna enfermedad mental [14]. Específicamente, la ansiedad se posicionó como la enfermedad más común, afectando a 284 millones de personas a nivel mundial en 2018; seguida de la depresión, la cual afectó a 264 millones de personas; mientras que, el consumo de alcohol y otras drogas perjudicó a cerca de 200 millones de personas [14]. Después de décadas de investigación, se ha demostrado la utilidad de la psilocibina como un tratamiento potencial para el manejo de múltiples trastornos de la salud mental por su capacidad para inducir cambios en la conectividad funcional [37], [38]. Se han demostrado efectos beneficiosos contra la depresión, la ansiedad, el consumo de drogas, el trastorno obsesivo compulsivo, el trastorno de estrés postraumático, el desorden bipolar, la fobia social y los trastornos dismórficos corporales [14], [37], [38], [39].

La terapia asistida por psilocibina para la depresión posee la evidencia clínica más sólida hasta el momento [40]. La depresión suele ser una enfermedad crónica y recurrente que perjudica en gran medida la calidad de vida de los pacientes y de las personas a su alrededor; además, se relaciona con cierta discapacidad funcional [41]. Los principales tratamientos actuales se enfocan en el apoyo de un profesional de la salud en conjunto con el uso de fármacos; específicamente, se acostumbra utilizar los antidepresivos de segunda generación, tales como los inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (ISRS) o de serotonina y norepinefrina (IRSN) [41]. No obstante, estos antidepresivos suelen tener efectos secundarios como el aumento de peso y disfunción sexual; además, gran parte de los pacientes no responde apropiadamente a este tipo de terapias y, si lo llegase a hacer, la reincidencia es bastante común [41].

Se han reportado ensayos con personas con depresión resistentes a los tratamientos convencionales y se descubrió que una dosis activa de psilocibina (25 mg) mostró una mayor capacidad de respuesta de la amígdala, mostrando gran eficacia en comparación con métodos antes probados [42]. Por su parte, los tratamientos antidepresivos típicos, como los ISRS, pueden tardar de semanas a meses en surtir efecto [42]. Un ejemplo de este efecto se encuentra en estudios mencionados por Nichols [17], los cuales tratan pacientes con depresión y ansiedad relacionada al cáncer; en los cuales se demostró que la psilocibina redujo en gran medida la desmoralización y desesperanza, al mismo tiempo que mejoró el bienestar espiritual y la calidad de vida. Tras seis meses de seguimiento a los pacientes tratados, entre el 60 y 80% mantuvieron reducciones significativas de su depresión y ansiedad.

Haijen *et al.* [43] llevaron a cabo una revisión donde se demuestran efectos beneficiosos de la psilocibina en comparación con los tratamientos convencionales para el tratamiento del trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH). Por otra parte, Bogadi & Kaštelan [37] describieron el caso de un adolescente de 16 años diagnosticado con fobia social, el cual

presentó problemas de aprendizaje, falta de motivación y aislamiento. Posterior al consumo de psilocibina, presentó mejoras en su comportamiento, pues tuvo mayor facilidad para expresar sus emociones y para participar en actividades grupales.

En cuanto a la dependencia del consumo de sustancias, se han realizado estudios acerca de la adicción al tabaco y al alcohol y cómo la psilocibina ayuda a tratarla. Por ejemplo, Bogenschutz *et al.* [44], llevaron a cabo un estudio en el que administraron psilocibina (25-30 mg/70 kg) a pacientes con un diagnóstico de dependencia al alcohol. Este tratamiento, en conjunto con sesiones de psicoterapia, permitió observar una considerable y sostenida disminución en el consumo de alcohol sin efectos adversos severos. Por otra parte, Santos & Marques [45] mencionan dos estudios clínicos en los que se evaluó la eficacia de la psilocibina para tratar la adicción al tabaco en pacientes con un consumo mínimo de 10 cigarrillos diarios. Después de administrar una dosis moderada del psicodélico, estos autores observaron abstinencia en el 80% de los participantes después de tres meses del consumo de la última dosis de psilocibina y en el 67% luego de 9 meses.

Es importante destacar que la psilocibina no sólo resulta útil para tratar enfermedades mentales, sino que también puede utilizarse para la psicología positiva, la cual puede ser una de las aplicaciones más beneficiosas del compuesto [46]. El enfoque actual consiste en aplicar terapias psicoterapéuticas únicamente cuando se sufre de un trastorno mental; sin embargo, la psilocibina también podría funcionar como una terapia preventiva para disminuir la probabilidad de que las personas con una salud mental estable desarrollen alguno de los trastornos mentales mencionados con anterioridad [46]. Algunos autores describen que el uso de este alucinógeno se encuentra asociado a una menor probabilidad de ser partícipe de diversas conductas delictivas, un mayor aprecio y respeto por la naturaleza, y una baja en la simpatía por comportamientos políticos autoritarios [47], [48].

Contraindicaciones

Los hongos que acumulan psilocibina han demostrado aumentar el ritmo cardiaco y la presión sanguínea; por ende, aumentan el riesgo de sufrir lesiones o enfermedades cardiovasculares, tales como infartos [21], [49]. Generalmente, los hongos alucinógenos no son considerados tóxicos; no obstante, las intoxicaciones fatales debido a la exposición a este tipo de hongos son extrañas y suelen darse por combinarlos con otras drogas [50]. De acuerdo con Sottile *et al.* [33], la dosis letal media de psilocibina en humanos corresponde a 22.1 g/kg para un adulto de 77.5 kg.

Regularmente, la dosis de consumo recreativo varía entre 0.1% y 0.2% del peso seco [17]. Los efectos psicológicos perceptibles de la psilocina han sido correlacionados con rápidos aumentos de los niveles de plasma entre 4 ng/mL y 6 ng/mL [14]. Por otro lado, se estima que la biodisponibilidad del compuesto es de 52.7%, después de una ingesta de 10-20 ng/mL [14].

Otros síntomas principales causados por la ingesta de estos hongos incluyen distorsión perceptual (incluyendo alucinaciones visuales), náusea, vómito, dolor de cabeza, escalofríos, somnolencia, euforia, ansiedad, agitación, midriasis y enrojecimiento; estos síntomas suelen presentarse entre 20 y 60 minutos después de la ingesta y se disipan aproximadamente entre 4 y 6 horas después [12], [46]. Las intoxicaciones por hongos alucinógenos también conllevan otros riesgos un poco más severos tales como enfermedades gastrointestinales como la gastroenteritis, eritromelalgia, rabiomielolisis, fibrosis intestinal, hipertensión, hiperreflexia, insuficiencia hepática, convulsiones, bradicardia y taquicardia [14], [46]. Cabe destacar que no es recomendable la ingesta de psilocibina ni psicodélicos similares si dicho individuo tiene historial personal o familiar de trastornos psicóticos o psiquiátricos severos [51].

Mercado

La eficacia de la psilocibina para el tratamiento de diversas enfermedades mentales ha despertado el interés científico y comercial en este compuesto; sin embargo, no es un compuesto que se encuentre disponible en el mercado [52]. El estudio de Kargbo [53] resalta el interés que la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés) han tenido en la psilocibina, describiendo este compuesto para el tratamiento de estrés postraumático, desórdenes mentales y adicción.

Se estima que el mercado de las drogas psicodélicas alcanzará los \$10.000 millones en 2027 [54], y se proyecta que la integración de un nuevo narcótico de este tipo al mercado norteamericano podría requerir una inversión de 3 billones de dólares; sin embargo, su valor económico podría superar en gran medida dicha cifra [53]. Del mismo modo, este tipo de compuesto podría ser incluido en el mercado con relativa facilidad debido a que es producido naturalmente, se necesita una dosis muy baja, no es adictivo, y puede servir para tratamientos de por vida [53].

En los últimos 20 años, se han registrado más de 130 ensayos clínicos con psilocibina en ClinicalTrials.gov, no obstante, ninguno de ellos ha sido clasificado como Fase 4, debido a la falta de aprobación de la FDA [55]. Además, actualmente, existen 24 patentes registradas de psilocibina para estudios farmacológicos y ensayos clínicos; sin embargo, estos productos no han llegado a ser formulados ni incorporados al mercado para su comercialización, debido a la situación legal y dilemas éticos asociados a este alucinógeno [56].

Conclusiones

El hongo *Psilocybe cubensis*, originario de Mesoamérica, ha sido históricamente utilizado en rituales culturales y ha captado el interés científico debido a sus potenciales beneficios terapéuticos. La psilocibina y la psilocina han demostrado tener efectos prometedores en el tratamiento de enfermedades como la depresión, la ansiedad, el trastorno obsesivo-compulsivo, y el estrés postraumático. A pesar de estos hallazgos positivos, el consumo de estos hongos puede causar efectos secundarios como náuseas, vómitos y aumentos en la presión sanguínea, y su comercialización está restringida por limitaciones legales.

En Costa Rica, en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica se cuenta con experiencia en investigaciones con hongos de interés biotecnológico con aplicaciones a nivel industrial, biomédico y ambiental; el desarrollo en el futuro de investigaciones en sustancias psicoactivas de origen fúngico sería de gran valor para revelar el gran potencial biomédico de estos compuestos en el país.

Referencias

- [1] Y. Wang *et al.*, "Divergent evolution of early terrestrial fungi reveals the evolution of *Mucormycosis* pathogenicity factors", *Genome Biology and Evolution*, vol. 15, no. 4, pp. 1-19, 2023. <https://doi.org/10.1093/gbe/evad046>
- [2] G. Ángeles de Paz, U. Conejo Saucedo, R. León Morcillo, E. Aranda, "World of fungi and fungal ecosystems", en *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, M. J. Taherzadeh, J. A. Ferreira, A. Pandey, Eds. Amsterdam: Elsevier, 2023, pp. 1-29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91872-5.00010-7>
- [3] A. L. Rúa-Giraldo, "Taxonomía de los hongos: Un rompecabezas al que le faltan muchas piezas", *Biomédica*, vol. 43, no. 1, pp. 288-311, 2023. <https://doi.org/10.7705/biomedica.7052>
- [4] P. J. Strong *et al.*, "Filamentous fungi for future functional food and feed", *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 76, no. 102729, pp. 1-10, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102729>



- [5] S. R. Prabhu, "Infectious and communicable diseases: An overview", en *Textbook of General Pathology for Dental Students*, S. R. Prabhu, Ed. Cham: Springer, 2023, pp. 63-72. https://doi.org/10.1007/978-3-031-31244-1_9
- [6] M. Bahram, T. Netherway, "Fungi as mediators linking organisms and ecosystems", *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 46, no. 2, pp. 1-16, 2022. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab058>
- [7] P. Peiris, S. Upamali, Y. Li, P. Brown, C. Xu, "Fungal biocontrol against *Meloidogyne* spp. in agricultural crops: A systematic review and meta-analysis", *Biological Control*, vol. 144, no. 104235, pp. 1-11, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104235>
- [8] A. Shankar, K. K. Sharma, "Fungal secondary metabolites in food and pharmaceuticals in the era of multiomics", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 106, no. 9-10, pp. 3465-3488, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11945-8>
- [9] J. G. Zorilla, A. Evidente, "Structures and biological activities of alkaloids produced by mushrooms, a fungal subgroup", *Biomolecules*, vol. 12, no. 8, pp. 1-25, 2022. <https://doi.org/10.3390/biom12081025>
- [10] M. Gressler, N. A. Löhr, T. Schäfer, S. Lawrinowitz, P. S. Seibold, D. Hoffmeister, "Mind the mushroom: Natural product biosynthetic genes and enzymes of Basidiomycota", *Natural Product Reports*, vol. 38, no. 4, pp. 702-722, 2021. <https://doi.org/10.1039/d0np00077a>
- [11] D. Dhanasekaran *et al.*, "Taxonomic identification and bioactive compounds characterization of *Psilocybe cubensis* DPT1 to probe its antibacterial and mosquito larvicidal competency", *Microbial Pathogenesis*, vol. 143, no. 104138, pp. 1-10, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104138>
- [12] R. C. Van Court *et al.*, "Diversity, biology, and history of psilocybin-containing fungi: Suggestions for research and technological development", *Fungal Biology*, vol. 126, no. 4, pp. 308-319, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2022.01.003>
- [13] D. Strauss, S. Ghosh, Z. Murray, M. Gryzenhout, "Psilocybin containing mushrooms: A rapidly developing biotechnology industry in the psychiatry, biomedical and nutraceutical fields", *3 Biotech*, vol. 12, no. 339, pp. 1-15, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03355-4>
- [14] H. Lowe *et al.*, "The therapeutic potential of psilocybin", *Molecules*, vol. 26, no. 2948, pp. 1-33, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26102948>
- [15] K. Gotvaldová, K. Hájková, J. Borovičková, R. Juroka, P. Cihlářová, M. Kuchař, "Stability of psilocybin and its four analogs in the biomass of the psychotropic mushroom *Psilocybe cubensis*", *Drug Testing and Analysis*, vol. 13, no. 2, pp. 439-446, 2020. <https://doi.org/10.1002/dta.2950>
- [16] T. J. Wolff, "Historical approaches on DMT" en *The Touristic Use of Ayahuasca in Peru: Expectations, Experiences, Meanings and Subjective Effects*, T. J. Wolff, Ed. Wiesbaden: Springer VS, 2020, pp. 29-38. https://doi.org/10.1007/978-3-658-29373-4_6
- [17] D. E. Nichols, "Psilocybin: From ancient magic to modern medicine", *The Journal of Antibiotics*, vol. 73, pp. 679-686, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0311-8>
- [18] R. Serreau, A. Amirouche, A. Benyamina, S. Berteina-Raboin, "A review of synthetic access to therapeutic compounds extracted from *Psilocybe*", *Pharmaceuticals*, vol. 16, no. 1, pp. 1-18, 2023. <https://doi.org/10.3390/ph16010040>
- [19] J. Guerrero-Paredes, J. Pineda, D. A. Barrigas, C. A. Pineda, "Producción del hongo (*Psilocybe cubensis*): Una revisión", *Revista Biorrefinería*, vol. 4, no. 4, pp. 1-6, 2021. ISSN: 2602-8530.
- [20] L. F. Arce-Torres, I. Gómez-Díaz, M. Monge-Artavia, J. Prado-Cordero, "Metabolitos secundarios con actividad medicinal extraídos de hongos provenientes de Centroamérica", *Tecnología en Marcha*, vol. 33, no. 3, pp. 80-89, 2020. <https://doi.org/10.18845/tm.v33i3.4416>
- [21] C. Lenz *et al.*, "Injury triggered blueing reactions of *Psilocybe* "magic" mushrooms", *Angewandte Chemie*, vol. 132, no. 4, pp. 1466-1470, 2020. <https://doi.org/10.1002/anie.201910175>
- [22] R. Goff *et al.*, "Determination of psilocybin and psilocin content in multiple *Psilocybe cubensis* mushroom strains using liquid chromatography–tandem mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, vol. 1288, no. 342161, pp. 1-9, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.342161>
- [23] S. Dörner *et al.*, "Genetic survey of *Psilocybe* natural products", *ChemBioChem*, vol. 23, no. 14, pp. 1-8, 2022. <https://doi.org/10.1002/cbic.202200249>
- [24] X. Du, "Pharmacology and therapeutic effects of psilocybin", *Highlights in Science, Engineering and Technology*, vol. 65, pp. 134-139, 2023. <https://doi.org/10.54097/hset.v65i.11331>

- [25] A. Sarparast, K. Thomas, B. Malcolm, C. S. Stauffer, "Drug-drug interactions between psychiatric medications and MDMA or psilocybin: A systematic review", *Psychopharmacology*, vol. 239, no. 6, pp. 1945-1976, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00213-022-06083-y>
- [26] N. Milne, P. Thomsen, N. Mølgaard, P. Rubaszka, M. Kristensen, I. Borodina, "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the *de novo* production of psilocybin and related tryptamine derivatives", *Metabolic Engineering*, vol. 60, pp. 25-36, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.12.007>
- [27] M. K. Madsen *et al.*, "Psychedelic effects of psilocybin correlate with serotonin 2A receptor occupancy and plasma psilocin levels", *Neuropsychopharmacology*, vol. 44, pp. 1328-1334, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0324-9>
- [28] M. Coppola, F. Bevione, R. Mondola, "Psilocybin for treating psychiatric disorders: A psychonaut legend or a promising therapeutic perspective?", *Journal of Xenobiotics*, vol. 12, no. 1, pp. 41-52, 2022. <https://doi.org/10.3390/jox12010004>
- [29] E. Dahmane, P. R. Hutson, J. V. Gobburu, "Exposure-response analysis to assess the concentration-QTc relationship of psilocybin/psilocin", *Clinical Pharmacology in Drug Development*, vol. 10, no. 1, pp. 78-85, 2021. <https://doi.org/10.1002/cpdd.796>
- [30] A. Wojtas, K. Golembiowska, "Molecular and medical aspects of psychedelics", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 25, no. 1, pp. 1-21, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25010241>
- [31] Y. Carvajal, "Productos y hongos que contienen psilocibina y psilocina", *Cuaderno Médico Sociales*, vol. 63, no. 4, pp. 57-65, 2023. <https://doi.org/10.56116/cms.v63.n4.2023.1765>
- [32] S. Dodd *et al.*, "Psilocybin in neuropsychiatry: A review of its pharmacology, safety, and efficacy", *CNS Spectrums*, vol. 28, no. 4, pp. 416-426, 2023. <https://doi.org/10.1017/s1092852922000888>
- [33] R. Sottile, H. Singh, A. Weisman, T. Vida, "Unraveling the mysteries of mental illness with psilocybin", *Cureus*, vol. 14, no. 5, pp. 1-13, 2022. <https://doi.org/10.7759/cureus.25414>
- [34] K. Dommaneg, W. H. Sommer, M. W. Meinhardt, "Psychedelic targeting of metabotropic glutamate receptor 2 and its implications for the treatment of alcoholism", *Cells*, vol. 12, no. 6, pp. 1-20, 2023. <https://doi.org/10.3390/cells12060963>
- [35] B. Yu, D. M. Battaglia, T. P. Foster, C. D. Nichols, "Serotonin 5-HT_{2A} receptor activity mediates adipocyte differentiation through control of adipogenic gene expression", *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, pp. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98970-1>
- [36] M. Moeti, G. F. Gao, H. Herrman, "Global pandemic perspectives: Public health, mental health, and lessons for the future", *The Lancet*, vol. 400, no. 10353, pp. e3-e7, 2022. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01328-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01328-9)
- [37] M. Bogadi, S. Kaštelan, "A potential effect of psilocybin on anxiety in neurotic personality structures in adolescents", *Croatian Medical Journal*, vol. 62, no. 5, pp. 528-530, 2021. <https://doi.org/10.3325/cmj.2021.62.528>
- [38] C. S. Peritore, "The promise of psychedelic research", *Future Drug Discovery*, vol. 4, no. 1, pp. 1-16, 2022. <https://doi.org/10.4155/fdd-2021-0012>
- [39] R. Zeiss, M. Gahr, H. Graf, "Rediscovering psilocybin as an antidepressive treatment strategy", *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 985, pp. 1-14, 2021. <https://doi.org/10.3390/ph14100985>
- [40] S. Ling *et al.*, "Molecular mechanisms of psilocybin and implications for the treatment of depression", *CNS Drugs*, vol. 36, no. 1, pp. 17-30, 2022. <https://doi.org/10.1007/s40263-021-00877-y>
- [41] G. A. Higgins *et al.*, "Low doses of psilocybin and ketamine enhance motivation and attention in poor performing rats: Evidence for an antidepressant property", *Frontiers in Pharmacology*, vol. 12, no. 640241, pp. 1-19, 2021. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.640241>
- [42] L. J. Mertens, M. B. Wall, L. Roseman, L. Demetriou, D. J. Nutt, R. L. Carhart-Harris, "Therapeutic mechanisms of psilocybin: Changes in amygdala and prefrontal functional connectivity during emotional processing after psilocybin for treatment-resistant depression", *Journal of Psychopharmacology*, vol. 34, no. 2, pp. 167-180, 2020. <https://doi.org/10.1177/0269881119895520>
- [43] E. C. Haijen, P. P. Hurks, K. P., "Microdosing with psychedelics to self-medicate for ADHD symptoms in adults: A prospective naturalistic study", *Neuroscience Applied*, vol. 1, no. 101012, pp. 1-9, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.nsa.2022.101012>
- [44] M. P. Bogenschutz *et al.*, "Percentage of heavy drinking days following psilocybin-assisted psychotherapy vs placebo in the treatment of adult patients with alcohol use disorder: A randomized clinical trial", *JAMA Psychiatry*, vol. 79, no. 10, pp. 953-962, 2022. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2022.2096>
- [45] H. C. Santos, J. G. Marques, "What is the clinical evidence on psilocybin for the treatment of psychiatric disorders?", *Porto Biomedical Journal*, vol. 6, no. 1, pp. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1097/j.pbj.0000000000000128>



- [46] D. E. W. McCulloch, M. Z. Grzywacz, M. K. Madsen, P. M. Fisher, D. S. Stenbæk, "Psilocybin-induced mystical-type experiences are related to persisting positive effects: A quantitative and qualitative report", *Frontiers in Pharmacology*, vol. 13, no. 841648, pp. 1-17, 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.841648>
- [47] G. M. Jones, M. K. Nock, "Psilocybin use is associated with lowered odds of crime arrests in US adults: A replication and extension", *Journal of Psychopharmacology*, vol. 36, no. 1, pp. 66-73, 2022. <https://doi.org/10.1177/02698811211058933>
- [48] K. Paterniti, S. Bright, E. Gringart, "The relationship between psychedelic use, mystical experiences, and pro-environmental behaviors", *Journal of Humanistic Psychology*, vol. 0, no. 0, pp. 1-29, 2022. <https://doi.org/10.1177/00221678221111024>
- [49] S. M. Nkadimeng, C. M. L. Steinmann, J. N. Eloff, "Effects and safety of *Psilocybe cubensis* and *Panaeolus cyanescens* magic mushroom extracts on endothelin-1-induced hypertrophy and cell injury in cardiomyocytes", *Science Reports*, vol. 10, no. 22314, pp. 1-11, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79328-5>
- [50] A. K. Schlag, J. Aday, I. Salam, J. C. Neill, D. J. Nutt, "Adverse effects of psychedelics: From anecdotes and misinformation to systematic science", *Journal of Psychopharmacology*, vol. 36, no. 3, pp. 258-272, 2022. <https://doi.org/10.1177/02698811211069100>
- [51] K. Corrigan *et al.*, " Psychedelic perceptions: Mental health service user attitudes to psilocybin therapy", *Irish Journal of Medical Science*, vol. 191, no. 3, pp. 1385-1397, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11845-021-02668-2>
- [52] D. Fradkin, "Psilocybin: A brief overview for psychiatric mental health nurse practitioners", *Perspectives in Psychiatric Care*, vol. 58, no. 3, pp. 1200-1203, 2021. <https://doi.org/10.1111/ppc.12888>
- [53] R. B. Kargbo, "Psilocybin therapeutic research: The present and future paradigm", *ACS Medicinal Chemistry Letters*, vol. 11, no. 4, pp. 399-402, 2020. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00048>
- [54] A. Ali, M. E. Gifford, H. Lowe, L. Gordon, J. Grant, "Natural vs. synthetic psilocybin: The same or completely different?", en *Mushrooms with Therapeutic Potentials*, D.C. Agrawal, M. Dhanasekaran, Eds. Singapore: Springer, 2023, pp. 479-492. https://doi.org/10.1007/978-981-19-9550-7_18
- [55] S. A. Norring, M. G. Spigarelli, "The promise of therapeutic psilocybin: an evaluation of the 134 clinical trials, 54 potential indications, and 0 marketing approvals on ClinicalTrials.gov", *Drug Design, Development and Therapy*, vol. 18, pp. 1143-1151, 2024. <https://doi.org/10.2147/dddt.s443177>
- [56] K. Gerber, I. G. Flores, A. C. Ruiz, I. Ali, N. L. Ginsberg, E. E. Schenberg, "Ethical concerns about psilocybin intellectual property", *ACS Pharmacology & Translational Science*, vol. 4, no. 2, pp. 573-577, 2021. <https://doi.org/10.1021/acspsci.0c00171>

Inducción de mutaciones y biotecnología vegetal para la producción de cultivos resistentes a condiciones de estrés y con mayor rendimiento


Induction of mutations and plant biotechnology to produce stress-resistant crops with higher yields

Frank Carlos Barrientos-Alfaro¹, Jason Pérez²,
Alejandro Hernández-Soto³

Barrientos-Alfaro, F.C; Pérez, J; Hernández-Soto, A. Inducción de mutaciones y biotecnología vegetal para la producción de cultivos resistentes a condiciones de estrés y con mayor rendimiento. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 143-157.


 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7619>

1 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 frankca37@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0001-8961-4110>

2 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 jasperez@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0002-8267-4978>

3 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 alhernandez@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0001-9435-5117>



Palabras clave

Producción agrícola; genética agrícola; desarrollo sostenible; mutación; energía atómica.

Resumen

Las mutaciones y la variabilidad genética causada por estas desempeñan un rol fundamental en el mejoramiento genético de las plantas. La inducción de mutaciones o mutagénesis representa una opción rápida y efectiva para el desarrollo de nuevas variedades que conservan los niveles óptimos de productividad en entornos desafiantes para la agricultura. La inducción de mutaciones puede ser llevada a cabo mediante el uso de agentes físicos, agentes químicos o herramientas de edición génica. El empleo conjunto de la mutagénesis con técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos permite establecer estrategias de selección eficientes y rentables. El presente artículo ofrece una breve recopilación sobre la inducción de mutaciones, las técnicas más empleadas para dicho fin y algunas mejoras obtenidas en diferentes cultivos, con relación al estrés biótico, al estrés abiótico y al rendimiento productivo. Finalmente, se examina el panorama histórico del mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones en Costa Rica; específicamente, en los cultivos de mayor relevancia económica y social para el país.

Keywords

Agricultural production; agricultural genetics; sustainable development; mutation; atomic energy.

Abstract

Mutations and the genetic variability caused by them play a fundamental role in the genetic improvement of plants. Mutation induction or mutagenesis represents a rapid and effective option for the development of new varieties that maintain optimal productivity levels in challenging agricultural environments. Mutation induction can be carried out using physical agents, chemical agents, or gene editing tools. The combined use of mutagenesis with *in vitro* tissue culture techniques allows for the establishment of efficient and cost-effective selection strategies. This article provides a brief overview of mutation induction, the most commonly used techniques for this purpose, and some improvements achieved in various crops in relation to biotic stress, abiotic stress, and productive yield. Finally, it examines the historical landscape of genetic improvement through mutation induction in Costa Rica, specifically in the crops of greatest economic and social relevance to the country.

Introducción

El mejoramiento de cultivos se basa en la variabilidad genética de las plantas [1]. Las mutaciones son la mayor fuente de esta variabilidad, que es posteriormente amplificada por recombinación genética de cromosomas homólogos durante la meiosis [2]. El término “mutación” fue acuñado a finales del siglo XIX por Hugo de Vries en referencia a cambios o “saltos” en características que llevan al desarrollo de variaciones y de nuevas especies, como resultado de redescubrir las leyes de la herencia mendeliana [3], [4]. El principio de la mutación se encuentra en producir cambios en el material genético [5].

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una biomolécula cuya estabilidad le permite almacenar la información genética en diferentes organismos [6], [7]. El ADN no sólo es fundamental en los procesos de herencia genética [6], sino que también está sujeto a lesiones producto de la división celular y de factores exógenos como la luz ultravioleta, radicales libres de oxígeno y exposición a radiaciones y químicos [8]. Si estas lesiones no son reparadas correctamente se

puede generar la aparición de mutaciones [8]. Las mutaciones son cambios en la secuencia de ADN de un organismo [9], que pueden darse en tres niveles distintos: molecular, cromosómico y genómico. Lo anterior corresponde a afectar genes, segmentos del cromosoma y el número de juegos cromosómicos, respectivamente [5]. Estas mutaciones pueden ser aprovechadas para la inducción de variabilidad genética en plantas y, por ende, en programas de mejoramiento vegetal [10].

La inducción artificial de mutaciones (mutagénesis) representa una opción rápida y efectiva para el desarrollo de programas de fitomejoramiento [11], [12]. Las técnicas de mutagénesis permiten obtener características de interés agronómico y económico en las plantas, tal como mejor rendimiento, mayor diversidad genética, y tolerancia a estrés biótico y abiótico [13]. La inducción de mutaciones puede realizarse, en condiciones *in vitro* o *in vivo*, mediante la exposición a agentes genotóxicos, la inserción de fragmentos de ADN, o el empleo de herramientas de edición génica [2].

Actualmente, la mayoría de las variedades mutantes de plantas que se utilizan en agricultura son producidas mediante la inducción de mutaciones por métodos físicos, particularmente por radiación gamma, cuya fuente es usualmente el cobalto radiactivo (^{60}Co) o Cesio (^{137}Cs) [14], [15]. La preferencia de este sistema para el mejoramiento por inducción de mutaciones se debe a su habilidad para penetrar el tejido y la simplicidad de la metodología de irradiación [16]. En contraste, el uso de mutágenos químicos requiere de incubaciones y exposiciones, con especial cuidado de los reactivos y desechos, y el control del efecto residual en los tejidos tratados [17], [18].

En Costa Rica, existen múltiples investigaciones relacionadas al empleo de la mutagénesis para el desarrollo de variedades con nuevas características. El Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), la Universidad de Costa Rica (UCR) y la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) encabezan dichas investigaciones [19], [20], [21], [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28]. Adicionalmente, en la base de datos de variedades mutantes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) se reporta que en Costa Rica se han desarrollado nuevas variedades de arroz (*Oryza sativa* L.), de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y de chícharos (*Vigna unguiculata* Walp.), mediante la inducción de mutaciones [29], [30], [31], [32].

Mutaciones

Las mutaciones son descritas como cambios estables en la secuencia de ADN de determinado locus en un organismo [9], [18]. Estas pueden ocurrir de forma simultánea durante la división celular; o bien, por la exposición a agentes externos como mutágenos o infecciones virales [5], [9]. Shelake *et al.* [16] señalan a las mutaciones como la base de la variabilidad genética y de la evolución y diferenciación entre organismos.

Las mutaciones pueden presentar sus efectos a nivel molecular de forma puntual, a nivel cromosómico, o a nivel genómico (Figura 1). Las mutaciones génicas o puntuales afectan la composición química de los genes o de las regiones intergénicas; específicamente, modificando una o pocas de las bases nitrogenadas que los conforman [5]. Las mutaciones puntuales incluyen las inserciones, las deleciones y las sustituciones [5], [16]. Por su parte, las mutaciones cromosómicas cambian la estructura de los cromosomas, pudiendo ocurrir duplicaciones, translocaciones, o la inversión de regiones completas del cromosoma, entre otras alteraciones, y aneuploidías ($2n \pm$ cromosoma) [5], [16]. Finalmente, las mutaciones genómicas conllevan a alteraciones en el número de juegos cromosómicos, produciendo poliploidías [5], [16].

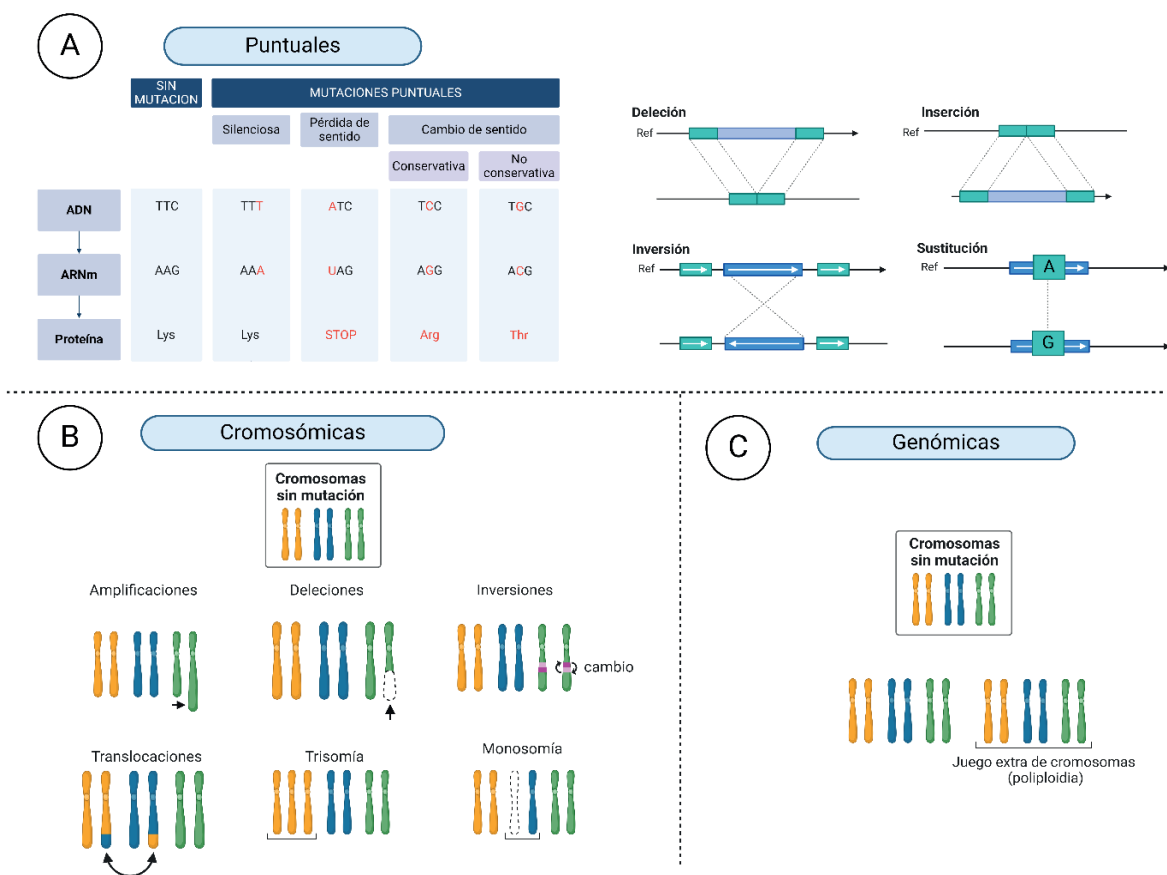


Figura 1. Representación gráfica de tipos de mutaciones: Puntuales (A), cromosómicas (B) y genómicas (C) (Elaborado en BioRender.com).

Las mutaciones desempeñan un papel clave en términos evolutivos debido a que permiten el desarrollo de características nuevas en los cultivos [18], [33]. A pesar de lo anterior, las mutaciones espontáneas son poco frecuentes en la naturaleza, por lo que la búsqueda de metodologías para acelerar dicho proceso es uno de los problemas clave en el desarrollo de nuevas variedades [33].

Mutagénesis

La mutagénesis consiste en la exposición de material biológico a agentes mutagénicos con el fin de incrementar, de forma artificial, la tasa de mutaciones respecto a la frecuencia de mutaciones espontáneas en condiciones naturales [34], [35]. De esta manera, la mutagénesis permite incrementar la variabilidad genética en plantas para obtener características de interés en la producción agrícola [36]. La eficiencia de la inducción de mutaciones depende de factores como el tipo de mutágeno, el explante vegetal, la duración de la exposición y la concentración utilizada [34].

Los agentes mutagénicos empleados pueden ser clasificados como agentes físicos, agentes químicos y herramientas de edición génica, tal como plantean Bhoi *et al.* [13]. La mutagénesis física emplea, mayoritariamente, radiaciones de carácter ionizante, por ejemplo, los rayos gamma y la radiación de neutrones rápidos [13], [35]. Dichas radiaciones producen gran cantidad de radicales libres que interactúan con el ADN, causando pérdidas de nucleótidos y

deleciones cromosómicas [13]. Asimismo, las radiaciones ionizantes pueden generar cambios en la estructura del ADN debido a la ionización directa o a la ruptura de enlaces [37]. En la mutagénesis química se emplean agentes mutágenos como azida de sodio, etilmetanosulfonato (EMS) y 1-metil-1-nitrosourea (MNU), entre muchos otros [13], [35]. Los mutágenos químicos inducen cambios en el ADN mediante procesos como la clastogénesis, la aneugénesis y el daño oxidativo [38]. Es importante señalar que la inducción de mutaciones mediante estos dos métodos no es posible dirigirla hacia determinado gen o región del material genético [13].

Las técnicas de edición génica utilizando herramientas moleculares tales como las nucleasas con dedos de zinc (ZFNs), las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALENs) y las secuencias de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés) asociadas a endonucleasas tipo Cas permiten inducir mutaciones en sitios y genes específicos (Figura 2) [13]. Estas herramientas emplean nucleasas dirigidas para generar cortes en un sitio específico en una o las dos hebras de la molécula de ADN [2], [13]. De acuerdo con Holme *et al.* [39] y Kashtwari *et al.* [34], el empleo de estos sistemas para la inducción de mutaciones resulta ser eficiente y preciso.

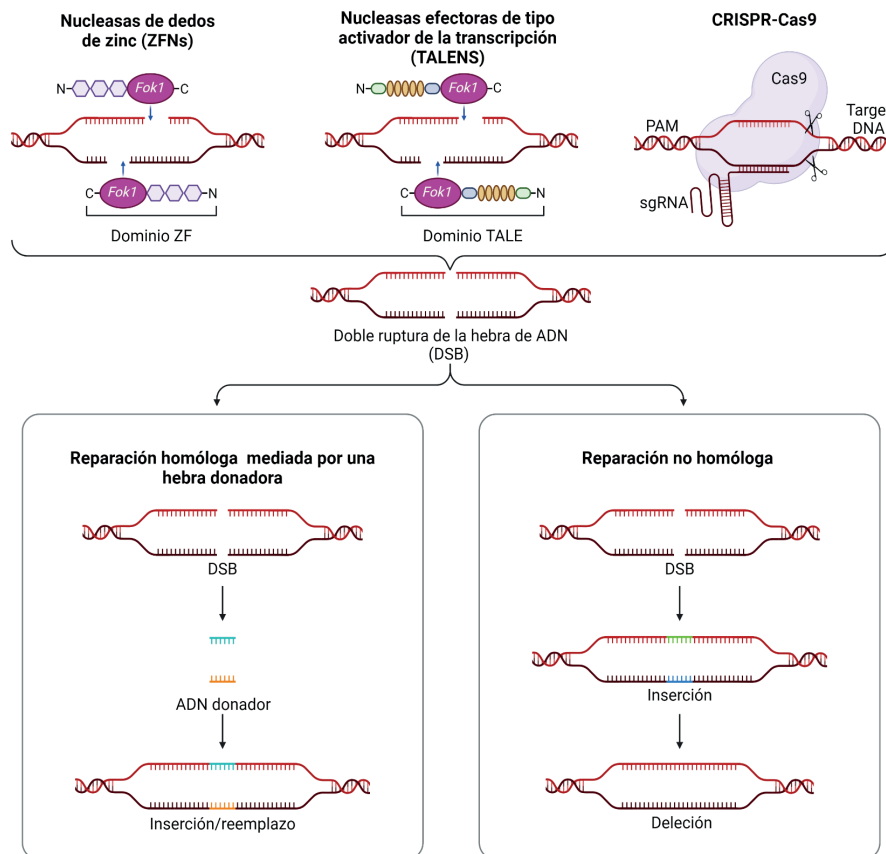


Figura 2. Representación de nucleasas más comunes usadas para la inducción de mutaciones dirigidas: nucleasas con dedos de zinc (ZNFs), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALENs) y CRISPR-Cas9. Nótese que la doble ruptura (DSB) de la hebra de ADN puede resultar en los mecanismos de reparación mediados por recombinación homóloga o no homóloga. En la primera se requiere de una hebra donadora y el resultado final es una inserción o reemplazo; mientras que, en la segunda el resultado final es mayoritariamente una inserción o una deleción (Elaborado en BioRender.com).

Aplicaciones de la mutagénesis utilizando cultivo de tejidos

El mejoramiento genético por inducción de mutaciones ha permitido la producción de miles de variedades de cultivos. La mutagénesis inducida ha sido utilizada para producir altos rendimientos, mayor calidad de cosechas, resistencia a plagas y enfermedades y tolerancia al estrés [40]. La inducción de las mutaciones debe apoyarse en estrategias de selección eficientes y rentables, para lo cual el cultivo de tejidos representa un apoyo vital a esta metodología de mejoramiento genético [41]. Esta técnica permite la identificación de las características de interés controlando las condiciones de cultivo, y manteniendo miles de individuos en un espacio reducido, condiciones controladas, independencia de condiciones climáticas que son requeridas y menor inversión de mano de obra; adicionalmente, los terrenos, insumos y mano de obra que se utilizarían en el mejoramiento, pueden liberarse para la producción de alimentos [41]. A continuación, se mencionan algunas aplicaciones de la inducción de mutaciones utilizando protocolos de cultivo de tejidos.

Producción de cultivos resistentes al estrés biótico

Los factores bióticos tienen influencia sobre el comportamiento de las plantas [13]. Múltiples organismos como insectos, bacterias, nemátodos, hongos y virus pueden impactar negativamente el rendimiento de los cultivos [13], [42], [43]. Mediante la inducción de mutaciones, las proteínas receptoras de moléculas que median la interacción planta-patógeno pueden ser modificadas con el fin de conferir resistencia o tolerancia a estos [44]. En la última década, se han desarrollado múltiples investigaciones para obtener plantas tolerantes o resistentes al estrés biótico, tales como las que se recopilan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Ejemplos de producción de cultivos resistentes al estrés biótico mediante inducción de mutaciones.

| Especie | Agente mutagénico utilizado | Tolerancia o resistencia inducida | Fuente |
|------------------------------|-----------------------------|---|--------|
| <i>Saccharum officinarum</i> | Radiación gamma | <i>Colletotrichum falcatum</i> | [45] |
| <i>Citrus x sinensis</i> | Etilmetanosulfonato | <i>Xanthomonas citri</i> | [46] |
| <i>Solanum melongena</i> | Etilmetanosulfonato | <i>Leucinodes orbonalis</i> | [47] |
| <i>Citrus x sinensis</i> | CRISPR/Cas | <i>Xanthomonas citri</i> | [48] |
| <i>Triticum aestivum</i> | CRISPR/Cas | <i>Blumeria graminis</i> | [49] |
| <i>Oryza sativa</i> | CRISPR/Cas | <i>Xanthomonas oryzae</i> | [50] |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | CRISPR/Cas | <i>Phelipanche aegyptiaca</i> y <i>Orobanche</i> spp. | [51] |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | CRISPR/Cas | <i>Oidium neolycopersici</i> | [52] |

Producción de cultivos resistentes al estrés abiótico

La producción mundial de alimentos ha enfrentado una serie de retos en los últimos años, dentro de los que destacan fenómenos antropogénicos como la contaminación y el cambio climático [33]. Consecuentemente, las lluvias excesivas, las temperaturas extremas, el agotamiento del suelo y de los recursos hídricos y otras situaciones han conducido a una reducción significativa en la producción agrícola [53], [54]. Investigadores como Raina *et al.* [53] y Rai *et al.* [55] señalan que dichos retos pueden enfrentarse mediante la obtención de nuevos alelos gracias al uso de técnicas biotecnológicas de fitomejoramiento como la mutagénesis. Las investigaciones realizadas en diversos cultivos con el objetivo de conferirles tolerancia o resistencia a factores causantes de estrés abiótico en las plantas han permitido generar variedades resistentes a salinidad, herbicidas y sequías (Cuadro 2).

Cuadro 2. Ejemplos de producción de cultivos resistentes al estrés abiótico mediante inducción de mutaciones.

| Especie | Agente mutagénico utilizado | Tolerancia o resistencia inducida | Fuente |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|--------|
| <i>Oryza sativa</i> cv. Nagina 22 | Etilmetanosulfonato | Salinidad | [56] |
| <i>Triticum aestevium</i> | Etilmetanosulfonato | Herbicida | [57] |
| <i>Triticum aestevium</i> | Etilmetanosulfonato | Salinidad | [58] |
| <i>Oryza sativa</i> | Radiación gamma | Salinidad y sequía | [25] |
| <i>Oryza sativa</i> | Radiación gamma | Herbicida | [27] |
| <i>Saccharum</i> sp. | Radiación gamma | Salinidad | [59] |
| <i>Saccharum officinarum</i> | Radiación gamma | Salinidad | [60] |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | CRISPR/Cas9 | Sequía | [61] |

Producción de cultivos con mayor rendimiento

Teshome *et al.* [62] señalan que la exposición de las plantas a agentes causantes de estrés biótico o abiótico puede reducir considerablemente el desempeño de estas. Animasaun y Oguntoyey [40] señalan la mutagénesis como una herramienta clave para el desarrollo de variedades con mayores rendimientos productivos. Diversos estudios han empleado diferentes agentes mutagénicos para incrementar dicho parámetro en cereales como *Triticum aestivum* (trigo) y *Oryza sativa* (arroz) [63], [64]. En el Cuadro 3 se detalla información referente a algunas investigaciones realizadas con dicho propósito durante la última década.

Cuadro 3. Utilización de mutágenos para incrementar la productividad en cultivos de interés agrícola.

| Especie | Agente mutagénico utilizado | Características mejoradas | Fuente |
|------------------------------|-----------------------------|---|--------|
| <i>Triticum aestivum</i> | Etilmetanosulfonato | Se obtuvieron 16 líneas con mutaciones en el gen <i>Rht-1</i> , asociado a un incremento significativo en la productividad de la planta. | [63] |
| <i>Sesamum indicum</i> | Etilmetanosulfonato | El número de semillas incrementó significativamente en las plantas regeneradas a partir de las semillas expuestas a 1% de EMS durante 4 h. | [65] |
| <i>Saccharum</i> spp. | Radiación gamma | Se obtuvieron 38 líneas mutantes con un incremento significativo en el número de tallos aptos para su procesamiento y en los grados Brix. | [66] |
| <i>Saccharum officinarum</i> | Radiación gamma | Cuatro líneas presentaron mayor concentración de azúcares (° Brix) a los 10 meses respecto a los cultivares Co86032, CoM0265 y Co740. | [60] |
| <i>Oryza sativa</i> | CRISPR/Cas | Se obtuvieron 7 líneas mutantes con mayor rendimiento por hectárea respecto al cultivar base, gracias a la edición de los genes <i>Gn1a</i> y <i>DEP1</i> . | [64] |

Producción de mutantes de importancia agrícola en Costa Rica

Durante la segunda mitad del siglo XX, en Costa Rica se obtuvieron cuatro nuevas variedades de plantas de interés agrícola y comercial producto de la inducción de mutaciones, tal como se muestra en la base de datos de variedades mutantes de la FAO y del OIEA [29], [30], [31], [32]. La variedad de frijol (*Phaseolus vulgaris*) NEP-2 fue registrada en 1975 tras su desarrollo

mediante el uso de EMS como agente mutagénico [29]. Una de las principales características de esta variedad de frijol es su resistencia a enfermedades [29]. En 1986, se registró la variedad Uneca-Gama de chícharo (*Vigna unguiculata*), producto de la exposición de semillas a 100 Gy de radiación gamma [31]. Esta nueva variedad se caracterizó por poseer un mayor rendimiento productivo respecto al material parental [31].

Las variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) UNP 9027 y Camago-8 fueron registradas en 1994 y 1996, respectivamente; esta última fue desarrollada por investigadores de la Escuela de Ciencias Agrarias (ECA) de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) [30], [32]. Estas se produjeron mediante la exposición de semillas a rayos gamma, a 200 y 250 Gy, respectivamente [30], [32]. Ambas variedades se caracterizan por su resistencia a *Pyricularia oryzae*, agente causal del tizón del arroz; mientras que, la variedad Camago-8 también presenta resistencia a diferentes virosis [30], [32]. Adicionalmente, en la UNA se han desarrollado mutantes de frijol (*P. vulgaris*) con mayor tamaño de semilla y tolerante a bajas temperaturas; banano (*Musa* spp.) con resistencia parcial a *Mycosphaerella fijiensis*; y, ñame (*Dioscorea alata*) resistente a *Colletotrichum gloeosporioides* [67].

En el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica (UCR) se han desarrollado diversos proyectos para el mejoramiento genético de plantas mediante la inducción de mutaciones [19], [20], [21], [22]. Dentro de estas, destacan la soya (*Glycine max*) y el arroz (*O. sativa*) [19], [20], [21], [22]. En el caso del arroz, se han empleado mutágenos de naturaleza química como el EMS y azida de sodio [19]. Adicionalmente, se han ejecutado proyectos en especies ornamentales como la heliconia (*Heliconia* sp.) y la cala (*Zantedeschia aethiopica*) [19], [20], [21], [22].

La UCR en conjunto con el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) han ejecutado diferentes proyectos relacionados al mejoramiento genético del café (*Coffea arabica*) mediante procesos de mutagénesis química [24], [28]. Bolívar-González *et al.* [24] expusieron suspensiones celulares embriogénicas de dicha planta a diferentes concentraciones de EMS y azida de sodio (NaN_3). Las suspensiones mutagenizadas y las plántulas regeneradas posteriormente a partir de estas fueron cultivadas en medios con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) [24]. Esto se realizó con el fin de seleccionar plantas de *C. arabica* tolerantes a condiciones de alta salinidad [24].

El interés por el mejoramiento genético del café radica en que es un cultivo con baja diversidad genética y reproducción autógena, por lo que las variedades de interés productivo presentan alta susceptibilidad a factores bióticos y abióticos. Gatica-Arias *et al.* [26] evaluaron el efecto de tres agentes mutagénicos (NaN_3 , EMS y rayos gamma) en la sobrevivencia de embriones cigóticos de café, permitiendo optimizar los protocolos para la inducción de mutaciones en este material. Por otra parte, Rojas-Chacón *et al.* [28] expusieron semillas de *C. arabica* a 50 mM de azida de sodio por 8 h. Posterior a este tratamiento, dichos autores evaluaron el efecto de este mutágeno sobre diferentes características en las plántulas regeneradas a partir de semillas tratadas.

Adicionalmente, investigadores de la Universidad de Costa Rica han desarrollado proyectos para obtener plantas de frijol resistentes a *Rhizoctonia solani* [23]. En la investigación, se irradiaron ejes embrionarios desde 0 a 100 Gy, y determinaron que la dosis de 20 Gy fue la adecuada para inducir las mutaciones de interés [23]. Posteriormente, realizaron la selección de líneas promisorias utilizando concentraciones crecientes de filtrado de *Rhizoctonia solani* [23].

Múltiples investigaciones lideradas por el ITCR, en colaboración con la UCR, han empleado radiación gamma para el desarrollo de nuevas variedades de arroz (*O. sativa*) [25], [27]. Abdelnour-Esquivel *et al.* [25] expusieron callos embriogénicos de arroz a 80 Gy de radiación

gamma. Este tratamiento se realizó con el fin de obtener plantas tolerantes a condiciones de sequía y salinidad [25]. Producto de dicha investigación, se obtuvieron 60 mutantes tolerantes a condiciones de sequía, 58 líneas tolerantes a condiciones de salinidad y 15 líneas tolerantes a ambas condiciones de forma simultánea [25].

En 2022, Hernández-Soto *et al.* [27] irradiaron semillas de arroz con dosis dentro del rango 50-350 Gy. A partir de semillas irradiadas se indujo la formación de callo embriogénico y posteriormente, la regeneración de plántulas mutantes [27]. Estos mutantes fueron cultivados en concentraciones crecientes de fluazifop-*p*-butil, donde se identificaron 31 líneas mutantes con tolerancia putativa a dicha molécula herbicida [27].

Los proyectos para la producción de mutantes de interés agrícola en Costa Rica en el ITCR han sido desarrollados principalmente por el Laboratorio de Crioconservación del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), el Laboratorio de Radiación Gamma del Centro de Investigación y Extensión en Materiales del TEC (CIEMTEC) y el Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible para el Trópico Húmedo (CIDASTH). Estos proyectos han sido financiados gracias a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR (VIE), convocatorias realizadas por el Consejo Nacional de Rectores (CONARE), la Sociedad Alemana de Investigación (DFG, por sus siglas en alemán) y el sector productivo representado por organizaciones de productores de caña de azúcar a través de la Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA) y productores arroceros, así como colaboraciones con colegas de la UCR y UNA (Cuadro 4).

Cuadro 4. Hoja de ruta de proyectos de investigación relacionados con la producción de mutantes en cultivos de interés agrícola del Laboratorio de Crioconservación del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

| Línea de investigación: Producción de líneas mutantes de plantas de interés agrícola para contribuir con el desarrollo del sector agroproductivo en zonas rurales. | | | |
|--|---------------------------------|-----------|--|
| Objetivo a largo plazo: Desarrollar nuevas variedades vegetales mejoradas por su adaptación a condiciones de cambio climático y mayor productividad. | | | |
| Fase | Financiamiento | Período | Proyecto de investigación |
| I (3 años) | FEES-CONARE y ITCR-VIE | 2016-2018 | Generación de variabilidad genética en el arroz: una alternativa para enfrentar el cambio climático y favorecer la seguridad alimentaria en Costa Rica. |
| II (3 años) | ITCR-VIE y productores de arroz | 2020-2022 | Producción de mutantes de arroz (<i>Oryza sativa</i>) tolerantes a herbicidas utilizando rayos gamma para contribuir con el manejo sostenible del cultivo. |
| III (3 años) | ITCR-VIE y LAICA | 2022-2025 | Desarrollo de líneas de caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) producidas por mutagénesis radioinducida para una agricultura más resiliente y productiva. |
| IV (3 años) | ITCR-VIE, CONARE y DFG | 2024-2026 | New Plant Breeding Technologies (NPBTs) strengthening research capacities between Costa Rica and Germany using rice as a model. |
| | | | Producción de líneas mutantes de arroz tolerantes a suelos ácidos para contribuir con la productividad agrícola nacional. |
| V (3 años) | Por solicitar | 2025-2027 | Inducción de variabilidad genética en caña de azúcar para la obtención de cultivos resilientes a sequía y el favorecimiento de la productividad en zonas marginales dependientes de las lluvias. |
| VI (3 años) | Por solicitar | 2027-2029 | Evaluación de la metodología DUS (Distinción, Uniformidad y Estabilidad) en mutantes resistentes a acidez y herbicidas. |

Actualmente, en el CIB se continúa con el desarrollo de proyectos de mejoramiento genético vía mutagénesis radioinducida en plantas de la familia *Poaceae*. Tanto en arroz (*O. sativa*), como en caña de azúcar (*Saccharum* sp.), se trabaja en la obtención de líneas mutantes tolerantes a las altas concentraciones de aluminio (Al^{3+}) en suelos ácidos (Cuadro 4). Además, en caña de azúcar (*Saccharum* sp.) se desea obtener nuevas variedades cuya tasa de floración sea inferior a la del material parental, o bien, nula, característica con la que se busca aumentar el rendimiento productivo.

Adicionalmente, en el CIB se ha realizado edición genómica como parte del proyecto del Espacio de Estudios Avanzados de la Universidad de Costa Rica (UCREA; Proyecto 801-B7-294) para la edición del genoma de arroz y del proyecto “New Plant Breeding Technologies (NPBTs) strengthening research capacities between Costa Rica and Germany using rice as a model” financiado por CONARE y la DFG de Alemania (Cuadro 4) [68], [69], [70], [71]. Adicionalmente, también se ha realizado producción científica relacionada con la edición de genomas en levaduras [71], arroz [72], [73], [74] y café [75]; tesis de posgrado [76], [77]; y, en colaboración con el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), tres cursos prácticos sobre edición génica (2021, 2022 y 2024). Por otra parte, también se han realizado trabajos sobre la percepción de la población costarricense respecto a dichas tecnologías [68], [69].

Las metodologías desarrolladas en el CIB han permitido la producción de plantas a partir de tejidos irradiados. Estas plantas han sido seleccionadas utilizando la técnica de cultivo de tejidos por la simplicidad con la que se puede modificar las condiciones *in vitro*. Además, en un espacio reducido se pueden evaluar miles de mutantes de forma simultánea, lo que reduce el tiempo y costo en los programas de mejora. De esta forma, es posible obtener una segunda generación de plantas mutantes (M2) en invernadero a partir de una primera generación mutante con dos ciclos de multiplicación (M1V2) seleccionada en condiciones *in vitro* en menos de un año (Figura 3).

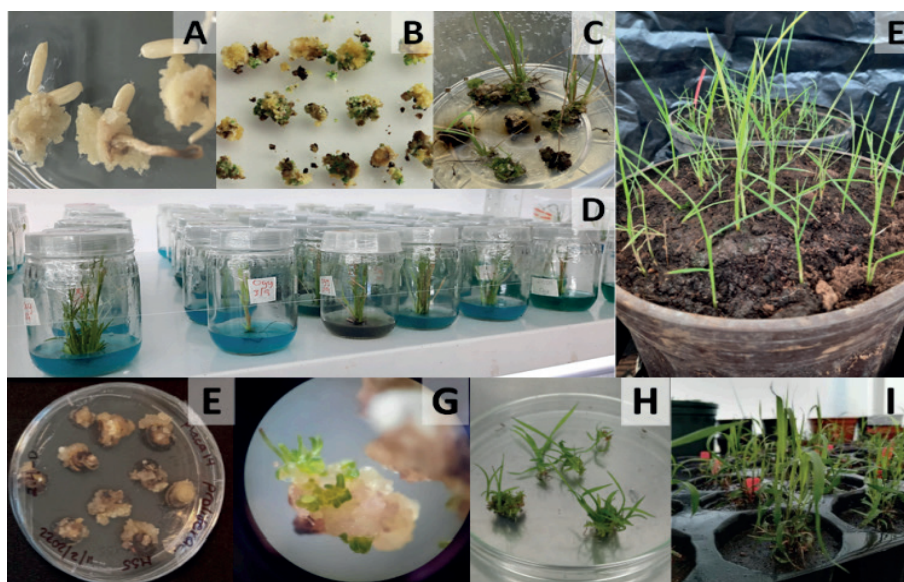


Figura 3. Etapas para la inducción de mutaciones en arroz (*O. sativa*) y caña de azúcar (*Saccharum* sp.) utilizando cultivo de tejidos e irradiación gamma en el Laboratorio de Criopreservación del Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR: Inducción de callos embrionarios de arroz a partir de semilla (A), callos embrionarios de arroz irradiados a 60 Gy (B), plantas de arroz regeneradas a partir de callos embrionarios irradiados (C), población M1V2 de arroz (D), plantas de arroz de la población M2 desarrollándose en invernadero (E), inducción de callo embrionario de caña de azúcar (F), callos embrionarios de caña de azúcar irradiados tras 1 semana en medio de regeneración (G), plántulas mutantes de caña de azúcar regeneradas a partir de callos embrionarios irradiados tras 4 semanas en medio de regeneración (H) y plantas de caña de azúcar tras 4 semanas de cultivo en condiciones de invernadero (I).

En el cultivo de arroz son requeridas aproximadamente 2 semanas en la etapa de inducción de callo embriogénico (Figura 3A), 4 semanas evaluando la regeneración de los callos después de la irradiación (Figura 3B), 8 semanas obteniendo plantas a partir de callos irradiados (Figura 3C), 2 a 3 semanas estableciendo la primera generación mutante (M1) *in vitro* (Figura 3D) y entre 5 a 6 meses obteniendo la población de semilla M2 a partir de plantas M1 aclimatadas en invernadero y 2 a 3 semanas adicionales obteniendo plántulas M2 a partir de semilla (Figura 3E).

Por su parte, en caña de azúcar se requieren, aproximadamente, 10 semanas para la obtención de callo embriogénico (Figura 3F), 4 semanas para obtener plantas a partir de los tejidos embriogénicos irradiados (Figuras 3G y 3H) y posteriormente, cada línea mutante es micropropagada cada 6 semanas. Asimismo, transcurrido dicho período, las vitroplantas pueden ser cultivadas en condiciones de invernadero (Figura 3I).

Conclusiones

Gracias a la emergencia de diferentes tecnologías (radiaciones ionizantes, herramientas de edición génica y otras) ha sido posible modificar artificialmente el material genético de plantas de gran relevancia agrícola. Este aumento en la variabilidad genética de plantas de gran relevancia agrícola mediante la inducción artificial de mutaciones (mutagénesis) ha permitido desarrollar materiales vegetales aptos para su cultivo ante condiciones agrícolas marginales, y a su vez, garantizando un rendimiento productivo óptimo. En Costa Rica, el avance de las investigaciones en producción de mutantes de interés agrícola ha permitido el desarrollo de protocolos y metodologías afinadas, la adquisición de equipo e infraestructura, la producción de conocimiento, la formación de capital humano, la generación de líneas mutantes que actualmente se encuentran en evaluación, y diferentes publicaciones científicas. Por otra parte, estas estrategias benefician a los productores agrícolas del país, contribuyendo a que su actividad económica siga siendo rentable, y a que Costa Rica, como país, pueda acercarse cada vez más al ansiado autoabastecimiento y mejorar la seguridad alimentaria en la población nacional.

Agradecimientos

Este artículo es posible gracias a los proyectos “Producción de líneas mutantes de arroz tolerantes a suelos ácidos para contribuir con la productividad agrícola nacional” (CF 1510194), adscrito a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR); y “New Plant Breeding Technologies (NPBTs) strengthening research capacities between Costa Rica and Germany using rice as model” (111-C3-655), adscrito a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), al Consejo Nacional de Rectores (CONARE), y a la Sociedad Alemana de Investigación (DFG, por sus siglas en alemán).

Referencias

- [1] N. Hasan, S. Choudhary, N. Naaz, N. Sharma, R. A. Laskar, “Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes”, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, vol. 19, no. 1, pp. 1-26, 2021. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00231-1>
- [2] V. E. Viana, C. Pegoraro, C. Busanello, A. C. De Oliveira, “Mutagenesis in rice: The basis for breeding a new super plant”, *Frontiers in Plant Science*, vol. 10, no. 1326, pp. 1-28, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01326>
- [3] Y. Oladosu *et al.*, “Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: A review”, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 30, no. 1, pp. 1-16, 2016. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1087333>



- [4] A. Berry, J. Browne, "Mendel and Darwin", *PNAS*, vol. 119, no. 30, pp. 1-10, 2022. <https://doi.org/10.1073/pnas.2122144119>
- [5] J. J. García Villarroel, "Impacto de las mutaciones en la salud humana: Una revisión actualizada", *Revista Orbis Tertius UPAL*, vol. 7, no. 14, pp. 127-152, 2023. <https://doi.org/10.59748/ot.v7i14.140>
- [6] W. Ma, Y. Zhan, Y. Zhang, C. Mao, X. Xie, Y. Lin, "The biological applications of DNA nanomaterials: Current challenges and future directions", *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 6, no. 351, pp. 1-28, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00727-9>
- [7] J. Vijg, "From DNA damage to mutations: All roads lead to aging", *Ageing Research Reviews*, vol. 68, no. 101316, pp. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101316>
- [8] A. Carusillo, C. Mussolino, "DNA damage: From threat to treatment", *Cells*, vol. 9, no. 7, pp. 1-20, 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9071665>
- [9] A. Livnat, A. C. Love, "Mutation and evolution: Conceptual possibilities", *BioEssays*, vol. 46, no. 2, pp. 1-12, 2024. <https://doi.org/10.1002/bies.202300025>
- [10] S. Ahmar *et al.*, "Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: Recent advances and future outlook", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 7, pp. 1-24, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21072590>
- [11] J. Chaudhary *et al.*, "Mutation breeding in tomato: Advances, applicability and challenges", *Plants*, vol. 5, no. 8, pp. 1-17, 2019. <https://doi.org/10.3390/plants8050128>
- [12] M. de la L. Riviello-Flores *et al.*, "Use of gamma radiation for the genetic improvement of underutilized plant varieties", *Plants*, vol. 11, no. 9, pp. 1-19, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11091161>
- [13] A. Bhoi, B. Yadu, J. Chandra, S. Keshavkant, "Mutagenesis: A coherent technique to develop biotic stress resistant plants", *Plant Stress*, vol. 3, no. 100053, pp. 1-10, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100053>
- [14] F. Li, A. Shimizu, T. Nishio, N. Tsutsumi, H. Kato, "Comparison and characterization of mutations induced by gamma-ray and carbon-ion radiation in rice (*Oryza sativa* L.) using whole genome resequencing", *G3 Genes|Genomes|Genetics*, vol. 9, no. 11, pp. 3743-3751, 2019. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400555>
- [15] G. Yang *et al.*, "Genome-wide comparisons of mutations induced by carbon-ion beam and gamma-rays irradiation in rice via resequencing multiple mutants", *Frontiers in Plant Science*, vol. 10, no. 1514, pp. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01514>
- [16] R. M. Shelake, D. Pramanik, J. -Y. Kim, "Evolution of plant mutagenesis tools: A shifting paradigm from random to targeted genome editing", *Plant Biotechnology*, vol. 13, pp. 423-445, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00562-z>
- [17] Q. M. M. Hossen *et al.*, "Development of early flowering, short life-spanned jute (*Corchorus* spp.) mutant via ethyl methane sulfonate mutagenesis", *Journal of Crop Science and Biotechnology*, vol. 25, pp. 489-500, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12892-022-00146-4>
- [18] A. C. Udage, "Introduction to plant mutation breeding: Different approaches and mutagenic agents", *The Journal of Agricultural Sciences - Sri Lanka*, vol. 16, no. 3, pp. 466-483, 2021. <https://doi.org/10.4038/jas.v16i03.9472>
- [19] Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, "Informe de Labores 2014-2015", Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica, 2015. <https://cigras.ucr.ac.cr/documentos/category/21-informe-2014-2015>
- [20] Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, "Informe de Labores 2016", Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica, 2016. <https://cigras.ucr.ac.cr/documentos/category/22-informe-2016>
- [21] Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, "Informe de Labores 2017", Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica, 2017. <https://cigras.ucr.ac.cr/documentos/category/23-informe-2017>
- [22] Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, "Informe de Labores 2018", Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica, 2018. <https://cigras.ucr.ac.cr/documentos/category/24-informe-2018>
- [23] L. Y. Solís-Ramos *et al.*, "Effect of gamma irradiation and selection with fungus filtrate (*Rhizoctonia solani* Kuhn) on the *in vitro* culture of common bean (*Phaseolus vulgaris*)", *American Journal of Plant Sciences*, vol. 6, no. 16, pp. 2672-2685, 2015. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.616269>
- [24] A. Bolívar-González, M. Valdez-Melara, A. Gatica-Arias, "Responses of Arabica coffee (*Coffea arabica* L. var. Catuaí) cell suspensions to chemically induced mutagenesis and salinity stress under *in vitro* culture conditions", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 54, pp. 576-589, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9918-x>

- [25] A. Abdelnour-Esquivel, J. Pérez, M. Rojas, W. Vargas, A. Gatica-Arias, "Use of gamma radiation to induce mutations in rice (*Oryza sativa* L.) and the selection of lines with tolerance to salinity and drought", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 56, pp. 88-97, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10015-5>
- [26] A. Gatica-Arias, J. Rodríguez-Matamoros, A. Abdelnour-Esquivel, M. Valdez-Melara, "Determination of the optimal conditions for mutagenesis induction in a commercial Arabica coffee variety" en *Mutation Breeding, Genetic Diversity and Crop Adaptation to Climate Change*, S. Sivasankar, N. Ellis, L. Jankuloski, I. Ingelbrecht, Eds. Wallingford, CABI, 2021, pp. 213-233. <https://doi.org/10.1079/9781789249095.0034>
- [27] A. Hernández-Soto *et al.*, "Tolerance to aryloxy-phenoxy-propionate (APP) as a model for Lazarroz FL rice in vitro gamma irradiation variability selection", *bioRxiv*, pp. 1-12, 2022. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1950230/v2>
- [28] J. A. Rojas-Chacón, F. Echeverría-Beirute, B. J. Till, A. Gatica-Arias, "Enhancing coffee diversity: Insights into the impact of sodium azide mutagenesis on quantitative and qualitative traits in *Coffea arabica* L.", *Scientia Horticulturae*, vol. 330, no. 113043, pp. 1-9, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113043>
- [29] International Atomic Energy Agency, "Mutant Variety Search - NEP-2", 2022. [Online]. Disponible en: <https://nucleus.iaea.org/sites/mvd/SitePages/Search.aspx?MVID=1550> [Consultado: 28-abr-2024]
- [30] International Atomic Energy Agency, "Mutant Variety Search - UNP 9027", 2022. [Online]. Disponible en: <https://nucleus.iaea.org/sites/mvd/SitePages/Search.aspx?MVID=905> [Consultado: 28-abr-2024]
- [31] International Atomic Energy Agency, "Mutant Variety Search - Uneca-Gama", 2022. [Online]. Disponible en: <https://nucleus.iaea.org/sites/mvd/SitePages/Search.aspx?MVID=1549> [Consultado: 28-abr-2024]
- [32] International Atomic Energy Agency, "Mutant Variety Search - Camago-8", 2022. [Online]. Disponible en: <https://nucleus.iaea.org/sites/mvd/SitePages/Search.aspx?MVID=904> [Consultado: 28-abr-2024]
- [33] L. Ma, F. Kong, K. Sun, T. Wang, T. Guo, "From classical radiation to modern radiation: Past, present, and future of radiation mutation breeding", *Frontiers in Public Health*, vol. 9, no. 768071, pp. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.768071>
- [34] M. Kashtwari *et al.*, "Random mutagenesis in vegetatively propagated crops: Opportunities, challenges and genome editing prospects", *Molecular Biology Reports*, vol. 49, pp. 5729-5749, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06650-0>
- [35] H. Singh, A. Khar, P. Verma, "Induced mutagenesis for genetic improvement of *Allium* genetic resources: A comprehensive review", *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 68, pp. 2669-2690, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01210-8>
- [36] C. Jung, B. Till, "Mutagenesis and genome editing in crop improvement: Perspectives for the global regulatory landscape", *Trends in Plant Science*, vol. 26, no. 12, pp. 1258-1269, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.08.002>
- [37] K. A. Omar, K. Hasnaoui, A. de la Lande, "First-principles simulations of biological molecules subjected to ionizing radiation", *Annual Review of Physical Chemistry*, vol. 72, pp. 445-465, 2021. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-101419-013639>
- [38] B. B. Gollapudi, A. L. Williams, J. S. Bus, "A review of the genotoxicity of the industrial chemical cume-ne", *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 787, no. 108364, pp. 1-10, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108364>
- [39] I. B. Holme, P. L. Gregersen, H. Brinch-Pedersen, "Induced genetic variation in crop plants by random or targeted mutagenesis: Convergence and differences", *Frontiers in Plant Science*, vol. 10, no. 1468, pp. 1-9, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01468>
- [40] D. A. Animasaun, E. O. Oguntoye, "Mutagenesis in crop improvement: Methods and applications", *Journal of Crop Improvement*, vol. 38, no. 3, pp. 1-23, 2024. <https://doi.org/10.1080/15427528.2024.2336257>
- [41] J. Pérez, A. Hernández-Soto, A. Abdelnour-Esquivel, W. Vargas-Segura, W. Watson-Guido, A. Gatica-Arias, "In vitro gamma mutagenesis techniques in rice (*Oryza sativa* L. var. Lazarroz FL)" en *Plant Functional Genomics: Methods and Protocols*, vol. 2, F. Maghuly, Ed. Nueva York: Humana Press, 2024, pp. 243-255. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3782-1_14
- [42] M. Ahmad, Q. Ali, M. M. Hafeez, A. Malik, "Improvement for biotic and abiotic stress tolerance in crop plants", *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, vol. 2021, no. 1, pp. 1-9, 2021. <https://doi.org/10.54112/bcsrj.v2021i1.50>
- [43] A. Hernández-Soto, F. Echeverría-Beirute, A. Abdelnour-Esquivel, M. Valdez-Melara, J. Boch, A. Gatica-Arias, "Rice breeding in the new era: Comparison of useful agronomic traits," *Current Plant Biology*, vol. 27, no. 100211, pp. 1-15, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100211>



- [44] S. Tyagi *et al.*, "Genome editing for resistance to insect pests: An emerging tool for crop improvement", *ACS Omega*, vol. 5, no. 33, pp. 20674-20683, 2020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01435>
- [45] M. Kaur, K. S. Thind, G. S. Sanghera, R. Kumar, L. Kashyap, "Gamma rays induced variability for economic traits, quality and red rot resistance in sugarcane (*Saccharum* spp.), *International Journal of Science, Environment and Technology*, vol. 5, no. 2, pp. 355-365, 2016. <https://www.ijset.net/journal/868.pdf>
- [46] H. Ge *et al.*, "Production of sweet orange somaclones tolerant to citrus canker disease by *in vitro* mutagenesis with EMS", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 123, pp. 29-38, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0810-7>
- [47] M. A. Islam, M. M. B. M. Uddin, M. G. Rasul, M. A. H. Swapon, M. Ahmed, M. Hasan, "*In vitro* screening and field performance of EMS-treated eggplants for the selection of shoot and fruit borer-resistant plants", *Agronomy*, vol. 12, no. 8, pp. 1-14, 2022. <https://doi.org/10.3390/agronomy12081832>
- [48] A. Peng *et al.*, "Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus", *Plant Biotechnology Journal*, vol. 15, no. 12, pp. 1509-1519, 2017. <https://doi.org/10.1111/pbi.12733>
- [49] Y. Zhang *et al.*, "Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat", *The Plant Journal*, vol. 91, no. 4, pp. 714-724, 2017. <https://doi.org/10.1111/tpj.13599>
- [50] R. Oliva *et al.*, "Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing", *Nature Biotechnology*, vol. 37, pp. 1344-1350, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0267-z>
- [51] V. K. Bari *et al.*, "CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 in tomato provides resistance against the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*", *Scientific Reports*, vol. 9, no. 11438, pp. 1-12, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47893-z>
- [52] V. Nekrasov, C. Wang, J. Win, C. Lanz, D. Weigel, S. Kamoun, "Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion", *Scientific Reports*, vol. 7, no. 482, pp. 1-6, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00578-x>
- [53] A. Raina, S. Khan, P. K. Sahu, R. Sao, "Increasing rice grain yield under abiotic stresses: Mutagenesis, genomics and transgenic approaches" en *Rice Research for Quality Improvement: Genomics and Genetic Engineering*, vol. 1, A. Roychoudhury, Ed. Singapur: Springer, 2020, pp. 753-777. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4120-9_31
- [54] O. Arriagada, F. Cacciuttolo, R. A. Cabeza, B. Carrasco, A. R. Schwember, "A comprehensive review on chickpea (*Cicer arietinum* L.) breeding for abiotic stress tolerance and climate change resilience", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 12, pp. 1-24, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23126794>
- [55] A. Rai, S. Bhujbal, S. J. Jambhulkar, "Development of abiotic stress-tolerant mustard genotype through induced mutagenesis" en *Global Climate Change*, S. Singh, P. Singh, S. Rangabhashiyam, K. K. Srivastava, Eds. Ámsterdam: Elsevier, 2021, pp. 213-233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822928-6.00004-6>
- [56] A. Shankar, O. Choudhary, K. Singh, "Effect of EMS induced mutation in rice cultivar Nagina 22 on salinity tolerance", *bioRxiv*, pp. 1-10, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.08.03.455004>
- [57] Z. Chen *et al.*, "Generation of a series of mutant lines resistant to imidazolinone by screening an EMS-based mutant library in common wheat", *The Crop Journal*, vol. 9, no. 5, pp. 1030-1038, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.11.001>
- [58] J. Lethin *et al.*, "Development and characterization of an EMS-mutagenized wheat population and identification of salt-tolerant wheat lines", *BMC Plant Biology*, vol. 20, no. 1, pp. 1-15, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2137-8>
- [59] M. V. Purankar, A. A. Nikam, R. M. Devarumath, S. Penna, "Radiation induced mutagenesis, physio-biochemical profiling and field evaluation of mutants in sugarcane cv. CoM 0265", *International Journal of Radiation Biology*, vol. 98, no. 7, pp. 1261-1276, 2022. <https://doi.org/10.1080/09553002.2022.2024291>
- [60] A. A. Nikam, R. M. Devarumath, A. Ahuja, H. Babu, M. G. Shitole, S. Penna, "Radiation-induced *in vitro* mutagenesis system for salt tolerance and other agronomic characters in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)", *The Crop Journal*, vol. 3, no. 1, pp. 46-56, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2014.09.002>
- [61] G. -J., Baeg, S. -H. Kim, D. -M. Choi, S. Tripathi, Y. -J. Han, J. -I. Kim, "CRISPR/Cas9-mediated mutation of 5-oxoprolinase gene confers resistance to sulfonamide compounds in *Arabidopsis*", *Plant Biotechnology Reports*, vol. 15, pp. 753-764, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11816-021-00718-w>
- [62] D. T. Teshome, G. E. Zharare, S. Naidoo, "The threat of the combined effect of biotic and abiotic stress factors in forestry under a changing climate", *Frontiers in Plant Science*, vol. 11, no. 601009, pp. 1-19, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.601009>

- [63] E. M. Jobson *et al.*, "Identification and molecular characterization of novel *Rht-1* alleles in hard red spring wheat", *Crop Science*, vol. 61, no. 2, pp. 1030-1037, 2021. <https://doi.org/10.1002/csc2.20375>
- [64] L. Huang *et al.*, "Developing superior alleles of yield genes in rice by artificial mutagenesis using the CRISPR/Cas9 system", *The Crop Journal*, vol. 6, no. 5, pp. 475-481, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.05.005>
- [65] A. Saha, "EMS induced polygenic mutation in tilottama cultivar of *Sesamum indicum*", *Plant Archives*, vol. 19, no. 1, pp. 630-632, 2019. [https://www.plantarchives.org/PDF%2019-1/630-632%20\(4657\).pdf](https://www.plantarchives.org/PDF%2019-1/630-632%20(4657).pdf)
- [66] S. K. Sandhu, R. Singh, S. Penna, "Radiation-induced mutants with increased cane number in sugarcane variety CoJ 85", *Journal of Crop Improvement*, vol. 33, no. 2, pp. 1-15, 2019. <https://doi.org/10.1080/15427528.2018.1554546>
- [67] J. F. Argüello Delgado *et al.*, "Costa Rica: Aumento de la variabilidad genética en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.)" en *Inducción de mutaciones: Estado del conocimiento en el mejoramiento de plantas en América Latina y el Caribe*, S. de los Santos Villalobos, Ed. Ciudad de México, Editorial FONTARAMA, 2021, pp. 45-66. ISBN: 978-607-736-684-3.
- [68] A. Gatica-Arias, "The regulatory current status of plant breeding technologies in some Latin American and the Caribbean countries," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 141, no. 2, pp. 229-242, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01799-1>
- [69] D. M. Macall, J. Madrigal-Pana, S. J. Smyth, A. Gatica-Arias, "Costa Rican consumer perceptions of gene editing," *Heliyon*, vol. 9, no. 8, pp. 1-11, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19173>
- [70] A. Gatica-Arias, M. Valdez-Melara, G. Arrieta-Espinoza, F. J. Albertazzi-Castro, and J. Madrigal-Pana, "Consumer attitudes toward food crops developed by CRISPR/Cas9 in Costa Rica," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 139, no. 2, pp. 417-427, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01647-x>
- [71] A. Hernández-Soto, J. P. Delgado-Navarro, M. Benavides-Acevedo, S. A. Paniagua, A. Gatica-Arias, "*NTH2 1271_1272delTA* gene disruption results in salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*", *Fermentation*, vol. 8, no. 4, pp. 1-14, 2022. <https://doi.org/10.3390/fermentation8040166>
- [72] F. M. Romero, A. Gatica-Arias, "CRISPR/Cas9: Development and application in rice breeding," *Rice Science*, vol. 26, no. 5, pp. 265-281, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2019.08.001>
- [73] R. Rojas-Vásquez, A. Gatica-Arias, "Use of genome editing technologies for genetic improvement of crops of tropical origin," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 140, no. 1, pp. 215-244, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01707-2>
- [74] C. Aguilar-Bartels, P. Quirós-Segura, A. García-Piñeres, A. Gatica-Arias, G. Arrieta-Espinoza, "Key aspects for the genetic transformation of rice (*Oryza sativa* L.) subspecies indica by *Agrobacterium tumefaciens*", *Agronomía Mesoamericana*, vol. 32, no. 3, pp. 764-778, 2021. <https://doi.org/10.15517/am.v32i3.44978>
- [75] J. Villalta-Villalobos, A. Gatica-Arias, "A look back in time: Genetic improvement of coffee through the application of biotechnology," *Agronomía Mesoamericana*, vol. 30, no. 2, pp. 577-599, 2019. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v30i2.34173>
- [76] R. Rojas Vásquez, "Edición del gen de la enzima trehalasa mediante CRISPR-Cas9 en arroz subsp. indica var. CR-5272," Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica, 2022. [En línea]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10669/87766>
- [77] A. Sebiani-Calvo, "Desarrollo de un sistema de edición genética CRISPR/CAS9 in planta en embriones maduros de arroz (*Oryza sativa* L.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*," Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica, 2023. [En línea]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10669/90585>

Optimización de la embriogénesis somática en *Coffea arabica*: evaluación de la orientación y punto de origen del explante foliar

Optimization of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*: evaluation of leaf explant orientation and origin

Daniela Vargas-Morera¹, Roselind Vargas-Delgado², Steven Ceciliano-Castro³

Vargas-Morera, D; Vargas-Delgado, R; Ceciliano-Castro, S. Optimización de la embriogénesis somática en *Coffea arabica*: evaluación de la orientación y punto de origen del explante foliar. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 158-166.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7620>

- 1 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 daniela.vm@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-5816-3641>
- 2 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 roselind.vargas@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0000-0001-7051-3563>
- 3 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 stevenceci858@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-0478-6237>

Palabras clave

Cultivo *in vitro*, callo, café, hoja, vitroplanta.

Resumen

El cultivo del café (*Coffea arabica*) en Costa Rica afronta diversos desafíos debido a los cambios climáticos y a las fluctuaciones del mercado. La búsqueda de variedades más resistentes y de mayor calidad ha llevado a explorar métodos de propagación alternativos, como la embriogénesis somática (ES), que permite la multiplicación de nuevas variedades en condiciones controladas de laboratorio. Cuando se realiza directamente, sin callo de por medio, la orientación del segmento foliar y el punto de origen de la muestra poseen influencia evidente en el éxito del explante. Para comprobarlo, en este estudio se evaluó el efecto de la disposición adaxial y abaxial de las hojas de *C. arabica* obtenidas de puntos distales, proximales y mediales de vitroplantas para la inducción de embriogénesis somática directa. Secciones de las hojas fueron introducidas en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado. Se realizó un análisis multivariado para conocer cuál combinación de tratamientos generó una mejor respuesta en la ES, denotado mediando un mapa de calor. Se obtuvo un 36% de callo de regeneración al introducir explantes de forma adaxial con una oxidación reducida. Asimismo, la parte distal y medial exhibieron mayor capacidad de regeneración. La orientación adaxial de las hojas de café aumentó la inducción de embriones somáticos, posiblemente al favorecer el intercambio gaseoso por la característica hipoestomática de *C. arabica*. Con esta optimización, se podría facilitar el proceso de introducción de plantas a partir de hojas con un mayor porcentaje esperado de éxito.

Keywords

In vitro culture, callus, coffee, leaf, vitroplant.

Abstract

Coffee (*C. arabica*) farming in Costa Rica is facing several challenges due to climatic changes and market fluctuations. The search for higher quality and more resistant varieties has led to the research of new alternative propagation methods, such as somatic embryogenesis (SE), which allows the generation of new subspecies under controlled laboratory conditions. Direct propagation, without callus, has a significant influence on explant success depending on leaf orientation and the origin of the sample. To prove this, this work evaluates the effect of the adaxial and abaxial orientation of *C. arabica* leaves obtained from distal, proximal and medial points of vitroplants for the induction of direct somatic embryogenesis. Leaf sections were placed into supplemented Murashige and Skoog (MS) culture medium. Multivariate analysis was performed to know which combination of treatments led to a better response to SE, and it is shown using a heat map. About 36% regeneration callus was produced by introducing explants in adaxial form with decreased oxidation. Furthermore, distal and medial parts exhibited higher regenerative capacity. Adaxial orientation of *C. arabica* leaves promoted somatic embryo induction possibly by enhancing gas exchange due to hypostomatic leaf feature. By optimizing this protocol, the plant introduction process from leaves may be improved with a higher expected success rate.

Introducción

El café (*Coffea arabica*) es uno de los principales cultivos de interés agrícola en el ámbito mundial, con más de 11 millones de hectáreas sembradas y el 80% cultivado en América Latina [1]. En Costa Rica, desempeña un destacado papel agrícola, social y comercial, al ocupar la mayor extensión de tierras dedicadas a cultivos permanentes en el país con 74 437 hectáreas sembradas según la última Encuesta Nacional Agropecuaria [2], [3]. Actualmente, el cultivo de café enfrenta importantes desafíos debido a su alta sensibilidad a las variaciones en los patrones climáticos, aumento de costos de producción, y a las fluctuaciones en el precio del mercado [4]. Esto ha motivado a los productores a explorar nuevas alternativas para asegurar una producción eficiente con variedades con mayor resistencia a enfermedades como la roya (*Hemileia vastatrix*), y variedades con mayor calidad en grano, como Híbrido F1 y Venecia, respectivamente, para adaptarse mejor a las condiciones cambiantes del entorno [5].

El aumento del número de plantas de dichos genotipos potenciales dentro de un programa de mejoramiento genético tradicional es un proceso complejo, considerando que la generación de nuevas variedades con características mejoradas y estables mediante dichas técnicas puede tomar alrededor de 30 años [6]. Ante esto, el cultivo *in vitro* se proyecta como una alternativa para la multiplicación de variedades de *C. arabica* a través del aislamiento de explantes vegetales obtenidos de la planta madre, con características potenciales para su crecimiento en condiciones reguladas dentro de un laboratorio y en un menor período de tiempo, demostrado a través de métodos basados en técnicas cada vez más optimizadas [7], [8]. Entre ellas, la embriogénesis somática (ES) es uno de los métodos biotecnológicos más viables para la micropropagación del café debido a su condición de especie leñosa y con un largo ciclo de vida, facilitando la producción clonal masiva de individuos élite [9].

Durante la ES, las células somáticas tomadas de tejidos como las hojas pueden desdiferenciarse en células totipotentes y reprogramar su desarrollo hacia la vía embriogénica con el estímulo apropiado [10]. En *C. arabica*, el proceso se puede lograr por una vía somática directa con células proembriogénicas formadas directamente desde células del explante foliar, o indirecta con el desarrollo previo de un callo friable del cual emergen estructuras embriogénicas [11]. Se ha reportado la obtención directa de embriones somáticos globulares y torpedo desde la hoja de vitroplantas posterior a 10 semanas de introducción en variedades como Catuaí y Caturra [12]; sin embargo, se ha señalado que en *Coffea* sp. el método indirecto genera mayor cantidad de estructuras tipo torpedo, donde la etapa de desarrollo del explante, edad de la planta, y la orientación de la hoja hacia el medio de cultivo durante la introducción *in vitro* toman relevancia si se busca la eficacia en la embriogénesis directa [13].

La orientación adaxial o abaxial del explante foliar permite el intercambio de gases dentro del frasco de cultivo *in vitro* según la posición de las estomas de la especie, siendo fundamental en la embriogénesis y morfogénesis, a pesar de que las tasas fotosintéticas y respiratorias en cultivos *in vitro* son bajas [14]. Además, la capacidad embriogénica *in vitro* puede depender del equilibrio entre los reguladores del crecimiento endógeno y exógeno, en particular de los niveles de auxinas endógenas, las cuales se concentran en mayor proporción en zonas distales o apicales con respecto a la totalidad de la planta [15]. Para evaluar la incidencia de estos factores, en este trabajo se buscó evaluar la eficiencia en la embriogénesis somática directa según la disposición adaxial o abaxial de hojas de vitroplantas de *C. arabica* var. Caturra obtenidas de desde un punto de origen distal, proximal o medial con respecto a la totalidad de la planta.

Materiales y métodos

El ensayo se llevó a cabo como parte de las prácticas del curso “Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales” de la carrera de Ingeniería en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), en Cartago, Costa Rica, siguiendo metodologías descritas en [16], [17].

Material vegetal. El material vegetal utilizado consistió en vitroplantas de *C. arabica* var. Caturra disponibles para las prácticas docentes de dicho curso. Estas plantas se encontraban en el cuarto de crecimiento del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la carrera de Ingeniería en Biotecnología (ITCR) en un medio con sales M&S [18], complementado con vitaminas [19], 5 mg/L de benciladenina (BA), 15 g/L sacarosa, 125 mg/L de estreptomycin y 3 g/L de Phytigel, con un pH de 5.7, a una temperatura promedio de 24 + 2° C y a un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, con 90 días de crecimiento [20].

Medio de cultivo. Para la ES de *C. arabica* var. Caturra, se empleó un medio de cultivo basal M&S al 25% (Macroelementos) y 50% (Microelementos) [18], FeEDTA al 50%, así como los siguientes componentes: fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 42,5 mg/L, piridoxina 1 mg/L, ácido nicotínico 1 mg/L, tiamina 10 mg/L, mionositol 100 mg/L, bencilaminopurina (BAP) 1 mg/L, sacarosa 30g/L, 3 g/L de Phytigel, y se ajustó el pH a 5.6 [16]. El medio se dispensó en frascos de vidrio de 5.2 x 6 x 6-7 cm; con 60 ml para el cultivo *in vitro*.

Preparación del material e inducción de embriogénesis somática. Se extrajeron secciones de hojas de café de aproximadamente 1 cm² de los puntos de origen distales (primer par de hojas de la parte superior de la vitroplanta), medias (hojas de la parte media) y basales (hojas de la parte inferior, más cercanas al medio de cultivo) de vitroplantas seleccionadas. Cada explante se cultivó en un frasco con la orientación de la hoja en posición abaxial (envés hacia el medio de cultivo) o adaxial (haz hacia el medio de cultivo). El material se incubó a una temperatura constante de 26 °C en condiciones de oscuridad durante 60 días, tras los cuales se expusieron a luz directa durante 20 días adicionales [17]. Al final del proceso sobrevivieron 72 explantes.

Análisis estadístico. Las variables de respuesta para este experimento fueron oxidación, regeneración o embriogénesis, y formación de callo, mientras que los tratamientos fueron disposición de la hoja (abaxial, adaxial) y la parte del explante de donde se tomó la hoja (basal, medial y proximal). La evaluación del material se llevó a cabo luego de 80 días del ensayo. Se realizó un análisis multivariado utilizando la herramienta RStudio (v 2023.09.1), utilizando los paquetes; agricolae, factoextra, FactoMineR, pheatmap, RColorBrewer, colorspace y grid, con las variables de respuesta (oxidación, callo y regeneración) y la interacción entre los dos tratamientos establecidos (origen y posición del explante). Para ello se definió una matriz, los componentes principales analizados mediante análisis de covarianza y el análisis de conglomerados, por medio de la determinación de distancias euclidianas. En base a esto se realizó un mapa de calor para determinar cuál combinación de factores (orientación de la hoja y punto de origen en la planta) generó una mayor regeneración en la inducción de embriogénesis somática.

Resultados

La embriogénesis somática de *C. arabica* var. Caturra expuso el crecimiento de callo de cicatrización en las zonas cercanas a los cortes realizados en las hojas luego de 1 mes de incubación. Los ejes embrionarios germinaron en gran parte de los tratamientos 80 días después de la introducción de hoja en posición adaxial desde distintos puntos de origen (Cuadro 1, Figura 1), al igual que tratamientos con la hoja en posición abaxial, pero en menor cantidad.

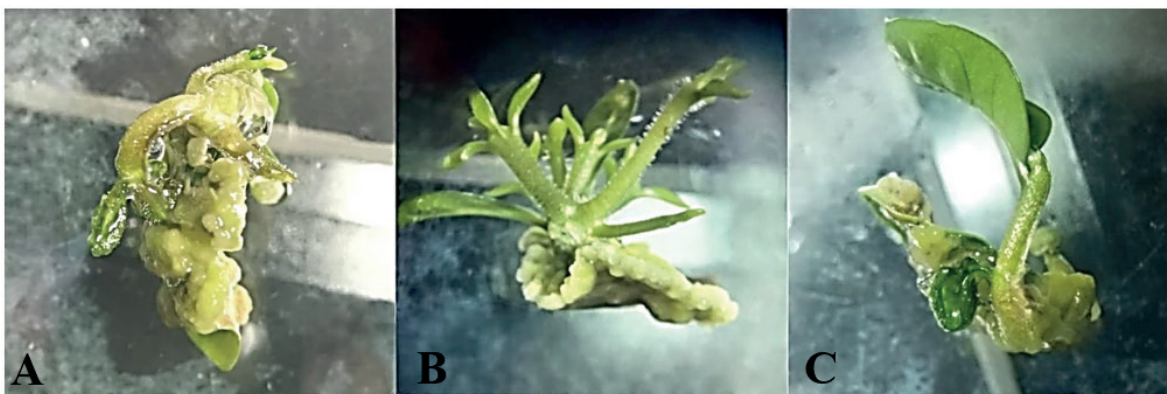


Figura 1. Embriogénesis somática a partir de explantes de hoja de vitroplantas de *Coffea arabica* var. Caturra de origen adaxial-distal (A), adaxial-medial (B) y adaxial-proximal (C) luego de 80 días.

Cuadro 1. Cantidad de explantes obtenidos por tratamiento luego de 80 días de desarrollo.

| Orientación de la hoja | Punto de origen | Cantidad de explantes |
|------------------------|-----------------|-----------------------|
| Adaxial | Distal | 12 |
| | Medial | 13 |
| | Proximal | 12 |
| Abaxial | Distal | 12 |
| | Medial | 10 |
| | Proximal | 13 |
| Total de explantes | | 72 |

El análisis de conglomerados aplicado para la cuantificación vectorial dividió los datos en dos grupos, donde se agruparon los datos considerando la proximidad de las medias; es decir, al considerar todas las variables de respuesta conjuntamente, las combinaciones de tratamientos se agruparon en dos conglomerados que presentaron patrones de respuesta similares (Figura 2). La agrupación 1 se conformó por los tratamientos Abaxial/distal y Abaxial/proximal con una suma de cuadrados dentro del clúster (SS) de 0.0190, mientras que en la agrupación 2 se encontraban los tratamientos Adaxial/distal, Adaxial/medial, Adaxial/proximal y Abaxial/medial (SS = 0.1493). El conglomerado 2 exhibió el mayor promedio de regeneración con 0.36 (Cuadro 2). Dicho grupo engloba todas las muestras con disposición de hoja adaxial, y el tratamiento abaxial medial. La relación de SS entre el total de SS es de 46.7% asociado a la dispersión de los datos dentro del grupo de cada clúster.

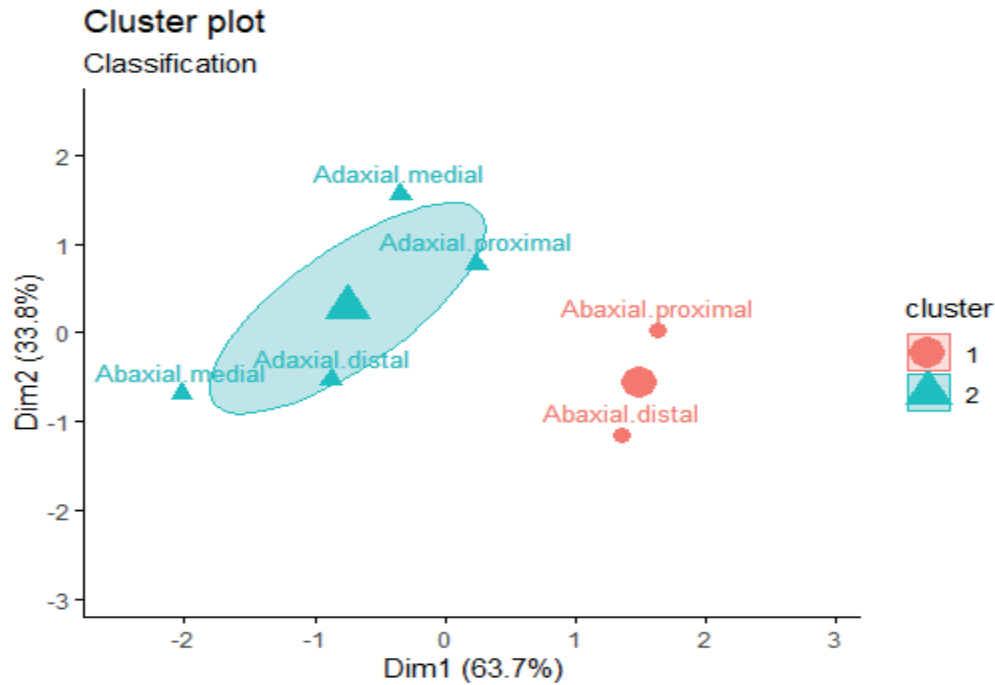


Figura 2. Agrupación de los datos a partir del análisis de clúster por K-medias para diferentes tratamientos de embriogénesis en *C. arábica* var. Caturra en base a su respuesta en callo, regeneración y oxidación, a partir de una métrica de distancia euclídea, un método de enlace completo y dos clúster. Representado con un 46.7% de varianza entre los clúster RStudio (v 2023.09.1).

Cuadro 2. Promedios de respuestas asociadas con la inducción de embriogénesis somática (callo, regeneración y oxidación) obtenidos a partir de explantes de hojas de vitroplantas de *Coffea arabica* var. Caturra a partir del análisis de clúster por K-medias.

| Variable | Clúster 1 (Abaxial/distal-proximal) (n = 25) (SS=0.019) | Clúster 2 (Adaxial/distal-medial-proximal; Abaxial/ medial) (n = 47) (SS=0.15) |
|--------------|---|---|
| Callo | 0.68 | 0.70 |
| Regeneración | 0.12 | 0.36 |
| Oxidación | 0.36 | 0.23 |

Nota: SS = suma de cuadrados dentro del clúster.

Las respuestas de cada tratamiento fueron representadas en forma de un mapa de calor (Figura 3), donde los colores representan diferentes niveles de respuesta junto a la escala de 0 a 1 donde la mayor cercanía a 1 representa que el tratamiento tiene una influencia significativa en la variable observada. El tratamiento con la hoja abaxial/medial generó más callo (0.92), probablemente relacionado con la cicatrización del tejido, y simultáneamente exhibió el mayor porcentaje de regeneración (0.46), que es la variable principal de interés en este estudio. El segundo tratamiento con mayor regeneración fue el adaxial distal (0.40), seguido del adaxial medial (0.33), indicando que estas partes de la planta permitieron la regeneración. Además, los tratamientos adaxiales restantes también mostraron regeneración, con una oxidación

relativamente reducida. Por otro lado, los tratamientos abaxiales distal y proximal muestran tonos más azulados en cuanto a regeneración, con un valor específico de 0.17 y 0.06, respectivamente, lo que sugiere una respuesta deficiente en esta variable, junto con mayor oxidación.

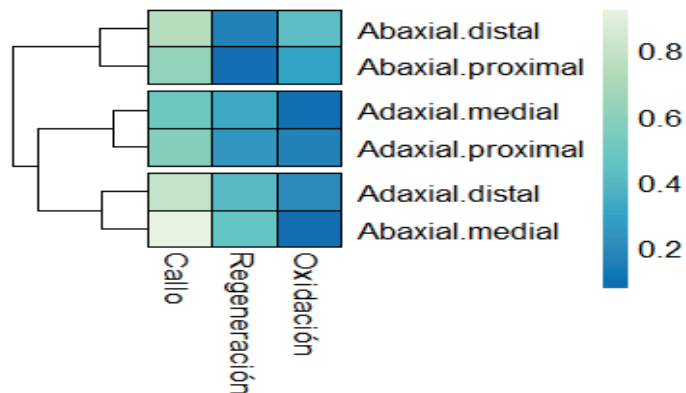


Figura 3. Mapa de calor de respuestas asociadas con inducción de embriogénesis somática (oxidación, regeneración y callo) respecto al tipo de explante de hojas de vitroplantas de *Coffea arabica* var. Caturra.

Discusión

La embriogénesis somática es una técnica importante para la propagación masiva de plantas como *C. arabica* var. Caturra. La posición de la hoja puede contribuir significativamente a la eficacia del proceso de embriogénesis somática, con variaciones que pueden representar hasta un 70% de diferencia en la formación de embriones dependiendo del protocolo y la posición de la hoja [21].

La orientación adaxial de las hojas hacia el medio de cultivo ha demostrado tener una respuesta eficiente y significativa en la formación de callos y embriones en esta especie [22]. Este aspecto posiblemente se debe a la riqueza en células activas de los tejidos epidérmicos y mesófilos presentes en el lado adaxial de la hoja, facilitando la absorción de nutrientes y fitohormonas esenciales para la embriogénesis somática. Además, la característica hipoestomática (estomas en el envés) de las hojas de *C. arábica* favorece el intercambio gaseoso cuando es cultivada con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo, lo que puede resultar en una formación de callos más eficiente [7].

La regeneración de embriones en *C. arábica* también está estrechamente relacionada con la biosíntesis local de auxinas y sus vías de transporte endógenas [23]. La acumulación de auxinas en los tejidos cercanos a las lesiones promueve la regeneración tisular, siendo fundamental para el proceso de embriogénesis [24]. Asimismo, el punto de origen de la hoja en la planta donadora también desempeña un papel crucial en la inducción de la embriogénesis somática a partir de tejido foliar, ya que las hojas jóvenes/adultas ubicadas en la parte media o distal de la planta son ricas en citocininas y auxinas, estimulando el desarrollo embrionario significativamente [21]. Adicionalmente, los explantes obtenidos de vitroplantas tienden a exhibir la mejor respuesta a la inducción de la embriogénesis somática debido a su composición parenquimatosa, caracterizada por un bajo nivel de diferenciación celular [25].

Se observó que las hojas tomadas de la parte medial de la planta mostraron una mayor capacidad de regeneración. La combinación de hojas con posición adaxial medial generó una respuesta más favorable, seguida de los tratamientos con hojas adaxiales tanto distales, basales y proximales, destacando además una reducida oxidación en el grupo 2, donde se observó un

36% de formación de embriones, mientras que en el grupo 1 fue del 12%. Estas observaciones se basan en un total de 72 inducciones de embriogénesis, en las cuales, la mayoría de los explantes del clúster 2 presentaron una capacidad superior para formar embriones somáticos.

Conclusiones

El cultivo de explantes de hoja de café (*C. arabica* var. Caturra) en posición abaxial mostró regeneración de plantas reducida, pues posiblemente se limita el intercambio gaseoso y conduce a un mayor nivel de oxidación. En consecuencia, se sugiere priorizar el uso de hojas tomadas de la parte medial de la planta, las cuales deben ser colocadas en el medio de cultivo en posición adaxial para obtener mayor porcentaje esperado de éxito en la inducción de la embriogénesis somática con vitroplantas de *C. arabica*. La capacidad de esta especie para originar embriones a partir de tejido somático representa una ventaja en la regeneración de plantas por cultivo de tejidos, siendo de interés para procesos de propagación a gran escala.

Agradecimientos

Los autores agradecen al grupo de Laboratorio de Cultivo de Tejidos II del Instituto Tecnológico de Costa Rica del año 2023 por su colaboración con el desarrollo de la técnica empleada, así como el uso de los datos obtenidos para esta investigación.

Referencias

- [1] S. Ahmed *et al.*, "Climate Change and Coffee Quality: Systematic Review on the Effects of Environmental and Management Variation on Secondary Metabolites and Sensory Attributes of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*," *Front. Plant Sci.*, vol. 12, Oct. 2021, doi: 10.3389/fpls.2021.708013.
- [2] R. H. Perez, Y. C. Adriana, A. C. Sancho, M. V. Chinchilla, and J. M. C. Subirachs, "Influencia de un nuevo bioestimulante sobre la floración y fructificación en café (*Coffea arabica* L.)," *Rev. ESPAMCIENCIA ISSN 1390-8103*, vol. 12, no. 1, Art. no. 1, Jun. 2021, doi: 10.51260/revista_espamciencia.v12i1.226.
- [3] Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), "Resultados generales de la actividad agrícola y forestal.," Encuesta Nacional Agropecuaria 2021, 2021. [Online]. Available: <https://admin.inec.cr/sites/default/files/2022-09/reagropecENAAGR%C3%8DCOLA2021-01.pdf>
- [4] S. Wagner, L. Jassogne, E. Price, M. Jones, and R. Preziosi, "Impact of Climate Change on the Production of *Coffea arabica* at Mt. Kilimanjaro, Tanzania," *Agriculture*, vol. 11, no. 1, Art. no. 1, Jan. 2021, doi: 10.3390/agriculture11010053.
- [5] C. A. Harvey *et al.*, "Transformation of coffee-growing landscapes across Latin America. A review," *Agron. Sustain. Dev.*, vol. 41, no. 5, p. 62, Aug. 2021, doi: 10.1007/s13593-021-00712-0.
- [6] C. M. Avila-Victor, V. M. Ordaz-Chaparro, E. de J. Arjona-Suárez, L. Iracheta-Donjuan, F. C. Gómez-Merino, and A. Robledo-Paz, "In Vitro Mass Propagation of Coffee Plants (*Coffea arabica* L. var. Colombia) through Indirect Somatic Embryogenesis," *Plants*, vol. 12, no. 6, Art. no. 6, Jan. 2023, doi: 10.3390/plants12061237.
- [7] M. E. Aguilar, X. Wang, M. Escalona, L. Yan, and L. Huang, "Somatic embryogenesis of Arabica coffee in temporary immersion culture: Advances, limitations, and perspectives for mass propagation of selected genotypes," *Front. Plant Sci.*, vol. 13, Oct. 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.994578.
- [8] H. A. Méndez-Hernández *et al.*, "In Vitro Conversion of *Coffea* spp. Somatic Embryos in SETIS™ Bioreactor System," *Plants*, vol. 12, no. 17, Art. no. 17, Jan. 2023, doi: 10.3390/plants12173055.
- [9] T. Hazubska-Przybył, M. K. Wawrzyniak, J. Kijowska-Oberc, A. M. Staszak, and E. Ratajczak, "Somatic Embryogenesis of Norway Spruce and Scots Pine: Possibility of Application in Modern Forestry," *Forests*, vol. 13, no. 2, Art. no. 2, Feb. 2022, doi: 10.3390/f13020155.
- [10] M. Zhang *et al.*, "Direct and Indirect Somatic Embryogenesis Induction in *Camellia oleifera* Abel," *Front. Plant Sci.*, vol. 12, p. 644389, Mar. 2021, doi: 10.3389/fpls.2021.644389.
- [11] R. Arimarsetiowati, B. S. Daryono, Y. T. M. Astuti, E. Prastowo, and E. Semiarti, "Regeneration and development of *Coffea arabica* L. plants through indirect somatic embryogenesis," *Coffee Sci. - ISSN 1984-3909*, vol. 18, pp. e182078–e182078, Mar. 2023, doi: 10.25186/v18i.2078.



- [12] A. M. Gatica-Arias, G. Arrieta, and A. M. Espinoza, "Direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuai: effect of tricontanol, light condition, and medium consistency," *Agron. Costarric.*, 2008.
- [13] M. S. D. Ibrahim, R. S. Hartati, R. Rubiyo, A. Purwito, and S. Sudarsono, "Direct and Indirect Somatic Embryogenesis on Arabica Coffee (*Coffea arabica*)," *Indones. J. Agric. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 79–86, Oct. 2013, doi: 10.21082/ijas.v14n2.2013.p79-86.
- [14] J. P. R. Martins, V. Verdoodt, M. Pasqual, and M. De Proft, "Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on in vitro propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae)," *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC*, vol. 123, pp. 121–132, 2015.
- [15] A. M. Capelo, S. Silva, G. Brito, and C. Santos, "Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive," *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC*, vol. 103, no. 2, pp. 237–242, Nov. 2010, doi: 10.1007/s11240-010-9773-x.
- [16] J. Sanchéz, R. C. Pintado, and J. J. D, "Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café," *Sci. Agropecu.*, vol. 10, no. 2, pp. 259–264, Apr. 2019, doi: 10.17268/sci.agropecu.2019.02.11.
- [17] R. M. Cabrera and K. J. Sánchez, *Regeneración de plántulas de café (Coffea arabica L.) mediante embriogénesis somática*. Instituto Nacional de Innovación Agraria, 2022. Accessed: Apr. 06, 2024. [Online]. Available: <https://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/2038>
- [18] T. Murashige and F. Skoog, "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures.," *Physiol Plant*, vol. 15, no. 3, pp. 473–497, 1962.
- [19] G. Morel and R. H. Wetmore, "Tissue Culture of Monocotyledons," *Am. J. Bot.*, vol. 38, no. 2, pp. 138–140, 1951, doi: 10.2307/2437836.
- [20] N. R. Martínez, "Establecimiento in vitro de café (*coffea arabica*) variedad cuscatleco por medio de microesquejes'.," bachelor, Universidad De El Salvador, 2014. Accessed: May 22, 2024. [Online]. Available: <https://oldri.ues.edu.sv/id/eprint/13735/>
- [21] A. Gatica-Arias, "Regeneración de plantas de café (*Coffea arabica* cv. Caturra y catuai) por embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja," 2002, Accessed: Apr. 06, 2024. [Online]. Available: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/5647>
- [22] E. Arias-Pérez, C. Lecona-Guzmán, F. Gutiérrez-Miceli, J. Montes-Molina, and N. Ruiz-Lau, "Encapsulation of Immature Somatic Embryos of *Coffea arabica* L. for *in Vitro* Preservation," *Phyton-Int. J. Exp. Bot.*, vol. 90, no. 6, pp. 1741–1748, 2021, doi: 10.32604/phyton.2021.016004.
- [23] K. A. Withers *et al.*, "Auxin Involvement in *Ceratopteris* Gametophyte Meristem Regeneration," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 21, Art. no. 21, Jan. 2023, doi: 10.3390/ijms242115832.
- [24] M. Omary, R. Matosevich, and L. Efroni, "Control sistémico de la regeneración de plantas y reparación de heridas." Accessed: Apr. 06, 2024. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1111/nph.18487>
- [25] C. M. Avila-Victor *et al.*, "Embriogenesis somatica directa e indirecta en *Coffea arabica* var. Colombia.," *AGROProductividad*, vol. 11, no. 4, pp. 30–36, Apr. 2018, Accessed: Apr. 06, 2024. [Online]. Available: <https://go.gale.com/ps/i.do?p=IFME&sw=w&issn=&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA619548664&sid=googleScholar&linkaccess=abs>

Reporte de Caso: detección y caracterización del virus del acucharamiento del tomate (TYLCV) en plantas de tomate del cantón de Sarchí, Costa Rica

Case Report: detection and characterization of the tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in tomato plants from Sarchí, Costa Rica

Alexandra Castro-Estrada¹, Estefanía Chavarría-Jiménez², Mareling García-Madrigal³, Verónica Ramos-Salazar⁴, Elsie Lorena Gorostiola-Martínez⁵, Randall Chacón-Cerdas⁶, Luis Alvarado-Marchena⁷

Castro-Estrada, A; Chavarría-Jiménez, E; García-Madrigal, M; Ramos-Salazar, V; Gorostiola-Martínez, E.L; Chacón-Cerdas, R; Alvarado-Marchena, L. Reporte de caso: detección y caracterización del virus del acucharamiento del tomate (TYLCV) en plantas de tomate del cantón de Sarchí, Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 167-178.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7621>

- 1 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 alecaest@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0000-0003-2051-6963>
- 2 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 emchavarría21@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0009-0009-2234-465X>
- 3 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 maregarciam1109@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0009-0008-2905-4770>
- 4 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 vrs31@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0009-0004-5933-7887>
- 5 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 egorostiola@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0009-0008-5915-7236>
- 6 Centro de investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 rchacon@itcr.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-5364-4649>
- 7 Centro de investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 lalvarado@itcr.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-1867-4543>



Palabras clave

Solanum lycopersicum; reacción en cadena de la polimerasa; microscopía electrónica de transmisión; *Geminiviridae*.

Resumen

El presente estudio se enfocó en investigar la presencia del virus del acucharamiento de la hoja del tomate (TYLCV) en plantas de tomate en el cantón de Sarchí, Costa Rica. Se recolectaron muestras de plantas con síntomas de la enfermedad, así como una muestra sin síntomas, y se realizaron análisis moleculares y microscópicos para detectar y caracterizar el virus. Se demostró la presencia del TYLCV en las muestras analizadas mediante PCR, y comparando con otras secuencias mediante un BLAST y un árbol filogenético. Además, se observaron diferencias en la gravedad de los síntomas entre las plantas expuestas al sol y a la sombra. En el análisis por microscopía electrónica de transmisión, se identificaron síntomas citopatológicos en los cloroplastos de las plantas infectadas, tales como deformación, presencia de gránulos de almidón, y cambios en la estructura y organización de los tilacoides. Estos hallazgos confirman la presencia del TYLCV en los cultivos de tomate analizados. Estos resultados pueden ser de utilidad para los agricultores y científicos que buscan desarrollar estrategias de manejo y control de esta enfermedad en los cultivos de tomate en Costa Rica.

Abstract

The present study focused on investigating the presence of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in tomato plants in Sarchí, Costa Rica. Samples from plants with symptoms of the disease, as well as a sample without symptoms, were collected, and molecular and microscopic analysis were performed to detect and characterize the virus. The results confirmed the presence of TYLCV in the analyzed samples by PCR amplification and by comparison with other sequences using a BLAST and a phylogenetic tree. In addition, differences in the severity of symptoms were observed between plants exposed to sun or in the shade. Cytopathological symptoms were identified by transmission electron microscopy in the chloroplasts of infected plants, such as deformation, presence of starch granules, and changes in the thylakoid structure. These findings confirm the presence of TYLCV in the tomato crops analyzed in this study. These results may be useful for farmers and scientists seeking to develop management and control strategies for this disease in tomato crops in Costa Rica.

Keywords

Solanum lycopersicum; polymerase chain reaction; transmission electron microscopy; *Geminiviridae*.

Introducción

En Costa Rica, el tomate (*Solanum lycopersicum*) ha ocupado lugares relevantes dentro de los cultivos anuales de mayor área de siembra; en el 2019 ocupó el tercer lugar de la categoría de hortalizas con 1001 ha (14%) [1] y actualmente se continúa monitoreando dentro de los cultivos de mayor importancia en el país según la última Encuesta Agrícola Nacional del 2022 [2]. El tomate se caracteriza por ser un cultivo intensivo realizado durante todo el año por pequeños y medianos productores [3]. Alrededor de mil agricultores están dedicados a la producción de tomate en diferentes lugares del país; sin embargo, el 90% de la producción se concentra en el Valle Central [4].

El cultivo del tomate se ve afectado por gran cantidad de plagas y enfermedades, causadas principalmente por insectos (*Heliothis virescens*), ácaros (*Tetranychus urticae*), hongos (*Botrytis cinerea*), bacterias (*Pseudomonas syringae* pv *tomato*) y virus [5], [6]. Dentro de este último grupo de fitopatógenos destacan los *Begomovirus*, pertenecientes a la familia *Geminiviridae*. Estos se caracterizan por su alta tasa de recombinación y tener un amplio rango de plantas hospederas, ocasionando dificultades en su manejo [7].

El TYLCV, también conocido como virus de la cuchara (o del acucharamiento, enrollamiento, o rizado de la hoja), causa el amarillamiento, reducción en el área de superficie, y el enrollamiento hacia arriba de los márgenes de las hojas de las plantas de tomate, retrasando su crecimiento y reduciendo la productividad del cultivo [8], [9]. El TYLCV es un begomovirus monopartito [10], [11] de ADN de cadena sencilla sentido positivo (+ssADN), lo que lo coloca en el Grupo II según la clasificación Baltimore [12], [13]. Este virus fue detectado en Costa Rica en el 2012 en cultivos de tomate [14] y desde entonces se han realizado estudios para la detección de razas, para conocer su efecto sobre estos cultivos, y para determinar la relación con su principal vector *Bemisia tabaci* (mosca blanca) [10], [11], [15], [16], ya que es considerado uno de los virus más importantes en el sector agrícola por el daño que se le atribuye a nivel mundial [17], [18], [19].

En América Central, los *Begomovirus* que infectan tomate han ocasionado pérdidas que sobrepasan el 60% de su producción; por esta razón, países como Guatemala y Nicaragua dejaron de cultivarlo por temporadas [20]. En cuanto a Costa Rica, ya desde el 2014 se reportan pérdidas desde el 50 al 80% en algunas de las zonas productoras [21]. En el estudio de Valverde-Méndez et al. [11], reportaron que las secuencias de los haplotipos encontradas en el país durante 2015-2016 presentaron similitud con haplotipos de China, Australia, Japón, México y Corea del Sur, validando la variabilidad y capacidad de dispersión del virus. Para el 2023, el virus se había detectado prácticamente en todo el país, y los agricultores continúan reportando pérdidas de hasta el 75% de la producción de tomate [22].

Debido a esta problemática, se hace importante la detección y caracterización de este virus y sus variables, para que se puedan identificar y tomar las medidas respectivas. Estudios previos realizados en Australia [23] y China [24] han realizado pruebas moleculares para la detección de este virus, así como su debida caracterización mediante herramientas bioinformáticas y árboles filogenéticos. Por lo tanto, el presente reporte de caso tuvo como objetivo documentar la implementación de un protocolo para la detección molecular del virus del acucharamiento de la hoja del tomate (TYLCV) en plantas de tomate en una finca específica de Sarchí, Costa Rica. Además, se buscó caracterizar y estudiar los síntomas causados por la infección en estas plantas, proporcionando datos valiosos que pueden contribuir al desarrollo de estrategias de manejo localizadas para esta enfermedad en Costa Rica.

Metodología

Los experimentos del presente estudio fueron realizados como parte de las prácticas del curso "Virología Molecular de Plantas" de la carrera de Ingeniería en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica en el 2023.

Recolección de muestras

La zona de muestreo corresponde a una finca de producción de tomate en la Región Central Occidental de Costa Rica, específicamente en el cantón de Sarchí en la provincia de Alajuela, durante el mes de marzo del año 2023.



Para la colecta de las muestras vegetales se seleccionaron de forma no aleatoria, nueve plantas individuales de tomate de la variedad 'Milano', ocho de las cuales presentaban síntomas potenciales de la enfermedad (amarillamiento y acucharamiento de las hojas), y una que no presentaba dicha sintomatología. Las muestras consistieron en tejido foliar próximo al meristemo apical, y específicamente en áreas con síntomas atribuibles al TYLCV. De cada planta se tomaron dos secciones de aproximadamente 1.0 cm², una de las cuales se colocó en bolsas estériles y se almacenó a -18 °C para las pruebas moleculares, mientras que la otra sección se introdujo en tubos con solución fijadora de Karnovsky [25] y se almacenó a 4 °C para su análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET).

Extracción de ADN

Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido, luego se molieron con un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. De este polvo se tomaron aproximadamente 40 mg para realizar la extracción de ADN. Para esta extracción se utilizó el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Estados Unidos). Las muestras de ADN se almacenaron a -20° C hasta su uso.

Detección del virus por PCR

Para la amplificación por PCR se utilizaron los cebadores reportados por Park *et al.* [26] para la detección de distintas variantes del virus TYLCV (*forward* 5'-TTTCCTGAATCTGTTACACGGATT-3' y *reverse* 5'-AACTAATGCCTGTTCCCTTCATTC-3'), los cuales amplifican un producto de aproximadamente 740 pb e incluyen parte de la región intergénica, el gen de la proteína de cubierta (CP o V2), y parte de la proteína de movimiento (MP o V1). Además, el programa de termociclado corresponde a una modificación del propuesto por Park *et al.* [26]. El programa utilizado fue el siguiente: 30 s a 98 °C desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos térmicos (10 s a 98 °C de desnaturalización, 10 s a 60 °C de apareamiento, y 45 s a 72 °C de extensión) y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los amplicones fueron luego analizados en un gel de agarosa con amortiguador 1x TAE (Tris-acetato-EDTA). La corrida se realizó durante 30 minutos a 100 voltios.

Análisis bioinformático

Luego de realizar la secuenciación de Sanger del amplicón obtenido de la muestra 9, se envió la muestra a secuenciar a MacroGen USA. Posteriormente, se realizó un ensamblaje de secuencias mediante CAP3® [27]. Luego, se realizó una comparación de los nucleótidos utilizando la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a través de una búsqueda Nucleoide BLAST. Se realizó una reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud (ML) [28], usando las accesiones del GenBank más estrechamente emparentadas, seleccionadas mediante un análisis BLAST para identificar las secuencias con mayor similitud. El análisis filogenético se realizó utilizando el software MEGA v11.0.13 [29]. Para calcular la distancia genética entre aislamientos considerando el número de sustituciones de bases y eliminando posiciones con datos faltantes se utilizó el modelo Tamura-Nei [30] y un bootstrap de 3000. Adicionalmente, se identificó la variante viral de TYLCV mediante *in silico* RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, por sus siglas en inglés), utilizando el software SnapGene 7.2.0. Se utilizaron las enzimas de restricción BssSI, Faul, Ddel y Avall las cuales ya se han utilizado en otros estudios de este tipo [26], [31], [32], [33]. En el Cuadro 1 se encuentran las secuencias utilizadas tanto para la reconstrucción filogenética como para la identificación mediante *in silico* RFLP.

Cuadro 1. Acciones consultadas en el NCBI para variantes del virus TYLCV y su lugar de origen.

| Variante viral | País | Accesión de GeneBank | Referencia |
|----------------------|----------------|----------------------|------------|
| TYLCV-IL (SR) | Siria | ON864376.1 | [34] |
| TYLCV-IL (US-F10-04) | Estados Unidos | AY530931 | [35] |
| TYLCV-KR | Corea | JN680149 | [36] |
| TYLCV-Mdl (Jo-Cuc) | Jordania | EU143745 | [37] |
| GRBaV* | Canadá | JX559642 | [38] |

**Grapevine red blotch virus*; grupo externo de referencia.

Análisis citopatológicos mediante MET

Segmentos de tejido sintomáticos de infección con TYLCV y colectados de hojas de tomate (0.5 cm²) fueron procesadas de acuerdo con lo propuesto por Alvarado *et al.* [25]. Esto consistió en una fijación durante 2 días a 4 °C en glutaraldehído y paraformaldehído al 2% v/v disuelto en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.2 (solución de Karnovsky), seguido de una fijación en tetraóxido de osmio (OsO₄) al 2 % por 2 horas. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas en diluciones graduales de acetona y fueron luego polimerizadas en resina de baja viscosidad Spurr[®]. Las muestras ultrafinas se tiñeron con 2% acetato de uranilo y una solución saturada de SATO plomo durante 10 minutos, respectivamente. Finalmente, las muestras se visualizaron en un MET Jeol JEM 2010 (JEOL, Japón).

Resultados y discusión

Al realizar el muestreo, se observó una mayor gravedad de la sintomatología en las plantas expuestas mayoritariamente al sol respecto a las que se encontraban a la sombra en el tomatal muestreado (Figura 1). Para descartar la posibilidad de que estos síntomas se debieran a una simple falta de agua, se verificó que todas las plantas recibieran un riego adecuado y uniforme durante el periodo de estudio. Además, los síntomas observados, como el amarillamiento y el acucharamiento de las hojas, son característicos de la infección por TYLCV y no de la deshidratación, lo que refuerza la conclusión de que la sintomatología se debe a la presencia del virus [11].

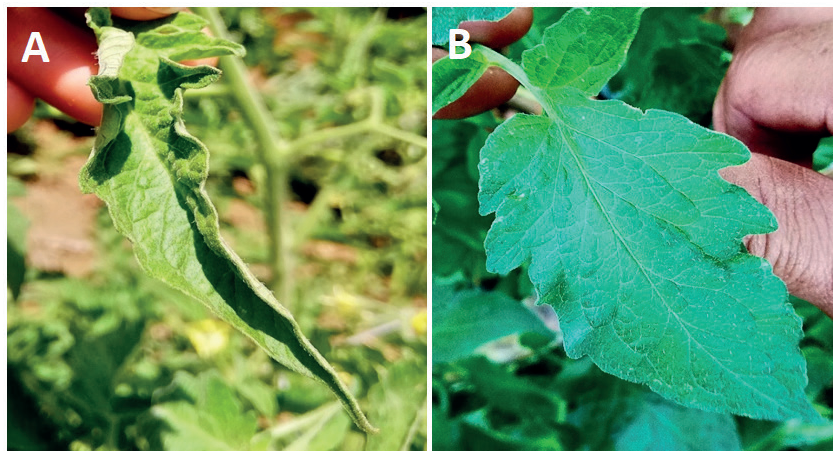


Figura 1. Muestra representativa de las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Milano) colectadas en Sarchí, Costa Rica. A, hoja de planta expuesta al sol y presuntamente infectada con el virus TYLCV; B, hoja de planta en sombra y presuntamente infectada con el virus TYLCV.

Investigaciones previas han demostrado que las temperaturas superiores a 25°C pueden agravar los síntomas de la infección viral en las hojas, lo cual concuerda con el hecho de que algunos tipos de estrés abiótico están relacionados con el debilitamiento de los mecanismos de defensa de la planta, aumentando la susceptibilidad a la infección de patógenos [35], [37], [39], [40]. Por ejemplo, en la interacción entre el virus SCMV y el maíz se ha demostrado que los síntomas de la infección son más graves en luminosidad que en sombra [41].

En el tomate, algunos de los genes afectados por las temperaturas elevadas son los codificantes de proteínas de choque térmico (HSP) [35], [40]. Algunas de las funciones de las HSP incluyen prevenir agregados proteicos, así como degradación y plegamiento inadecuado de proteínas; no obstante, pueden ser secuestradas por virus de plantas que buscan asociarse con chaperonas del huésped para potenciar su infección [42], [43]. De hecho, el desarrollo de agregados proteicos formados por proteínas de la cápside viral, ADN del virus y proteínas de estrés celular como las HSP, se considera como un signo de una invasión viral exitosa de parte del TYLCV [28], [43]. Además, al mantener las chaperonas en agregados se disminuye la eficiencia de la respuesta al estrés, incluso ante una eventual recuperación de la planta [35].

Detección de TYLCV mediante PCR

En la electroforesis realizada para el análisis de los amplicones producto del PCR, se obtuvo como resultado una banda en todas las muestras con síntomas y en la muestra sin síntomas. Según el marcador molecular, estas bandas se encuentran entre las 650-850 pb (Figura 2). Lo anterior coincide con el tamaño del producto de PCR esperado para los cebadores de ADN utilizados, el cual se encuentra entre 739-740 pb [26], lo que sugiere que la totalidad de las muestras analizadas, incluyendo la muestra asintomática, fueron positivas con respecto a la presencia de TYLCV. Esto indica que la muestra asintomática también estaba infectada con el virus, a pesar de no presentar síntomas visibles.

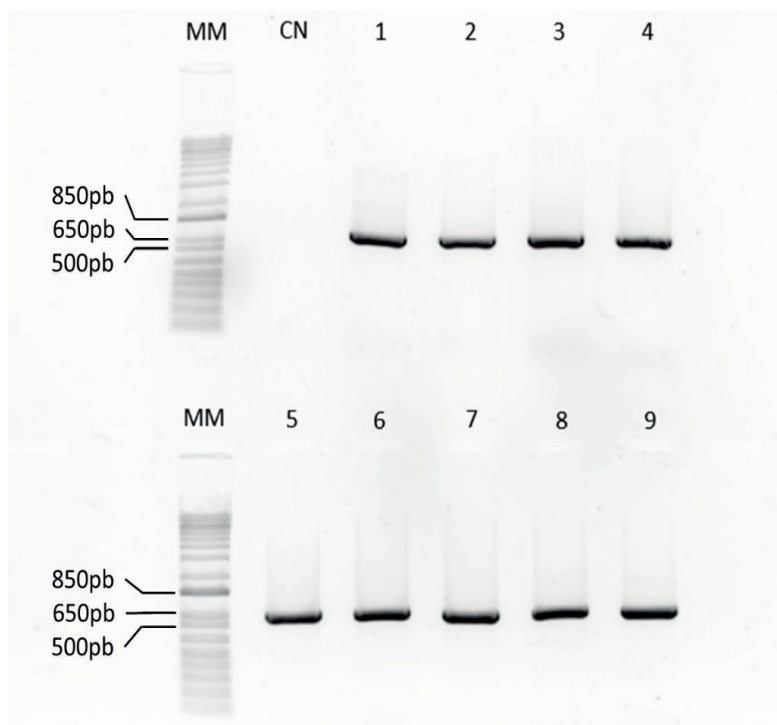


Figura 2. Análisis de ADN viral del TYLCV en gel de agarosa con los productos de la amplificación de PCR. MM, marcador molecular (Invitrogen 1kb plus DNA ladder Thermofisher); CN, control negativo (agua); 1-9, muestras de hoja de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Milano) colectadas en Sarchí, Costa Rica, con y sin sintomatología aparente de infección por TYLCV.

Análisis citopatológico mediante MET

Con el fin de realizar el estudio de citopatología con MET, se seleccionó la muestra 9 debido al resultado positivo en la detección por PCR (Figura 2) y dado que durante la recolección se observó que la planta de origen presentaba síntomas más evidentes en comparación con las demás.

En la Figura 3 se observan los posibles síntomas citopatológicos generados por TYLCV en los cloroplastos de las hojas de tomate analizadas. El cloroplasto tiene apariencia hinchada, presenta reducción en las granas, y una organización anormal de los tilacoides; además, hay presencia de plastoglóbulos y gránulos de almidón anormalmente grandes (Figura 3A). La presencia de estos últimos puede ocurrir por la expresión constitutiva de MP virales, las cuales pueden llegar a desencadenar síntomas típicos como acumulación anormal de azúcar, clorosis, enanismo y fotosíntesis reducida [36].

Además, tentativamente se observaron partículas virales siendo transportadas a través del plasmodesmo (Figura 3B). Ya se ha reportado previamente una relación compleja entre los geminivirus y los cloroplastos para el movimiento intercelular a través del plasmodesmo [44]. Las anomalías de los cloroplastos son comunes durante la interacción huésped-virus, lo cual se asocia con la sintomatología [36], y genera disminución en la capacidad fotosintética de los cloroplastos [37], lo cual coincide con los síntomas reportados para TYLCV [8], [9].

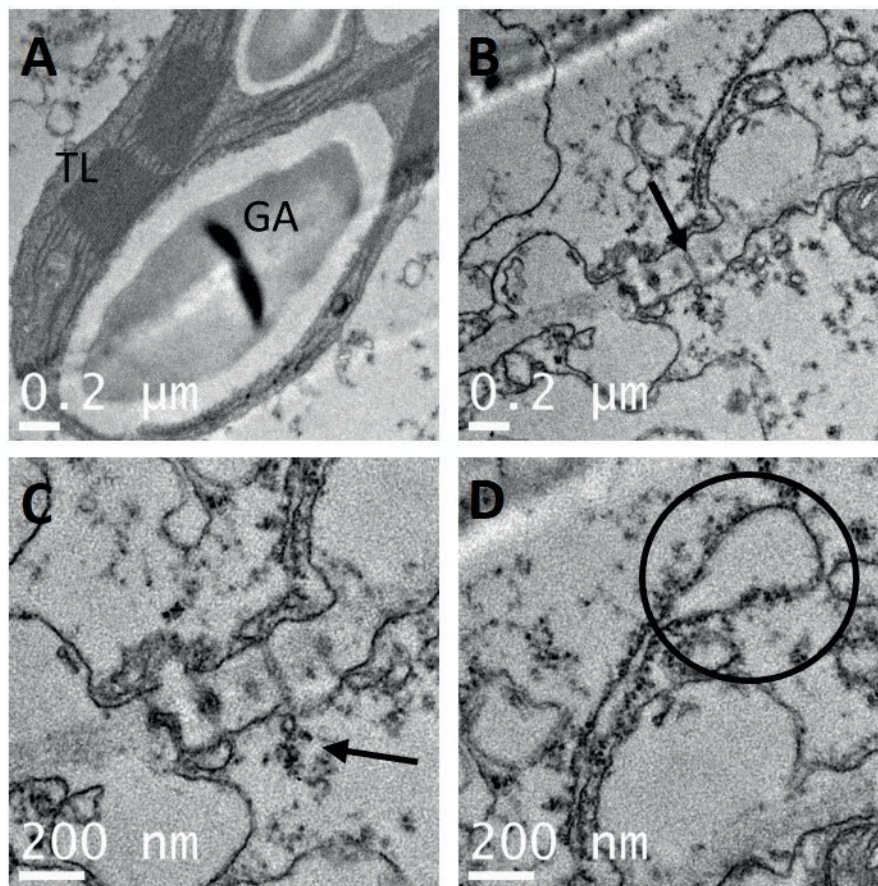


Figura 3. Microscopía electrónica de transmisión de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Milano) colectadas en Sarchí, Costa Rica, con sintomatología aparente de infección por TYLCV. A, deformación de cloroplasto debido a presencia de gránulos de almidón (TL, tilacoides presionados contra la membrana del cloroplasto debido a la presencia de gránulos de almidón; GA, gránulos de almidón

dentro del cloroplasto); B, plasmodesmos (flecha); C, presuntas partículas virales transportándose a través de los plasmodesmos (flecha); D, presunta acumulación de partículas virales (círculo).

Análisis bioinformático

Se realizó un BLAST en el NCBI que dio como resultado un 100% de similitud con la accesión ON864376.1 (TYLCV-IL (SR)), la cual corresponde a un estudio realizado en Siria en el año 2022 [34]. Esto se confirmó mediante el análisis de RFLP *in silico*, donde se puede observar que la secuencia TYCLV-IL (SR) presenta un patrón de restricción idéntico al amplicón obtenido experimentalmente, y los fragmentos son cortados por las mismas enzimas (BssSI, Avall) (Figura 4).

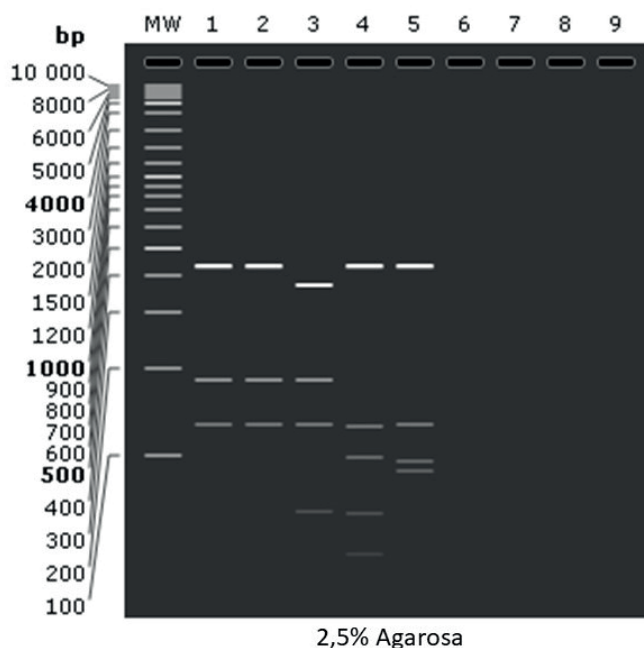


Figura 4. Resultados del RFLP *in silico* realizado al amplicón de PCR secuenciado a partir de una muestra de hoja de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Milano) colectada en Sarchí, Costa Rica, con sintomatología aparente de infección por TYLCV. 1, amplicón del PCR; 2, TYLCV-IL(SR); 3, TYLCV-IL(US-F10-04); 4, TYLCV-KR; 5, TYLCV-Mdl (Jo-Cuc). (SnapGene 7.2.0).

En cuanto al árbol filogenético, este respalda el resultado obtenido con el RFLP, al mostrar el amplicón experimental en el mismo clado que la secuencia TYCLV-IL (SR); confirmando así la identidad del amplicón secuenciado (Figura 5). El uso de un árbol de máxima verosimilitud produce mejores estimaciones iniciales cuando hay muchas inserciones, eliminaciones y datos faltantes en las secuencias [45], tal como es el caso del amplicón experimental, el cual no es el genoma completo. Estudios anteriores han utilizado este árbol para determinar la presencia de la cepa Israel del TYLCV en dos sitios distintos de España [46], permitiendo confirmar la relación de los mismos gracias a su proximidad. También en el estudio de Valverde-Méndez [11] lograron establecer similitud entre las cepas costarricenses y haplotipos reportados en Corea del Sur, Japón, Estados Unidos, México y Australia, guardando algunas coincidencias con nuestro análisis.

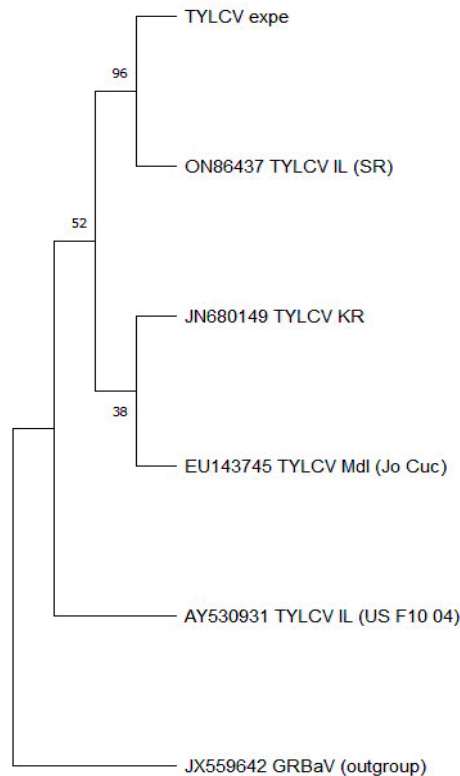


Figura 5. Árbol filogenético de máxima verosimilitud comparando el amplicón de PCR secuenciado a partir de una muestra de hoja de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Milano) colectada en Sarchí, Costa Rica, con sintomatología aparente de infección por TYLCV, con las accesiones del GeneBank (NCBI) más estrechamente emparentadas (MEGA v11.0.13).

Conclusiones

Se determinó la presencia del virus TYLCV correspondiente a la variedad de Israel (IL) en las muestras analizadas provenientes de cultivos de tomate colectadas el cantón de Sarchí, Costa Rica, confirmado mediante técnicas moleculares como la PCR, secuenciación y análisis bioinformáticos. Además, se observaron diferencias en la severidad de los síntomas entre las plantas expuestas al sol y a la sombra, lo cual sugiere la influencia de factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad. Los análisis microscópicos revelaron síntomas citopatológicos en los cloroplastos de las plantas infectadas, lo cual sugiere alteraciones en el funcionamiento de estos orgánulos celulares clave para la fotosíntesis y el crecimiento vegetal, y coincide con la sintomatología característica de la infección viral.

El TYLCV ha sido monitoreado por la Universidad de Costa Rica y el gobierno costarricense desde hace varios años, utilizando diversos métodos moleculares. Sin embargo, la detección y caracterización del TYLCV en los cultivos de tomate en el cantón resalta la importancia de la vigilancia continua y la implementación de medidas de control para minimizar los impactos económicos y agrícolas de esta enfermedad. La colaboración entre agricultores, científicos y autoridades es fundamental para proteger la producción de tomate y garantizar la seguridad alimentaria en el país. Se recomienda la realización de estudios adicionales para comprender mejor y reforzar la interacción de los factores intrínsecos y extrínsecos asociados a la enfermedad, virulencia y patogenicidad. Esto permitirá desarrollar enfoques más eficientes y específicos para mitigar los efectos del TYLCV y proteger la producción de tomate en Costa



Rica. Cabe resaltar que investigadores de la Universidad de Costa Rica han desarrollado y distribuido una variedad de tomate (llamada *Acorazado*) resistente al TYLCV, la cual está disponible para los agricultores desde el 2023 [22].

Referencias

- [1] I. N. de E. y C. INEC, "Encuesta Nacional Agropecuaria 2019 RESULTADOS GENERALES DE LA ACTIVIDAD AGRÍCOLA Y FORESTAL," San José, Costa Rica, Sep. 2020. Accessed: Jul. 16, 2024. [Online]. Available: https://admin.inec.cr/sites/default/files/media/reena-cultivos2019_2.pdf
- [2] I. N. de E. y C. INEC, "Encuesta Nacional Agropecuaria 2022 RESULTADOS GENERALES DE LA ACTIVIDAD AGRÍCOLA Y FORESTAL," San José, Costa Rica, Sep. 2023. Accessed: Jul. 16, 2024. [Online]. Available: <https://admin.inec.cr/sites/default/files/2023-10/reagropecENAPECUARIO2022-01.pdf>
- [3] M. Blanco-Meneses, O. Castro-Zúñiga, and A. Calderón-Abarca, "Diagnóstico del uso de antibióticos en regiones productoras de tomate en Costa Rica," *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*, vol. 47, no. 1, pp. 87-99, Feb. 2023, doi: 10.15517/RAC.V47I1.53967.
- [4] L. M. López-Marín, *Manual técnico del cultivo del tomate Solanum lycopersicum*, 1era ed., vol. 01. San José, Costa Rica: Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), 2017. Accessed: Jul. 14, 2024. [Online]. Available: <https://repositorio.iica.int/handle/11324/3143>
- [5] C. Ramírez-Vargas and J. Nienhuis, "Cultivo protegido de hortalizas en Costa Rica," *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 25, no. 2, p. pág. 10-20, Aug. 2012, doi: 10.18845/tm.v25i2.303.
- [6] F. E. Martínez-Ruiz, L. Cervantes-Díaz, C. E. Ail-Catzím, L. G. Hernández-Montiel, C. L. D. T. Sánchez, and E. O. Rueda-Puente, "Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico," *European Scientific Journal, ESJ*, vol. 12, no. 18, pp. 232-232, Jun. 2016, doi: 10.19044/ESJ.2016.V12N18P232.
- [7] N. Barboza, M. Blanco-Meneses, P. Esker, E. Moriones, and A. K. Inoue-Nagata, "Distribution and diversity of begomoviruses in tomato and sweet pepper plants in Costa Rica," *Annals of Applied Biology*, vol. 172, no. 1, pp. 20-32, Jan. 2018, doi: 10.1111/AAB.12398.
- [8] R. S. Ramos, L. Kumar, F. Shabani, and M. C. Picanço, "Risk of spread of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in tomato crops under various climate change scenarios," *Agric Syst*, vol. 173, pp. 524-535, Jul. 2019, doi: 10.1016/J.AGSY.2019.03.020.
- [9] A. H. El-Sappah *et al.*, "Natural resistance of tomato plants to Tomato yellow leaf curl virus," *Front Plant Sci*, vol. 13, no. 1, p. 1081549, Dec. 2022, doi: 10.3389/FPLS.2022.1081549/BIBTEX.
- [10] M. R. Maliano, M. R. Rojas, M. A. Macedo, N. Barboza, and R. L. Gilbertson, "The invasion biology of tomato begomoviruses in Costa Rica reveals neutral synergism that may lead to increased disease pressure and economic loss," *Virus Res*, vol. 317, p. 198793, Aug. 2022, doi: 10.1016/J.VIRUSRES.2022.198793.
- [11] K. Valverde-Méndez, E. J. Hernández, D. Matamoros, and N. Barboza, "Begomovirus diversity in tomato crops in Costa Rica," *Annals of Applied Biology*, vol. 183, no. 3, pp. 231-243, Nov. 2023, doi: 10.1111/AAB.12850.
- [12] A. Varsani *et al.*, "Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus," *Arch Virol*, vol. 159, no. 8, pp. 2193-2203, Mar. 2014, doi: 10.1007/S00705-014-2050-2/FIGURES/4.
- [13] A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz, "Family - Geminiviridae," in *Virus Taxonomy*, vol. 01, A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz, Eds., Elsevier, 2012, pp. 351-373. doi: 10.1016/B978-0-12-384684-6.00035-5.
- [14] N. Barboza, M. Blanco-Meneses, M. Hallwass, E. Moriones, and A. K. Inoue-Nagata, "First Report of Tomato yellow leaf curl virus in Tomato in Costa Rica," <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0881-PDN>, vol. 98, no. 5, p. 699, Apr. 2014, doi: 10.1094/PDIS-08-13-0881-PDN.
- [15] N. Barboza *et al.*, "Achievements in the epidemiology of begomoviruses and their vector Bemisia tabaci in Costa Rica," *Rev Biol Trop*, vol. 67, no. 3, pp. 419-453, Jun. 2019, doi: 10.15517/RBT.V67I3.33457.
- [16] L. Hilje and P. A. Stansly, "Preferencia de hospedantes por dos biotipos de Bemisia tabaci en Costa Rica y Florida," *Agronomía Mesoamericana*, vol. 29, no. 3, pp. 585-595, 2018, doi: 10.15517/MA.V29I3.311742.
- [17] E. Moriones and J. Navas-Castillo, "Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide," *Virus Res*, vol. 71, no. 1-2, pp. 123-134, Nov. 2000, doi: 10.1016/S0168-1702(00)00193-3.
- [18] W. Ning *et al.*, "Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Virus by Bemisia tabaci as Affected by Whitefly Sex and Biotype," *Scientific Reports 2015 5:1*, vol. 5, no. 1, pp. 1-8, May 2015, doi: 10.1038/srep10744.

- [19] A. Prasad, N. Sharma, G. Hari-Gowthem, M. Muthamilarasan, and M. Prasad, "Tomato Yellow Leaf Curl Virus: Impact, Challenges, and Management," *Trends Plant Sci*, vol. 25, no. 9, pp. 897–911, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.TPLANTS.2020.03.015.
- [20] M. K. Nakhla, A. Sorensen, D. P. Maxwell, L. Mejía, P. Ramírez, and J. P. Karkashian, "Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in central America and development of DNA-based detection methods," *Acta Horti*, vol. 695, pp. 277–288, 2005, doi: 10.17660/ACTAHORTIC.2005.695.31.
- [21] C. A. Parral, "Virus de la cuchara amenaza producción de tomate del país," Portal de la Investigación-Vicerrectoría de Investigación UCR. Accessed: Jul. 16, 2024. [Online]. Available: <https://vinv.ucr.ac.cr/es/noticias/virus-de-la-cuchara-amenaza-produccion-de-tomate-del-pais>.
- [22] P. Mora-Vargas, "Nuevo tipo de tomate podría salvar hasta un 75 % de las cosechas," Portal de la Investigación-Vicerrectoría de Investigación UCR. Accessed: Jul. 16, 2024. [Online]. Available: <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2023/12/12/nuevo-tipo-de-tomate-podria-salvar-hasta-un-75-de-las-cosechas.html>.
- [23] S. L. Van Brunschot, D. M. Persley, A. D. W. Geering, P. R. Campbell, and J. E. Thomas, "Tomato yellow leaf curl virus in Australia: Distribution, detection and discovery of naturally occurring defective DNA molecules," *Australasian Plant Pathology*, vol. 39, no. 5, pp. 412–423, 2010, doi: 10.1071/AP10083/METRICS.
- [24] Y. Xie, X. Jiao, X. Zhou, H. Liu, Y. Ni, and J. Wu, "Highly sensitive serological methods for detecting tomato yellow leaf curl virus in tomato plants and whiteflies," *Virology*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, May 2013, doi: 10.1186/1743-422X-10-142/FIGURES/9.
- [25] L. Alvarado-Marchena, C. Alvarado-Ulloa, R. Chacón Cerdas, A. Schmidt-Durán, and D. Flores-Mora, "Viral clearance for three varieties of *Ficus carica* L. infected with the Fig Mosaic Virus (FMV)," *Plant Cell Biotechnol Mol Biol*, vol. 18, no. 7–8, pp. 395–408, Oct. 2017, Accessed: Jul. 14, 2024. [Online]. Available: <https://ikpress.org/index.php/PCBMB/article/view/1727/1630>
- [26] J. Park, E. J. Kil, J. Kim, Y. G. Shin, N. Y. Heo, and S. Lee, "Rapid Detection and Identification of Six Tomato yellow leaf curl virus Isolates from Different Regions Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis," *Journal of Phytopathology*, vol. 162, no. 4, pp. 209–217, Apr. 2014, doi: 10.1111/JPH.12172.
- [27] X. Huang and A. Madan, "CAP3: A DNA Sequence Assembly Program," *Genome Res*, vol. 9, no. 9, pp. 868–877, Sep. 1999, doi: 10.1101/GR.9.9.868.
- [28] M. R. Hosseinzadeh, M. Shams-Bakhsh, S. K. Osaloo, and J. K. Brown, "Phylogenetic relationships, recombination analysis, and genetic variability among diverse variants of tomato yellow leaf curl virus in Iran and the Arabian Peninsula: Further support for a TYLCV center of diversity," *Arch Virol*, vol. 159, no. 3, pp. 485–497, Mar. 2014, doi: 10.1007/S00705-013-1851-Z/TABLES/4.
- [29] K. Tamura, G. Stecher, and S. Kumar, "MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11," *Mol Biol Evol*, vol. 38, no. 7, pp. 3022–3027, Jun. 2021, doi: 10.1093/MOLBEV/MSAB120.
- [30] K. Tamura and M. Nei, "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees," *Mol Biol Evol*, vol. 10, no. 3, pp. 512–526, 1993, doi: 10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A040023.
- [31] G. P. Accotto, J. Navas-Castillo, E. Noris, E. Moriones, and D. Louro, "Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe," *Eur J Plant Pathol*, vol. 106, no. 2, pp. 179–186, 2000, doi: 10.1023/A:1008736023293/METRICS.
- [32] A. Fanigliulo *et al.*, "Analysis of the spatial spread of two Begomoviruses, TYLCV and TYLCSV, in tomato hydroponics in Calabria region, Italy," *Acta Horti*, vol. 789, pp. 127–132, 2008, doi: 10.17660/ACTAHORTIC.2008.789.16.
- [33] I. Fekih-Hassan *et al.*, "Detection of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in Tunisia," *EPPO Bulletin*, vol. 33, no. 2, pp. 347–350, Aug. 2003, doi: 10.1046/J.1365-2338.2003.00646.X.
- [34] A. A. Hasan and A. M. Mouhanna, "Efficiency of transmission of Tomato yellow leaf curl virus using single leaflet grafting," *Damascus University Journal of agriculture sciences*, vol. 39, no. 1, pp. 1–12, Mar. 2022.
- [35] A. Ghandi *et al.*, "Tomato yellow leaf curl virus infection mitigates the heat stress response of plants grown at high temperatures," *Scientific Reports* 2016 6:1, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2016, doi: 10.1038/srep19715.
- [36] A. Singh and I. K. Singh, "Molecular aspects of plant-pathogen interaction," *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*, pp. 1–351, Feb. 2018, doi: 10.1007/978-981-10-7371-7/COVER.
- [37] J. Zhao, X. Zhang, Y. Hong, and Y. Liu, "Chloroplast in plant-virus interaction," *Front Microbiol*, vol. 7, no. OCT, p. 219889, Oct. 2016, doi: 10.3389/FMICB.2016.01565/BIBTEX.
- [38] B. Krenz, J. R. Thompson, M. Fuchs, and K. L. Perry, "Complete Genome Sequence of a New Circular DNA Virus from Grapevine," *J Virol*, vol. 86, no. 14, pp. 7715–7715, Jul. 2012, doi: 10.1128/JVI.00943-12.

- [39] T. G. Shibaeva, E. G. Sherudilo, E. Ikkonen, A. A. Rubaeva, I. A. Levkin, and A. F. Titov, "Effects of Extended Light/Dark Cycles on Solanaceae Plants," *Plants* 2024, Vol. 13, Page 244, vol. 13, no. 2, p. 244, Jan. 2024, doi: 10.3390/PLANTS13020244.
- [40] R. Gorovits, I. Sobol, M. Altaieb, H. Czosnek, and G. Anfoka, "Taking advantage of a pathogen: understanding how a virus alleviates plant stress response," *Phytopathology Research*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, Dec. 2019, doi: 10.1186/S42483-019-0028-4/FIGURES/2.
- [41] T. Jiang *et al.*, "Activated malate circulation contributes to the manifestation of light-dependent mosaic symptoms.," *Cell Rep*, vol. 42, no. 4, pp. 112333–112333, Apr. 2023, doi: 10.1016/J.CELREP.2023.112333.
- [42] T. Nusayr, "The role of heat-shock proteins, in vector-virus transmission," in *Applied Plant Virology: Advances, Detection, and Antiviral Strategies*, 01 ed., vol. 01, L. P. Awasthi, Ed., Academic Press, 2020, pp. 249–254. doi: 10.1016/B978-0-12-818654-1.00019-0.
- [43] R. Gorovits, A. Moshe, M. Ghanim, and H. Czosnek, "Recruitment of the Host Plant Heat Shock Protein 70 by Tomato Yellow Leaf Curl Virus Coat Protein Is Required for Virus Infection," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, p. e70280, Jul. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0070280.
- [44] B. C. Reagan and T. M. Burch-Smith, "Viruses reveal the secrets of plasmodesmal cell biology," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 33, no. 1, pp. 26–39, Nov. 2020, doi: 10.1094/MPMI-07-19-0212-FI/ASSET/IMAGES/LARGE/MPMI-07-19-0212-FI_F1.JPEG.
- [45] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods," *Mol Biol Evol*, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739, Oct. 2011, doi: 10.1093/MOLBEV/MSR121.
- [46] F. Péréfarres *et al.*, "Occurrence of the Israel strain of Tomato yellow leaf curl virus in New Caledonia and Loyalty Islands," *New Dis Rep*, vol. 25, no. 1, pp. 6–6, Jan. 2012, doi: 10.5197/J.2044-0588.2012.025.006.

Agentes químicos que dañan al ADN: inducción de genotoxicidad en la vida diaria, riesgo y prevención


DNA-damaging chemical agents: genotoxicity induction in daily life, risk and prevention


Virginia Montero-Campos¹, Ying Yi Huang-
Qiu², Henry Rodríguez-Sevilla³

Montero-Campos, V; Huang-Qiu, Y.Y; Rodríguez-Sevilla, H.
Agentes químicos que dañan al ADN: inducción de geno-
toxicidad en la vida diaria, riesgo y prevención. *Tecnología
en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro
de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág.
179-188.


 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7622>


1 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 vmontero@itcr.ac.cr


 <https://orcid.org/0000-0002-2666-5030>

2 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 yingyi2711@gmail.com

 <https://orcid.org/0009-0002-7588-7905>

3 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 johense902@gmail.com

 <https://orcid.org/0009-0001-0333-4175>



Palabras clave

Epigenética; expresión génica; mutágenos; cáncer.

Resumen

Los agentes genotóxicos son sustancias que tienen la capacidad de inducir daño en el ADN; este daño puede ser causado por agentes químicos, biológicos y físicos. Su capacidad de inducir daño está influida por la dosis recibida, el tiempo y la vía de exposición, y la constitución genética del individuo, y puede estar relacionada con hábitos de vida y el lugar de residencia. Relacionado directamente con la genotoxicidad está la epigenética; esta ciencia es el estudio de los cambios en la función de los genes que son hereditarias y que no se pueden atribuir a alteraciones de la secuencia de nucleótidos en el ADN. Estos procesos regulan la expresión de genes por medio de la modulación de la estructura de la cromatina. La interacción de factores genéticos y no genéticos involucrados en el control de patrones hereditarios puede degenerar en enfermedades o trastornos complejos como cáncer, infertilidad, procesos inflamatorios, enfermedades degenerativas y disrupción endocrina, padecimientos que pueden ser transmitidos a la descendencia. Varios estudios epidemiológicos han demostrado que los cambios en el estilo de vida y los hábitos alimentarios podrían prevenir o reducir la incidencia del cáncer, especialmente mediante el aumento del nivel de antioxidantes y disminuyendo la formación de radicales libres con efecto intracelular. En el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica se investigan diversos agentes genotóxicos a los cuales está expuesta la población en Costa Rica, incluyendo bacterias como *Helicobacter pylori*, microplásticos en especies marinas de consumo humano, y metales pesados en aguas potables y en suelos. Estas investigaciones son relevantes para determinar la presencia de estos agentes genotóxicos en el país, evaluar el riesgo de exposición de la población, y así generar estrategias de prevención y mitigación del daño.

Keywords

Epigenetics; gene expression; mutagens; cancer.

Abstract

Genotoxic agents are substances that can induce DNA damage; this damage can be caused by chemical, biological, and physical agents. The dose, time and route of exposure, and the genetic constitution of the individual influence the capacity of these agents to induce damage and may also be related to lifestyle habits and place of residency. Directly associated with genotoxicity is epigenetics, which is the study of hereditary changes in the function of hereditary genes not attributed to alterations in the DNA sequence. These processes regulate the expression of genes through the modulation of chromatin structure. The interaction of genetic and non-genetic factors in the control of hereditary patterns of this expression may cause diseases or disorders such as cancer, infertility, inflammatory processes, degenerative diseases, and endocrine disruption that could be transmitted to the offspring. Several epidemiological studies have shown that changes in lifestyle and eating habits could prevent or reduce cancer incidence; particularly by increasing the level of antioxidants and reducing the formation of free radicals with intracellular effects. At the Biotechnology Research Center of the Technological Institute of Costa Rica, various genotoxic agents to which the population in Costa Rica is exposed are investigated, including bacteria such as *Helicobacter pylori*, micro plastics in marine species for human consumption, and heavy metals in drinking water and in soils. These investigations

are relevant to determine the presence of these genotoxic agents in the country, to evaluate the risk of exposure of the population, and thus generate strategies for prevention and mitigation of the damage.

Introducción

El ADN es la molécula en la cual se almacena la información genética de las células [1]. Los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética son llamados genotóxicos; según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), los genotóxicos que actúan como carcinógenos se clasifican en tres categorías de acuerdo con su origen: químicos (la gran mayoría), físicos (radiaciones en todo su espectro) y biológicos (principalmente algunas bacterias y virus) [2]. La acción o capacidad de inducir daño al ADN de estos agentes está influida por la dosis recibida, el tiempo y la vía de exposición, junto a la constitución genética del individuo. La genética toxicológica es una rama interdisciplinaria de la ciencia, que se encarga de evaluar el daño causado por los potenciales agentes genotóxicos a partir del monitoreo ambiental y humano por distintos tipos de exposición [3].

Los genotóxicos pueden clasificarse de acuerdo a su modo de acción o efectos en las personas en: mutágenos, sustancias que alteran la secuencia del ADN y que pueden o no resultar en un proceso carcinogénico; carcinógenos, agentes capaces de inducir cáncer pudiendo o no ser revertidos en sus inicios por los mecanismos celulares de defensa; y teratógenos, los cuales son el producto del daño inducido sobre un organismo en desarrollo o en periodo de gestación, tiempo en el que los seres humanos son altamente vulnerables a los tóxicos externos [3].

La epigenética es una ciencia que hace referencia a todos los mecanismos que regulan la expresión genética sin alterar la secuencia de nucleótidos en el ADN (Figura 1). La metilación del ADN es una marca epigenética que juega un papel esencial en la regulación de la expresión genética [4]. Las islas CpG (regiones de pares de citosina – guanina enlazados por un fosfato) son regiones de metilación del ADN; en genes promotores, se sabe que regulan la expresión génica mediante el silenciamiento transcripcional del gen correspondiente. La metilación del ADN en estas regiones -islas CpG- es crucial para la expresión genética y los procesos tejido-específicos. Sin embargo, los niveles de expresión rara vez se ven afectados por la metilación del ADN en tejidos adultos normales [4]. La metilación alterada del ADN se puede dividir en dos tipos: hipermetilación e hipometilación [5]. La hipermetilación puede conducir a la inhibición de la expresión génica (silenciamiento genético) del gen correspondiente; mientras que se ha observado hipometilación en elementos repetitivos en todo el genoma [5].

La epigenética incluye procesos de interacción de factores genéticos y no genéticos involucrados en el control de patrones hereditarios de expresión génica [6]. El resultado es el control de la expresión de genes por medio de la modulación de la estructura de la cromatina (a nivel de histonas); organización cromosómica; regulación de la maquinaria transcripcional ADN-ARN; y la denominada impronta genómica [5]. Este último término se refiere a que, dado que los humanos heredamos dos copias de cada gen (una de cada progenitor), algunas veces una de esas copias es “apagada epigenéticamente” (a menudo mediante metilación) en etapas tempranas del desarrollo, lo cual puede desenmascarar efectos deletéreos, incluyendo una serie de enfermedades y trastornos con este tipo de impronta genómica, incluidos el síndrome de Angelman, el síndrome de Prader-Willi y el síndrome de Beckwith-Wiedemann [6].

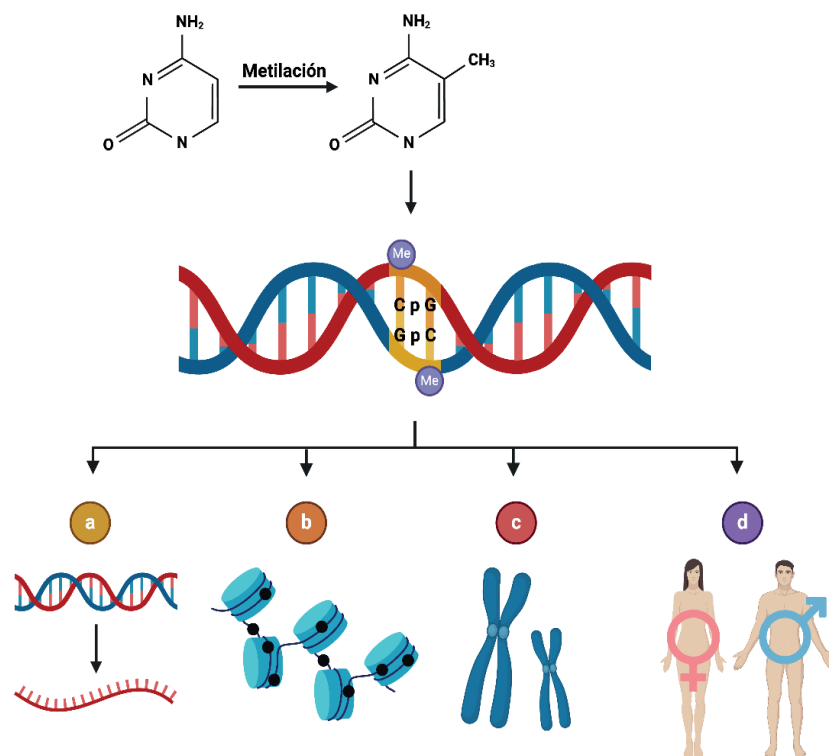


Figura 1. Algunas alteraciones epigenéticas: a) transcripción de ADN en ARN, b) estructura de la cromatina, c) integridad cromosómica, d) impronta genómica. (Elaborado con BioRender).

Investigaciones recientes en animales proporcionan evidencia de las modificaciones epigenéticas involucradas en alteraciones fisicoquímicas, que en última instancia conducen a la etiología de trastornos complejos, como cáncer, infertilidad, procesos inflamatorios y disrupción endocrina [7]. Los mecanismos de modificación epigenética pueden ser también modulados por numerosos factores externos, incluyendo estímulos ambientales como la dieta extrema, el estrés, la actividad física, hábitos de trabajo, el fumado, y el consumo del alcohol [8]. El estudio continuo en epigenética ha demostrado su importancia en las enfermedades autoinmunes, enfermedades congénitas, impedimentos en el desarrollo cognitivo, y desórdenes neuropsiquiátricos, entre otros [9].

El medio ambiente como factor causal

Existen compuestos a los cuales estamos en contacto a diario, los cuales han demostrado poseer efectos genotóxicos según su concentración y exposición. Entre ellos, se encuentran partículas plásticas; algunos ingredientes en cosméticos; algunos aditivos para comida, tales como sulfito de sodio, ácido bórico, y ácido benzoico [10]; colorantes de comida como carmoisina, y amarillo metanilo [11]; el dióxido de titanio [12, 13]; el edulcorante acesulfamo de potasio [14, 15]; y de manera especial los metales pesados, como cadmio (Cd), plata (Ag), cobre (Cu), mercurio (Hg) y arsénico (As) [16, 17].

El potencial genotóxico de las partículas de plástico ha sido resaltado en los últimos años. Se ha demostrado que las nanopartículas de poliestireno, uno de los plásticos más usados actualmente, contiene actividad genotóxica en células humanas [18]. Esto mismo se ha

encontrado en estudios con nanopartículas de tereftalato de polietileno -PET, por sus siglas en inglés- [19, 20]. Por su parte, el bisfenol A (BPA), presenta potencial de inducir genotoxicidad aun a dosis bajas; lo anterior es importante pues es uno de los componentes más usados a nivel industrial para la fabricación de plásticos y resinas epóxicas como plastificante, utilizado en la manufactura de materiales de contenedores y empaques de comidas y bebidas, revestimiento de latas, biberones, juguetes, diversos productos de consumo de papel, entre otros; además del potencial de inducir genotoxicidad, estos plásticos pueden causar diferentes alteraciones al sistema reproductivo, al metabolismo, al desarrollo puberal, al desarrollo en infantes y al desarrollo neurológico [21, 22, 23].

Asimismo, los metales pesados son de gran interés en el estudio de la genotoxicidad. Las nanopartículas de óxido de zinc, las cuales son utilizadas ampliamente en productos de cuidado personal, bloqueadores solares, ungüentos, pigmentos, revestimientos (protección contra la luz ultravioleta y fungicidas en pinturas), aditivos alimentarios, catalizadores, cemento, caucho, y plástico [24], han demostrado ser potencialmente genotóxicas [25].

Por otra parte, los metales pesados tales como As, Cd y Hg tienen efectos nocivos para la salud humana, y la exposición a estos se ha incrementado por actividades no solo antropogénicas, sino también geogénicas; estos metales son contaminantes ambientales de origen natural, especialmente de suelos volcánicos, los cuales pueden ser especialmente peligrosos cuando son endémicos en el lugar de residencia y, por ende, la exposición de las personas a estas partículas es casi inevitable [26]. Lo anterior es preocupante dado que se ha observado que algunos metales como el arsénico, cadmio y cromo pueden alterar la síntesis y reparación del ADN, además de ser carcinogénicos [27].

Mecanismos de acción

Los compuestos genotóxicos y epigenotóxicos pueden causar diferentes daños en el ADN y alteraciones en el patrón de transcripción dependiendo de su naturaleza (Figura 2). Los agentes 'reactivos al ADN' causan principalmente daño directo por formación de aductos de ADN covalente y mediante entrecruzamiento (es decir, enlaces cruzados de ADN intracadena, enlaces cruzados de ADN entre cadenas, y enlaces cruzados ADN-proteína). Por el contrario, los agentes 'no reactivos al ADN' dan lugar a daños a través de mecanismos indirectos, por ejemplo, mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), o interfiriendo con componentes celulares implicados en el mantenimiento de la estabilidad genómica [28].

En el caso de los metales pesados, estos pueden causar daños genéticos por medio de múltiples vías; entre ellas se encuentran la creación de micronúcleos, aberraciones cromosómicas y daño del ADN a nivel molecular [28]. También el daño depende de su identidad química [17]; por ejemplo, el arsénico inorgánico tiene la capacidad de causar estrés oxidativo a través de ROS, los cuales pueden evitar la reparación del ADN mediante la inactivación de enzimas vitales para este proceso, a la vez que rompen las hebras de ADN y generan mutaciones que incrementan el riesgo de cáncer. Además, el arsénico puede causar modificaciones epigenéticas a través de alteraciones en la metilación del ADN y la producción de microARN [29]. Resultados similares se han reportado en estudios con otros metales como plomo, mercurio, cromo y cadmio [27, 36, 37].

Daños similares a estos se han descrito producidos por los microplásticos [23, 30, 31], nanopartículas de dióxido de titanio [32, 33], y nanopartículas de óxido de zinc [34, 35]. Otros compuestos genotóxicos no metálicos como el bisfenol A pueden alterar la metilación del ADN, así como generar modificaciones en las histonas, los cuales pueden desembocar en cáncer y alteraciones neurológicas [22], además de poder inducir la ruptura del ADN [38, 39].

Se han desarrollado diversos ensayos de laboratorio que permiten evidenciar estos procesos, tales como: mutaciones de genes mediante el Test De Ames, daños en el ADN por medio del Ensayo Cometa, y daños cromosómicos mediante Ensayo de Micronúcleos [5].

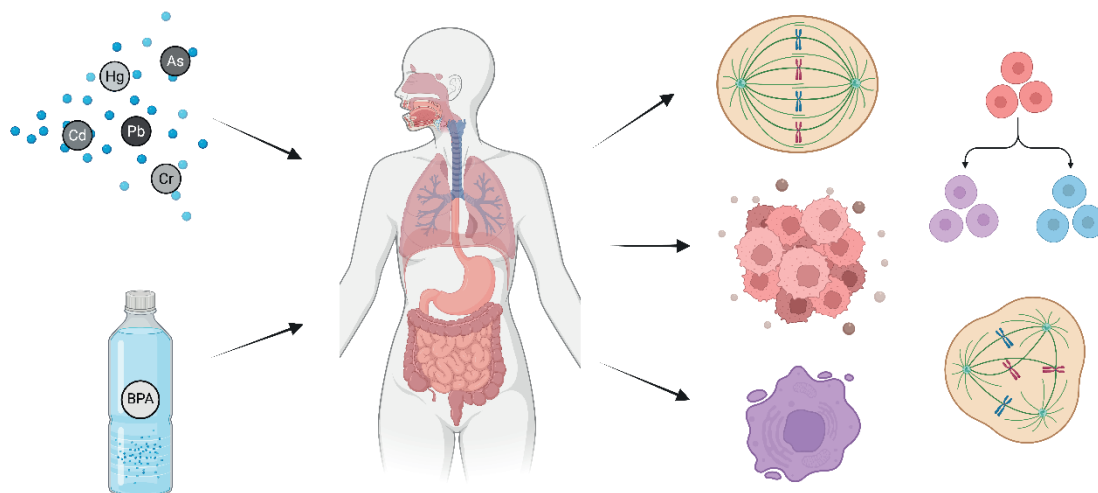


Figura 2. Procesos celulares alterados por el contacto crónico con metales pesados y plásticos como el bisfenol A (BPA) (Elaborado con BioRender).

Análisis de riesgo a la salud humana por exposición a sustancias genotóxicas

Los datos de genotoxicidad se interpretan principalmente de forma cualitativa, lo que normalmente da como resultado una clasificación binaria de entidades químicas (tiene capacidad de provocar genotoxicidad una sustancia, sí o no). Actualmente, se discuten las oportunidades en la determinación de un punto de referencia (por ejemplo, una dosis de referencia) a partir de datos genéticos de dosis-respuesta de toxicidad, seguidos del cálculo de un margen de exposición (MOE, por sus siglas en inglés, *margin of exposure*) o la derivación de una guía basada en valores de salud (HBGV, por sus siglas en inglés, *health-based guidance value*). Además, con respecto a los mutágenos reactivos al ADN, surge la pregunta de si el supuesto ampliamente aceptado de una relación dosis-respuesta sin umbral, es compatible con la derivación de un HBGV. Por lo tanto, en la actualidad, cualquier enfoque de evaluación cuantitativa de la genotoxicidad aún está por resolverse y es evaluado caso por caso [28].

La interpretación cuantitativa de los datos de genotoxicidad *in vivo* con fines de priorización, por ejemplo, en conexión con el enfoque del MOE, podría verse como una oportunidad prometedora para su aplicación rutinaria. Para seguir avanzando en la evaluación cuantitativa de la genotoxicidad, se debe dar prioridad al desarrollo de nuevos métodos experimentales para proporcionar una comprensión mecanicista más profunda y una base más completa para el análisis de la relación dosis-respuesta. Los resultados de las pruebas de genotoxicidad desempeñan un papel especial en la evaluación y gestión de riesgos químicos para los consumidores. Este se debe principalmente al carácter irreversible y a la particular gravedad de los efectos adversos para la salud que pueden derivarse de eventos genotóxicos [28].

Reversión de daño oxidativo y quimio prevención

La quimio prevención se define como el uso de agentes químicos naturales o sintéticos para revertir, suprimir o prevenir la progresión cancerígena [40]. Muchos agentes quimiopreventivos son fitoquímicos, es decir, sustancias químicas vegetales no nutritivas que tienen propiedades protectoras o preventivas de enfermedades. Además, los compuestos naturales ejercen quimio prevención mediante la modulación del estado oxidación-reducción (redox) de las células. En varios casos, estos cambios en el entorno redox celular pueden conducir a otros resultados; por ejemplo, algunos fitoquímicos pueden actuar como antioxidantes y proteger del daño al ADN inducido por ROS, previniendo así la mutagénesis y el inicio de la carcinogénesis [40].

Los agentes y suplementos dietéticos son fuentes importantes de antioxidantes y están destinados únicamente a proteger los organismos aeróbicos de los efectos tóxicos de los radicales libres y los oxidantes [41]. Los antioxidantes neutralizan el estrés oxidativo, ya sea enzimáticamente (superóxido dismutasa [SOD], catalasa [CAT] o glutatión peroxidasa) o no enzimáticamente (vitaminas C, E o β -caroteno) para proteger las organelas. Varios estudios epidemiológicos han demostrado que los cambios en el estilo de vida y los hábitos alimentarios podrían prevenir o reducir la incidencia del cáncer (Figura 3), donde lo más importante es aumentar el nivel de antioxidantes y disminuir la formación de radicales libres con efecto intracelular [41].

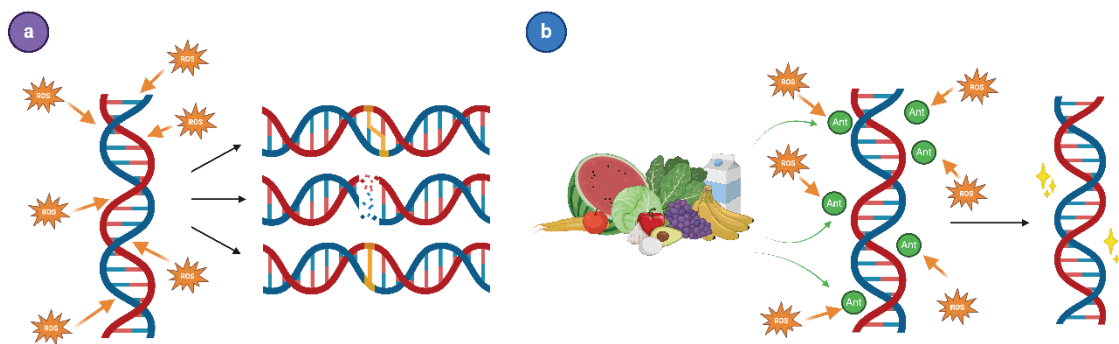


Figura 3. a) Especies reactivas de oxígeno (ROS) interactuando con ADN. b) Antioxidantes provenientes de los alimentos pueden neutralizar los efectos nocivos de los ROS. (Elaborado con BioRender).

Investigaciones en genotoxicidad en el Centro de Investigación en Biotecnología

En las áreas de investigación del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica se incluye el área de "Toxicidad", liderada por la Dra. Virginia Montero Campos. Su grupo de investigación se ha dedicado al estudio de diversos agentes genotóxicos, incluyendo bacterias, microplásticos y metales pesados. En el caso de *Helicobacter pylori* [42], se confirmó que en cantones de alta incidencia de cáncer gástrico existía un 39% de prevalencia de esta bacteria en muestras de agua de la zona, mientras que en áreas de baja incidencia la bacteria se encontró solamente en 7.5% de las muestras. Los estudios en arsénico [43] han demostrado la presencia de este metal pesado en agua potable. Actualmente se investigan las causas de la Enfermedad Renal Crónica de causas Desconocidas en Costa Rica en poblaciones de la provincia de Guanacaste, y específicamente se está explorando la relación de genotoxicidad inducida en la población afectada por la presencia de metales pesados en polvo respirable en las zonas de estudio [44]. También se está investigando el

riesgo de los microplásticos, particularmente en especies marinas de consumo humano, donde se confirmó la presencia de BPA y otros agentes genotóxicos en hasta 34% de las muestras [45].

Conclusiones

El estudio de la posible genotoxicidad inducida por compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, es motivo de gran preocupación por los científicos actualmente, ya que esto es un problema de salud transferible a las generaciones futuras. Debido a la dificultad y el costo económico del efecto particular de muchos compuestos genotóxicos en la salud humana y particularmente en muchas enfermedades de reciente reconocimiento, es relevante la investigación de la presencia de estas sustancias en Costa Rica, y la evaluación del riesgo de la exposición humana a los mismos, así como el desarrollo de estrategias de prevención y mitigación del daño.

Referencias

- [1] B. Kopp, L. Khoury, and M. Audebert, "Validation of the γ H2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review," *Archives of Toxicology*, vol. 93, no. 8, pp. 2103–2114, Jul. 2019, doi: 10.1007/s00204-019-02511-9.
- [2] International Agency for Research on Cancer, "Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–128 – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans," *monographs.iarc.who.int*, Dec. 01, 2023. <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>
- [3] D. H. Phillips and V. M. Arlt, "Genotoxicity: damage to DNA and its consequences," *EXS*, vol. 99, pp. 87–110, 2009, doi: 10.1007/978-3-7643-8336-7_4.
- [4] W.-J. Lim, K. H. Kim, J.-Y. Kim, S. Jeong, and N. Kim, "Identification of DNA-Methylated CpG Islands Associated with Gene Silencing in the Adult Body Tissues of the Ogye Chicken Using RNA-Seq and Reduced Representation Bisulfite Sequencing," *Frontiers in Genetics*, vol. 10, pp. 1-15, Apr. 2019, doi: 10.3389/fgene.2019.00346.
- [5] N. Ren, M. Atyah, W.-Y. Chen, and C.-H. Zhou, "The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications," *Journal of Translational Medicine*, vol. 15, no. 1, pp. 7-10, May 2017, doi: 10.1186/s12967-017-1218-4.
- [6] I. Lacal and R. Ventura, "Epigenetic Inheritance: Concepts, Mechanisms and Perspectives," *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 11, no. 292, pp. 2-11, Sep. 2018, doi: 10.3389/fnmol.2018.00292.
- [7] Y. Zhou, J. Liu, and L. Qian, "Epigenomic Reprogramming in Cardiovascular Disease," *Elsevier eBooks*, pp. 149–163, Jan. 2019, doi: 10.1016/b978-0-12-814513-5.00010-6.
- [8] C. Pagiatakis, E. Musolino, R. Gornati, G. Bernardini, and R. Papait, "Epigenetics of aging and disease: a brief overview," *Aging Clinical and Experimental Research*, vol. 33, pp. 737-745, Dec. 2019, doi: 10.1007/s40520-019-01430-0.
- [9] L. Zhang, Q. Lu, and C. Chang, "Epigenetics in Health and Disease," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1253, pp. 3–55, 2020, doi: 10.1007/978-981-15-3449-2_1.
- [10] I. El-Hefny, "Evaluation of Genotoxicity of Three Food Preservatives in *Drosophila Melanogaster* Using Smart and Comet Assays", *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 10, no. 1, pp. 38–41, Aug. 2020, doi: 10.15414/jmbfs.2020.10.1.38-41.
- [11] I. S. Khan, Md. N. Ali, R. Hamid, and S. A. Ganie, "Genotoxic effect of two commonly used food dyes metanil yellow and carmoisine using *Allium cepa* L. as indicator," *Toxicology Reports*, vol. 7, pp. 370–375, 2020, doi: 10.1016/j.toxrep.2020.02.009.
- [12] M. Gea, S. Bonetta, L. Iannarelli, A. M. Giovannozzi, V. Maurino, S. Bonetta, V. D. Hodoroaba, C. Armato, A. M. Rossi and T. Schilirò, "Shape-engineered titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NPs): cytotoxicity and genotoxicity in bronchial epithelial cells," vol. 127, pp. 89–100, May 2019, doi: 10.1016/j.fct.2019.02.043.
- [13] L. Bellani, S. Muccifora, F. Barbieri, E. Tassi, M. Ruffini Castiglione, and L. Giorgetti, "Genotoxicity of the food additive E171, titanium dioxide, in the plants *Lens culinaris* L. and *Allium cepa* L.," *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 849, p. 503142, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.mrgen-tox.2020.503142.

- [14] S. Mamur, D. Yüzbaşıoğlu, S. N. Bülbül, and F. Ünal, "Investigation of cyto-genotoxic effects of a food sweetener Acesulfame potassium," *Food and Health*, vol. 8, no. 4, pp. 273–283, 2022, doi: 10.3153/fh22025.
- [15] F. F. Mohammed, E. G. Abdelrazik, A. Anwar, and S. S. Abdelgayed, "Hepatic P53 upregulation and the genotoxic potential of acesulfame-K treatment in rats with a special emphasis on in vitro lymphocyte and macrophage activity testing," *Human & experimental toxicology*, vol. 43, pp. 1-9, Jan. 2024, doi: <https://doi.org/10.1177/09603271241236900>.
- [16] E. Demir and Fatma Turna Demir, "Genotoxicity responses of single and mixed exposure to heavy metals (cadmium, silver, and copper) as environmental pollutants in *Drosophila melanogaster*," *Environmental toxicology and pharmacology*, vol. 106, pp. 104390–104390, Mar. 2024, doi:10.1016/j.etap.2024.104390.
- [17] K. Kocadal, F. Alkas, D. Battal, and S. Saygi, "Cellular pathologies and genotoxic effects arising secondary to heavy metal exposure: A review," *Human & Experimental Toxicology*, vol. 39, no. 1, pp. 3–13, Sep. 2019, doi: 10.1177/0960327119874439
- [18] A. Poma, G. Vecchiotti, S. Colafarina, O. Zarivi, M. Aloisi, L. Arrizza, G. Chichiriccò, and P. D. Carlo, "In Vitro Genotoxicity of Polystyrene Nanoparticles on the Human Fibroblast Hs27 Cell Line," *Nanomaterials*, vol. 9, no. 9, p. 1299, Sep. 2019, doi: 10.3390/nano9091299.
- [19] M. Roursgaard, M. Hezareh Rothmann, J. Schulte, I. Karadimou, E. Marinelli, and P. Møller, "Genotoxicity of Particles from Grinded Plastic Items in Caco-2 and HepG2 Cells," *Frontiers in Public Health*, vol. 10, pp. 1-15, Jul. 2022, doi: 10.3389/fpubh.2022.906430.
- [20] M. Alzaben, R. Burve, K. Loeschner, P. Møller, and M. Roursgaard, "Nanoplastics from ground polyethylene terephthalate food containers: Genotoxicity in human lung epithelial A549 cells," *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, vol. 892, pp. 503705–503705, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.mrgentox.2023.503705.
- [21] A. Anet, S. Olakkaran, A. Kizhakke Purayil, and G. Hunasanahally Puttaswamygowda, "Bisphenol A induced oxidative stress mediated genotoxicity in *Drosophila melanogaster*," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 370, pp. 42–53, May 2019, doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.07.050.
- [22] T. Qin, X. Zhang, T. Guo, T. Yang, Y. Gao, W. Hao, and X. F. Xiao, "Epigenetic Alteration Shaped by the Environmental Chemical Bisphenol A" *Frontiers in Genetics*, vol. 11, pp. 1-7, Jan. 2021, doi: 10.3389/fgene.2020.618966.
- [23] V. Montero-Campos, Lucía Noboa-Jiménez, and L. Gómez-Vargas, "Toxicología de micro y nanoplásticos: riesgo de tóxicos a dosis baja y cambios epigenéticos," *Tecnología en marcha*, vol.36, no. 4, pp. 1-12 Oct. 2023, doi:10.18845/tm.v36i4.6417.
- [24] S. Singh, "Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity," *Toxicology Mechanisms and Methods*, vol. 29, no. 4, pp. 300–311, Jan. 2019, doi: 10.1080/15376516.2018.1553221.
- [25] T. R. Cardozo, R. F. De Carli, A. Seeber, W. H. Flores, J. A. N. da Rosa, Q. S. G. Kotzal, M. Lehmann, F. R. da Silva, and R. R. Dihl, "Genotoxicity of zinc oxide nanoparticles: an in vivo and in silico study," *Toxicology Research*, vol. 8, no. 2, pp. 277–286, 2019, doi: 10.1039/c8tx00255j.
- [26] J. Bundschuh, J. P. Maity, S. Mushtaq, M. Vithanage, S. Seneweera, J. Schneider, P. Bhattacharya, N. I. Khan, I. Hamawand, L. R. G. Guilherme, K. Reardon-Smith, F. Parvez, N. Morales-Simfors, S. Ghaze, C. Pudmenzky, L. Kouadio, and C. Y. Chen, "Medical geology in the framework of the sustainable development goals," *Science of The Total Environment*, vol. 581–582, pp. 87–104, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.11.208.
- [27] M. Balali-Mood, K. Naseri, Z. Tahergorabi, M. R. Khazdair, and M. Sadeghi, "Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 12, no. 643972, pp. 1-19 Apr. 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.643972.
- [28] J. Menz, M. E. Götz, U. Gündel, R. Gürtler, K. Herrmann, S. Hessel-Pras, C. Kneuer, F. Kolrep, D. Nitzsche, U. Pabel, B. Sachse, S. Schmeisser, D. M. Schumacher, T. Schwerdtle, T. Tralau, S. Zellmer, and B. Schäfer, "Genotoxicity assessment: opportunities, challenges and perspectives for quantitative evaluations of dose-response data," *Archives of Toxicology*, vol. 97, no. 9, pp. 2303–2328, Jul. 2023, doi: 10.1007/s00204-023-03553-w.
- [29] M. Ozturk, M. Metin, V. Altay, R. A. Bhat, M. Ejaz, A. Gul, B. T. Unal, M. Hasanuzzaman, L. Nibir, K. Nahar, A. Bukhari, M. A. Dervash, and T. Kawano, "Arsenic and Human Health: Genotoxicity, Epigenomic Effects, and Cancer Signaling," *Biological Trace Element Research*, vol. 200, no. 3, pp. 988–1001, Apr. 2021, doi: 10.1007/s12011-021-02719-w.
- [30] C. G. Alimba, C. Faggio, S. Sivanesan, A. L. Ogunkanmi, and K. Krishnamurthi, "Micro(nano)-plastics in the environment and risk of carcinogenesis: Insight into possible mechanisms," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 416, p. 126143, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126143.



- [31] A. T. Batista Guimarães, F. Neves Estrela, P. S. Pereira, J. E. de Andrade Vieira, A. S. de Lima Rodrigues, F. Guimarães Silva, and G. Malafaia, "Toxicity of polystyrene nanoplastics in *Ctenopharyngodon idella* juveniles: A genotoxic, mutagenic and cytotoxic perspective," *Science of The Total Environment*, vol. 752, pp. 141937–141937, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141937.
- [32] K. A. Delmond, T. Vicari, I. C. Guiloski, A. C. Dagostim, C. L. Voigt, H. C. Silva de Assis, W. A. Ramsdorf, and M. M. Cestari, "Antioxidant imbalance and genotoxicity detected in fish induced by titanium dioxide nanoparticles (NpTiO₂) and inorganic lead (PbII)," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 67, pp. 42–52, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.etap.2019.01.009.
- [33] K. Shahzad, M. N. Khan, F. Jabeen, A. S. Chaudhry, M. K. Ahmad Khan, C. Ara, and M. S. Khan, "Study of Some Toxicological Aspects of Titanium Dioxide Nanoparticles Through Oxidative Stress, Genotoxicity, and Histopathology in Tilapia, *Oreochromis mossambicus*," *BioNanoScience*, vol. 12, pp. 1116–1124, Aug. 2022, doi: 10.1007/s12668-022-01024-7.
- [34] K. Shahzad, M. Naeem Khan, F. Jabeen, N. Kosour, A. Shakoor Chaudhry, M. Sohail, and N. Ahmad, "Toxicity of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) in tilapia (*Oreochromis mossambicus*): tissue accumulation, oxidative stress, histopathology and genotoxicity," *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 16, no. 4, pp. 1973–1984, May 2018, doi: 10.1007/s13762-018-1807-7.
- [35] R. Belal and A. Gad, "Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress, genotoxicity, and apoptosis in the hemocytes of *Bombyx mori* larvae," *Scientific Reports*, vol. 13, no. 1, p. 3520, Mar. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-30444-y.
- [36] L. Neeratanaphan, C. Kamoller, P. Suwannathada, P. Suwannathada, and B. Tengjaroenkul, "Genotoxicity and Oxidative Stress in Experimental Hybrid Catfish Exposed to Heavy Metals in a Municipal Landfill Reservoir," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 17, no. 6, p. 1980, Mar. 2020, doi: 10.3390/ijerph17061980.
- [37] S. Hemmaphan and N. K. Bordeerat, "Genotoxic Effects of Lead and Their Impact on the Expression of DNA Repair Genes," vol. 19, no. 7, pp. 4307–4307, Apr. 2022, doi: 10.3390/ijerph19074307.
- [38] K. Hercog, S. Maisanaba, M. Filipič, M. Sollner-Dolenc, L. Kač, and B. Žegura, "Genotoxic activity of bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF and their mixtures in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells," *Science of The Total Environment*, vol. 687, pp. 267–276, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.486.
- [39] M. Sendra, M. Štampar, K. Fras, B. Novoa, A. Figueras, and B. Žegura, "Adverse (geno)toxic effects of bisphenol A and its analogues in hepatic 3D cell model," *Environment International*, vol. 171, p. 107721, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.envint.2022.107721.
- [40] H. J. Forman and H. Zhang, "Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 20, no. 9, pp. 689–709, Jun. 2021, doi: 10.1038/s41573-021-00233-1.
- [41] John, M. K. Ankem, and Chendil Damodaran, "Oxidative Stress: a Promising Target for Chemoprevention," *Current Pharmacology Reports*, vol. 2, no. 2, pp. 73–81, Feb. 2016, doi: 10.1007/s40495-016-0052-3.
- [42] V. Montero, A. Hernández, and J. C. Sandoval "Culture and Molecular Identification, of *Helicobacter pylori* in Drinking Water from Areas of High and Low Incidence of Gastric Cancer in Costa Rica," *Open Journal of Medical Microbiology*, vol. 4, no. 4, pp. 261-269, Dec. 2014, doi:10.4236/ojmm.2014.44030.
- [43] V. Montero, J. Quesada, A. Ledezma, and J. Sandoval, "Determination of arsenic in drinking water for human consumption in the province of Cartago," *Acta Médica Costarricense*, vol. 52, no. 2, pp. 96-101, 2010.
- [44] B. Valdés-Rodríguez, V. Montero-Campos, and M. G. Siebecker, "Causes of Chronic Kidney Disease of Non-Traditional Origin in Central America: An Approach Based on Medical Geology," *Geosciences*, vol. 13, no. 360, pp. 1-12, Nov. 2023, doi: 10.3390/geosciences13120360.
- [45] V. Montero, Y. Chinchilla, L. Gómez, A. Flores, A. Medaglia, R. Guillen, and E. Montero, "Human health risk assessment for consumption of microplastics and plasticizing substances through marine species," *Environmental Research*, vol. 237, no. 1, pp. 1-10, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.envres.2023.116843

Gut microbiota dysbiosis and the role of its person-to-person transmission in the development of non-communicable diseases

Disbiosis de la microbiota intestinal y el papel de su transmisión de persona-a-persona en el desarrollo de enfermedades no transmisibles

Gloriana Chaves-Jiménez¹, Mauro Briceño-Chaves²

Chaves-Jiménez, G; Briceño-Chaves, M. Gut microbiota dysbiosis and the role of its person-to-person transmission in the development of non-communicable diseases. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 189-199.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7623>

- 1 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 glochaves@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0009-0007-0764-5839>
- 2 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 mbriceno@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0009-0001-1123-6233>



Palabras clave

Obesidad; disbiosis; microbiota; salud; dieta.

Resumen

La microbiota intestinal desempeña un papel integral en la realización de los procesos de digestión, además de tener profundas implicaciones para la salud. Su composición y su impacto en el huésped dependen de diversos factores ambientales, tales como el tipo de dieta que consume un individuo. La alteración del microbioma intestinal provoca su disbiosis. Algunas enfermedades actualmente consideradas no transmisibles están relacionadas con la microbiota intestinal disbiótica. En los últimos años ha habido un interés creciente en estudiar la transmisión persona-a-persona de la microbiota intestinal y su papel en los efectos asociados a la salud. En esta revisión, se proporciona una visión sobre estos temas; además, se propone estudiar más a fondo los efectos de factores como la cohabitación y la dieta personal en la velocidad de transmisión.

Keywords

Obesity; dysbiosis; microbiota; obesity; health; diet.

Abstract

The gut microbiota plays an integral role in carrying out digestion processes as well as having profound health implications. Environmental factors such as the type of diet an individual consumes dictate its composition and its impact on the host. The disruption of the gut microbiome causes dysbiosis. Some presently considered non-communicable diseases are related to dysbiotic gut microbiota. In recent years, there has been increasing interest in studying gut microbiota's person-to-person transmission and its role in health associated effects. In this review, an insight is provided into these topics; additionally, a proposition is made to further study the effects of factors such as cohabitation and personal diet on transmission rate speed.

Introduction

The diverse microbial community colonizing the human gastrointestinal (GI) tract gathers more than 100 trillion organisms and is termed as the gut microbiota [1]. The co-evolution of the gut microbiota and the host has formed a tangled symbiotic interaction [2]. These organisms include bacteria, yeasts, viruses, and parasites [3]; however, the major focus of current gut microbiota studies lie on bacteria [4].

Intestinal microbiota has been alluded to be a key determinant factor influencing the digestion, absorption, metabolism, and storage of indigested nutrients, with profound effects on the host physiology; therefore, gut dysbiosis, understood as reduced diversity and an imbalance of gut microbiota community structure [5], [6] has been associated with obese state, diabetes, and gastrointestinal diseases such as inflammatory bowel disease [7].

Non-communicable diseases (NCDs) such as obesity [8], heart disease and diabetes are some of the leading causes of death worldwide [9] and represent an emerging global health threat [10]. Deaths from NCDs now exceed all communicable disease deaths combined; they represent 41 million of them each year (7 out of 10 deaths worldwide) [10]. Growing evidence suggests that individuals with noncommunicable diseases have intestinal microbiota dysbiosis

[11]. Moreover, the occurrence and progression of obesity, comprehended as a metabolic disease, is significantly contributed by the gut microbiota, which influences mechanisms like energy homeostasis, lipid synthesis and storage [12], and gut permeability [13].

There are limitations to establish what constitutes a healthy gut microbiome common to all individuals, as many environmental factors shape its composition (Table 1), more than host genetics do [14], [15]. These factors include inflammation [16], diet, exercise, sleep pattern, smoking, alcohol intake, radiation, air pollution, exposure to antibiotics, and various co-morbidities [6], [17]. Furthermore, depending on a specific strain, its location in the body, the relative abundance of other bacteria, and many other conditions, a discrimination between health-associated bacteria and harmful pathogenic bacteria is not always clear [18], [19]. It is presently considered that the most abundant phyla in gut microbiota are Firmicutes and Bacteroidetes (90%) [20]. An increased Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) ratio has been linked to obesity and could be a marker of dysbiosis [5], [21].

Table 1. Some environmental factors and their effects on gut microbiota.

| Factor | Effects | References |
|-------------------------------|--|------------|
| Smoking | Neonates exposed to environmental smoke had a higher relative abundance of <i>Ruminococcus</i> and <i>Akkermansia</i> , and infants exposed to environmental smoke during pregnancy or postnatal period showed increased <i>Firmicutes</i> levels at 3 months of age, along with higher odds of obesity at 1 and 3 years of age. | [22] |
| Excessive alcohol consumption | Increases gut permeability, alters gut microbiota communities, and influences the pathogenesis of diseases including alcoholic liver disease. | [23], [24] |
| | Even a low dose of alcohol, such as 0.8 g/kg/day, altered the gut microbiota composition in mice. | [25] |
| | Gut microbiota composition differs between alcohol-related liver disease and non-alcoholic fatty liver disease, indicating an effect of alcohol intake on the gut microbiota. | [25] |
| Exercise | Exercise frequency tended to be negatively associated with the amount of <i>Enterobacteriaceae</i> , and positively correlated with the amount of <i>Prevotella</i> , in feces. | [26] |
| | Rapid increase in microbiota diversity before and after competition in a world-class ultramarathon runner. | [27] |
| | Exercise-induced alterations in the gut microbiota were closely associated with improvements in glucose homeostasis, insulin sensitivity, anti-inflammatory effects, increased microbiota diversity, and increased amount of commensal bacteria. | [28], [29] |
| Air pollution | Fine particulate matter (<10 μM) induces alterations in the microbiota diversity throughout the gastrointestinal tract. | [17], [30] |
| | Microbial diversity of spontaneously hypertensive rats was shown to be inversely associated with pollutants exposure. | [31] |

Native core microbiota is shaped during early life: the profile of intestinal microbiota in the pregnancy term (birth gestational age), type of birth delivery, methods of milk feeding, the introduction of solid food, termination of milk feeding age, and use of antibiotics, are some of the major determinants, most of them being heavily influenced by the mother's own gut microbiome [1]. Another factor in the shaping of the gut microbiota is host genetics, which has a role in the selection of commensal bacteria; for example, the expression of fecal microRNA (miARN) genes by gut epithelial cells can regulate bacterial gene expression and growth [32].

However, maternal seeding alone cannot account for the large diversity of microorganisms found in adults [33]. How members of the microbiome are acquired and transmitted by individuals and spread in populations, and how this shapes the personal microbiome genetic makeup, remain largely unexplored, especially in humans [33], [34], [35]. Recent findings have brought to light the importance of inter-host transmission and its influence on microbiome composition and dynamics [36].

Diet is another fundamental factor that shapes gut microbiota composition and function [7]. The diversity of the microbiota gained through food depends on diet [18], as it is one of the major lifestyle factors responsible for microbiome changes [37], [38]. Commensal bacteria provide health benefits to the host that are a result of their colonization; whereas, depending on their virulence and infectious dose, pathogen colonization can cause disease [18].

The colon is the most densely populated microbial body location [39]; there, undigested food acts as a substrate for bacterial metabolism [7]. Dietary macronutrient composition dictates the source and amount of fermentable substrate by the microbiota, which releases different classes of metabolites [40]. These products can induce a series of physiological functions on hosts and other bacteria [41]. Short-chain fatty acids (SCFAs) are one of the most extensively studied gut microbiota metabolites, and account for specific functions such as regulation of gut microbiota composition [41]; however, their production is decreased under Western-style diets (WSD), which are low in fibers and high in fats and simple sugars [42].

Hereinafter, the influence of dietary patterns, particularly WSD, in the gut microbiota is discussed, as well as the factors determining the person-to-person transmission dynamics of the microbiota, in an attempt to explore the influence of diet-induced dysbiotic gut microbiota in the transmission of diseases currently considered non-communicable.

Dietary fibers as primordial microbial substrates

Dietary fibers are carbohydrates mainly from plant foods, like whole grains, fruits, vegetables and legumes [43]. Based on physiological properties, dietary fiber can be subdivided into three types: non-starchy polysaccharides (NSPs), resistant starches (RS) and resistant/nondigestible oligosaccharides (ROS) [43], [44]. Dietary fiber is fermented by fiber-degrading bacteria, producing beneficial microbial metabolites, such as SCFAs [43]. Generally, SCFAs are considered beneficial to gut health [7].

Dietary fibers evade breakdown in the upper gastrointestinal tract and are fermented by bacteria in the colon, where fiber serves as a substrate for microbial carbohydrate-active enzymes (CAZymes), like glycoside hydrolases (GHs) and polysaccharide lyases. Some bacterial strains can share dietary fibers synergistically through cross-feeding, i.e., primary degraders can partially hydrolyze polysaccharides and these breakdown products can be used by secondary degraders [40], [43].

Among the metabolites produced by gut microbial degradation of nutrients, SCFAs have a weighty importance as they are essential for microbial population and intestinal homeostasis; these metabolites are mainly produced by anaerobic fermentation of dietary fibers in the intestine [45]. SCFAs contain less than six carbon atom numbers; acetate, propionate and butyrate account for 90% of SCFAs produced by gut microbiota [46], which are a major energy source for the intestinal epithelial cells [47]. Besides, SCFAs impact host health by mechanisms related to gut barrier function, glucose metabolism, immunomodulation, and obesity [21].

The processes by which the SCFAs are biosynthesized involve specific bacterial taxa. *Bifidobacterium* species are characteristic acetate producers [48], which is also secreted by *Akkermancia muciniphila* along with propionate [49]. *A. muciniphila* has an important role

promoting the synthesis of SCFAs by regulating the gut microbiota [50]. *Roseburia inilivorans* and *Coproccoccus spp.*, which belong to the Lachnospiraceae family, together with Bacteroidetes such as *Prevotella spp.*, and Bacillota (*Phascolarctobacterium succinatutens* or *Veillonella spp.*), are examples of bacteria that can release propionate [48]. Most butyrate-producing bacteria pertain to the Clostridia class of the Firmicutes phylum, including *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia spp.*, *Eubacterium spp.*, *Anaerostipes spp.*, and *Coprococcus spp.* Of importance, *Faecalibacterium prausnitzii* is the most abundant butyrate producer in the human gut [51]. Furthermore, in obese individuals, the levels of *F. prausnitzii* have been found to be reduced [5], [52]. Interestingly, species like *Eubacterium hallii* utilize acetate and lactate produced by *Bifidobacterium spp.* for butyrate generation, which in turn supports *Bifidobacterium spp.* abundance, evidencing the cross-feeding between SCFAs-producing bacteria [48], [51].

The Western-Style diet and gut health

Despite the known fiber requirements for gut health, the WSD lacks dietary fiber [44] and it is rich in saturated and trans fats, while low in health-promoting fats such as mono and polyunsaturated fats [53]. The development of obesity and other metabolic diseases is contributed by changes from a diet rich in fibers and low in fats to a diet low in fibers and high in saturated fats [54], [55]. There are major differences in gut microbiota composition among individuals adhering to a WSD and those with a diet high in fiber [17].

Some diets may affect the gut microbiota by promoting the growth of some bacterial strains and inducing dysbiosis. For example, greater permeability of the inner mucus layer and a slower mucus growth rate were observed in mice fed a WSD, compared with chow-fed mice, together with a gradual decrease of *Actinobacteria* (*Bifidobacterium*) and *Bacteroidetes*, while *Firmicutes* increased in relative abundance in the colonic luminal content [56]. In another study, greater colonic damage and decreased expression of tight junction proteins (TJPs) in colonic tissue was observed in rodents fed a high fat diet (HFD), compared to the low-fat diet treatment [57]. Likewise, the F/B ratio was higher in HFD-fed mice following a 16-week intervention, compared to chow-fed mice, also showing lower expressions of TJPs (occludin and claudin-1) [58], which compromise the regulation of the intestinal barrier permeability [59]. Furthermore, a decreased abundance of probiotics like *Faecalibacterium*, *Dubosiella*, and *Muribaculaceae* was reported in the HFD-fed mice, while the relative abundance of harmful bacteria such as *Erysipelatoclostridium*, *Romboutsia*, and *Acetatifactor* increased [58]. Similarly, under a whole-grain diet, healthy, overweight adults with high *Prevotella* abundance in their gut microbiota lost more weight than in the refined-grain diet (lower in dietary fiber) [60].

Interestingly, “good” bacteria intake has shown promising potential for ameliorating WSD negative effects. For example, the oral administration of *Lactiplantibacillus plantarum* strain CNCM I-4459 on male mice improved the metabolic parameters that were compromised by HFD treatments, such as hepatic lipid and glucose metabolism [8]. Likewise, in HFD-induced obese mice treated with *Lactobacillus plantarum* K50, the fat mass and body weight were significantly reduced, compared to the HFD-fed control mice; the (F/B) ratio was notably higher in the HFD-fed control mice than in *L. plantarum* K50-treated mice; and the concentration of SCFAs such as butyrate and valerate had a significant increase in the *L. plantarum* K50-treated mice, showing how this probiotic could ameliorate obesity and even reverse HFD-induced gut microbiota dysbiosis [61]. In a like manner, body weight gain in HFD-induced diabetic mice was reduced after being fed with *Akkermancia muciniphila*-derived extracellular vesicles, showing increased expression of major TJPs (occludin, zonal occludens and claudin-5) in the intestinal epithelial layer [62].

The person-to-person transmission dynamics of the gut microbiota

For the transmission of commensal and pathogenic bacteria, the bacteria must exit the host, typically through fecal matter, then they must persist in the external space and survive environmental stresses such as the toxic effects of atmospheric oxygen, ultraviolet radiation, a lack of nutrients, adverse temperatures and desiccation [18].

Once the bacteria persist in the environment and are ingested by a host, they must colonize it, which entails establishing a niche in the intestinal environment, using available nutrients, and replicating to a level that will ensure stability and survival; for all of that to happen, the bacteria must compete against the resident microbiota, and this colonization resistance has important roles in preventing invasion by pathogenic bacteria and in maintaining intestinal homeostasis [18]. Resident bacteria can fend off pathogenic bacteria by using the available nutrients and by secreting toxins that target neighboring bacteria [18], [63]. The reservoirs of commensal bacteria are food, water, animals, the built environment (furniture, objects, structures, and surfaces), and humans as the main reservoir [18], [64].

There's also a hypothetical model that explains the different transmission dynamics of spore-forming and non-spore-forming bacteria. For people who are in close contact and proximity with each other, for example co-residents, both non-spore-forming and spore-forming bacteria have the same transmission efficiency; in contrast, with a colleague or an acquaintance, one might get in close contact less frequently and more physically distant, which leads to the spore-forming bacteria to have prevalence in transmission since they can remain viable in the environment for longer periods of time [17].

However, the extent to which interpersonal relations shape the individual makeup of the microbiome and its transmission within and across populations remains largely unknown. Valles-Colomer *et al.* [33] used a robust metagenomic dataset to detect extensive bacterial strain sharing across individuals, with distinct transmission patterns among mother-to-infant, intra-household and intra-population. Around 50% of the same strains were shared in mother-to-infant transmission, while 12% were shared in cohabitating individuals, with time since the start of cohabitation having a larger role in strain sharing than age or genetics did. Moreover, diet, drug consumption, access to health institutions, and hygiene practices had little influence on microbiome transmission, referring to the transmission rate itself and not the types of microbiota composition transmitted [33]. These results might point to similar colonization resistance across populations potentially having greater importance than the rates of transmission events; and suggest that, given that the gut microbiome can be inherited and even transmitted, some diseases categorized as non-communicable should be reevaluated [33].

The interindividual differences in disease evolution, incomplete comprehension of the mechanisms integrating microbiota-derived signals into host signaling pathways, and microbial communities' heterogeneity, considerably represent current limitations when understanding the contribution of the gut microbiota to disease causality [65]. The interaction between diet, gut microbiota, and human health are complex and multidirectional, which also poses a challenge in establishing causality for the gut microbiome's role in the predisposition to human diseases [66].

The possible transmission of non-communicable diseases (NCDs) through dysbiotic gut microbiota

There is growing evidence suggesting that NCDs are associated with some transmissible components, one of them being the gut microbiota [67], [68], [69]. For example, in a study of fecal microbiota transplant from obese and lean co-twin mice to separate groups of germ-free mice, significantly greater increases in body mass, as well as obesity-associated metabolic

phenotypes, were conveyed from the obese co-twins' bacterial component than those from the lean mice, where SCFAs fermentation was increased; moreover, cohousing mice harboring a lean twin's microbiota with mice containing obese co-twin's microbiota prevented the aforementioned effects in obese cage mates and transformed their microbiota's metabolic profile to a lean like state [70].

The spread of NCDs may be promoted as people socialize more frequently, since this can multiply the risk of gut microbiota exchange among individuals in a population [11]. In a study conducted by Huang *et al.* [17], several questions were addressed related to the hypothesis that NCDs are in fact communicable via dysbiosis, some of them being: can environmental factors such as diet, smoking, alcohol intake, exercise, and air pollution influence the microbiota (Table 1), and how dysbiosis can be induced by the transmission of the microbiota from person to person [17]?

In 1890, Robert Koch published a set of postulates that have served well for establishing the causative agent of most infectious diseases. Applying a version of Koch's postulates adapted to NCDs could determine whether the collective microbiota can be considered an "infectious agent," which would support the hypothesis of communicable NCDs [69]. First, transmissible dysbiotic microbiota (TDM) should be found in individuals with NCDs. Second, TDM can be isolated from the host and grown in culture. Third, TDM can cause NCDs when transferred into a healthy host. Finally, TDM can again be isolated from the inoculated diseased host [71].

However, another issue concerns the definition of transmissible dysbiotic microbiota. The composition of TDM may differ among various NCDs, as well as at the population level due to heterogeneity among individuals. In fact, these pathogen or causative agent in NCDs patients could be induced to a higher abundance or prevalence under some environmental factors such high-fat diet and smoking. These may not simply alter the gut microbiota composition but could also induce microbiota dysbiosis in the gut [17].

The role of colonization resistance in the transmission of the gut microbiota

Colonization resistance is a phenomenon whereby the gut microbiota has the capacity to resist the invasion of the exogenous pathogens and the expansion of the resident pathobionts [71]. The diversity and richness of gut microbiome is key to immune system regulation and colonization resistance against pathogens [72].

The determination of who becomes the donor and who becomes the recipient is dependent on each individual's gut microbiota state [18]. A person with a healthy non-dysbiotic microbiota possesses a high colonization resistance [73] and is presumed to be the usual donor which can therefore provide commensal bacteria to the environment, which can then colonize a dysbiotic recipient, characterized by having a low colonization resistance [18]. In theory, donors that have the greatest diversity of commensal bacteria are most likely to replenish the depleted microbiota of potential recipients [74]. Suboptimal donors may have once been healthy donors, but antibiotic exposure or other disease conditions caused a decrease in the diversity of their gut microbiota, and they could potentially include higher levels of pathogens, which may be transmitted at a higher frequency than from healthy donors [18].

Conclusion

A Western-style diet is capable of inducing gut microbiota dysbiosis which can then cause pathophysiological effects on the host, such as an increase in weight, eventually leading to overweight and obesity. Assuming that dysbiotic gut microbiota is transmittable, through the routes of transmission previously expanded upon, additional studies are necessary to establish

the links and causalities between the person-to-person transmission of a dysbiotic gut microbiota and the development of a disease presumed to be non-communicable, taking into account the colonization resistance of each person.

Assembling and maintaining a healthy intestinal microbiota may depend not only on one's diet but also on the diet-induced state of others' microbiota. The health status of the donors that people acquire the microbiota from may affect the composition of one's own intestinal microbiota.

Further investigations should focus on studying the effects on transmission dynamics in more specific social contexts, such as following a household change, and if factors such as the amount of time since the start of cohousing or personal diets affect the speed of transmission rate.

References

- [1] E. Rinninella *et al.*, "What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases," *Microorganisms*, vol. 7, no. 14, Jan. 2019, doi: 10.3390/microorganisms7010014.
- [2] E. Thursby and N. Juge, "Introduction to the human gut microbiota," *Biochemical Journal*, vol. 474, no. 11, pp. 1823–1836, Jun. 2017, doi: 10.1042/BCJ20160510.
- [3] M. De Siena *et al.*, "Gut and Reproductive Tract Microbiota Adaptation during Pregnancy: New Insights for Pregnancy-Related Complications and Therapy," *Microorganisms*, vol. 9, no. 3, p. 473, Feb. 2021, doi: 10.3390/microorganisms9030473.
- [4] C.-H. Tseng and C.-Y. Wu, "The gut microbiome in obesity," *Journal of the Formosan Medical Association*, vol. 118, pp. S3–S9, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.jfma.2018.07.009.
- [5] T. U. Maioli *et al.*, "Possible Benefits of *Faecalibacterium prausnitzii* for Obesity-Associated Gut Disorders," *Front Pharmacol*, vol. 12, no. 740636, Dec. 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.740636.
- [6] J. E. Martinez *et al.*, "Unhealthy Lifestyle and Gut Dysbiosis: A Better Understanding of the Effects of Poor Diet and Nicotine on the Intestinal Microbiome," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 12, no. 667066, Jun. 2021, doi: 10.3389/fendo.2021.667066.
- [7] P. Zhang, "Influence of Foods and Nutrition on the Gut Microbiome and Implications for Intestinal Health," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 17, p. 9588, Aug. 2022, doi: 10.3390/ijms23179588.
- [8] E. Jacouton, S. Mondot, P. Langella, and L. G. Bermúdez-Humarán, "Impact of Oral Administration of *Lactiplantibacillus plantarum* Strain CNCM I–4459 on Obesity Induced by High-Fat Diet in Mice," *Bioengineering*, vol. 10, no. 10, p. 1151, Oct. 2023, doi: 10.3390/bioengineering10101151.
- [9] World Health Organization, "Noncommunicable diseases," World Health Organization . Accessed: Apr. 05, 2024. [Online]. Available: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/noncommunicable-diseases#:~:text=They%20include%20tobacco%2C%20harmful%20use,be%20overcome%20using%20existing%20knowledge>.
- [10] Centers for Disease Control and Prevention, "About Global NCDs," Centers for Disease Control and Prevention. Accessed: Apr. 05, 2024. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/globalhealth/healthprotection/ncd/global-ncd-overview.html>
- [11] F. Bu *et al.*, "Pathogenic or Therapeutic: The Mediating Role of Gut Microbiota in Non-Communicable Diseases," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 12, no. 906349, Jul. 2022, doi: 10.3389/fcimb.2022.906349.
- [12] Z. Cheng, L. Zhang, L. Yang, and H. Chu, "The critical role of gut microbiota in obesity," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 13, no. 1025706, Oct. 2022, doi: 10.3389/fendo.2022.1025706.
- [13] P. Portincasa *et al.*, "Intestinal Barrier and Permeability in Health, Obesity and NAFLD," *Biomedicines*, vol. 10, no. 83, p. 83, Dec. 2021, doi: 10.3390/biomedicines10010083.
- [14] M. I. McBurney *et al.*, "Establishing What Constitutes a Healthy Human Gut Microbiome: State of the Science, Regulatory Considerations, and Future Directions," *J Nutr*, vol. 149, no. 11, pp. 1882–1895, Nov. 2019, doi: 10.1093/jn/nxz154.
- [15] E. R. Leeming, P. Louca, R. Gibson, C. Menni, T. D. Spector, and C. I. Le Roy, "The complexities of the diet-microbiome relationship: advances and perspectives," *Genome Med*, vol. 13, no. 10, Jan. 2021, doi: 10.1186/s13073-020-00813-7.

- [16] Z. Al Bander, M. D. Nitert, A. Mousa, and N. Naderpoor, "The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview," *Int J Environ Res Public Health*, vol. 17, no. 20, p. 7618, Oct. 2020, doi: 10.3390/ijerph17207618.
- [17] R. Huang, Z. Ju, and P.-K. Zhou, "A gut dysbiotic microbiota-based hypothesis of human-to-human transmission of non-communicable diseases," *Science of The Total Environment*, vol. 745, p. 141030, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141030.
- [18] H. P. Browne, B. A. Neville, S. C. Forster, and T. D. Lawley, "Transmission of the gut microbiota: spreading of health," *Nat Rev Microbiol*, vol. 15, no. 9, pp. 531–543, Sep. 2017, doi: 10.1038/nrmicro.2017.50.
- [19] D. Patra, D. Banerjee, P. Ramprasad, S. Roy, D. Pal, and S. Dasgupta, "Recent insights of obesity-induced gut and adipose tissue dysbiosis in type 2 diabetes," *Front Mol Biosci*, vol. 10, no. 1224982, Sep. 2023, doi: 10.3389/fmolb.2023.1224982.
- [20] E. Amabebe, F. O. Robert, T. Agbalalah, and E. S. F. Orubu, "Microbial dysbiosis-induced obesity: role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism," *British Journal of Nutrition*, vol. 123, no. 10, pp. 1127–1137, May 2020, doi: 10.1017/S0007114520000380.
- [21] O. Lange, M. Proczko-Stepaniak, and A. Mika, "Short-Chain Fatty Acids—A Product of the Microbiome and Its Participation in Two-Way Communication on the Microbiome-Host Mammal Line," *Curr Obes Rep*, vol. 12, no. 2, pp. 108–126, May 2023, doi: 10.1007/s13679-023-00503-6.
- [22] C. McLean, S. Jun, and A. Kozyrskyj, "Impact of maternal smoking on the infant gut microbiota and its association with child overweight: a scoping review," *World Journal of Pediatrics*, vol. 15, no. 4, pp. 341–349, Aug. 2019, doi: 10.1007/s12519-019-00278-8.
- [23] V. B. Dubinkina *et al.*, "Links of gut microbiota composition with alcohol dependence syndrome and alcoholic liver disease," *Microbiome*, vol. 5, no. 141, Dec. 2017, doi: 10.1186/s40168-017-0359-2.
- [24] A. Lenhart and W. D. Chey, "A Systematic Review of the Effects of Polyols on Gastrointestinal Health and Irritable Bowel Syndrome," *Advances in Nutrition*, vol. 8, no. 4, pp. 587–596, Jul. 2017, doi: 10.3945/an.117.015560.
- [25] J. P. Arab, M. Arrese, and V. H. Shah, "Gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease and alcohol-related liver disease: Current concepts and perspectives," *Hepatology Research*, vol. 50, no. 4, pp. 407–418, Apr. 2020, doi: 10.1111/hepr.13473.
- [26] T. Shima *et al.*, "Association of life habits and fermented milk intake with stool frequency, defecatory symptoms and intestinal microbiota in healthy Japanese adults," *Benef Microbes*, vol. 10, no. 8, pp. 841–854, Dec. 2019, doi: 10.3920/BM2019.0057.
- [27] G. J. Grosicki, R. P. Durk, and J. R. Bagley, "Rapid gut microbiome changes in a world-class ultramarathon runner," *Physiol Rep*, vol. 7, no. 24, Dec. 2019, doi: 10.14814/phy2.14313.
- [28] Y. Liu *et al.*, "Gut Microbiome Fermentation Determines the Efficacy of Exercise for Diabetes Prevention," *Cell Metab*, vol. 31, pp. 77–91, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.cmet.2019.11.001.
- [29] V. Monda *et al.*, "Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2017, pp. 1–8, 2017, doi: 10.1155/2017/3831972.
- [30] E. A. Mutlu *et al.*, "Inhalational exposure to particulate matter air pollution alters the composition of the gut microbiome," *Environmental Pollution*, vol. 240, pp. 817–830, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2018.04.130.
- [31] D. Chen *et al.*, "Exposure to atmospheric pollutants is associated with alterations of gut microbiota in spontaneously hypertensive rats," *Exp Ther Med*, vol. 18, no. 5, pp. 3484–3492, Aug. 2019, doi: 10.3892/etm.2019.7934.
- [32] S. Liu *et al.*, "The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA," *Cell Host Microbe*, vol. 19, pp. 32–43, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.chom.2015.12.005.
- [33] M. Valles-Colomer *et al.*, "The person-to-person transmission landscape of the gut and oral microbiomes," *Nature*, vol. 614, no. 7946, pp. 125–135, Feb. 2023, doi: 10.1038/s41586-022-05620-1.
- [34] A. Sarkar *et al.*, "Microbial transmission in animal social networks and the social microbiome," *Nat Ecol Evol*, vol. 4, no. 8, pp. 1020–1035, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41559-020-1220-8.
- [35] S. Samartino, D. Christie, A. Penna, P. Sicotte, N. Ting, and E. Wikberg, "Social network dynamics, infant loss, and gut microbiota composition in female *Colobus vellerosus* during time periods with alpha male challenges," *Primates*, vol. 65, no. 4, pp. 299–309, Jul. 2024, doi: 10.1007/s10329-024-01132-w.
- [36] C. D. Robinson, B. J. Bohannan, and R. A. Britton, "Scales of persistence: transmission and the microbiome," *Curr Opin Microbiol*, vol. 50, pp. 42–49, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.mib.2019.09.009.
- [37] V. Lazar *et al.*, "Gut Microbiota, Host Organism, and Diet Dialogue in Diabetes and Obesity," *Front Nutr*, vol. 6, no. 21, Mar. 2019, doi: 10.3389/fnut.2019.00021.



- [38] P. Illiano, R. Brambilla, and C. Parolini, "The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease," *FEBS J*, vol. 287, no. 5, pp. 833–855, Mar. 2020, doi: 10.1111/febs.15217.
- [39] P. I. Costea *et al.*, "Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition," *Nat Microbiol*, vol. 3, pp. 8–16, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41564-017-0072-8.
- [40] K. A. Krautkramer, J. Fan, and F. Bäckhed, "Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates," *Nat Rev Microbiol*, vol. 19, no. 2, pp. 77–94, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41579-020-0438-4.
- [41] J. Liu, Y. Tan, H. Cheng, D. Zhang, W. Feng, and C. Peng, "Functions of Gut Microbiota Metabolites, Current Status and Future Perspectives," *Aging Dis*, vol. 13, no. 4, p. 1106, 2022, doi: 10.14336/AD.2022.0104.
- [42] G. Birchenough, B. O. Schroeder, F. Bäckhed, and G. C. Hansson, "Dietary destabilisation of the balance between the microbiota and the colonic mucus barrier," *Gut Microbes*, vol. 10, no. 2, pp. 246–250, Mar. 2019, doi: 10.1080/19490976.2018.1513765.
- [43] J. Fu, Y. Zheng, Y. Gao, and W. Xu, "Dietary Fiber Intake and Gut Microbiota in Human Health," *Microorganisms*, vol. 10, no. 12, p. 2507, Dec. 2022, doi: 10.3390/microorganisms10122507.
- [44] K. Makki, E. C. Deehan, J. Walter, and F. Bäckhed, "The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease," *Cell Host Microbe*, vol. 23, no. 6, pp. 705–715, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.chom.2018.05.012.
- [45] P. Portincasa *et al.*, "Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 3, p. 1105, Jan. 2022, doi: 10.3390/ijms23031105.
- [46] R.-G. Xiong *et al.*, "Health Benefits and Side Effects of Short-Chain Fatty Acids," *Foods*, vol. 11, no. 18, p. 2863, Sep. 2022, doi: 10.3390/foods11182863.
- [47] J. G. LeBlanc, F. Chain, R. Martín, L. G. Bermúdez-Humarán, S. Courau, and P. Langella, "Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria," *Microb Cell Fact*, vol. 16, no. 1, p. 79, Dec. 2017, doi: 10.1186/s12934-017-0691-z.
- [48] W. Fusco *et al.*, "Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota," *Nutrients*, vol. 15, no. 9, p. 2211, May 2023, doi: 10.3390/nu15092211.
- [49] A. P. Lakshmanan, S. Murugesan, S. Al Khodor, and A. Terranegra, "The potential impact of a probiotic: *Akkermansia muciniphila* in the regulation of blood pressure—the current facts and evidence," *J Transl Med*, vol. 20, no. 1, p. 430, Sep. 2022, doi: 10.1186/s12967-022-03631-0.
- [50] J. Shen *et al.*, "*Akkermansia muciniphila* attenuated lipopolysaccharide-induced acute lung injury by modulating the gut microbiota and SCFAs in mice," *Food Funct*, vol. 14, no. 23, pp. 10401–10417, 2023, doi: 10.1039/D3FO04051H.
- [51] V. Singh *et al.*, "Butyrate producers, 'The Sentinel of Gut': Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics," *Front Microbiol*, vol. 13, no. 1103836, Jan. 2023, doi: 10.3389/fmicb.2022.1103836.
- [52] R. Martín, L. G. Bermúdez-Humarán, and P. Langella, "Searching for the Bacterial Effector: The Example of the Multi-Skilled Commensal Bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*," *Front Microbiol*, vol. 9, no. 346, Mar. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00346.
- [53] R. K. Singh *et al.*, "Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health," *J Transl Med*, vol. 15, no. 1, p. 73, Dec. 2017, doi: 10.1186/s12967-017-1175-y.
- [54] D. Statovci, M. Aguilera, J. MacSharry, and S. Melgar, "The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces," *Front Immunol*, vol. 8, no. 838, Jul. 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00838.
- [55] A. Agus *et al.*, "Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation," *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, p. 19032, Jan. 2016, doi: 10.1038/srep19032.
- [56] B. O. Schroeder *et al.*, "Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration," *Cell Host Microbe*, vol. 23, no. 1, pp. 27–40, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.chom.2017.11.004.
- [57] G. Chompre *et al.*, "A one month high fat diet disrupts the gut microbiome and integrity of the colon inducing adiposity and behavioral despair in male Sprague Dawley rats," *Heliyon*, vol. 8, no. 11, p. e11194, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e11194.
- [58] X. Zhu *et al.*, "A High-Fat Diet Increases the Characteristics of Gut Microbial Composition and the Intestinal Damage Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease," *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 23, p. 16733, Nov. 2023, doi: 10.3390/ijms242316733.
- [59] F. Schreiber, I. Balas, M. J. Robinson, and G. Bakdash, "Border Control: The Role of the Microbiome in Regulating Epithelial Barrier Function," *Cells*, vol. 13, no. 6, p. 477, Mar. 2024, doi: 10.3390/cells13060477.

- [60] L. Christensen *et al.*, "Prevotella Abundance Predicts Weight Loss Success in Healthy, Overweight Adults Consuming a Whole-Grain Diet Ad Libitum: A Post Hoc Analysis of a 6-Wk Randomized Controlled Trial," *J Nutr*, vol. 149, no. 12, pp. 2174–2181, Dec. 2019, doi: 10.1093/jn/nxz198.
- [61] H. Joung, J. Chu, B.-K. Kim, I.-S. Choi, W. Kim, and T.-S. Park, "Probiotics ameliorate chronic low-grade inflammation and fat accumulation with gut microbiota composition change in diet-induced obese mice models," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 105, no. 3, pp. 1203–1213, Feb. 2021, doi: 10.1007/s00253-020-11060-6.
- [62] C. Chelakkot *et al.*, "Akkermansia muciniphila-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions," *Exp Mol Med*, vol. 50, no. 2, pp. e450–e450, Feb. 2018, doi: 10.1038/emmm.2017.282.
- [63] F. Spragge *et al.*, "Microbiome diversity protects against pathogens by nutrient blocking," *Science (1979)*, vol. 382, no. 6676, Dec. 2023, doi: 10.1126/science.adj3502.
- [64] S. T. Kelley and J. A. Gilbert, "Studying the microbiology of the indoor environment," *Genome Biol*, vol. 14, no. 2, p. 202, 2013, doi: 10.1186/gb-2013-14-2-202.
- [65] A. Metwaly, S. Reitmeier, and D. Haller, "Microbiome risk profiles as biomarkers for inflammatory and metabolic disorders," *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 19, no. 6, pp. 383–397, Jun. 2022, doi: 10.1038/s41575-022-00581-2.
- [66] A. M. Armet *et al.*, "Rethinking healthy eating in light of the gut microbiome," *Cell Host Microbe*, vol. 30, no. 6, pp. 764–785, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.chom.2022.04.016.
- [67] A. Kumar *et al.*, "Communication in non-communicable diseases (NCDs) and role of immunomodulatory nutraceuticals in their management," *Front Nutr*, vol. 9, no. 966152, Sep. 2022, doi: 10.3389/fnut.2022.966152.
- [68] Z. Huang *et al.*, "Unveiling and harnessing the human gut microbiome in the rising burden of non-communicable diseases during urbanization," *Gut Microbes*, vol. 15, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1080/19490976.2023.2237645.
- [69] B. B. Finlay, "Are noncommunicable diseases communicable?," *Science (1979)*, vol. 367, no. 6475, pp. 250–251, Jan. 2020, doi: 10.1126/science.aaz3834.
- [70] V. K. Ridaura *et al.*, "Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice," *Science (1979)*, vol. 341, no. 6150, Sep. 2013, doi: 10.1126/science.1241214.
- [71] I. Khan *et al.*, "Mechanism of the Gut Microbiota Colonization Resistance and Enteric Pathogen Infection," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 11, no. 716299, Dec. 2021, doi: 10.3389/fcimb.2021.716299.
- [72] A. M. Seekatz, N. Safdar, and S. Khanna, "The role of the gut microbiome in colonization resistance and recurrent *Clostridioides difficile* infection," *Therap Adv Gastroenterol*, vol. 15, pp. 1–18, Jan. 2022, doi: 10.1177/17562848221134396.
- [73] D. Podlesny *et al.*, "Identification of clinical and ecological determinants of strain engraftment after fecal microbiota transplantation using metagenomics," *Cell Rep Med*, vol. 3, no. 8, p. 100711, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.xcrm.2022.100711.
- [74] V. Horrocks, O. G. King, A. Y. G. Yip, I. M. Marques, and J. A. K. McDonald, "Role of the gut microbiota in nutrient competition and protection against intestinal pathogen colonization," *Microbiology (N Y)*, vol. 169, no. 8, Aug. 2023, doi: 10.1099/mic.0.001377.









Preclinical evaluation of a low-cost mechanical ventilator

Evaluación preclínica de un ventilador mecánico de bajo costo

Randall Chacón-Cerdas¹, Adrián Quesada-Martínez²,
Aníbal Ruíz-Barquero³, Roberto Estrada-McDermott⁴

Chacón-Cerdas, R; Quesada-Martínez, A; Ruíz-Barquero, A; Estrada-McDermott, R. Preclinical evaluation of a low-cost mechanical ventilator. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 200-214.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7624>

- 1 Biotechnology Research Center, Costa Rica Institute of Technology, Costa Rica.
 rchacon@itcr.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-5364-4649>
- 2 School of Material Science and Engineering, Costa Rica Institute of Technology, Costa Rica.
 adquesada@itcr.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-5975-4195>
- 3 School of Electronic Engineering, Costa Rica Institute of Technology, Costa Rica.
 aniruiz@itcr.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0003-1300-3887>
- 4 Large Animal Hospital, National University of Costa Rica, Costa Rica.
 roberto.estrada.mcdermott@una.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-1739-1461>

Keywords

Oxygen saturation; respiratory rate; COVID-19; acute lung injury.

Abstract

The COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus placed the global health systems in crisis due to the shortage of materials, devices, and emergency ventilation equipment for the Intensive Care Units (ICU). Low-cost ventilator designs emerged as a necessary option for many countries seeking to ameliorate the impact and demands for respiratory equipment. At the Costa Rica Institute of Technology (ITCR), a prototype mechanical ventilator (TEC-Ventilator) was developed with the following features: the capability to achieve a tidal volume of 250 to 800 mL with controlled increments of 50 mL, a respiratory rate of 10 to 30 breaths/min, a variable *Inspiration:Expiration* ratio from 1:1 to 1:5, and a fraction of inspired oxygen (FiO_2) of 21-70%. The safety and effectiveness of the device were evaluated in a preclinical study with eight pigs induced with acute lung injury, seven of which met the conditions for ventilator performance evaluation. Its performance was compared to that of a commercial ventilator used as a control by analyzing the statistical variation of parameters such as O_2 SAT, pO_2 , pCO_2 , pH, HCO_3^- , base excess, mean arterial pressure (MAP), respiratory rate (RESP), and heart rate (HR). It was found that the TEC ventilator provided stability of parameters equivalent to the commercial control. Additionally, the TEC ventilator did not cause complications and effectively managed respiratory failure in 100% of the evaluated subjects.

Palabras clave

Saturación de oxígeno; frecuencia respiratoria; COVID-19; lesión pulmonar aguda.

Resumen

La pandemia de COVID-19 provocada por la infección del virus SARS-CoV-2 colocó en crisis los sistemas de salud del mundo debido a la escasez de materiales, dispositivos y equipos de ventilación de emergencia para las unidades de cuidados intensivos (UCI). El diseño de dispositivos de ventilación de bajo costo surgió como una opción necesaria para los países con recursos limitados para satisfacer las demandas críticas de equipos respiratorios. En el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) se desarrolló un prototipo de ventilador mecánico (TEC-Ventilador) que reunió las siguientes características: capacidad de 250-800 mL de ventilación con incrementos controlados de 50 mL, frecuencia respiratoria de 10 a 30 respiraciones/min, relación *Inspiración:Espiración* variable de 1:1 a 1:5, y una fracción inspirada de oxígeno (FiO_2) de 21-70%. Se evaluó la seguridad y efectividad del dispositivo en un estudio preclínico con ocho cerdos inducidos con una lesión pulmonar aguda, de los cuales siete reunieron las condiciones para la evaluación del desempeño del ventilador. Se comparó su rendimiento con el de un ventilador comercial control mediante el análisis estadístico de la variación de los parámetros de O_2 SAT, pO_2 , pCO_2 , pH, HCO_3^- , exceso de base, presión arterial media (PAM), frecuencia respiratoria (RESP) y frecuencia cardíaca (HR); encontrándose que el ventilador TEC proporcionó estabilidad de parámetros equivalentes comparado con el control comercial. Se encontró además que el ventilador TEC no causó complicaciones y manejó eficazmente la insuficiencia respiratoria en el 100% de los sujetos evaluados.

Introduction

The COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 has been one of the most relevant health emergencies in the modern era [1]. As of September 2022, 613,942,561 million people were officially reported as infected, causing more than 6.52 million cumulative deaths [2].

Health systems worldwide were compromised by the scarcity of resources to deal with infections distributed in waves due to virus variants that circulate almost immediately among symptomatic and asymptomatic patients [3]. One of the main limitations was the ICUs (Intensive Care Units) capacities, since they must add numerous COVID-19 patients to the routine cases they already treat. Statistics indicate that 14-17% of COVID-19 patients have required ICU care [1].

In response to infrastructure, supplies, and equipment challenges, some governments opened new hospitals, and others modified them to expand their capacity to attend to these patients. They also required ventilators, personal protective equipment, and diverse medical materials [4]. With limited equipment and the associated cost of commercial ventilators, local open-source projects arose to modify and manufacture this type of device to complement the demand [5], [6]. These devices must meet international safety and effectiveness requirements to ensure that their operation is stable and that their use in patients leads to more benefits than associated complications, characteristics generally defined as the minimum acceptable clinical standards [7]. Their ventilation range and versatile configuration classify them as equipment to treat severe cases in the ICU (Full featured) [5]. Although the global vaccination and the coordinated actions of the national health system have managed to control this pandemic, these types of equipment will always be necessary to deal with potential outbreaks or even new respiratory emergencies.

This preclinical study evaluates the safety and effectiveness of a low-cost mechanical ventilator designed and assembled at the Costa Rica Institute of Technology (TEC-ventilator or TEC-V) and tested in pigs with induced acute lung injury.

Methodology

Ventilator. The ventilation mechanism was based on an *Ambu* bag-type manual resuscitator [8]. It features two metal springs connected to a plastic syringe head that pushes the *Ambu* bag around and simulates breathing. The adapted tubes allow oxygen transport through the system and the patient's intubation by matching with routine accessories. The electronics and electrical parts include solenoid valves, power sources, a touchscreen, and flow sensors (Figure 1).

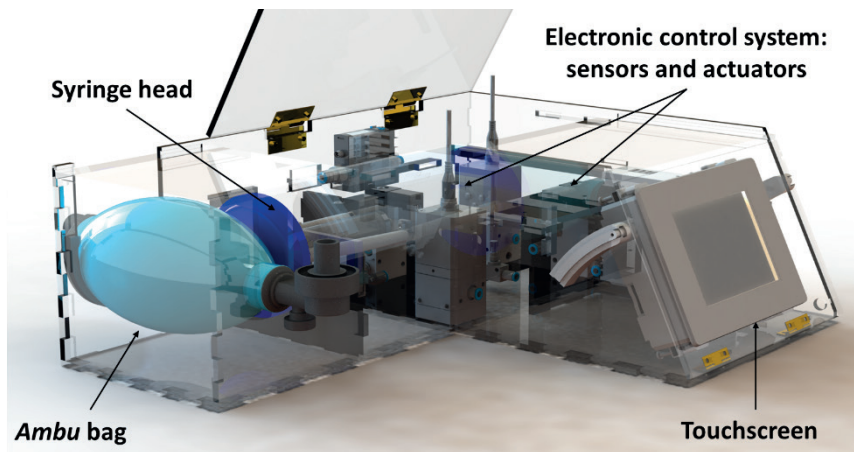


Figure 1. Isometric frontal view of the TEC-Ventilator.

The device provides the following specifications: variable breathing rate from 10 to 30 breaths per minute, tidal volume from 250 to 800 mL with 50 mL increased controlled automatically, the fraction of inspired oxygen (FiO_2) varies from 21-100% and variable Inspiration to expiration ratio (I:E) from 1:1 to 1:5.

Animal model. Eight four-week-old domestic pigs (*Sus scrofa domesticus*) were used as animal models for *ex vivo* testing. The weight ranged between 50-60 kg, and the same proportion of females and males was maintained. The sample size was calculated using the maximum estimation error of the upper limits of the risk values III and IV, established by the Physical Status Scale of the American Society of Anesthesiologists (ASA) [9] and considering variations implicit in previous studies [10]. A 95% confidence level was selected for estimating the proportion of events assuming a binomial distribution. The animals were kept in quarantine in the Large Animal Hospital of the School of Veterinary Medicine facilities at the National University of Costa Rica (UNA), where the preclinical study was carried out. The care, handling, and preclinical procedure were performed with the approval of the UNA's Institutional Committee for Bioethics and Animal Care (CBBA, for its acronym in Spanish), authorization N° UNA-EMV-CBBA-ACUE-006-2020.

Induction of Acute Lung Injury (ALI). To emulate the pulmonary affections reported in patients with COVID-19, an injury test was established to evaluate the ventilator's performance in critical care conditions. To reach the typical life-threatening status, oxygen saturation was monitored until the lung edema conducted the O_2 SAT value under 70% (hypoxemia) [11] which reflects a disruption in the endothelial and epithelial barriers associated with ALI syndrome [12] commonly presented in ICU patients [13]. For this, a mixture of features reported by previous procedures was used to define the injury induction [14], [15], [16]. The animals were sedated intramuscularly (in the neck) using xylazine (3 mg kg^{-1}), ketamine (10 mg kg^{-1}), and butorphanol (0.2 mg kg^{-1}); followed by induction with intravenous ketamine (5 mg kg^{-1}). Next, the endotracheal tube was placed, and the pig was connected to assisted ventilation (Matrx Ventilator, 3000) with inhalation anesthesia adding isoflurane (3%), in addition to a continuous infusion (CRI) of ketamine ($3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), xylazine ($1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and butorphanol ($0.2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Vital signs were continuously monitored (Biocare Monitor im12) to check the healthy condition of the animal. The procedure for lesion induction is as follows:

1. The subject's vital signs were checked using arterial gases (pH, pO_2/pCO_2 , Base Excess, HCO_3^- , O_2 Saturation, and Lactate) determined on the I-Stat device (IDEXX).
2. The subject's vital signs were double-checked using a multiparameter monitor (systolic pressure, diastolic pressure, heart rate, respiratory rate, and oxygen saturation).
3. The subject's viability for the induction of the lesion was verified by the criterion of the head veterinarian after evaluating the pig's response to anesthesia and the stability of the vital signs.
4. The subject's head was maneuvered to place it outside the stretcher and in an accessible position (slightly raised) to favor fluid entry into the lungs.
5. The subject was disconnected from the ventilator. A funnel attached to a flexible hose (1/4" in diameter and 60 cm long) was placed inside the trachea that communicates directly with the subject's lungs.
6. Ringer's lactate solution (1.0-1.5 L) was gradually poured into the animal's lungs, attaching a flexible hose to the tracheal tube, and placing the funnel one meter above the animal. Decantation was stopped by confirming that the respiratory system was full of fluid (keeping the fluid level stable).



7. The subject's head was maneuvered to place it in an accessible position (slightly inclined) to favor the exit of the fluid from the lungs.
8. After approximately 5 minutes of keeping the fluid inside the animal's lungs, the funnel was removed, and Ringer's lactate was removed alongside the alveolar surfactant using a suction pump (Medela, Basic) connected to the same hose by which Ringer's lactate was initially introduced at an approximate pressure of 250 mm Hg. This process usually took 30 seconds.
9. Once the first volume of lactate was withdrawn, a pause of around 5 min was given, where the animal was ventilated and stabilized for the subsequent lavage. Once stabilized and authorized by the veterinarian, the second wash was carried out, repeating the technique described above.
10. Once the second volume of lactate was withdrawn, the feasibility of continuing with the injury (third alveolar lavage) or the diagnosis of acute lung injury was confirmed based on the criteria of the veterinarian, the parameters of the monitor, and the I-stat measurements (in most of the animals at the second wash they presented changes suggestive of acute lung injury).
11. If the veterinarian diagnosed the induced lung injury, arterial blood samples were collected to quantify arterial gases using the I-Stat device, and the procedure of ventilation continued.
12. In cases where an additional wash was required, the procedure described above was repeated.

Safety and effectiveness evaluation. Animals diagnosed with lung injury were connected to the TEC-ventilator. After 10 minutes, the ventilator was set to 100% oxygen, and the animal was ventilated. Using the multiparameter monitor, the following parameters were monitored every 5-10 minutes and throughout the intervention: systolic blood pressure (BP), diastolic blood pressure (DP), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), respiratory rate (RESP) and blood oxygen saturation (O_2 SAT). After 20-30 minutes of ventilation, a blood sample was taken, and arterial gases pCO_2 (mmHg), pO_2 (mmHg), base excess ($mmol L^{-1}$), HCO_3^- ($mmol L^{-1}$), O_2 SAT (%), and Lactate ($mmol L^{-1}$) were measured. Arterial blood gas quantification was repeated after 40-50 minutes of ventilation. Each animal was monitored for approximately 60 minutes until its condition was confirmed to be stable or irregular. Once the performance of the TEC-ventilator was monitored, the animal was euthanized using sodium pentobarbital at a dose of $75 mg kg^{-1}$.

Safety endpoint. The device's safety was evaluated by recording complications associated with the use of the ventilator and monitoring fatal and non-fatal events during the intervention. Fatal complications were interpreted as events that would lead to death, are life-threatening, require hospitalization or prolonged hospital stay, and generate persistent or significant disability or incapacity.

Effectiveness endpoint. The device's effectiveness was determined by the percentage of subjects who managed to overcome the crisis due to the respiratory support function of the device. Three categories were established to measure this parameter: 1) Efficient: when the animal managed to overcome the crisis without problems and with only the use of the TEC-ventilator; 2) Partial failure: when the animal required additional assistance apart from the TEC-ventilator to overcome the crisis, and 3) Total failure: when the TEC ventilator failed to assist the animal, and therefore the subject died.

Statistical analysis. Descriptive statistics were applied to characterize the percentage of patients who suffered fatal and non-fatal complications related to ventilator use and effective respiratory assistance. If fatal and non-fatal adverse events related to ventilator use occurred, the percentage of cumulative risk would be calculated through the non-parametric Kaplan-Meier survival test (95% confidence, two-tailed) as a function of the time of the event. Quality control of the physiological parameter data was performed by checking the statistical assumptions of homogeneity of variances (Levene's test) and normality of data/residues (Anderson-Darling test, Ryan-Joiner test, Kolmogoro-Smirnov test). The preceding is to select the appropriate statistical comparison tests of parametric means.

In the case of arterial gases and vital signs of MAP, HR, and RESP, a one-way ANOVA (ANOVA F or ANOVA Welch, depending on the fulfillment of statistical assumptions) was applied to determine significant differences between the average values of the physiological parameters monitored at each stage. In the cases in which the ANOVA value gave significant differences ($p < 0.05$), a Tukey or Games Howell comparison of means was performed (according to the fulfillment of statistical assumptions). All tests were performed considering a confidence level of 95% ($\alpha = 0.050$) using the statistical software Minitab 19.1.1 [17].

Results and discussion

Safety and effectiveness evaluation. The use of the device was considered safe (Figure 2) since it did not produce complications of any type (fatal or non-fatal) in the subjects evaluated. Because the incidence of complications was 0%, the cumulative risk index was not calculated using the Kaplan-Meier survival test, reported as 0%. Regarding the level of effectiveness (Figure 3), it was found that in 100% of the cases, the animal was assisted by improving their respiratory condition, and using another respirator or alternatives was not necessary, so the percentage of partial or total failure was 0%. It is essential to mention that seven of the eight subjects evaluated showed adequate physiological conditions for the induction of lung injury and subsequent ventilation using the TEC-ventilator (TEC-V). One of them (pig 7) developed malignant hyperthermia after lung injury and was not included in the post-injury physiological measurements, as ventilator performance could not be compared with the other data from the individuals without malignant reaction to injury. The power curve for one-proportion estimation and the details of the vital signs monitored for each subject are presented in the supplementary materials.

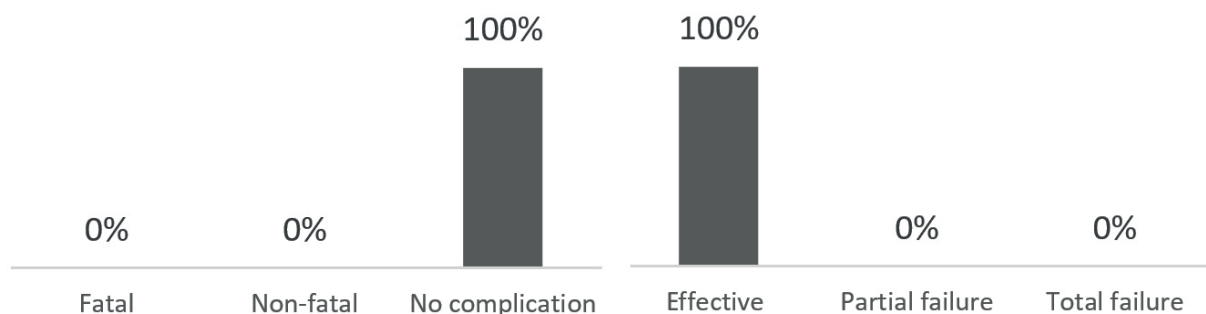


Figure 2. Percentage of animals with complications caused by the TEC-ventilator according to the type of complication.

Figure 3. Percentage of animals according to the effectiveness of ventilation assisted by the TEC-ventilator.

Regarding the quality control of the data evaluated through the fulfillment of the statistical assumptions, it was obtained that, for most of the physiological parameters, the required homogeneity of variance was fulfilled, confirmed by the Levene's test or the Multiple Comparisons

tests ($p > 0.050$), except for oxygen saturation (O_2 SAT), in which case the normality of the data allows Welch ANOVA + Games-Howell test. In the case of normality, it was also met in most cases ($p > 0.050$) when the data or residuals were evaluated using the Anderson Darling, Ryan-Joiner, or Kolmogorov Smirnov test, except for the data series of pO_2 (Post-injury 40-50 min TEC-V) and RESP (Pre-injury TEC-V, Pulmonary Injury and Post-injury 20-30 min TEC-V); however, it did not affect the selection of the inferential parametric test for these parameters since homoscedasticity was met and the central limit theorem was assumed for small samples that would potentially meet normality by increasing the sample size. The physiological parameters monitored (Figures 4, 5, 6) support the safety and effectiveness results.

Oxygen saturation (O_2 SAT). It measures the amount of oxygen in the bloodstream. Healthy level is between 96% and 100% in anesthetized patients, but animals with lung disease have a lower percentage unless supplemental oxygen is used [18]. Levels below 90% are considered hypoxemia, and lower than 80% is known as severe hypoxemia. [19]. The induced injury managed to place the animals in severe hypoxemia in all cases (average O_2 SAT = 67.13%) requiring the use of the ventilator to assist the patient's breathing. The recovery of the oxygen level in the blood brought to typical values by the TEC-ventilator after the lung injury (96.67-99.00%) was observed (Figure 4a), which remained at adequate levels for about one hour. The assisted oxygenation values achieved after the damage were statistically equal to pre-injury levels, as measured both on the commercial ventilator (Commercial V) and the TEC-ventilator. The observed changes in ventilation were rapid, as expected with assisted breathing equipment.

Oxygen pressure (pO_2). Another critical parameter monitored during the intervention was arterial oxygen pressure (Figure 4b). Its value reflects the state of the oxygen-capturing function of the lung [20]. In the healthy lung, the arterial partial pressure of oxygen (pO_2) is thought to remain almost constant [21]. Respiratory paO_2 oscillations of less than 16 mmHg have been detected in animals with intact lungs when abnormally large tidal volumes (TV) greater than 20 mL kg^{-1} or even 30 mL kg^{-1} were administered during mechanical ventilation [21]. Large swings in pO_2 have been observed on injured lung [22] as variable intra-respiratory shunting caused by cyclic atelectasis, causing pO_2 to increase during inspiration and decrease during expiration. According to the results, the oxygen pressure determined by both ventilators before lung injury indicated statistically similar values representative of a healthy lung ventilated at 100% oxygen (315.60-349.29 mmHg); when inducing lung injury, a significant decrease was observed, reaching values practically ten times lower (35.63 mmHg). With the ventilation assisted by the TEC-ventilator (100% oxygen) after the lung injury, the pressure was recovered over time, observing an incremental trend. After 40-50 minutes, there was a significant positive difference between the value at that time (153.67 mm Hg) and the representative at the time of injury. If this trend continues, values higher than those recorded 50 minutes post-injury could be recovered.

Carbon dioxide pressure (pCO_2). When ventilation increases in the body, the concentration of CO_2 in the extracellular fluid decreases since CO_2 is lost through the lungs [20]. The CO_2 typically dissolved in body fluids is 1.2 mmol L^{-1} , corresponding to a partial carbon dioxide (pCO_2) pressure of approximately 40 mmHg [23]. When the metabolic production of CO_2 increases, the pCO_2 will also increase simultaneously [20], [24], [25]. Figure 4c (pCO_2) presents the summary of the CO_2 partial pressure monitored during the intervention. It was observed an increasing trend in the CO_2 partial pressure. However, this increase did not become statistically significant at any monitoring points. In addition, it ranged in moderate values between 34.02-47.20 mmHg, which is associated with the effectiveness of the ventilation process, which manages to modulate CO_2 through the inspiration/expiration circuit. This positive action of the ventilation function mitigated the effect of lung injury on this parameter.

pH. The fluctuation of O_2 and CO_2 gases, measured as the resulting arterial pressure, produces changes in the body's acid-base balance, which is reflected in variations of blood pH [24]. In mammals, the average blood pH is about 7.4 [26] for the proper functioning of proteins, cell components and its homeostasis [26], [27]. The body carries out a series of modulations to balance the pH, including lung function to increase the elimination of CO_2 [30], some buffering chemical reactions (bicarbonate buffer system), as well as contributing to storage in red blood cells [28],[29], [30]. In the case of mechanical ventilators, the efficiency of the acid-base control respiratory mechanism is 50-75%; that is, it has a feedback gain of 1 to 3. This translates into a drop in pH of 7.4 to 7.0, and the lung can compensate up to 7.2 or 7.3. In general, the overall buffering capacity of a ventilator can be 1-2 times higher than some chemical extracellular fluid buffers combined [29].

The intervention results show that before the induction of the injury, both the commercial ventilator and the TEC-ventilator achieved hyperoxygenation (ventilation at 100% oxygen), translated into pH values statistically higher than those obtained in the lung injury. This value falls statistically at that point, decreasing as time increases (Figure 4d). This event is also justified by the results of the CO_2 partial pressure (Figure 4c), where the tendency is for the CO_2 level to increase and, consequently, produce a drop in the blood's pH. However, these values are not critical or did not show an essential alteration in the acidification of the organism despite the significant statistical differences found.

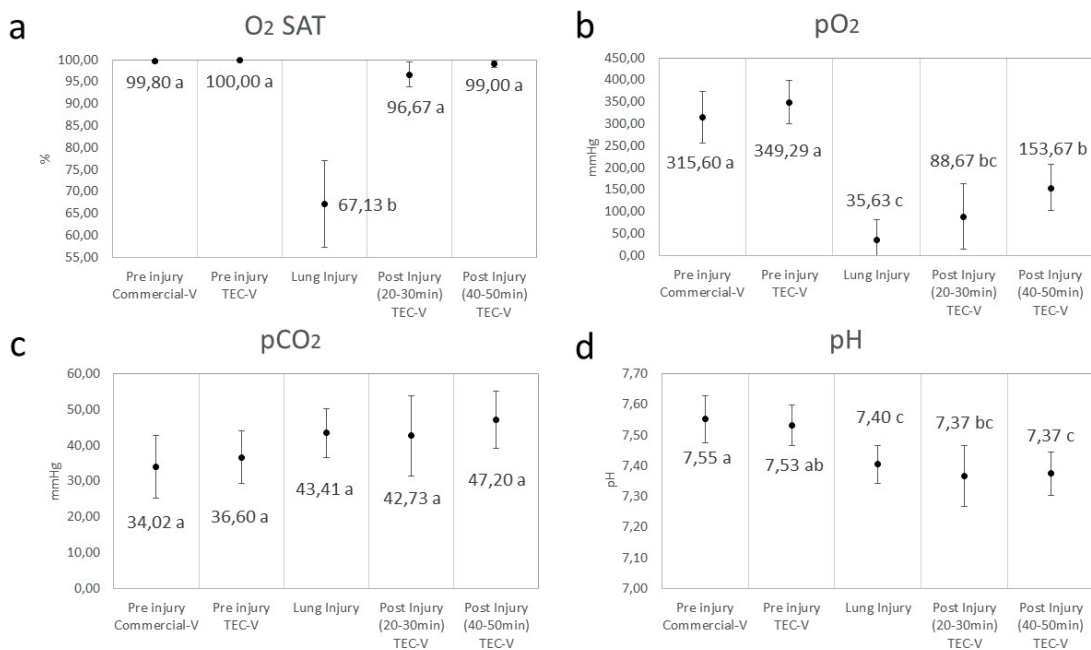


Figure 4. Physiological gas and pH parameters (mean \pm SD) in pigs ($n = 7$) before and after lung injury and treated with the TEC-ventilator (TEC-V) or with the commercial ventilator. a) Blood oxygen saturation (O_2 SAT), b) oxygen pressure (pO_2), c) CO_2 partial pressure (pCO_2), d) pH. The 95% confidence interval is shown. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.050$) (pairwise comparison). O_2 SAT by One-way ANOVA-Welch and Games-Howell test, other variables by One-way ANOVA-F and Tukey test.

Bicarbonate ion (HCO_3^-). The ability of HCO_3^- to undergo pH-dependent conversions is critical to its physiological role in maintaining the concentration of H^+ within a normal range and eliminating the significant accumulation of acids produced daily in the body [31]. It consists of an aqueous solution that contains a weak acid, such as H_2CO_3 , and a bicarbonate salt, such as N_aHCO_3 [28]. Various reactions occur within the body so that the concentration of H_2CO_3 decreases,

which favors the reaction of H_2O and CO_2 to replenish the amounts of H_2CO_3 and favoring the elimination of CO_2 by the lung. It also decreases the blood levels of CO_2 and the excess of HCO_3^- in the blood; then, it is compensated by increasing its renal excretion [28]. Figure 5a shows that the variation in the intervention in this physiological parameter followed a very similar trend to that of CO_2 partial pressure and pH due to the previously explained relationship between all these parameters in search of physiological compensation.

Base excess. The same trend in pH and bicarbonate anion concentration was observed in base excess (Figure 5b) since it is also linked to blood CO_2 partial pressure. Base excess is the amount of acid required to restore one liter of blood to its normal pH at pCO_2 40 mm Hg and it is also expressed as mEq L^{-1} . A positive base excess would indicate a metabolic alkalosis, adding acid to return the blood to normal pH. A negative base excess value would indicate metabolic acidosis, meaning that acids must be removed to return the blood to normal pH [32].

The values observed in the results show that after the lung injury, there was a period where metabolic acidosis ($-1.00 \text{ mmol L}^{-1}$) occurred due to the excess of CO_2 which accumulated in the body and subsequently recovered due to the buffering effect of the organism to positive values (2.17 mmol L^{-1}), which also evidences the respiratory assistance provided by the TEC-ventilator in the evacuation of CO_2 .

However, the value measured for base excess does not depend exclusively on the variation of CO_2 in the body [32]. For this reason, the experimental values do not change immediately in correspondence with lung injury, as we observed in the case of pH and the bicarbonate ion. Base excess comprises blood hemoglobin concentration, plasma protein and phosphate concentration, and the ion concentration itself [33], [34].

Lactate. Regarding lactate, it is known that the increase in the levels of this metabolite is used as a marker of tissue hypoxia; if it is not resolved, it leads to the development of organ dysfunction-failure [34]. Lactate results from anaerobic metabolism [35]; therefore, it is necessary to improve the oxygen supply to the patient's tissues with increased lactate levels to improve the outcome of critically ill patients. Several studies aimed at improving tissue oxygenation in patients with increased lactate levels (hyperlactatemia) have decreased morbidity and mortality [36]. It can also predict mortality after severe blunt traumas [35], [37] and is associated with the degree of organ failure in patients with septic shock [38].

The results obtained (Figure 5c) in this study showed normal lactate levels close to 2 mmol L^{-1} when the patient was ventilated at 100% oxygen with the commercial ventilator and with the TEC-ventilator before the induction of the injury ($2.32\text{-}2.28 \text{ mmol L}^{-1}$). The values of the metabolite evolved to 3.10 mmol L^{-1} once the damage was induced and reached the maximum of 5.38 mmol L^{-1} 20-30 minutes after the injury due to the deficiency of oxygen that is transported to the tissues; it is relevant to indicate that this change is not immediate due to the body's compensation. Therefore, the effect was delayed in time. However, at 50 minutes, it was observed that TEC ventilator-assisted oxygenation could begin to lower blood lactate levels (3.91 mmol L^{-1}). Although the changes in the average values did not show a significant statistical difference (due to the variability in the measurement), the values do show relevant trends for the attending veterinarian, which allows modulating respiratory assistance to stabilize the patient (Figure 5c).

Mean Arterial Pressure (MAP). It is the diastolic and systolic pressure ratio [39]. Respiratory failure is an arterial oxygen pressure below 60 mmHg or carbon dioxide pressure above 45 mmHg. The clinical manifestations of an imminent respiratory failure are the increased breathing frequency and the acceleration in the respiratory effort [40].

Blood pressure was modulated to stabilize the pigs during and after the induction of the injury; on some occasions, the momentary pressure drop was below 50 mmHg (hypotension) because of the lung injury. It required the application of lobutamine to avoid adding physiological stress to the animal. The results show (Figure 5d) that pressure compensation allowed the animals to be stable. It is essential to keep in mind that the vital signs of the pigs are very similar to those of humans since they present a heart rate of 58 to 86 beats min^{-1} , oxygen saturation of 95 \pm 5 percent, blood pressure of 100/60 mmHg \pm 10 mmHg, and the temperature parameter around 39°C \pm 5°C [41].

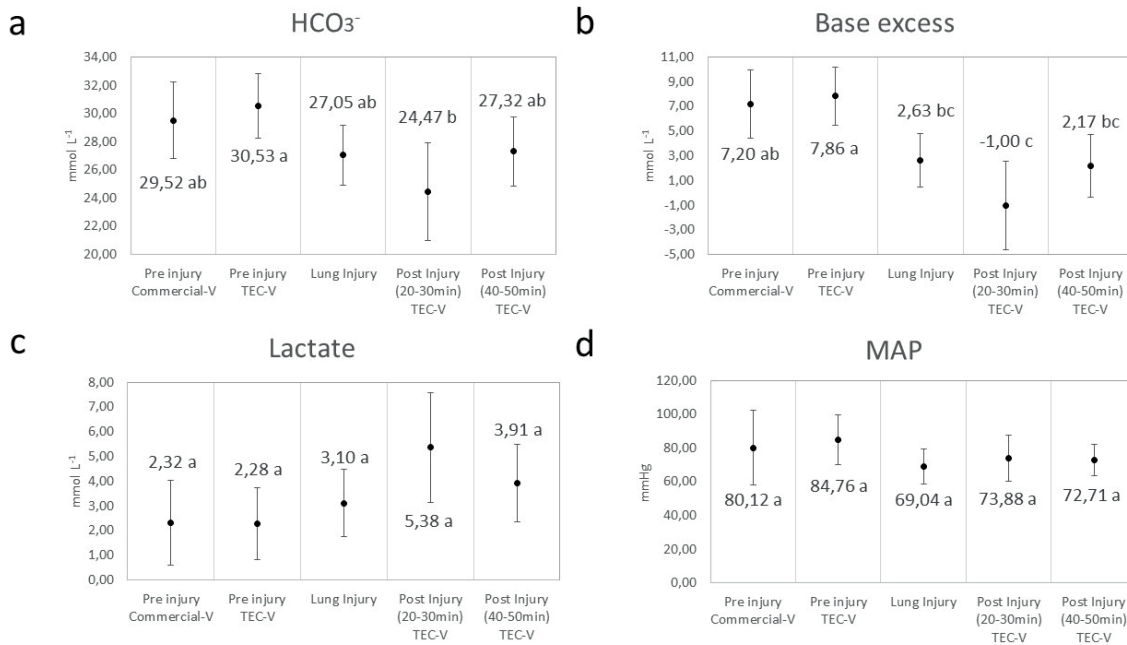


Figure 5. Other physiological parameters (mean \pm SD) in pigs ($n = 7$) before and after lung injury and treated with the TEC-ventilator (TEC-V) or with the commercial ventilator. a) Bicarbonate (HCO_3^-), b) base excess, c) lactate, d) mean arterial pressure (MAP). The 95% confidence interval is shown. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.050$) (pairwise comparison). One-way ANOVA-F and Tukey test.

Respiratory Rate (RESP). The respiratory rate plays an essential role in the CO_2 concentration of the extracellular fluid [42] [43]. Alveolar ventilation can modulate the concentration of CO_2 , but it, in turn, is affected by the concentration of hydrogen ions. The reason is a decrease in the partial pressure and amount of O_2 in the blood when the pH decreases; therefore, the respiratory system is forced to improve ventilation through an increase in respiratory rate [43], [44]. Under normal conditions, the respiration rate of juvenile pigs ranges from 25-40 breaths min^{-1} [45].

Through the assisted ventilation function, the respiratory rate was modulated to help the animal receive enough oxygen to regulate his physiological level at adequate points and thus stabilize the changes in the acid-base. This was achieved by controlling the operation of the ventilator and thereby maintaining the frequency. The TEC ventilator proved efficient in modulating this parameter before and after the lung injury and was statistically equal to the commercial ventilator before the injury (Figure 6a).

Heart Rate (HR). Changes in HR are used to diagnose multiple disorders by reflexing the direct/indirect effect of physiological stress and the compensation by the autonomic nervous system [46], [47], [49]. The increase in heart rate compromises cardiac output due to the rise in the amount of oxygen consumed by the myocardium, while the reduction in the diastolic time can

lead to a decrease in the pumped blood volume [47]. The heart rate of animals can vary in a range of 60 to 150 beats min^{-1} , depending on factors such as the size of the animal, exercise, or emotional arousal [48]. In weaned pigs, the HR ranges from 90 to 100 beats per minute [45].

In the case of this study, respiratory rate monitoring functioned as a marker of stress and as a parameter to measure anesthesia in the animal. No significant variation in beats per minute was observed during the monitoring. The average values ranged between 98-75 and were helpful in the anesthesia regulation process, mainly during the induction of lung injury (Figure 6b).

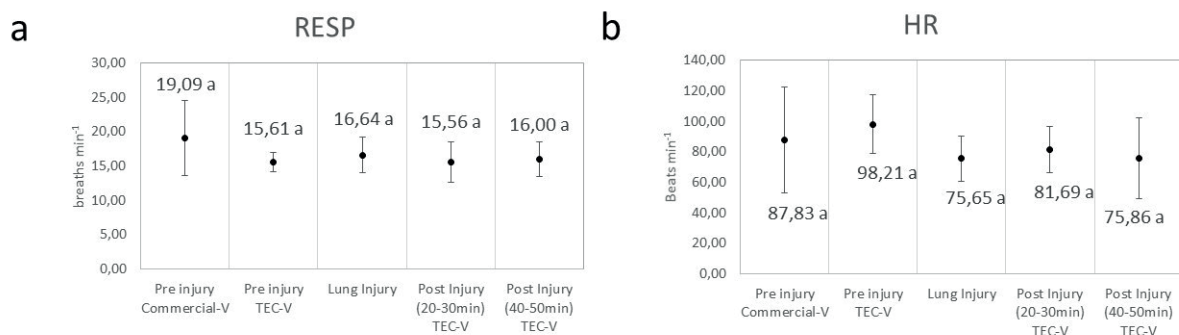


Figure 6. Respiratory and heart rate (mean \pm SD) in pigs ($n = 7$) before and after lung injury and treated with the TEC-ventilator (TEC-V) or with the commercial ventilator. a) respiratory rate (RESP), b) heart rate (HR). The 95% confidence interval is shown. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.050$) (pairwise comparison). One-way ANOVA-F and Tukey test.

Overall, the TEC-ventilator demonstrated that its operation was equivalent to the commercial control ventilator when statistically comparing the compensation of the vital signs of the evaluated animals. Additionally, the operation and handling of the device did not present a limitation for the attending veterinary physician, who had experience using this type of device. According to its regulatory parameters, indication of use, and current performance, this device could be classified as Type III. Its advantage over commercial ventilators within this category lies in its manufacturing cost (8,500 USD), which is less than half that of some commercially available models, and the potential local availability of units. Since it is an expensive resource, health centers generally do not maintain idle units.

The reason for using an animal model for evaluating medical devices, drugs, and therapies for human health, is based on the similarity between animals and humans. Although they do not fully replicate human conditions, they allow the application of procedures where the results obtained can be largely inferential to human beings [49], [50] and thereby reduce the risk of offering products and services to the market that would present a potential threat to people [51]. An example is a porcine model, which has a high anatomical, histological, and physiological similarity to the human being, which is particularly useful in the field of respiratory medicine because of the structure and distribution of the respiratory tract [52], [53]. This is critical for our objective when testing the safety and effectiveness of the ventilator, where intubation of the specimen is required, being one of the scenarios where animal models to date are difficult to replace.

Conclusions

The device under evaluation proved to be safe as it did not cause harm to the animals; the percentages of fatal and non-fatal complications caused by the ventilator was 0% in both cases. The TEC-ventilator was shown to be effective in managing respiratory failure in 100% of animals

with induced lung injury and ventilated with the TEC device. Compared to the commercial ventilator used as control, it demonstrated the ability to regulate monitored parameters to equivalent levels, as well as ease of use and the advantage of a lower price.

Supplementary material

Data from individual monitoring per animal is summarized in a multiparameter graph. Overall behavior and tendencies are detailed per animal since variations are expected regarding metabolic conditions. It will be provided under proper request.

Author Contributions

Conceptualization, A.Q-M, A.R-B, R.E-M and R.C-C.; methodology, R.E-M and R.C-C; formal analysis, R.E-M and R.C-C.; investigation, A.Q-M, A.R-B, R.E-M and R.C-C.; data curation, R.C-C and R.E-M.; writing—original draft preparation, R.C-C.; writing—review and editing, A.Q-M, A.R-B, R.E-M and R.C-C.; project administration, A.Q-M.; funding acquisition, A.Q-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This project was funded by Vicerrectoría de Investigación y Extensión, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Grant VIE-5401-1490-2701 Special edition COVID-19 projects.

Institutional Review Board Statement

The animal study protocol was approved by the Institutional Committee for the Bioethics and Animal Care (CBBA for its acronym in Spanish) of the National University of Costa Rica (UNA), Veterinary Sciences (protocol code UNA-EMV-CBBA-ACUE-006-2020, 03 September 2020).

Acknowledgments

The authors thank the M.D. Carlos Estrada-Garzona for his support in human pneumology and critical care consultancy; MBA. Adriana Nanne-García for the administrative and strategic support for the link with the UCIMED alliance (University of Medical Sciences); the technical team of research assistants from the TEC, especially Eng. Fabio Rojas-Fernández, Eng. Anny Alfaro-López, Eng. Hamlet Loría-Mesén, Eng. María José Araya-Cárdenas, Eng. Luis Ramírez Anchía, and Eng. Wilson Bermúdez Campos and the veterinary team from the UNA Large Animal Hospital.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] O. Peñuelas *et al.*, “Long-term survival of mechanically ventilated patients with severe COVID-19: an observational cohort study,” *Ann Intensive Care*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, Dec. 2021, doi: 10.1186/S13613-021-00929-Y/TABLES/2.
- [2] WHO, “WHO, 2022,” WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. Accessed: Sep. 28, 2022. [Online]. Available: <https://covid19.who.int/>



- [3] V. P. Chavda, A. B. Patel, and D. D. Vaghasiya, "SARS-CoV-2 variants and vulnerability at the global level," *J Med Virol*, vol. 94, no. 7, pp. 2986–3005, Jul. 2022, doi: 10.1002/JMV.27717.
- [4] A. Vallatos *et al.*, "Adaptive Manufacturing for Healthcare During the COVID-19 Emergency and Beyond," *Front Med Technol*, vol. 3:702556, pp. 1–18, Aug. 2021, doi: 10.3389/FMEDT.2021.702526.
- [5] M. Dar, L. Swamy, D. Gavin, and A. Theodore, "Mechanical-Ventilation Supply and Options for the COVID-19 Pandemic Leveraging All Available Resources for a Limited Resource in a Crisis," *Ann Am Thorac Soc*, vol. 18, no. 3, pp. 408–416, Mar. 2021, doi: 10.1513/ANNALSATS.202004-317CME/SUPPL_FILE/DISCLOSURES.PDF.
- [6] J. M. Pearce, "A review of open source ventilators for COVID-19 and future pandemics," *F1000Res*, vol. 9: 218, pp. 1–29, April. 2020, doi: 10.12688/F1000RESEARCH.22942.2.
- [7] R. Beale *et al.*, "OxVent: Design and evaluation of a rapidly-manufactured Covid-19 ventilator," *EBioMedicine*, vol. 76:103868, pp. 1–12, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.ebiom.2022.103868.
- [8] A. Ruiz-Barquero *et al.*, "Design and implementation of a controlled low-cost ventilator for emergency use on ICU patients," *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 37, no. 3, pp. 178–191, Jun. 2024, doi: 10.18845/tm.v37i3.6838.
- [9] K. Portier and K. K. Ida, "The ASA physical status classification: What is the evidence for recommending its use in veterinary anesthesia?-A systematic review," *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 5: 204, pp. 1–15, Aug. 2018, doi: 10.3389/fvets.2018.00204.
- [10] M. Daabiss, "American Society of Anaesthesiologists Physical Status Classification," *Indian Journal of Anaesthesia*, vol. 55, no. 2, pp. 111–115, Mar. 2011. doi: 10.4103/0019-5049.79879.
- [11] B. K. Peterson, Chapter 22 - "Vital Signs.," in *Physical Rehabilitation: Evidence-Based Examination, Evaluation, and Intervention*, ed., M. H. Cameron, and L. G. Monroe, Ed., St Louis: Saunders Elsevier, Jan. 2007, pp. 598–624, doi: 10.1016/B978-072160361-2.50025-9.
- [12] E. R. Johnson and M. A. Matthay, "Acute Lung Injury: Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment," *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, vol. 23, no. 4, pp. 243–252, Aug. 2010, doi: 10.1089/JAMP.2009.0775.
- [13] L. Li, Q. Huang, D. C. Wang, D. H. Ingbar, and X. Wang, "Acute lung injury in patients with COVID-19 infection," *Clin Transl Med*, vol. 10, no. 1, pp. 20–27, Mar. 2020, doi: 10.1002/CTM2.16.
- [14] H. B. Alam, B. Austin, E. Koustova, and P. Rhee, "Resuscitation-induced pulmonary apoptosis and intracellular adhesion molecule-1 expression in rats are attenuated by the use of Ketone Ringer's solution," *J Am Coll Surg*, vol. 193, no. 3, pp. 255–263, Sep. 2001, doi: 10.1016/S1072-7515(01)01004-3.
- [15] L. Chimenti *et al.*, "Comparison of direct and indirect models of early induced acute lung injury," *Intensive Care Medicine Experimental*, vol. 8, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2020, doi: 10.1186/S40635-020-00350-Y/FIGURES/5.
- [16] G. Matute-Bello, C. W. Frevert, and T. R. Martin, "Animal models of acute lung injury," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 295, no. 3, pp. L379–L399, Sep. 2008, doi: 10.1152/ajplung.00010.2008.
- [17] Minitab LLC, "Minitab Statistical Software." 2019. Available from: <https://www.minitab.com>.
- [18] E. G. F. Biteli *et al.*, "Blood gas analysis in pigs submitted to different concentrations of nitrous oxide or oxygen, under different ventilatory modalities," *Arq Bras Med Vet Zootec*, vol. 71, no. 1, pp. 35–43, Jan. 2019, doi: 10.1590/1678-4162-10210.
- [19] A. Lervik, S. F. Toverud, R. Krontveit, and H. A. Haga, "A comparison of respiratory function in pigs anaesthetised by propofol or alfaxalone in combination with dexmedetomidine and ketamine," *Acta Vet Scand*, vol. 62:14, no. 1, pp. 1–9, Mar. 2020, doi: 10.1186/s13028-020-0512-y.
- [20] P. D. Wagner, "The physiological basis of pulmonary gas exchange: Implications for clinical interpretation of arterial blood gases," *European Respiratory Journal*, vol. 45, no. 1, pp. 227–243, Jan. 2015, doi: 10.1183/09031936.00039214.
- [21] F. Formenti *et al.*, "Respiratory oscillations in alveolar oxygen tension measured in arterial blood," *Sci Rep*, vol. 7:7499, no. 1, pp. 1–10, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06975-6.
- [22] R. S. Syring, C. M. Otto, R. E. Spivack, K. Markstaller, and J. E. Baumgardner, "Maintenance of end-expiratory recruitment with increased respiratory rate after saline-lavage lung injury," *J Appl Physiol*, vol. 102, no. 1, pp. 331–339, Jan. 2007, doi: 10.1152/JAPPLPHYSIOL.00002.2006/ASSET/IMAGES/LARGE/ZDG0010769610006.JPEG.
- [23] B. S. Nassar and G. A. Schmidt, "Estimating arterial partial pressure of carbon dioxide in ventilated patients: How valid are surrogate measures?," *Annals of the American Thoracic Society*, vol. 14, no. 6. American Thoracic Society, pp. 1005–1014, Jun. 01, 2017. doi: 10.1513/AnnalsATS.201701-034FR.

- [24] H. J. Adrogué and N. E. Madias, "Secondary responses to altered acid-base status: The rules of engagement," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 21, no. 6. pp. 920–923, Jun. 2010. doi: 10.1681/ASN.2009121211.
- [25] J. Fierstra, M. MacHina, A. Battisti-Charbonney, J. Duffin, J. A. Fisher, and L. Minkovich, "End-inspiratory rebreathing reduces the endtidal to arterial PCO₂ gradient in mechanically ventilated pigs," *Intensive Care Med*, vol. 37, no. 9, pp. 1543–1550, Sep. 2011, doi: 10.1007/s00134-011-2260-y.
- [26] W. Aoi and Y. Marunaka, "Importance of pH Homeostasis in Metabolic Health and Diseases: Crucial Role of Membrane Proton Transport," *BioMed Research International*, vol. 2014:598986, pp. 1–8, Sept. 2014. doi: 10.1155/2014/598986.
- [27] E. D. Barros and C. D. Rojas, "Valores de electrolitos, gases sanguíneos, nitrógeno ureico y glucosa en sangre venosa de caninos, ubicados a 2.600 msnm," *Rev Med Vet (Bogota)*, vol. 1, no. 16, pp. 53–61, Jan. 2008, Accessed: May 15, 2022. [Online]. Available: <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv/vol1/iss16/8>
- [28] E. N. Robinson, "Cap 52. Homeostasis acidobásica. Sección IX: Homeostasis.," in *Cunningham Fisiología Veterinaria*, 5ta ed., B. G. Klein, Ed., Barcelona: Elsevier España S.L, 2014, pp. 549–554.
- [29] R. Galera, L. Gómez Carrera, and B. Ortega, "Respiratory tract diseases," *Medicine*, vol. 10, no. 63, pp. 4323–4331, 2010, doi: 10.1016/S0304-5412(10)70241-9.
- [30] T. Sánchez and I. Concha, "Estructura y Funciones del Sistema Respiratorio," *Neumología Pediátrica*, vol. 13, no. 3, pp. 101–106, Jan. 2018, doi: 10.51451/NP.V13I3.212.
- [31] E. Cordat and J. R. Casey, "Bicarbonate transport in cell physiology and disease," *Biochemical Journal*, vol. 417, no. 2, pp. 423–439, Jan. 2009, doi: 10.1042/BJ20081634.
- [32] G. P. Burns, "Arterial blood gases made easy," *Clinical Medicine*, vol. 14, no. 01, pp. 66–68, Feb. 2014, doi: 10.7861/clinmedicine.14-1-66.
- [33] L. Gattinoni and E. Carlesso, "Arterial and Venous Blood Gases," in *Critical Care Nephrology*, 2nd ed., C. Ronco, R. Bellomo, and J. A. Kellum, Eds., Philadelphia, USA: W.B. Saunders, 2009, pp. 607–611. doi: 10.1016/B978-1-4160-4252-5.50121-0.
- [34] K. Berend, "Diagnostic Use of Base Excess in Acid–Base Disorders," *New England Journal of Medicine*, vol. 378, no. 15, pp. 1419–1428, Apr. 2018, doi: 10.1056/nejmra1711860.
- [35] S. C. Gale, J. F. Kocik, R. Creath, J. S. Crystal, and V. Y. Dombrovskiy, "A comparison of initial lactate and initial base deficit as predictors of mortality after severe blunt trauma," *Journal of Surgical Research*, vol. 205, no. 2, pp. 446–455, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.jss.2016.06.103.
- [36] I. Smith *et al.*, "Base excess and lactate as prognostic indicators for patients admitted to intensive care," *Intensive Care Med*, vol. 27, no. 1, pp. 74–83, Jan. 2001, doi: 10.1007/S001340051352.
- [37] J. Qi, L. Bao, P. Yang, and D. Chen, "Comparison of base excess, lactate and pH predicting 72-h mortality of multiple trauma," *BMC Emerg Med*, vol. 21:80, no. 1, pp. 1–7, Dec. 2021, doi: 10.1186/s12873-021-00465-9.
- [38] M. Garcia-Alvarez, P. Marik, and R. Bellomo, "Sepsis-associated hyperlactatemia," *Critical Care*, vol. 18:503, no. 5, pp. 1–11, Sep. 09, 2014. doi: 10.1186/s13054-014-0503-3.
- [39] R. B. Stephenson, "Cap 22. Circulaciones pulmonar y sistémica. 213-221 pp. Sección III: Fisiología Cardiovascular.," in *Cunningham Fisiología Veterinaria*, 5ta ed., B. G. Klein, Ed., Barcelona: Elsevier España S.L, 2014, pp. 213–221.
- [40] C. Roussos and A. Koutsoukou, "Respiratory failure," *European Respiratory Journal*, vol. 22, no. Supplement 47, pp. 3s–14s, Nov. 2003, doi: 10.1183/09031936.03.00038503.
- [41] M. A. López Centeno, G. Ruiz Ripstein, M. Ramírez Ruíz, and A. Arce Ruelas, "Investigación en Salud," *Investigación en Salud*, vol. 6, no. 1, pp. 11–13, 2004, Accessed: May 15, 2022. [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14260103>
- [42] S. Rolfe, "The importance of respiratory rate monitoring," *British Journal of Nursing*, vol. 28, no. 8, pp. 504–508, April 2019, Accessed: May 15, 2024. [Online]. Available: <https://www.britishjournalofnursing.com/content/clinical/the-importance-of-respiratory-rate-monitoring/>
- [43] E. N. Robinson, "Cap 45. Visión General de la función respiratoria. Sección VIII: Función Respiratoria.," in *Cunningham Fisiología Veterinaria*, 5ta ed., B. G. Klein, Ed., Barcelona: Elsevier España S.L, 2014, pp. 495–503.
- [44] J. Dolensšek, F. Runovc, and M. Kordaš, "Simulation of pulmonary ventilation and its control by negative feedback," *Comput Biol Med*, vol. 35, no. 3, pp. 217–228, Mar. 2005, doi: 10.1016/J.COMPBIOMED.2004.02.002.



- [45] C. Pereira-Barbosa, H. Dohmeier, J. Kunczik, N. Hochhausen, R. Tolba, and M. Czaplik, "Contactless monitoring of heart and respiratory rate in anesthetized pigs using infrared thermography," *PLoS One*, vol. 14, no. 11, pp. 1–12, Nov. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0224747.
- [46] Y. Kasahara, C. Yoshida, M. Saito, and Y. Kimura, "Assessments of Heart Rate and Sympathetic and Parasympathetic Nervous Activities of Normal Mouse Fetuses at Different Stages of Fetal Development Using Fetal Electrocardiography," *Front Physiol*, vol. 12:652828, pp. 1–7, Apr. 2021, doi: 10.3389/fphys.2021.652828.
- [47] I. Álvarez-Ramírez and L. E. Cruz-Martínez, "Fisiología cardiovascular aplicada en caninos con insuficiencia cardiaca," *Rev Med Vet (Bogotá)*, vol. 21, pp. 115–132, Jan/June. 2011, Accessed: May 15, 2022. [Online]. Available: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542011000100009
- [48] R. B. Stephenson, "Cap 21. El corazón como bomba. Sección III: Fisiología Cardiovascular.," in *Cunningham Fisiología Veterinaria*, 5ta ed., Barcelona: Elsevier España S.L, 2014, pp. 200–209.
- [49] F. Barré-Sinoussi and X. Montagutelli, "Animal models are essential to biological research: issues and perspectives," *Future Sci OA*, vol. 1, no. 4:FSO63, pp. 1–3, Jul. 2015, doi: 10.4155/FSO.15.63.
- [50] A. Hernández *et al.*, "Estudio comparativo de los cambios funcionales y estructurales producidos en un modelo porcino de infarto de miocardio agudo y crónico," *Arch Cardiol Mex*, vol. 86, no. 1, pp. 64–74, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.ACMX.2015.09.009.
- [51] D. G. Hackam, "Translating animal research into clinical benefit," *BMJ : British Medical Journal*, vol. 334, no. 7586, p. 163, Jan. 2007, doi: 10.1136/BMJ.39104.362951.80.
- [52] L. Fernández-Trujillo *et al.*, "El biomodelo porcino en la investigación médica traslacional: del biomodelo al humano en trasplante pulmonar," *Biomédica*, vol. 39, no. 2, pp. 300–313, Jun. 2019, doi: 10.7705/BIOMEDICA.V39I3.3820.
- [53] V. Ghorani, M. H. Boskabady, M. R. Khazdair, and M. Kianmeher, "Experimental animal models for COPD: a methodological review," *Tob Induc Dis*, vol. 15, no. 25, pp. 1–13, May 2017, doi: 10.1186/S12971-017-0130-2.

Procesamiento y esterilización de tejido óseo para su uso terapéutico: bases preclínicas desde una universidad tecnológica


Bone tissue processing and sterilization for therapeutic use: preclinical experiments from a technological university

Carolina Centeno-Cerdas¹, Fabián Somarribas-Brenes²,
Walter Vargas-Segura³, Montserrat Jarquín-Cordero⁴,
Andrea Ulloa-Fernández⁵, Laura A. Calvo-Castro⁶

Centeno-Cerdas, C; Somarribas-Brenes, F; Vargas-Segura, W; Jarquín-Cordero, M; Ulloa-Fernández, A; Calvo-Castro, L.A. Procesamiento y esterilización de tejido óseo para su uso terapéutico: bases preclínicas desde una universidad tecnológica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 215-228.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7625>

1 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 [cccenteno@itcr.ac.cr](mailto:ccenteno@itcr.ac.cr)

 <https://orcid.org/0000-0003-4600-8887>

2 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 somarribas.bio@gmail.com

 <https://orcid.org/0009-0000-7899-4429>

3 Escuela de Física. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 walvargas@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0003-2434-1945>

4 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 mocordero@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0001-7926-7290>

5 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 andreguf@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0002-3071-9564>

6 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 ancalvo@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0001-5101-9105>

Palabras clave

Hueso; irradiación gamma; banco de tejidos; peróxido de hidrógeno.

Resumen

Entre los métodos más utilizados de esterilización de hueso se encuentra la irradiación gamma. La dosis considerada estándar para alcanzar la esterilidad es de 25 kGy. Los estándares internacionales recomiendan la validación de los procedimientos a nivel local, de forma que sean factibles con el personal y las capacidades técnicas del país. En este estudio, se trataron muestras de tejido óseo porcino mediante desinfección química y esterilización con irradiación gamma, reduciendo la carga microbiana a niveles no detectables, sin afectar de manera significativa las propiedades deseables de la matriz tisular, lo cual se comprobó mediante caracterización de proteínas como el colágeno y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y microscopía electrónica de barrido. Esta investigación demuestra la capacidad del Instituto Tecnológico de Costa Rica de contribuir con la formación de profesionales y de acceso a equipo especializado que permiten el fortalecimiento de los bancos de tejidos en el país, y con ello continuar contribuyendo al desarrollo de nuevas estrategias tecnológicas que aporten a la salud humana.

Keywords

Bone; gamma irradiation; tissue banking; hydrogen peroxide.

Abstract

Gamma irradiation is among the most widely used methods of bone sterilization. The usual standard dose for achieving sterilization is 25 kGy. Although there are international standards for the main procedures, the general recommendation is to validate them at the local level, so that they are feasible with the personnel and technical capacities of the country. In this study, porcine bone tissue samples were treated by chemical disinfection and by sterilization with gamma irradiation, reducing the microbial load to non-detectable levels, without significantly affecting the desirable properties of the tissue matrix, which was verified by protein characterization of collagen and bone morphogenetic proteins (BMPs) and by scanning electron microscopy. This research demonstrates the ability of Costa Rica Institute of Technology (ITCR) to contribute to the training of professionals and to provide access to specialized equipment, which allows the strengthening of tissue banks in the country, and thereby contributing to the development of new technological strategies for human health.

Introducción

El aumento en la expectativa de vida, el concomitante incremento de las enfermedades crónico-degenerativas, y las actividades que llevan a lesiones extensas y traumas, hacen que la demanda de aloinjertos con fines terapéuticos se proyecte como una tendencia en franco crecimiento. Anualmente se realizan en el mundo más de 2.5 millones de trasplantes de tejidos procedentes de 58.000 donantes, y sólo en 2020 se trasplantaron 129.681 órganos [1]. Este escenario lleva a priorizar el diseño de estrategias exitosas capaces de fortalecer las actividades de donación y recuperación de múltiples tejidos y órganos en las instituciones especializadas para ello.

Los bancos de tejidos son instalaciones donde se recuperan, procesan, almacenan y distribuyen tejidos para que se apliquen a pacientes que requieren el reemplazo de grandes áreas de tejido, lo cual también implica el desarrollo paralelo de procesos médicos y tecnológicos relacionados,

así como de su regulación y homogenización internacional [1], [2]. El uso de estándares internacionales permite garantizar la seguridad y eficacia de los aloinjertos y xenoinjertos [3], [4], y fortalece la colaboración científica y promoción de las donaciones. Los bancos de tejidos no sólo proporcionan material biológico para trasplantes, sino que también favorecen el desarrollo de técnicas quirúrgicas, y habilitan nuevos usos de los injertos, contribuyendo a atender la creciente necesidad de tejidos [5], [6] y repercuten favorablemente en la calidad de la atención sanitaria. En Costa Rica existen varios bancos de tejidos para trasplante, incluyendo el Banco de Córneas y el Banco Nacional de Sangre, ambos de la Caja Costarricense de Seguro Social; el banco de tejidos perteneciente al Hospital Nacional de Niños; y el Banco de Tejidos del Servicio Quirúrgico del Hospital del Trauma del Instituto Nacional de Seguros de Costa Rica.

El tejido óseo constituye uno de los tejidos humanos de trasplante más frecuente [7]. En el pasado, la principal fuente de obtención de hueso era el mismo paciente mediante el uso de autoinjertos [8]. Con el avance de las técnicas de procesamiento se posibilitó el uso de donante cadavérico y remoción de miembros por amputación o procedimientos reconstructivos, lo que conlleva a un aumento en la disponibilidad de aloinjertos disponibles para la reconstrucción de tejidos dañados por traumas ortopédicos, tumores, artroplastias, u otras causas y, en todos los casos, convirtiéndose en un importante recurso médico al mejorar la calidad o incluso salvar la vida de los receptores [8], [9].

Para una adecuada distribución y disponibilidad de tejidos, la esterilidad y la conservación de su composición son aspectos vitales para tomar en cuenta en la gestión de un banco de tejidos [10]. El riesgo de contaminación es innegable y puede ser causa de infección, rechazo, o incluso muerte del receptor [7], [9]. La contaminación puede venir del donante, de los procedimientos relacionados a la procuración, procesamiento, almacenamiento, transporte y empaque del tejido, o incluso del mismo procedimiento de implantación [11]. Debido a esto, es de suma importancia aplicar las condiciones asépticas más estrictas en cada una de las etapas del proceso, así como optimizar los protocolos necesarios para la desinfección y esterilización del tejido para asegurar la bioseguridad en términos de carga microbiana y de propiedades físicas y biológicas, para así garantizar el éxito del trasplante [7].

La selección del método de esterilización más adecuado depende de la naturaleza y del estado físico del material a esterilizar (tejido sólido, blando, dispositivo, u otro); de la influencia del método de esterilización en las propiedades del material; del tipo de contaminante potencial; y del precio y acceso a la tecnología requerida; sin embargo, todos los métodos de esterilización presentan ventajas y riesgos; por ejemplo, los métodos químicos están asociados con riesgo de citotoxicidad, mientras que los métodos físicos pueden conllevar degradación de moléculas importantes para la función biológica del implante [12]. Los métodos de conservación (liofilización, criopreservación) también inciden en las características biológicas y fisicoquímicas del tejido (índice de viabilidad celular, pérdida de agua, de elasticidad y resistencia), influyendo en su posterior uso [13], [14].

Los métodos de esterilización química de tejidos incluyen el uso de diversas sustancias tales como antibióticos, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido peracético, etanol, óxido de etileno y otros biocidas de amplio espectro. Sin embargo, estas sustancias pueden ser corrosivas, lo cual puede afectar las propiedades biomecánicas del injerto [15], y pueden dejar residuos tóxicos [11].

El H_2O_2 es un método de esterilización química relativamente accesible, ampliamente utilizado, y efectivo para reducir cargas biológicas (*bioburdens*, en inglés); sin embargo, en concentraciones mayores al 30% y tiempos mayores a 15 minutos de exposición, su uso se ha relacionado con alteraciones histológicas y mecánicas, y puede causar la degradación de proteínas, incluyendo BMP-2 (*bone morphogenetic protein*, por sus siglas en inglés), un factor

de crecimiento indispensable para el desarrollo del hueso [11], [16]. No obstante, el H_2O_2 permite la remoción de células del donante, antígenos y agentes citotóxicos de la matriz, con lo cual se reduce el riesgo de rechazo al implante, y se estima que tiene un menor impacto en la integridad del tejido en relación con otros agentes químicos [11].

Por su parte, la esterilización por irradiación se trata de un proceso con mayor capacidad de penetración que los esterilizantes químicos (líquidos y gaseosos), lo cual es deseable para el proceso de esterilización. Las técnicas de irradiación utilizadas se basan en radiaciones ionizantes. El término radiación ionizante abarca todas las radiaciones con exceso de energía (rayos X y gamma, electrones de alta velocidad) capaces de producir cascadas de ionización en la materia. La energía de todas las radiaciones ionizantes se expresa como electronvoltios (eV) y se define como la energía ganada por un electrón que se mueve a través de una diferencia de potencial de 1 volt. La energía absorbida, es decir, la dosis absorbida, se mide en Greys (Gy): $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1}$. La unidad utilizada en el pasado fue rad, donde $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$ [17].

Se ha documentado que la radiación gamma presenta capacidad esterilizante tanto de manera directa a través del contacto con partículas, como de manera indirecta, por la generación de radicales libres; en ambos escenarios presentando gran poder de penetración e induciendo la muerte celular [18]. Además de eliminar poblaciones microbianas, la irradiación inactiva virus, micoplasmas y reduce el contenido de endotoxinas [8]. Desde mediados de la década de 1950 se registran ensayos clínicos sobre la eficacia de los injertos óseos humanos esterilizados mediante irradiación [17].

La eficiencia de la esterilización mediante radiación ionizante radica en su buena penetrabilidad dentro de la materia (especialmente rayos gamma) y en su alta efectividad en la inactivación de microorganismos patógenos sin incurrir en los problemas asociados de intercambio de calor, diferencia de presión u obstáculos por barreras de difusión. La radiación ionizante provoca un moderado aumento de temperatura que puede ser compensado para materiales biológicos sensibles, y es eficiente a temperatura ambiente e incluso a temperaturas bajo cero. La radiación ionizante también permite la esterilización de materiales en envoltorios previamente cerrados, evitando la re-contaminación durante el embalaje y posterior manipulación del tejido previa a la implantación [17].

El Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) ha dedicado esfuerzos a iniciativas que apoyen el establecimiento y diversificación de bancos de tejidos en el país [19], [20]. En el presente trabajo, se implementaron y validaron en el Instituto Tecnológico de Costa Rica procedimientos internacionalmente avalados para la procuración, esterilización y almacenamiento de tejido óseo, evidenciando con esto las capacidades técnicas en el país para la instalación, diversificación y fortalecimiento de bancos de este y otros tipos de materiales biológicos.

Materiales y métodos

Modelo de estudio y ablación de la muestra. Se utilizó hueso de origen porcino (*Sus scrofa*) proveniente de animales utilizados en entrenamientos quirúrgicos en el Centro de Investigación y Cirugía en Cáncer (CICICA), perteneciente a la Universidad de Costa Rica (UCR), quienes contaron con aprobación por parte del Comité Institucional para el Cuido y Uso de los Animales (CICUA-17-2018) para el procedimiento quirúrgico y eutanasia de los animales. El tejido óseo se extrajo retrayendo el glúteo profundo e incidiendo a través de su tendón, y se trasladó a las instalaciones del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) donde se removieron restos de sangre, grasa, cartílago y otras estructuras.

Desinfección superficial. El tejido óseo se cortó con una sierra para realizar la molienda de la cabeza femoral y se eliminó tejido blando y grasa, y los fragmentos (de 1 pulgada) se repartieron (en triplicados) en frascos de 250 mL, donde se sumergieron en suero fisiológico. Los frascos se colocaron en una bolsa estéril y se calentaron a 60 °C durante 50 minutos. Posteriormente, el suero de los frascos se eliminó utilizando un tamiz de filtración y se realizaron dos lavados adicionales con suero fisiológico en agitación por 10 minutos, eliminando el suero en cada cambio. Se eliminó el líquido remanente y los tejidos se almacenaron a -80 °C hasta los siguientes pasos de esterilización o análisis.

Esterilización química (EQ). Luego de la desinfección superficial, los fragmentos óseos se lavaron dos veces con peróxido de hidrógeno al 3% en agitación por 10 minutos, seguido por un lavado con suero fisiológico en agitación por 5 minutos. Se incubó el tejido óseo en suero con antibiótico (80 mg gentamicina y 1 g cefalotina en 100 ml de suero) en agitación por 20 minutos. Se agregó peróxido de hidrógeno al 3% y se dejó en agitación durante 18 horas, envueltos en una bolsa estéril. Finalmente, se agregó etanol 95% y se dejó en agitación durante 20 minutos.

Esterilización por irradiación (EI). Para el proceso de irradiación se utilizó un irradiador autoblandado de la marca Izotop, modelo Ob-Servo Ignis (Izotop, Hungary), que cuenta con 24 fuentes de Co-60. La cámara de irradiación es cilíndrica con 15 cm de diámetro interno y 27 cm de alto, fabricado en acero con un espesor de 2 mm. Para la verificación dosimétrica del material irradiado se utilizaron dosímetros Perspex RED tipo 4034 (batch PS), fabricados a partir de polimetilmetacrilato (Harwell Dosimeters, UK) que fueron calibrados siguiendo la recomendación de Sharpe & Miller [21].

Los valores de dosis límite para garantizar la esterilización y evitar la alteración del material en el proceso de irradiación se implementaron siguiendo la norma ISO 11137-3:2013 (Cuadro 1) [22]. Para determinar la incertidumbre del proceso de irradiación de las muestras, se acató lo establecido en la norma ISO 11137-4 [23], relacionado con el mapeo de dosis, datos requeridos para determinar las dosis: máxima, mínima y de monitoreo.

Cuadro 1. Dosis de radiación gamma establecidas para el proceso de esterilización de hueso.

| Tipo | Dosis (kGy) | Detalle |
|----------------|-------------|--|
| D_{est} | 25 | Dosis de esterilización. |
| $D_{max, acc}$ | 35 | Debe ser la máxima aceptable que no afecte las propiedades del material (basado en ISO 11137-4 [23], y [4]). |

Para determinar la dosis máxima, mínima y de monitoreo en el proceso de mapeo, se utilizó un polímero granulado o en pellets de densidad de 1.25 g cm⁻³ para simular el hueso y hielo seco para mantener las muestras congeladas. Para la simulación de hueso, tres recipientes similares a los utilizados para colocar las muestras de hueso a irradiar fueron llenados aproximadamente a la mitad de su capacidad con el polímero y en medio se colocó un dosímetro. Además, se utilizó este polímero para simular los bloques de hielo seco, colocados en la parte inferior y superior de los recipientes. La Figura 1 muestra el patrón de carga de las muestras y la posición de los dosímetros para cuantificar la distribución de dosis y con esto la determinación de la dosis máxima (D_{max}), mínima (D_{min}) y de monitoreo (D_{mon}). Este proceso fue repetido en tres ocasiones como se recomienda en la norma ISO/TS 11137-4 [23].

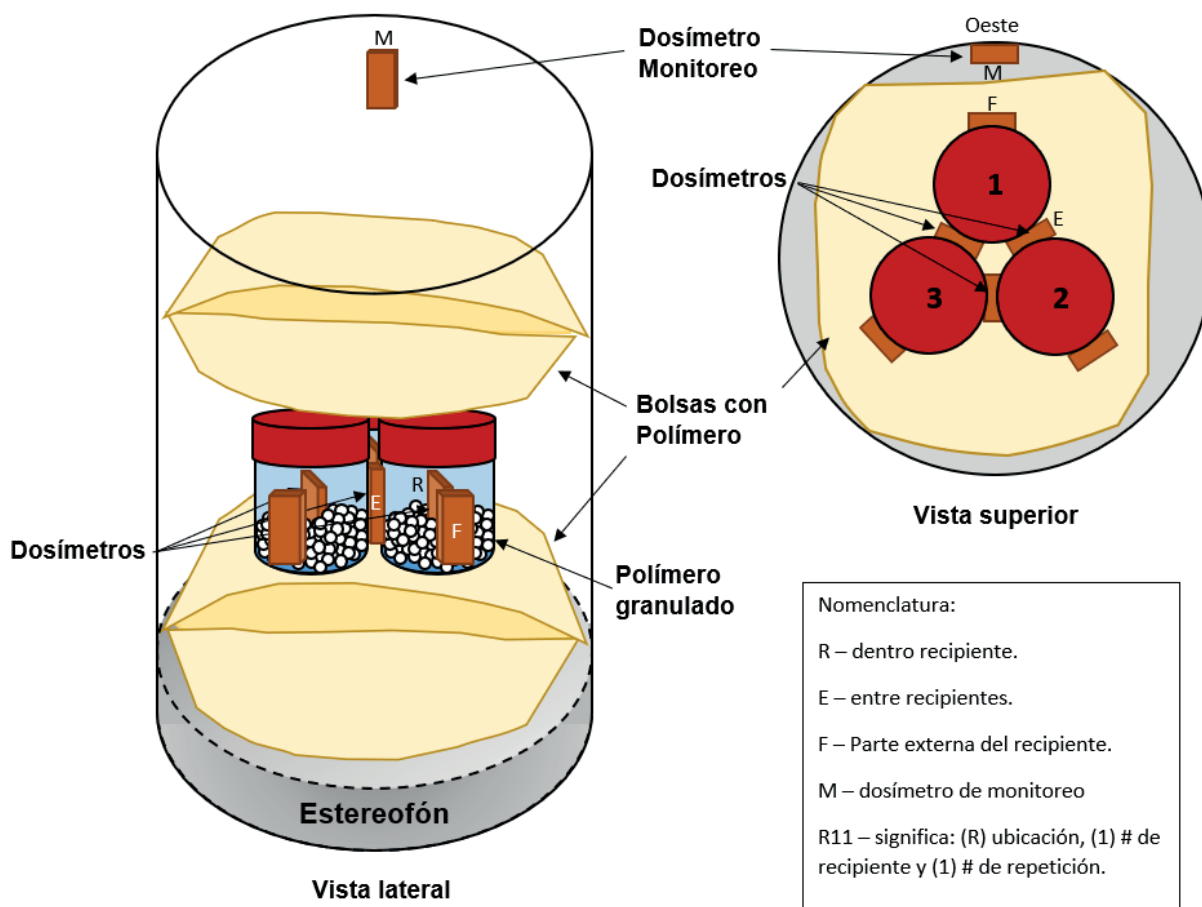


Figura 1. Patrón de carga utilizado en el mapeo de dosis de radiación (Co-60) para tejido óseo en el irradiador marca Izotop, modelo Ob-Servo Ignis, del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Debido al tiempo de exposición necesario para alcanzar la dosis requerida en el irradiador, para la irradiación de hueso (Figura 2) se utilizó hielo seco para mantener las muestras congeladas. Las muestras óseas fueron colocadas según el patrón de carga definido en el mapeo de dosis, colocando también el dosímetro de monitoreo para el control dosimétrico y el control microbiológico (ATCC 27142) para su verificación. Para el control de la temperatura dentro de la cámara de irradiación mientras las muestras fueron irradiadas se utilizó una termocupla.

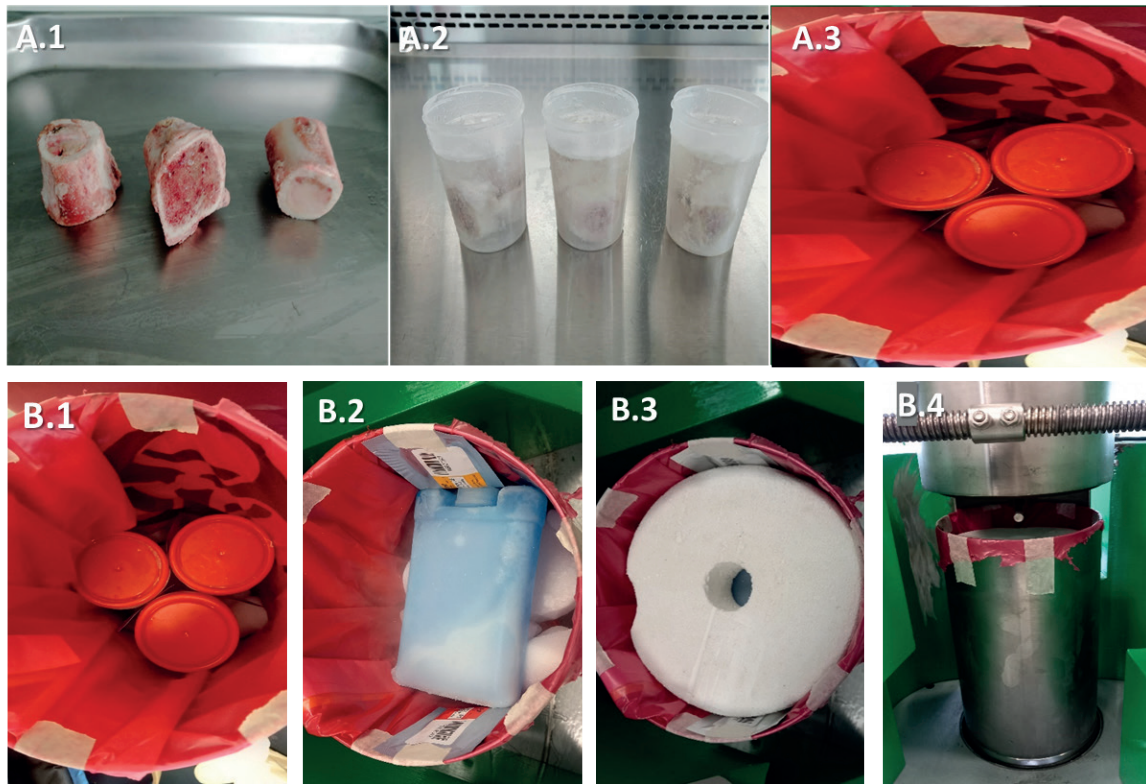


Figura 2. Desinfección del material óseo (A). Los huesos se sometieron a un lavado general con suero fisiológico (A.1, control), seguido de esterilización química (A.2) con peróxido de hidrógeno y suero fisiológico con antibiótico, o de esterilización por irradiación con rayos gamma utilizando una dosis de 25 kGy (A.3). Proceso de irradiación de hueso (B). Las muestras, dosímetros y control microbiológico (B.1) se cubrieron con hielo seco (B.2) y estereofón (B.3) para mantenerlas en congelación; se incluyó una termocupla para monitorear la temperatura durante el proceso, y se colocaron en la cámara del irradiador (B.4).

Control microbiológico. Los fragmentos óseos se lavaron con suero fisiológico estéril durante 5 minutos en agitación. El suero se filtró con el tamiz de filtrado utilizando filtros de 0.22 μm en condiciones de esterilidad. Los filtros se incubaron en agar de recuento estándar (ARE) a 37 °C y en agar papa dextrosa (PDA) a temperatura ambiente durante 7 días, al cabo de los cuales se tomaron fotografías y se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC).

Se utilizaron esporas del microorganismo *Bacillus pumilus* (ATCC 27142) en su presentación en tiras reactivas con un millón de esporas cada una como indicador biológico para la confirmación del proceso de esterilización por irradiación (Sigma-Aldrich Sterility Indicator). Los indicadores se colocaron junto con las muestras durante el proceso de irradiación. Las tiras irradiadas y sin irradiar se inocularon en tubos con caldo CASO estéril (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37 °C durante 7 días. Adicionalmente, las tiras incubadas en el medio CASO se utilizaron para inocular placas de agar sangre que se incubaron a 35-37 °C durante 7 días, a partir de las cuales se determinó el número de UFC.

Extracción de proteínas. Los fragmentos de hueso se molieron en un mortero hasta obtener fragmentos finos. Se pesó 200 mg de hueso molido en tubos de muestra de 2 mL. Se realizaron tres réplicas y un control por tratamiento. A los controles se les agregó 1 mL de agua destilada estéril mientras al resto de las muestras se les agregó 1 mL de HCl 1.2 M y se incubaron durante 24 h a 4 °C [24]. Las muestras se centrifugaron a 15000 rpm a 4°C durante 20 min y se recogió el sobrenadante (denominado extracto 1). Los residuos de tejido óseo desmineralizado presente en los tubos de muestra se incubaron con 1 mL de amortiguador de lisis Gu-HCl (guanidina-HCl

6 M, Tris 100 mM, pH 7.4) durante 72 horas a 4 °C. Nuevamente, se centrifugaron las muestras en las mismas condiciones y se recogieron los sobrenadantes (extracto 2). Los residuos de tejidos óseos se incubaron con 1 mL amortiguador de lisis Gu-HCl con EDTA tetrasódico 0.5 M durante 72 horas a 4 °C. Se centrifugaron las muestras y se recogieron los sobrenadantes (extracto 3). Por último, los residuos de tejidos óseos se incubaron con 1 mL HCl 6 M a 4 °C durante 24 horas. Se centrifugaron las muestras y se recogieron los sobrenadantes (extracto 4). Todos los extractos y controles de proteína cruda se precipitaron en 1 mL de acetona a -20 °C durante 24 horas. Las muestras de proteína precipitada se resuspendieron en 1 mL de amortiguador Gu-HCl a pH 8.1.

Cuantificación de proteína total mediante el ensayo de BCA. Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó el kit BCA Protein Assay (Santa Cruz Biotechnology Inc.) según las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) a 570 nm y la concentración de proteínas totales en las muestras se calculó comparando con una curva estándar externa de albúmina sérica bovina (BSA) (0 - 2 mg ml⁻¹).

Cuantificación de proteína BMP-2 mediante ELISA. La cuantificación de la proteína BMP-2 (*bone morphogenetic protein*, por sus siglas en inglés) se realizó utilizando el kit de ELISA BMP-2 Quantikine Kit (R&D Systems) según las instrucciones del fabricante. Se determinó la densidad óptica de cada muestra utilizando un lector de microplacas (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) ajustado a 450 nm. Se realizó una corrección de longitud de onda restando lecturas de las muestras a 570 nm.

Tinción histológica con hematoxilina-eosina. Los fragmentos de hueso se quebraron utilizando nitrógeno líquido y un mortero. Las muestras fueron sumergidas en distintas soluciones en el siguiente orden y periodos de tiempo: hematoxilina durante 2 minutos, agua destilada durante 2 minutos, carbonato de litio durante 15 segundos, agua destilada 5 minutos, eosina durante 35 segundos y finalmente agua durante 5 segundos. Para la deshidratación y aclaramiento de las muestras óseas se realizaron lavados seriados de etanol graduado y xilol [25].

Microscopía electrónica. Las muestras óseas de cada tratamiento se quebraron utilizando nitrógeno líquido y un mortero; posteriormente se fijaron utilizando solución de Karnovsky y se deshidrataron con lavados seriados en etanol graduado [26]. Las muestras se secaron al aire y mantuvieron en un desecador hasta su recubrimiento con oro de aproximadamente 10 nm (EMS 150R ES; Electron Microscopy Sciences). Se utilizó una corriente de 20 mA para el análisis de microscopía electrónica de barrido (Hitachi TM-3000, Japón).

Resultados y discusión

Modelo de estudio y ablación de la muestra. El procedimiento de ablación del tejido se realizó de la forma más semejante posible a la extracción que se haría en un paciente humano con respecto a la extracción quirúrgica y el manejo aséptico de las muestras. El modelo experimental porcino resultó apropiado puesto que simula fielmente diferentes sistemas humanos tanto desde el punto de vista fisiológico como anatómico, dado que es similar en tamaño, distribución de la anatomía y valores fisiológicos y bioquímicos [27].

Mapeo de dosis e irradiación de muestras. La dosis utilizada de 25 kGy corresponde a la dosis recomendada internacionalmente por el Organismo Internacional de Energía Atómica para la esterilización de tejidos con fines terapéuticos [21]. Los tejidos (en este caso congelados) se pueden calentar (y, por lo tanto, descongelar) durante el proceso de alcanzar la dosis de 25 kGy, lo cual se buscó subsanar con el uso de hielo seco en la cámara de irradiación y su monitoreo mediante una termocupla.

Seguendo la norma ISO/TS 11137-4 [23], la incertidumbre del proceso de irradiación (σ_{proc}) está dada por la ecuación:

$$\sigma_{proc} = \sqrt{\sigma_{cal}^2 + \sigma_{rep}^2 + \sigma_{maq}^2 + \sigma_{map}^2}$$

donde σ_{cal} se refiere a la incertidumbre debida a la calibración de los dosímetros RED. Las restantes fuentes de incertidumbre son resultado del proceso de mapeo y fueron calculadas como tipo A, incluyendo: σ_{rep} , es la incertidumbre por reproducibilidad determinada por la variabilidad en la lectura del dosímetro de monitoreo; σ_{maq} , se debe a variaciones del irradiador en el proceso de irradiación; y σ_{map} es la incertidumbre del mapeo, y depende de los valores de dosis mínima (D_{min}) y máxima (D_{max}), como también del número de repeticiones (n) realizadas, que en este estudio fueron tres. A pesar de que en el patrón de carga se ha indicado la dirección en que debe ser colocado el cilindro en la zona de carga en el irradiador, puede ocurrir que en la práctica esto no suceda y la orientación del dosímetro de monitoreo sea otra. Esta variación en la dosis por la colocación del portamuestras se debe a que las fuentes que rodean a este cilindro no tienen la misma actividad. Los resultados del proceso se resumen en el presupuesto de incertidumbre mostrado en el Cuadro 2.

El índice de conformidad indica la variación entre la dosis máxima y mínima, y se calcula mediante la razón entre ellas. El resultado obtenido fue de 1.1119, lo cual indica una diferencia del 11.19 % entre ambas dosis. Esta diferencia se debe a las dimensiones de la muestra y a cómo se encuentran distribuidas dentro de la cámara de irradiación. En el Cuadro 3 se presenta el rango de aceptación para el dosímetro de monitoreo para el control de rutina en la irradiación de hueso, donde $D_{obj,min}$ y $D_{obj,max}$ se refieren a las dosis objetivo mínima y máxima, respectivamente. Es decir, para las condiciones de irradiación de hueso en el irradiador Izotop del Instituto Tecnológico de Costa Rica, el resultado de la medida de la dosis registrada por el dosímetro de monitoreo (que siempre debe colocarse al momento de realizar la irradiación), debe estar entre las dosis indicadas en el Cuadro 3, para garantizar que el material irradiado se encuentra entre las dosis indicadas por el Cuadro 1.

Cuadro 2. Presupuesto de incertidumbre en dosis del proceso de irradiación (Co-60) para tejido óseo en el irradiador Izotop del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

| Fuentes | Tipo | Incertidumbre típica | Distribución de probabilidad | Coficiente de sensibilidad | Contribución a la incertidumbre |
|--|------|----------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Calibración dosímetros | | | | | |
| Determinación de la dosis | B | 1.95 | Normal | 1 | 1.95 |
| Calibración dosímetros | A | 1.41 | Normal | 1 | 1.41 |
| Variaciones en el producto y su ubicación | | | | | |
| Reproducibilidad | A | 0.38 | Normal | 1 | 0.38 |
| Mapeo: Máxima/Mínima | A | 1.41 / 0.37 | Normal | 1 | 1.41 / 0.37 |
| Máquina | A | 0.53 | Normal | 1 | 0.53 |
| Suma cuadrática | | | | | 8.20 / 6.35 |
| Incertidumbre combinada (k=1) | | | | | 2.86 / 2.52 |
| Incertidumbre expandida (k=2) | | | | | 5.73 / 5.04 |

Cuadro 3. Rango de dosis para el dosímetro de monitoreo para el control de rutina, en el proceso de irradiación de hueso en el irradiador marca Izotop del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

| | $D_{obj,min}$ | $D_{obj,max}$ |
|-----------------|---------------|---------------|
| D_{mon} (kGy) | 25.01 | 32.45 |

Del proceso de mapeo también se determinó la razón entre la dosis mínima y de monitoreo, la cual fue de 1.0503, lo cual indica una diferencia en dosis del 5.03%. Además, se determinó una diferencia entre la dosis mínima y la dosis nominal del 4.5%. Estos resultados, permitieron el ajuste del tiempo de irradiación para cumplir con la dosis establecida en el Cuadro 1.

Esterilización de las muestras. A todas las muestras se les removió de manera mecánica restos de tejido muscular y adiposo, y se les aplicó inicialmente una desinfección superficial, seguido por el proceso de esterilización química o física (irradiación). En las muestras con desinfección superficial utilizadas como control se detectó la presencia de bacterias y de hongos en los medios de cultivo semisólidos, con un número muy elevado de unidades formadoras de colonias (UFC) en la placa de ARE (Figura 3E). Por su parte, los tratamientos de esterilización química (EQ) e irradiación (EI) no presentaron formación de UFC en las placas de PDA y ARE, indicando el éxito del proceso de esterilización de estos tratamientos (Figura 3A y 3B).

Control microbiológico. Un procedimiento de esterilización aceptable para cualquier producto, incluidos los tejidos biológicos utilizados como injerto, depende de definir los microorganismos más resistentes que podrían estar presentes y su densidad. En este caso, no hubo crecimiento de las esporas de *B. pumilus* expuestas a irradiación (EI), mientras que las tiras con esporas no irradiadas sí presentaron crecimiento (control positivo), lo cual se confirma por la formación de turbidez en la parte superior del tubo con medio CASO (Figura 3C). Asimismo, se observó crecimiento de esporas no irradiadas (control positivo) en placas de agar sangre, mientras que las placas con esporas irradiadas (EI) dieron negativo (Figura 3D y 3E), demostrando que la dosis de 25 kGy fue suficiente para alcanzar el nivel de garantía de esterilidad aceptable (SAL, del inglés *sterility assurance level*) [17].

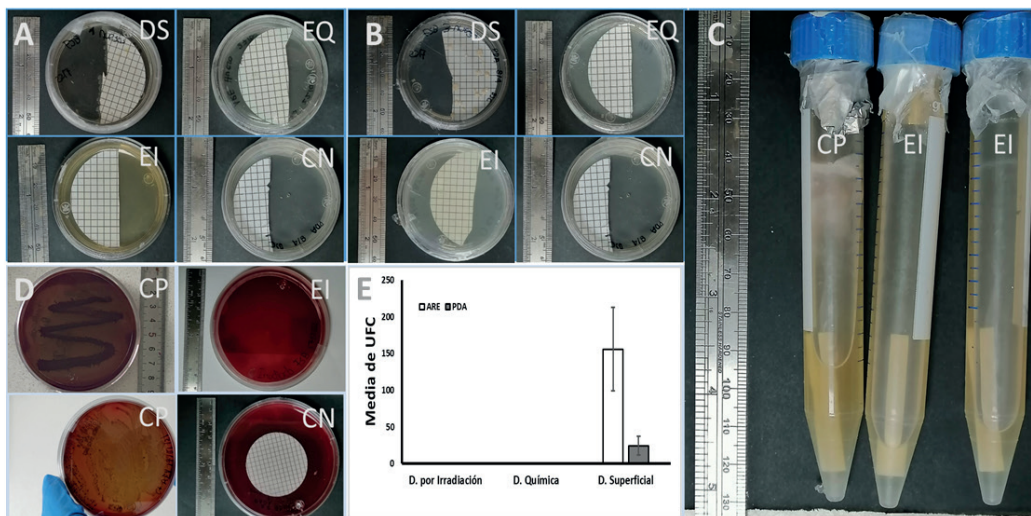


Figura 3. Controles microbiológicos realizados a tejido óseo porcino ($n = 3$) sometido a esterilización química (EQ) con antibióticos y peróxido de hidrógeno al 3% y esterilización por irradiación (EI) con una dosis de 25 kGy. Se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en cuatro diferentes medios de cultivo microbiológico: (A) Agar papa dextrosa (PDA); (B) Agar de recuento estándar (ARE); (C) Medio CASO; y (D) Agar sangre, en donde se inocularon esporas del microorganismo *Bacillus pumilus* (ATCC 27142) como indicador biológico para la confirmación del proceso de esterilización por irradiación. (E) Comparación cuantitativa de las UFC según el tratamiento de esterilización. De acuerdo con lo esperado, tanto la irradiación como el tratamiento químico bajaron la carga microbiana a niveles no detectables. DS; desinfección superficial; CN, control negativo; CP, control positivo.

Contenido proteico. Los métodos de esterilización pueden causar numerosos cambios físicos y químicos que afectan la calidad biológica de los aloinjertos. Los procedimientos de conservación, desinfección y esterilización pueden resultar agresivos con el tejido, afectando su estructura molecular, incluyendo la desnaturalización de proteínas importantes para el mantenimiento de las propiedades biomecánicas y de promover la regeneración del hueso durante procesos de reparación, tales como BMP-2. El potencial osteoinductivo de los injertos óseos, causado por proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) presentes en la matriz orgánica ósea, es de gran importancia clínica puesto que es responsable de la capacidad de inducir la formación de hueso nuevo en el sitio de trasplante. Por lo tanto, resulta importante proteger la propiedad osteoinductora del hueso durante su procesamiento, conservación y esterilización [17]. Consecuentemente, se estudiaron los efectos de la desinfección química y de la esterilización por irradiación en la degradación de proteínas en general, y se comparó el contenido de BMP-2 y de colágeno.

En cuanto a la cuantificación de proteínas totales, las muestras tratadas con irradiación presentaron un contenido proteico comparable al de los controles que recibieron solamente desinfección superficial (Figura 4A). Los tejidos de la desinfección superficial presentaron los niveles de proteína total más altos mientras que el hueso sometido a la esterilización química presentó la menor cantidad de proteína. Esto sugiere que esta última causó mayor degradación proteica que los otros tratamientos.

Respecto al contenido de BMP-2 en los fragmentos óseos, se encontró que tanto las muestras tratadas con desinfección química como con esterilización física presentaron cantidades similares de esta molécula entre sí y con respecto al control (Figura 4B). Considerando que BMP-2 es un factor de crecimiento con propiedades morfogénicas, requerido para mejorar la diferenciación osteoblástica de las células progenitoras, así como el apropiado desarrollo de hueso y cartílago [28], este resultado sugiere que los tejidos mantendrían la capacidad de apoyar procesos de regeneración luego de su implantación.

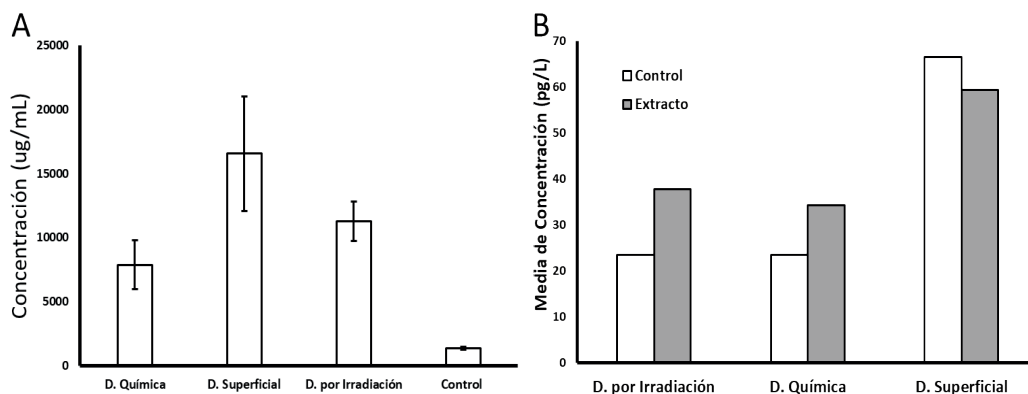


Figura 4. Recuperación y cuantificación de proteínas totales (promedio \pm desviación estándar, $n = 3$) mediante el método BCA (A) y cuantificación de la proteína BMP-2 mediante ELISA (B) a partir de tejido óseo porcino tratado con desinfección superficial, desinfección química y esterilización por irradiación. El control corresponde a proteína cruda no sometida al proceso de extracción de proteínas.

Evaluación de propiedades estructurales. El colágeno es un constituyente primordial de la matriz extracelular de todos los injertos de tejido conectivo. La matriz extracelular es particularmente importante para el tejido óseo debido a que determina sus propiedades biomecánicas, lo que a la vez se relaciona directamente con su función de sostén y movimiento. Se realizó una tinción de hematoxilina-eosina, la cual permite la detección de fibras de colágeno, las cuales

se esperan de manera abundante en diferentes áreas del tejido óseo. Se detectó que los pequeños fragmentos se tiñeron de manera homogénea, sugiriendo la presencia de colágeno en todas las muestras (Figura 5).

Adicionalmente, se realizó un análisis cualitativo de la ultraestructura de los fragmentos óseos mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 5). No se encontraron diferencias estructurales evidentes entre los tres tratamientos de esterilización, excepto algunas microfisuras que se sugiere son producto del procedimiento de fragmentación con el nitrógeno líquido y acción mecánica con el mortero.

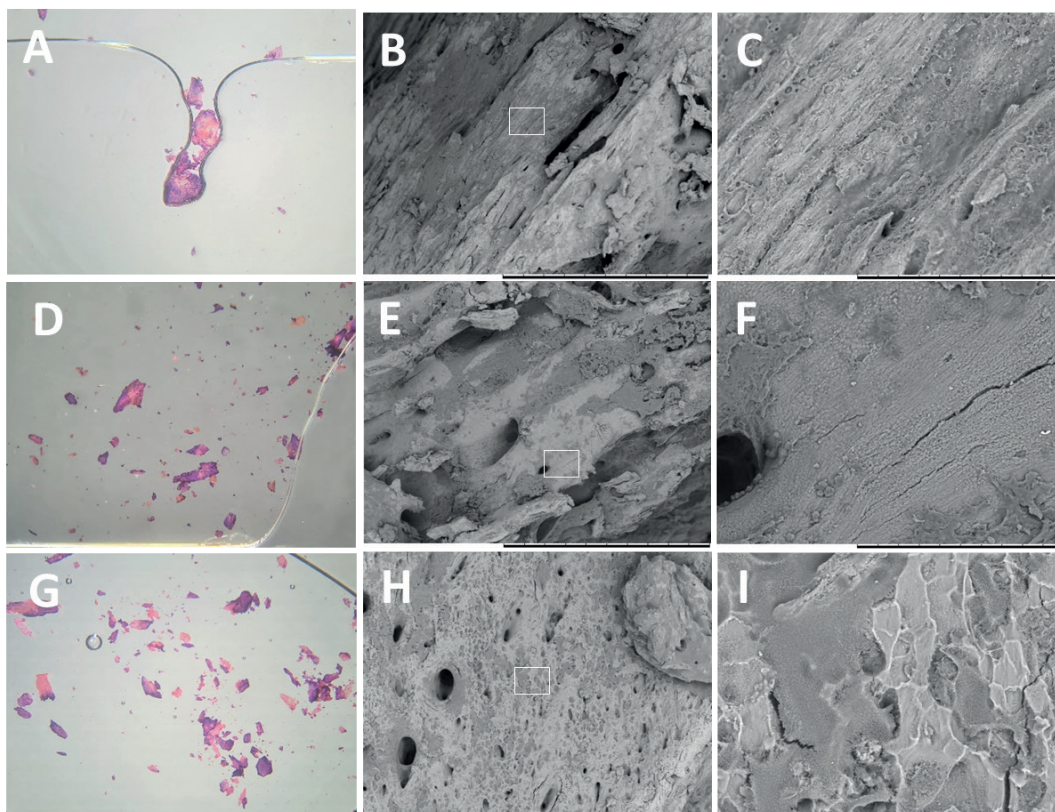


Figura 5. Caracterización estructural de tejido óseo mediante tinción histológica con hematoxilina-eosina (A, D, G) y visualización de la ultraestructura ósea mediante microscopía electrónica de barrido (B, C, E, F, H, I), de muestras tratadas con desinfección superficial (A, B, C), esterilización química (D, E, F) y esterilización por irradiación (G, H, I). La barra de escala corresponde a 2 mm en B, E y H, y a 200 µm en C, F e I.

Conclusiones

El Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), mediante el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología de la Escuela de Biología, desarrolla actividades relacionadas a bancos de tejidos con el objetivo de promover el ambiente favorable en términos técnicos, normativos, de equipamiento y oferta para la instauración y diversificación de este tipo de establecimientos en Costa Rica. Desde décadas atrás, el ITCR ha colaborado con el Organismo Internacional de Energía Atómica en la elaboración de “Guías para la operación de bancos de tejidos” [29] y “Códigos de prácticas para la esterilización por irradiación de tejidos humanos para uso clínico” [4]. El TEC realiza este tipo de esfuerzos con el fin de apoyar a los

bancos de tejidos en el país, de manera que puedan diversificar sus técnicas e inventario de tejidos. Se aspira además a promover la creación de nuevos establecimientos de este tipo en Costa Rica y la región centroamericana.

Este trabajo utilizó muestras porcinas y ejecutó procedimientos para la esterilización de tejido óseo que son aplicables a muestras provenientes de diferentes especies, incluyendo muestras de tejido humano, lo cual permitiría ampliar o diversificar la oferta de tejidos disponibles en bancos de tejidos del país ante la creciente demanda de material biológico. Se demostró la efectividad de los métodos de desinfección química y esterilización por irradiación utilizando las capacidades del irradiador Izotop del Instituto Tecnológico de Costa Rica para tratar la contaminación biológica sin afectar propiedades deseables en la matriz de las muestras óseas. Además, se validó el patrón de carga y se establecieron los parámetros dosimétricos para el control de rutina en este equipo de irradiación, generando mayor confianza y homogeneidad en el proceso de irradiación de muestras. Si bien el irradiador del ITCR tiene capacidad limitada, es un ejemplo del uso efectivo y seguro de este tipo de radiación para permitir avances tecnológicos y de salud en Costa Rica, demostrando con esto la capacidad en el país para la ejecución de las guías y prácticas mencionadas.

Agradecimientos

La investigación contó con apoyo económico de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica (VIE CF 1510101). Los autores agradecen a la Lic. N. Chaves Solano y al OIEA por el apoyo logístico en la implementación y difusión de la investigación. Se agradece además a B. Jiménez, M.I. Chaves y M. Rojas Chaves por su colaboración durante la ejecución de este trabajo.

Referencias

- [1] J. Sánchez-Ibañez *et al.*, "Tissue and Cell Donation: Recommendations From an International Consensus Forum," in *Transplantation Direct*, Apr. 2023, vol. 9, no. 5, p. e1466. doi: 10.1097/TXD.0000000000001466.
- [2] I. A. Kirilova *et al.*, "Terminology and conceptual apparatus of tissue donation and tissue banking: interdisciplinary expert consensus (Part 1)," *Hirurgia Pozvonocchnika*, vol. 20, no. 4, pp. 92–98, 2023, doi: 10.14531/ss2023.4.92-98.
- [3] M. Manyalich *et al.*, "European Quality System for Tissue Banking," *Transplant Proc*, vol. 41, no. 6, pp. 2035–2043, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.transproceed.2009.06.157.
- [4] Eulogia Kairiyama, *Código de prácticas para la esterilización por irradiación de tejidos humanos para uso clínico*. Editorial Tecnológica de Costa Rica, 2013.
- [5] P. G. Cimalista de Alencar and I. F. Ventura Vieira, "Bone Banks," *Rev Bras Ortop (Sao Paulo)*, vol. 45, no. 6, pp. 524–528, 2010.
- [6] N. Chaves-Solano, "Comunicación breve Living donor bone bank: Costa Rican experience (Banco de huesos a partir de donantes vivos: experiencia costarricense)," vol. 61, n. 2, p. 77-80. 2019 . En línea: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022019000200077&lng=en&nrm=iso.
- [7] N. Baseri, A. Meysamie, F. Campanile, A. A. Hamidieh, and A. Jafarian, "Bacterial contamination of bone allografts in the tissue banks: a systematic review and meta-analysis," vol 123, pp. 156-173, 2022. doi: 10.1016/j.jhin.2021.10.020.
- [8] R. Singh and A. Singh, "The potential of radiation sterilized and banked tissue allografts for management of nuclear casualties," *Cell Tissue Bank*, vol. 23, no. 2, pp. 325–334, Jun. 2022, doi: 10.1007/s10561-021-09946-4.
- [9] I. Ilays, S. A. Alsakran, A. B. Fallatah, M. Alyateem, and O. A. Al-Mohrej, "The contamination of allografts in multi-organ donors: a bone bank experience," *Cell Tissue Bank*, vol. 22, no. 3, pp. 499–504, Sep. 2021, doi: 10.1007/s10561-020-09899-0.



- [10] E. Tam, M. McGrath, M. Sladkova, A. AlManaie, A. Alostaad, and G. M. de Peppo, "Hypothermic and cryogenic preservation of tissue-engineered human bone," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1460, no. 1, pp. 77–87, Jan. 2020, doi: 10.1111/nyas.14264.
- [11] L. R. Dantas, L. C. Wollmann, P. H. Suss, L. Kraft, V. S. T. Ribeiro, and F. F. Tuon, "Disinfection protocol for human musculoskeletal allografts in tissue banking using hydrogen peroxide 30%," *Cell Tissue Bank*, vol. 22, no. 4, pp. 643–649, Dec. 2021, doi: 10.1007/s10561-021-09938-4.
- [12] L. M. Delgado, A. Pandit, and D. I. Zeugolis, "Influence of sterilisation methods on collagen-based devices stability and properties," *Expert Review of Medical Devices*, vol. 11, no. 3, pp. 305–314. 2014. doi: 10.1586/17434440.2014.900436.
- [13] F. Martínez-Flores, H. Sandoval-Zamora, C. Machuca-Rodríguez, A. Barrera-López, R. García-Cavazos, and J. A. Madinaveitia-Villanueva, "Banco de piel y tejidos: un modelo operativo para la recuperación y preservación de aloinjertos de piel y tejidos," *Cir Cir*, vol. 84, no. 1, pp. 85–92, 2016, doi: 10.1016/j.circir.2015.06.021.
- [14] N. Daras, G. N. Nurick, and T. J. Cloete, "Degradation of the mechanical properties of cortical bone due to long duration storage," *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 157, Sep. 2024, doi: 10.1016/j.jmbbm.2024.106632.
- [15] S. Haimi, A. Vienonen, M. Hirn, M. Pelto, V. Virtanen, and R. Suuronen, "The effect of chemical cleansing procedures combined with peracetic acid-ethanol sterilization on biomechanical properties of cortical bone," *Biologicals*, vol. 36, no. 2, pp. 99–104, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.biologicals.2007.06.001.
- [16] Q. Qing *et al.*, "Effects of hydrogen peroxide on biological characteristics and osteoinductivity of decellularized and demineralized bone matrices," *J Biomed Mater Res A*, vol. 107, no. 7, pp. 1476–1490, Jul. 2019, doi: 10.1002/jbm.a.36662.
- [17] A. Dziejdz-Goclawska, A. Kaminski, I. Uhrynowska-Tyszkiewicz, and W. Stachowicz, "Irradiation as a safety procedure in tissue banking," *Cell Tissue Bank*, vol. 6, no. 3, pp. 201–219, Sep. 2005, doi: 10.1007/s10561-005-0338-x.
- [18] N. Yusof, "Advances of radiation sterilisation in tissue banking," *Cell Tissue Bank*, vol. 19, no. 2, pp. 175–186, Jun. 2018, doi: 10.1007/s10561-017-9651-4.
- [19] L. A. Calvo-Castro, M. Guerrero-Barrantes, A. Ulloa-Fernández, R. Portuguese-Barboza, C. Centeno-Cerdas, and M. R. Chaves, "Evaluación de técnicas de procesamiento y almacenamiento de piel cadavérica para bancos de tejidos", *Revista Tecnología En Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 69–82. <https://doi.org/10.18845/tm.v28i5.2221>
- [20] J. Morales-Sánchez, A. Ulloa-Fernández, S. Castro-Piedra, C. Centeno-Cerdas, and L. A. Calvo-Castro, "Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina," *Revista Tecnología en Marcha*, Sep. 2019, doi: 10.18845/tm.v32i9.4628.
- [21] P. Sharpe and A. Miller, "Guidelines for the Calibration of Dosimeters for use in Radiation Processing. NPL REPORT CIRM 29," National Physical Lab., Teddington (United Kingdom). Centre for Ionising Radiation Metrology. 1999.
- [22] ISO 11137-2, "Esterilización de productos para asistencia sanitaria. Parte 3: Establecimiento de la dosis de esterilización," 2013.
- [23] ISO/TS 11137-4, "Sterilization of health care products -Radiation- Part 4: Guidance on process control," 2020.
- [24] X. Jiang *et al.*, "Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis," *J Proteome Res*, vol. 6, no. 6, pp. 2287–2294, Jun. 2007, doi: 10.1021/pr070056t.
- [25] M. Megías, P. Molist, and M. Pombal, " Atlas de histología vegetal y animal," <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>.
- [26] D. Marshall, M. H. Helfrich, and R. M. Aspden, "Scanning Electron Microscopy of Bone.," in *Bone Research Protocols. Methods in Molecular Medicine*, vol. 80, M. H. Helfrich and S. H. Ralston, Eds., 2003. <https://doi.org/10.1385/1-59259-366-6:311>
- [27] J. Sáenz Medina *et al.*, "Modelos experimentales para la investigación y el entrenamiento en trasplante renal," *Actas Urol Esp*, vol. 32, no. 1, pp. 83–90, 2008. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062008000100009&lng=es&nrm=iso
- [28] J. Park, S. Kim, and K. Kim, "Bone morphogenetic protein-2 associated multiple growth factor delivery for bone tissue regeneration," *Journal of Pharmaceutical Investigation*, vol. 48, pp. 187–197, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0382-0>
- [29] I. Álvarez Saldías, *Guía para la operación de bancos de tejidos*. Editorial Tecnológica de Costa Rica, 2013.










Incorporating strawberry leaf extract from waste biomass in prototype topical gel and cream formulations

Incorporación de extracto de hoja de fresa procedente de biomasa residual en prototipos de formulaciones tópicas de gel y crema

Karla Salas-Arias¹, Fabián Villalta-Romero², Randall Chacón-Cerdas³, David Hidalgo-Paniagua⁴, Laura A. Calvo-Castro⁵

Salas-Arias, K; Villalta-Romero, F; Chacón-Cerdas, R; Hidalgo-Paniagua, D; Calvo-Castro, L.A. Incorporating strawberry leaf extract from waste biomass in prototype topical gel and cream formulations. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 229-236.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7626>

- 1 Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR). Universidad Nacional (UNA). Universidad Estatal a Distancia (UNED). Costa Rica.
 ksalas@itcr.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-9772-1693>
- 2 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 fvillalta@itcr.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0001-7484-8125>
- 3 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 rchacon@itcr.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-5364-4649>
- 4 Samira Dreams S.R.L. Costa Rica.
 info@samiradreams.com
- 5 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 ancalvo@itcr.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0001-5101-9105>

Keywords

Leaves; natural extracts; polyphenols; strawberry.

Abstract

Berry fruits are an important source of polyphenols with beneficial antioxidant properties for human health. However, higher bioactive phytochemical content has been reported in berry leaves, which are usually discarded or underutilized. In this study, a hydroalcoholic extract with relevant polyphenol content obtained from strawberry leaves (*Fragaria x ananassa* cv. Festival), an agro-industrial waste material, was incorporated in two commercial topical formulations (aqueous gel and oil/water cream), in three concentrations of active ingredient (0.02, 0.1 and 1% strawberry leaf extract). The physicochemical properties of the formulations were monitored for 45 days at different temperatures. Particle size and stability analysis showed that the cream-based formulations were the most optimal for the development of a topical prototype with potential bioactive activities.

Palabras clave

Extractos naturales; hojas; polifenoles; fresa.

Resumen

Las bayas son una fuente importante de polifenoles con propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud humana. Sin embargo, se ha reportado mayor contenido de fitoquímicos bioactivos en las hojas, las cuales generalmente se desechan o se subutilizan. En este estudio, se incorporó un extracto hidroalcohólico con contenido relevante de polifenoles obtenido de hojas de fresa (*Fragaria x ananassa* cv. Festival), material de desecho agroindustrial, en dos formulaciones tópicas comerciales (gel acuoso y crema aceite/agua), en tres concentraciones de ingrediente activo (0.02, 0.1 y 1% extracto de hoja de fresa). Las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones se monitorearon durante 45 días a diferentes temperaturas. El análisis de estabilidad y tamaño de partícula mostró que las formulaciones a base de crema fueron las óptimas para el desarrollo de un prototipo tópico con potenciales actividades bioactivas.

Introduction

Strawberry leaves have been identified as a potential source of apparently abundant biomass with relevant bioactive components, particularly antioxidant polyphenols [1], [2], [3], [4]. Previous studies have reported possible antioxidant, photoprotective, and anti-aging activities in cosmetic and pharmaceutical topical products containing strawberry components [5], [6], [7], [8], [9].

Bioactive phytochemicals could replace some of the environmentally contaminant chemicals in cosmetics, while potentially providing added health benefits, particularly in skin-care products. Moreover, such bioactive phytochemicals are available in industrial and agricultural waste, which are often unexploited and could be incorporated into environmentally friendlier product design.

The purpose of this study was to evaluate the physicochemical properties and general stability of gel and cream prototype formulations containing a strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) leaf extract (SLE) rich in polyphenols [1]. A similar gel formulation developed by Auliya *et al.*

[10] containing 1% strawberry leaf extract showed an SPF barrier protection efficacy of 59.94 ± 0.260 . Meanwhile, Silva *et al.* [11] proposed that industrial-scale production of a gel-cream with 17.5% strawberry leaf extract could gain relevant profitability in the short term.

Methodology

Aqueous gel (water, carbopol, *Aloe barbadensis* extract, glycerin, sodium hydroxide 0.001%, and phenoxyethanol) and oil-in-water cream (water, glyceryl stearate, ceteareth-20, ceteareth-12, cetearyl alcohol, cetyl palmitate, sodium polyacrylate, *Aloe barbadensis* extract, glycerin, and phenoxyethanol) base formulations were provided by Samira Dreams S.R.L. (Costa Rica). The hydroalcoholic strawberry leaf extract (SLE) was prepared from strawberry leaves (*Fragaria x ananassa* cv. Festival; Llano Grande, Cartago, Costa Rica; permit R-CM-ITCR-001-2022-OT-CONAGEBIO) as reported before [1].

SLE contained 108.83 ± 4.65 mg gallic acid equivalents g^{-1} dry weight (DW) total polyphenols; 10.25 ± 0.50 mg quercetin equivalents g^{-1} DW total flavonoids; 57.53 ± 36.84 μg mg^{-1} DW gallic acid; 3.62 ± 4.97 μg mg^{-1} DW caffeic acid; 3.70 ± 2.68 μg mg^{-1} DW p-coumaric acid; 7.14 ± 3.40 μg mg^{-1} DW rutin; 21.90 ± 39.72 μg mg^{-1} DW ellagic acid; 19.44 ± 3.98 μg mg^{-1} DW quercetin; and 2918 ± 281 μmol trollox equivalents g^{-1} DW oxygen radical absorbance capacity (ORAC) as reported before [1]. SLE was added to gel and cream in three concentrations (0.02, 0.1 and 1%) in triplicates, and they were monitored macroscopically for 45 days at 4 °C, room temperature (~ 25 °C), or 37 °C.

Rheology measurements were performed at 23-24 °C in a rotational rheometer (Ares G2, WatersTM, Germany) at Centro de Investigación en Ciencias e Ingeniería de Materiales (CICIMA, Universidad de Costa Rica). The pH was measured in reflection photometer (Quantofix ® Relax, Macherey-Nagel GmbH & Co., Germany). The hydrodynamic diameter, polydispersity index (pdl) and ζ -potential of the particles from cream and gel samples dissolved in water (10 mg mL^{-1}) were measured in a Zetasizer Nano (Nano ZS, Malvern-Panalytical, UK) at Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQUIATEC, Instituto Tecnológico de Costa Rica) as reported before [12]. Total polyphenol content was determined by the Folin-Ciocalteu method as described previously [1].

Microbial content was determined in a random sample by standard methods (PT-MIC-35 Petrifilm, AOAC 997.02; PT-MIC-37 Petrifilm; PT-MIC-27 Petrifilm, AOAC 991.14, AOAC 998.08; and *Bacillus* sp. selective medium) at CEQUIATEC.

Results and discussion

In this study, topical gel and cream formulations were supplemented with 0.02, 0.1 and 1% strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) leaf extract (SLE), and their general physicochemical properties and stability were evaluated in freshly prepared samples and after 45 days in different temperatures [13].

Immediately after preparation, the gel and cream topical formulations with 0.02, 0.1 and 1% strawberry leaf extract (SLE) were centrifuged at 3000 rpm for 30 min at room temperature, showing no observable changes (no precipitates, no phase separation). No contaminating microorganisms (filamentous fungi and yeast, *Staphylococcus aureus*, faecal coliforms, *Escherichia coli* and *Bacillus* sp.) were detected in a random sample of the formulations.

The gel formulation showed lower apparent viscosity (presented on \log_{10} for better appreciation) compared to the cream system (Figure 1). In general, for both systems, a reduction in the apparent viscosity with the increase of the shear rate can be observed. This is characteristic of a non-

Newtonian behaviour and indicates that these systems have sheared thinning characteristics. Additionally, the apparent viscosity decreased with the increase of the strawberry leaf extract concentration in both systems (Figure 1). This viscosity reduction behaviour has been reported before [14], and it is probably due to the reduction of the capacity of water-binding with the polymer/micelles in the system caused by the addition of the strawberry leaf concentrate, consequently reducing the regeneration of more complex structures.

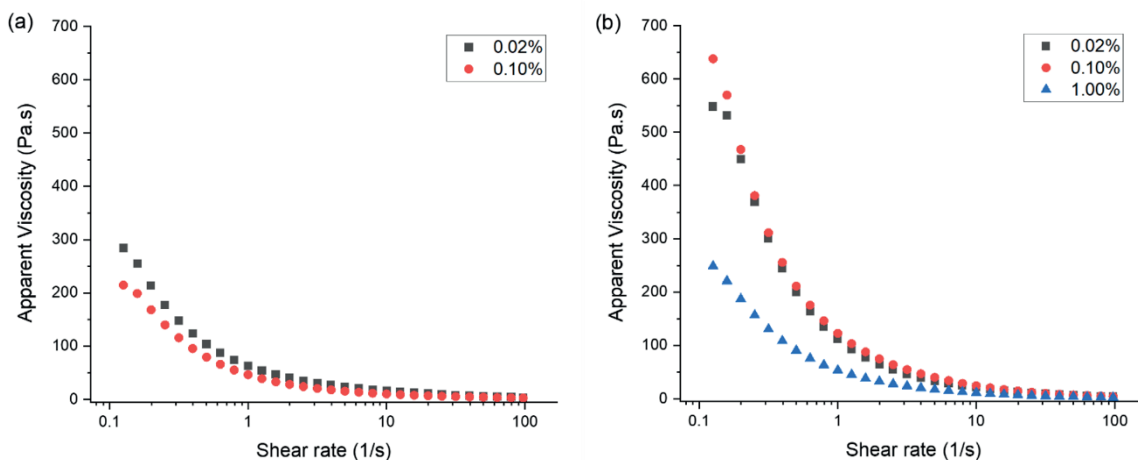


Figure 1. Apparent viscosity versus shear rate (\log_{10}) on (a) gel and (b) cream formulate samples with different strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) leaf extract (SLE; percentage active ingredient) concentrations.

Particle size, polydispersity index and ζ -potential may help predict the transport of the formulations through biological membranes [12]. Smaller particles usually improve particle/skin adhesion and absorption [15]. Liu *et al.* [16] report that particles larger than 600 nm are not able to penetrate to deeper skin layers, while particles of less than 300 nm can achieve higher skin deposition. However, Xiang *et al.* [17] suggest that higher precipitation of larger particles could increase topical permeation. The degree of penetration also depends on surface charge; however, there is no consensus on which type of charge produces better skin absorption [15]. The routes of skin permeation must also be considered, from more superficial passive skin penetration to deeper infiltration through the hair follicles [17]. Particle size in our formulations was between 450 to 775 nm, with no significant size difference between formulations, except for the 0.02% SLE cream, which had significantly larger particles than the rest (Table 1).

The type of gel/cream formulation significantly influenced the particle size, their size homogeneity (polydispersion), and the surface charge (Table 1). These variations in the properties of formulations are induced by the interaction of active ingredients and its excipients [18]. Particle size in the gel formulations was inversely proportional to the incremental addition of SLE, showing smaller and more homogeneous size distribution, but exhibiting at the same time a decrease in their surface charge with higher SLE concentrations. This suggests that gel formulations with more SLE may precipitate easier when applied (sample < -30mV) [19], [20]. The opposite effect occurred in the cream formulations (Table 1), where the incremental SLE concentrations increased particle size and polydispersity index, while becoming more stable in solution due to more negative charges and are therefore less likely to precipitate. Particles with more negative surface charges tend to react more spontaneously and consistently with oppositely charged biomolecules, such as amino groups in proteins at acidic pH and polycations [21]. Conversely, considering interactions with negatively charged biological membranes, it is possible that

negatively charged particles will not be able to interact or enter easily through the cell membrane by passive transport, and other transport mechanisms will be required to internalize them [22], [23], [24].

Table 1. Particle size, polydispersity index (PDI), and ζ -potential from gel and cream formulations with different strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) leaf extract (SLE; percentage active ingredient) concentrations.

| Formulation | SLE (%) | Size (nm) | PDI | ζ -Potential |
|-------------|---------|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Gel | 0.02 | 2426.33 \pm 494.95 ^a | 1.00 \pm 0.00 ^a | -49.27 \pm 3.96 ^{bc} |
| | 0.1 | 775.8 \pm 230.55 ^b | 0.74 \pm 0.07 ^b | -46.07 \pm 1.91 ^b |
| | 1 | 580.87 \pm 60.41 ^b | 0.47 \pm 0.04 ^c | -27.30 \pm 6.09 ^a |
| Cream | 0.02 | 449.13 \pm 75.72 ^b | 0.65 \pm 0.04 ^b | -53.20 \pm 1.51 ^{bc} |
| | 0.1 | 683.70 \pm 46.94 ^b | 0.61 \pm 0.08 ^{bc} | -53.50 \pm 2.71 ^{bc} |
| | 1 | 746.9 \pm 49.29 ^b | 0.73 \pm 0.07 ^b | -58.10 \pm 2.95 ^c |

Statistical differences between gel vs. cream formulations within each concentration were determined by a General Lineal Model and Tukey's multiple comparison test, and they are indicated by superscript letters ($p < 0.05$). Equal variances were determined by Levene's test ($p > 0.05$) (Minitab v.19.1.1., USA).

In terms of appearance, the 1% SLE formulations experienced observable loss of consistency and intense browning after 45 days at room temperature (~ 25 °C), while the 0.02% and 0.1% formulations remained stable to the touch, with no detectable changes in odour, and with only mild browning relative to the original yellow-like coloration (Figure 2). However, in the samples kept at 37 °C, both gel and cream formulations showed intense browning and extreme dehydration, to the point that only dry flakes remained of the 0.02% and 0.1% gel (Figure 2). Thus, our SLE-containing gel and cream formulations should be stored in opaque airtight containers, and the preservative component of the formulations should be improved to prevent further oxidation.

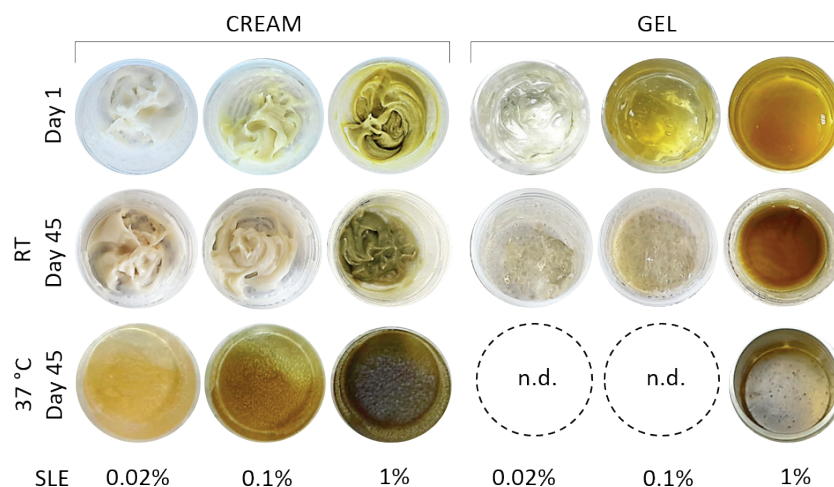


Figure 2. Colour changes in gel and cream topical formulations containing strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) leaf extract (SLE, percentage active ingredient) after 45 days at room temperature (RT, ~ 25 °C) or at 37 °C in a translucent container. Gel samples at 37 °C that were completely dry and crystallized after 45 days are reported as "not detected" (n.d.).

The increasing SLE concentrations did not seem to relevantly affect the pH values of the gel and cream formulations (Table 2); however, a larger sample size is required to statistically confirm this observation. On the other hand, the total average pH of all formulations was significantly ($p < 0.05$, unpaired t test; GraphPad Prism v. 10.1.1., USA) more acidic after 45 days incubation (5.43 ± 0.90 , mean \pm SD) relative to the average pH values observed immediately after gel/cream preparation (6.35 ± 0.58 , mean \pm SD). Nonetheless, all formulations remained close to the recommended range of pH from 4 to 6 for optimal topical applications [25] and, if anything, more acidification could eventually be necessary, particularly in the cream formulations.

The SLE used in this study was previously reported to contain 108.83 ± 4.65 total polyphenols (mg gallic acid equivalents g^{-1} dry weight) and 2918 ± 281 oxygen radical absorbance capacity (ORAC, μmol trollox equivalents g^{-1} dry weight) [1]. The addition of SLE did not relevantly increase the total polyphenol content (TPC) of the gel and cream formulations (~ 200 mg GAE g^{-1} DW), and TPC was reduced after 45 days both at 4 °C and 37°C, although SLE seems to have aided in maintaining higher TPC values over time (Table 3). However, as mentioned before, a larger sample size is required to statistically confirm this observation. Nonetheless, as active ingredient, the SLE concentrations used in this study might not be sufficient to provide added antioxidant properties *in vivo*, which must be tested in future experiments.

Table 2. pH measurements (mean \pm SD) of gel and cream formulations (10 mg mL^{-1}) containing strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) leaf extract (SLE; percentage active ingredient) after 45 days at different temperatures.

| Formulation | SLE (%) | Day 1 | Day 45 | | |
|-------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | | 4 °C | 25 °C | 37 °C |
| Gel | 0 | 6.43 \pm 0.25 | n.d. | 5.53 \pm 0.23 | n.d. |
| | 0.02 | 6.0 \pm 0.44 | 4.75 \pm 0.07 | 4.97 \pm 0.59 | 5.15 \pm 0.21 |
| | 0.1 | 5.67 \pm 0.57 | 4.70 \pm 0.14 | 5.00 \pm 1.04 | 5.05 \pm 0.35 |
| | 1 | 5.70 \pm 0.26 | 4.80 \pm 0.14 | 5.00 \pm 0.56 | 4.85 \pm 0.35 |
| Cream | 0 | 6.13 \pm 0.81 | n.d. | 6.60 \pm 0.72 | n.d. |
| | 0.02 | 6.83 \pm 0.49 | 4.70 \pm 0.28 | 5.80 \pm 0.53 | 4.75 \pm 0.07 |
| | 0.1 | 7.27 \pm 0.42 | 6.95 \pm 2.19 | 7.50 \pm 0.26 | 5.70 \pm 0.28 |
| | 1 | 6.80 \pm 0.44 | 4.50 \pm 0.00 | 7.13 \pm 1.69 | 5.20 \pm 0.28 |

$n = 3$, except samples at 4 and 37 °C with $n = 2$. n.d.: not determined.

Table 3. Total polyphenol concentrations (mean \pm SD; mg GAE g^{-1} DW) of gel and cream formulations (10 mg mL^{-1}) containing strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) leaf extract (SLE; percentage active ingredient) after 45 days at different temperatures.

| Formulation | SLE (%) | Day 1 | Day 45 | |
|-------------|---------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | | | 4 °C | 37 °C |
| Gel | 0 | 244.17 \pm 5.97 | - | - |
| | 0.02 | 241.83 \pm 16.30 | 72.15 \pm 4.27 | 78.19 \pm 28.95 |
| | 0.1 | 240.67 \pm 8.78 | 80.87 \pm 19.46 | 110.40 \pm 4.27 |
| | 1 | 261.50 \pm 21.75 | 120.13 \pm 4.75 | 170.81 \pm 86.37 |
| Cream | 0 | 217 | - | - |
| | 0.02 | 215.17 \pm 1.15 | 100.50 \pm 20.64 | 40.60 \pm 1.90 |
| | 0.1 | 231.17 \pm 4.04 | 140.44 \pm 64.30 | 15.60 \pm 4.51 |
| | 1 | 243.75 \pm 13.08 | 257.05 \pm 270.05 | 163.53 \pm 82.34 |

GAE, gallic acid equivalents; DW, dry weight. $n = 3$ for day 1 (except 0% SLE cream), $n = 2$ for day 45.

Conclusions

Supplementation of gel and cream topical formulations with 0.02 to 1% strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) leaf extract (SLE) rich in polyphenols resulted in physically stable formulations, but only the cream formulations retained its general characteristics over 45 days, showing also more favorable particle behavior, and are better suited for continuing the development of a topical product with SLE.

Acknowledgments

This work was funded by Vicerrectoría de Investigación y Extensión, Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), project "Formulation of a topical prototype using strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) extracts rich in anthocyanins". The authors thank R. Starbird-Pérez (School of Chemistry, ITCR), and K. Rodríguez and M. Montero (CICIMA, UCR) for their help with the viscosity measurements.

Author contributions

K.S.A., D.H.P., F.V.R. and R.C.C. conducted the experiments. L.A.C.C. and F.V.R. wrote the first draft, and all authors approved the final manuscript. F.V.R. is responsible for the final content.

Declarations

D.H.P. from Samira Dreams S.R.L. provided the base gel and cream formulations. The authors declare no conflict of interest. This article does not contain any studies with human or animal subjects. Datasets are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- [1] K. Salas-Arias *et al.*, "Strawberry *Fragaria x ananassa* cv. Festival: A Polyphenol-Based Phytochemical Characterization in Fruit and Leaf Extracts," *Molecules*, vol. 28, no. 4, p. 1865, 2023, doi: 10.3390/molecules28041865.
- [2] I. Fecka, K. Bednarska, and M. Włodarczyk, "*Fragaria x ananassa* cv. Senga Sengana Leaf: An Agricultural Waste with Antiglycation Potential and High Content of Ellagitannins, Flavonols, and 2-Pyrone-4,6-dicarboxylic Acid," *Molecules*, vol. 27, no. 16, p. 5293, 2022, doi: 10.3390/molecules27165293.
- [3] A. Kårlund, K. Hanhineva, M. Lehtonen, G. J. McDougall, D. Stewartc, and R. O. Karjalainen, "Non-targeted metabolite profiling highlights the potential of strawberry leaves as a resource for specific bioactive compounds," *J Sci Food Agric*, vol. 97, no. 7, pp. 2182–2190, May 2017, doi: 10.1002/JSFA.8027.
- [4] L. P. Stanojević, M. Z. Stanković, D. J. Cvetković, M. D. Cakić, S. R. Savić, and M. D. Miljković, "Antioxidant activity of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) leaves," *Sep Sci Technol*, vol. 52, no. 6, pp. 1039–1051, 2017, doi: 10.1080/01496395.2017.1281305.
- [5] S. Afrin, T. Y. Forbes-Hernandez, F. Giampieri, M. Battino, and M. Gasparri, "The photoprotective effects of strawberry-based cosmetic formulations on human dermal fibroblasts," *Acta Horti*, vol. 1156, pp. 397–404, 2017, doi: 10.17660/ActaHorti.2017.1156.59.
- [6] M. Gasparri *et al.*, "A Pilot Study of the Photoprotective Effects of Strawberry-Based Cosmetic Formulations on Human Dermal Fibroblasts," *Int J Mol Sci*, vol. 16, pp. 17870–17884, 2015, doi: 10.3390/ijms160817870.
- [7] M. Gasparri *et al.*, "Strawberry-Based Cosmetic Formulations Protect Human Dermal Fibroblasts against UVA-Induced Damage," *Nutrients*, vol. 9, no. 6, p. 605, Jun. 2017, doi: 10.3390/nu9060605.
- [8] A. Markiewicz, M. Zasada, A. Erkiert-Polguj, M. Wieckowska-Szakiel, and E. Budzisz, "An evaluation of the anti-aging properties of strawberry hydrolysate treatment enriched with L-ascorbic acid applied with microneedle mesotherapy," *J Cosmet Dermatol*, vol. 18, no. 1, pp. 129–135, 2019, doi: 10.1111/jocd.12545.



- [9] A. Ziemelewska, Z. Nizioł-Lukaszewska, M. Zagórska-Dziok, T. Bujak, M. Wójciak, and I. Sowa, "Evaluation of cosmetic and dermatological properties of kombucha-fermented berry leaf extracts considered to be by-products," *Molecules*, vol. 27, p. 2345, 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27072345>.
- [10] D. F. Auliya, Suhartinah, and H. M. Ansory, "Potency and Stability Emulgel of Ethanol Extract Strawberry Leaf (*Fragaria x ananassa* var Duchesne) as a Sunscreen," *Jurnal Majalah Farmaseutik*, vol. 18, no. 4, p. 469, 2022, doi: [10.22146/farmaseutik.v18i4.73909](https://doi.org/10.22146/farmaseutik.v18i4.73909).
- [11] A. P. Silva, B. Rodrigues, L. Bonny, and Y. Manrique, "Strawberry Leaves Extract for Cosmetic Industry," *U.Porto Journal of Engineering*, vol. 8, no. 5, pp. 135–144, 2022, doi: [10.24840/2183-6493_008.005_0012](https://doi.org/10.24840/2183-6493_008.005_0012).
- [12] L. A. Calvo-Castro *et al.*, "Self-Emulsifying Micellization of Crude Extracts from Apple (*Malus domestica* cv. Anna), Plum (*Prunus domestica* cv. Satsuma), and Guava (*Psidium guajava* L.) Fruits," *Molecules*, vol. 28, no. 3, p. 1297, Feb. 2023, doi: [10.3390/molecules28031297](https://doi.org/10.3390/molecules28031297).
- [13] National Health Surveillance Agency, *Cosmetic Products Stability Guide/National Health Surveillance*. Brasilia: ANVISA, 2005. Consultado: Feb. 01, 2024. [Online]: www.anvisa.gov.br
- [14] H. Jaster, G. D. Arend, K. Rezzadori, V. C. Chaves, F. H. Reginatto, and J. C. C. Petrus, "Enhancement of antioxidant activity and physicochemical properties of yogurt enriched with concentrated strawberry pulp obtained by block freeze concentration," *Food Research International*, vol. 104, no. July 2017, pp. 119–125, 2018, doi: [10.1016/j.foodres.2017.10.006](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.006).
- [15] M. Elmowafy, "Skin penetration/permeation success determinants of nanocarriers: Pursuit of a perfect formulation," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 203, p. 111748, Jul. 2021, doi: [10.1016/j.colsurfb.2021.111748](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111748).
- [16] M. Liu, M. Sharma, G. L. Lu, Z. Zhang, N. Yin, and J. Wen, "Full factorial design, physicochemical characterization, *ex vivo* investigation, and biological assessment of glutathione-loaded solid lipid nanoparticles for topical application," *Int J Pharm*, vol. 630, p. 122381, Jan. 2023, doi: [10.1016/j.ijpharm.2022.122381](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122381).
- [17] H. Xiang, S. Xu, W. Zhang, Y. Li, Y. Zhou, and X. Miao, "Skin permeation of curcumin nanocrystals: Effect of particle size, delivery vehicles, and permeation enhancer," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 224, p. 113203, Apr. 2023, doi: [10.1016/j.colsurfb.2023.113203](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113203).
- [18] A. Ali *et al.*, "Relationship between sensorial and physical characteristics of topical creams: A comparative study on effects of excipients," *Int J Pharm*, vol. 613, p. 121370, Feb. 2022, doi: [10.1016/j.ijpharm.2021.121370](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121370).
- [19] D. F. Evans and H. Wennerström, *The Colloidal Domain – where physics, chemistry, biology and technology meet*, 2nd Edition. Wiley-VCH, USA, 1999. doi: [10.1515/arh-2001-0032](https://doi.org/10.1515/arh-2001-0032).
- [20] R. Pool and P. G. Bolhuis, "The influence of micelle formation on the stability of colloid surfactant mixtures," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 12, no. 44, pp. 14789–14797, Nov. 2010, doi: [10.1039/c0cp00912a](https://doi.org/10.1039/c0cp00912a).
- [21] V. Francia, D. Montizaan, and A. Salvati, "Interactions at the cell membrane and pathways of internalization of nano-sized materials for nanomedicine," *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 11, pp. 338–353, Feb. 2020, doi: [10.3762/bjnano.11.25](https://doi.org/10.3762/bjnano.11.25).
- [22] C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, and C. Yin, "Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and bio-distribution of polymeric nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 31, no. 13, pp. 3657–3666, May 2010, doi: [10.1016/j.biomaterials.2010.01.065](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.065).
- [23] A. Vedadghavami, C. Zhang, and A. G. Bajpayee, "Overcoming negatively charged tissue barriers: Drug delivery using cationic peptides and proteins," *Nano Today*, vol. 34, Oct. 2020, doi: [10.1016/j.nantod.2020.100898](https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.100898).
- [24] Y. Ikeda, H. Nakamura, S. Ohsaki, and S. Watano, "Direct translocation of a negatively charged nanoparticle across a negatively charged model cell membrane," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 23, no. 17, pp. 10591–10599, May 2021, doi: [10.1039/d0cp06278b](https://doi.org/10.1039/d0cp06278b).
- [25] M. Lukić, I. Pantelić, and S. D. Savić, "Towards optimal pH of the skin and topical formulations: From the current state of the art to tailored products," *Cosmetics*, vol. 8, no. 69, Aug. 2021, doi: [10.3390/cosmetics8030069](https://doi.org/10.3390/cosmetics8030069).