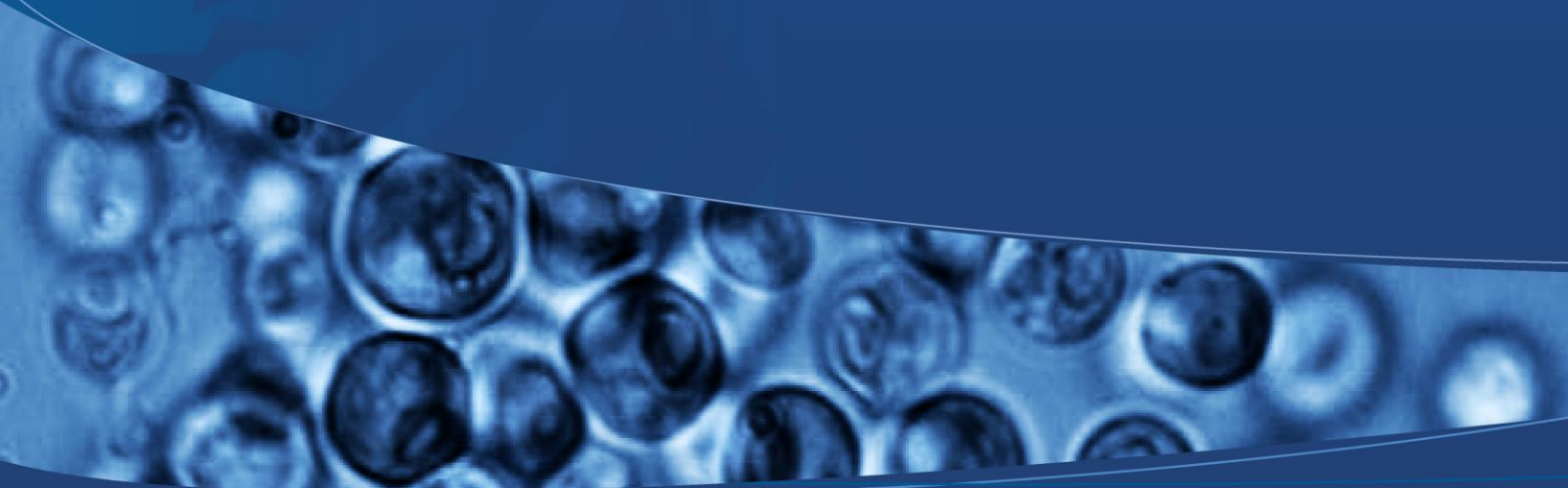


Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotechnología
y Bioingeniería A.C.



Año 2017 Volumen 21 Número 1
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotechnología y Bioingeniería

MESA DIRECTIVA

Dr. Carlos Regalado González
Presidente

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Vice-Presidente

Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz
Secretario

Dr. Aldo Amaro Reyes
Tesorero

Dra. Sylvie Le Borgne
Subsecretario

Dra. Blanca García Almendarez
Vocal Profesional

Ing. Diana Victoria Melo Sabogal
Vocal Estudiante

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Editora en Jefe
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
UNAM

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
CINVESTAV

Dr. Fernando Luis García Carreño
CIBNOR

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
UAM-I

Dra. Sara Solís Pereira
Instituto Tecnológico de Mérida

Dra. Elizabeth Langley McCarron
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Víctor Manuel Loyola
Centro de Investigación Científica de
Yucatán

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los Conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. o a la siguiente dirección electrónica smbb1982@gmail.com

Artículos

EDITORIAL

México Ante una Oportunidad de Oro para Reinventarse

Sergio Sánchez Esquivel **4**

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES **7**

ARTÍCULOS

Enfermedad de Alzheimer y la importancia de los adyuvantes en inmunización activa

Nathaly Vasquez-Martínez, Sergio Sánchez y Romina Rodríguez-Sanoja **12**

Un acercamiento a la fisiología y producción de hongos micorrizicos arbusculares

Andres Uribe-Lopez, Norma Adriana Valdez-Cruz y Mauricio A. Trujillo-Roldán **32**

Potencial y limitaciones de la minería de genomas de actinomicetos como herramienta para la identificación de clústeres de producción de metabolitos secundarios

Silvia Guzmán-Trampe, Romina Rodríguez Sanoja y Sergio Sánchez Esquivel **47**

México Ante una Oportunidad de Oro para Reinventarse

El presente *Editorial*, marca el inicio de actividades de la **Dra. Romina Rodríguez Sanoja** como nueva **Editora en Jefe** de la revista **BioTecnología**, órgano de difusión de la **Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.** A la nueva responsable de **BioTecnología**, le agradezco la invitación para escribir el primer *Editorial* de la Revista en su administración y le deseo el mejor de los éxitos en las tareas que le competan. Como todos los cambios, esta renovación también representa una oportunidad para que el *Comité Editorial* de la misma lleve cabo un análisis detallado sobre los objetivos de la Revista, los logros obtenidos y las metas que no se alcanzaron. Como resultado, podrán diseñar y ejecutar las estrategias mas convenientes para lograr un mayor crecimiento e impacto de la Revista, nuestra revista, para sus lectores y para la Sociedad.

En este *Editorial*, quiero referirme a la amenaza que las posturas del Presidente de Estados Unidos están acarreado, no solamente a nuestro país y al resto del mundo, sino también a la propia unión Americana.

Hemos sido amenazados y se han iniciado acciones de los Estados Unidos contra la inmigración ilegal, incluso con la construcción de un muro, que según su presidente nuestro país deberá costear. Se ha prevenido a empresas automotrices para que ya no sigan invirtiendo en México y presionado a las mismas para que trasladen sus plantas a los Estados Unidos, a riesgo de enfrentar represalias arancelarias. Como resultado de estas acciones, un gigante automotriz como es la Ford, anunció la cancelación de una inversión de mil 600 millones de dólares para la construcción de una planta en San Luis Potosí, que evitará la creación de unos dos mil 500 empleos.

Por lo que toca a la Ciencia y Tecnología, México tiene una tradición de al menos 45 años de colaboración con el vecino país. Esta tradición incluye no solamente la realización de proyectos en el marco del “Acuerdo de Cooperación Científica y Técnica”, firmado por ambos países en el año de 1972. Años más tarde se han firmado otros convenios y realizado diversos foros como el “Foro Bilateral sobre Educación Superior, Innovación e Investigación” suscrito en el año 2013 por los presidentes de ambas naciones y que permiten el desarrollo de más de 80 acuerdos de cooperación entre instituciones de educación superior de México y Estados Unidos. También se han creado equipos de trabajo como la “Comisión México-Estados Unidos para el Intercambio Educativo y Cultural (COMEXUS)”. De hecho, esta Comisión es responsable de administrar las becas “Fulbright-García Robles” que apoyan a estudiantes mexicanos para realizar posgrados en los Estados Unidos.

Dicho país, constituye el principal destino en el extranjero donde nuestros estudiantes mexicanos, realizan sus estudios de posgrado. Tan solo en el año anterior, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) otorgó mil 550 becas para la realización de estudios de posgrado

en los Estados Unidos, estancias posdoctorales, sabáticas y becas mixtas (Dirección Adjunta de Posgrados y Becas del CONACyT).

Los convenios y acuerdos mencionados, así como las cifras de becas otorgadas en el 2016 por el CONACyT, nos muestran claramente la gran fortaleza de nuestra relación científica con nuestro vecino del Norte.

Si el nuevo Gobierno de los Estados Unidos llegara a restringir la cooperación científica con México, como ya lo está haciendo con algunas industrias como la automotriz, habrá que voltear nuestro ojos hacia otros horizontes. Es tiempo de mirar hacia otras fronteras como Europa y Asia, e iniciar nuevas relaciones científicas y comerciales y reforzar las existentes con países que de hecho, son los líderes actuales en diversas áreas comerciales y del conocimiento. Se podrán visualizar programas de investigación en otras partes del mundo en los que nuestros científicos y estudiantes si sean bien recibidos, para colaborar científicamente y que los alumnos puedan completar su formación profesional y de posgrado.

México se encuentra ante una buena oportunidad para revisar sus estrategias y políticas económicas que puedan incidir en su desarrollo científico, tecnológico e industrial. ¿Acaso no somos un país soberano? Luego entonces sería deseable iniciar nuestra propia industria tecnológica para el desarrollo de medicamentos, maquinaria agrícola, automóviles y aeronaves. Sin duda hay un buen camino andado, pero al parecer ha sido insuficiente. Dejemos de ser solamente espectadores en estos grandes negocios y dejar de ser lo que somos, un país de maquiladores con mano de obra barata que permiten el enriquecimiento de las industrias transnacionales. Si queremos tener riqueza, es imperativo, en el marco de nuestro respeto a las patentes nacionales e internacionales, promover el desarrollo tecnológico e industrial en todos los ramos para no depender de otros países. Nuestro Gobierno debe comprender que la inversión más rentable es aquella que se destina a la ciencia y tecnología. El conocimiento científico y tecnológico genera soberanía y prosperidad. Países como China, Corea del Sur e Israel, decidieron invertir en ciencia y tecnología hace algunas décadas y ahora son naciones prósperas y ricas. ¿Qué esperamos para ser como esas naciones? Es triste observar como en la reciente convocatoria para "Fortalecimiento de la Infraestructura-2017" del CONACyT, solamente se aprobaron el 4% de los proyectos que solicitaron apoyo a nivel nacional.

En conclusión, si queremos estar en concierto con las naciones progresistas del mundo, nuestro México debe aprovechar esta coyuntura con nuestro vecino del Norte y reconsiderar sus posiciones de política económica y científica interior. Se recomienda apostar a la investigación científica y tecnológica del país. Como se comprende, a través de estas acciones, podremos apoyar el desarrollo sostenible de la industria nacional, la economía y la educación. Ante esta oportunidad, el talento mexicano podrá reinventarse y llevar a cabo descubrimientos científicos y tecnológicos que disparen nuestro desarrollo industrial. Somos Mexicanos comprometidos y nuestro país lo merece. Sin ciencia, no habrá desarrollo ni progreso.

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Investigador Titular "C"

Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México

E-mail: sersan@biomedicas.unam.mx

Instrucciones para los autores

Guía de Autores

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

Los idiomas de la revista son el Español y el Inglés.

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

Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones de trabajos originales y revisiones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

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

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde sus aspectos fundamentales hasta las aplicaciones de los mismos, incluyendo: microbiología, bioquímica y biología molecular, procesos y proyectos, así como biotecnología marina y biotecnología aplicada a la salud, alimentos, agricultura, veterinaria, enzimas y ambiente.

Los trabajos de investigación original serán divididos en las siguientes secciones: **Introducción, Materiales y métodos, Resultados, Discusión, Referencias y Agradecimientos**. Las secciones de **Resultados y Discusión** pueden presentarse combinadas.

Los trabajos de revisión incluirán el tema y subtemas que a juicio de los autores sean necesarios para la mejor presentación de la información. Estos trabajos pueden cubrir los siguientes contenidos:

1. ¿Qué es y para qué sirve la Biotecnología?. Es decir: descripciones que ilustren y divulguen los distintos campos de la biotecnología, sus alcances y limitaciones, su historia y sus perspectivas.
2. Las fronteras de la biotecnología: revisiones de nuevos campos o nuevas aplicaciones de la biotecnología. Por ejemplo: las perspectivas del uso de los genomas para el desarrollo de

Instrucciones para los autores

nuevas drogas o para el tratamiento de enfermedades metabólicas. Las perspectivas de la genómica (estudio sistemático de los genes y sus aplicaciones), la proteómica (predicción de la expresión de los genes en proteínas funcionales) y la fenómica (predicción de fenotipos o conductas de los organismos, en base a sus genes y a sus proteínas). El uso de la ingeniería genética para hacer ingeniería metabólica. Los nuevos tipos de reactores biológicos y los fenómenos de transporte implicados. Los nuevos esquemas de reacción, separación y control en procesos biotecnológicos.

3. Aplicaciones de la Biotecnología para resolver problemas o atender necesidades de la sociedad, con especial atención a sus aplicaciones ya vigentes en México. Esta sección será dedicada a una empresa o institución (pública o privada) que desee difundir los logros obtenidos en algún campo de la biotecnología. Por ejemplo: empresas productoras de antibióticos o productos biológicos, empresas de ingeniería ambiental que usen procesos biotecnológicos, empresas agropecuarias, forestales o de acuicultura que usen tecnologías biológicas avanzadas, o empresas de transformación de alimentos que utilicen enzimas, cultivos de microorganismos, etc. Esta lista es indicativa pero no exhaustiva.
4. Problemas de bioseguridad, bioética y biodiversidad relacionados con las aplicaciones de la biotecnología a la sociedad. Por ejemplo: análisis y comentarios sobre los debates acerca del uso de semillas transgénicas, los problemas de conservación y explotación de la biodiversidad mediante la biotecnología, los riesgos del uso de organismos transgénicos en diversos campos de la industria, los problemas de bioseguridad del uso de antibióticos y otros productos biotecnológicos.
5. La educación, la cultura y la difusión tecnológica en relación con la biotecnología. Por ejemplo: comentarios de planes y programas, de estilos y necesidades de la enseñanza, del enfoque interdisciplinario, en carreras o planes de estudio directamente ligados con la biotecnología. También necesidades y modalidades sobre programas de extensión educativa para la industria, para el público consumidor o para grupos selectos de personas interesadas en la biotecnología (políticos, funcionarios de empresas, líderes de opinión). El uso de la informática en la difusión de la biotecnología, y en general, el análisis de necesidades, métodos y alternativas para difundir los conocimientos de la biotecnología.
6. Oportunidades y propuestas para mejorar la cooperación y el desarrollo biotecnológicos. Por ejemplo: Análisis de las oportunidades vigentes de intercambio académico o comercial en biotecnología. Propuestas de nuevas formas de cooperación entre los sectores de investigación y la industria biotecnológica. Análisis y propuestas del uso óptimo de recursos humanos, financieros o materiales para mejorar la cooperación o el desarrollo de la

Instrucciones para los autores

biotecnología. En esta sección se dará espacio a los análisis, críticas o propuestas de los aspectos legales y fiscales que afecten e incluso puedan mejorar el desarrollo de la biotecnología en México. Tales como: la propiedad industrial, el régimen fiscal de las empresas, el costo del desarrollo biotecnológico y los subsidios o estímulos económicos para el desarrollo de la biotecnología.

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

1. El título del manuscrito será puesto en **negritas** con letra Arial o equivalente tamaño **14**. El título deberá estar centrado.

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño **12**. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como el e-mail del autor corresponsal.

3. Se deberá añadir un **Resumen** de no más de 250 palabras en Español y un **Abstract** en Inglés de tamaño similar.

4. Se incluirán entre 3 a 6 **Palabras clave:** que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en Español y en Inglés (**Key words:**).

5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste se pondrá como primera línea en *cursivas* con letra Arial o equivalente tamaño **10**. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño **10**. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.

6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras. La impresión de las figuras e imágenes se hará en blanco y negro, por lo que se recomienda que muestren un buen contraste, en especial las figuras con varias líneas. Según el orden de aparición en el texto, las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en

Instrucciones para los autores

las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto pero se anexarán en hojas separadas después de las **Referencias**.

7. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a tal fuente de información original, si ello fuera necesario. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribiera como sigue: “Gutiérrez *et al.* (2003), han demostrado....” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez *et al.*, 2003) han mostrado...” Si la cita es es una página de Internet, ésta deberá ponerse completa entre paréntesis directamente en el texto donde se mencione. La lista de **Referencias** se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño **10**) de acuerdo al siguiente formato:

Para revistas:

García-Carreño F, Cota K & Navarrete del Toro MA (2008) Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*: conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6454-6459.

Para libros y capítulos de libros:

(Libro)

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

(Capítulo de libro)

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

Para patentes:

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

Para congresos y reuniones: *Se aceptarán un máximo de dos citas de este tipo.*

Instrucciones para los autores

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

Para citas provenientes de internet: *Se aceptará un máximo de dos citas de este tipo.*

Van Deuren J, Wang Z & Ledbetter J (1997) Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ª Ed. *Technology Innovation Office, EPA*. Disponible en: <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.

Revistas electrónicas:

Sun J, Lu X, Rinas U, & Zeng AP (2007) Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biol.* 8: R182. *BioTecnología*, Año 2015, Vol. 19 No. 1 11

Para tesis de pre y posgrado:

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

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea. Las citas de internet, congresos y reuniones, deberán evitarse al máximo.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos. Los trabajos solamente se reciben vía correo electrónico al Comité Editorial encabezado por la Dra. Romina Rodríguez Sanoja en la dirección romina@biomedicas.unam.mx. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal, por lo que se pide incluir una dirección de correo electrónico para este fin, así como para mantener comunicación con el editor sobre la evolución de la revisión y sobre la aceptación del mismo.

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

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y LA IMPORTANCIA DE LOS ADYUVANTES EN INMUNIZACIÓN ACTIVA

Nathaly Vasquez-Martínez, Sergio Sánchez y Romina Rodríguez-Sanoja *

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 04510.

Email: romina@biomedicas.unam.mx

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa, considerada la principal causa de demencia en el mundo. Patológicamente se caracteriza por el depósito de placas amiloides compuestas del péptido β -amiloide ($A\beta$) y marañas neurofibrilares compuestas de la proteína tau hiperfosforilada. A la fecha, solo hay tratamientos sintomáticos para esta enfermedad. Existe suficiente evidencia del rol central del $A\beta$ en la progresión de EA para considerar que la inmunización activa contra este péptido es una estrategia eficaz para la disminución de las placas amiloides cerebrales y mejoras cognitivas en modelos animales. Sin embargo, debe alcanzarse un equilibrio entre la prevención eficaz, la reducción de la placa amiloide y la toxicidad, evitando respuestas excesivas de células Th1 y diseñando vacunas que impulsen respuestas Th2 anti-inflamatorias. Esto puede lograrse seleccionando un adyuvante que module la respuesta inmune independientemente del antígeno y/o la ruta de administración usada, además de que prevenga el daño ocasionado por la neuroinflamación y aminore la inmunosenescencia. Debido a que la mayor parte de los adyuvantes convencionalmente usados presentan toxicidad, reacciones adversas y respuestas indeseadas en EA, es necesario continuar en la búsqueda de un adyuvante de vacunas eficaz y seguro. En este trabajo se revisan los adyuvantes probados experimentalmente en vacunas contra la enfermedad de Alzheimer.

Palabras claves: vacunas, adyuvantes, Alzheimer, péptido β -amiloide, inmunomodulación

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease, considered the principal cause of dementia in the world. Pathologically, it is characterized by the deposition of amyloid plaques composed of β -amyloid peptide ($A\beta$) and neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated tau protein. To date, there are only symptomatic treatments for this disease. However, there is sufficient evidence of the central role of $A\beta$ in EA progression, to consider that active immunization against this peptide is an effective strategy for the reduction of brain amyloid plaques and cognitive

enhancements in animal models. Still, a balance must be struck between effective prevention, amyloid plaque reduction and toxicity, avoiding excessive Th1 cell responses and designing vaccines that drive anti-inflammatory Th2 responses. This may be achieved by selecting an adjuvant that modulates the immune response independently of the antigen and / or the route of administration used, in addition to preventing damage caused by neuroinflammation and ameliorating immunosenescence. Because most of the conventionally used adjuvants present toxicity, adverse reactions and unwanted responses in AD, it is necessary to continue the search for an effective and safe vaccine adjuvant. In this paper we review experimentally tested adjuvants in vaccines against Alzheimer's disease.

Key words: vaccines, adjuvants, Alzheimer's, β -amyloid peptide, immunomodulation

INTRODUCCIÓN

La demencia es un término usado para describir enfermedades y/o afecciones caracterizadas por un deterioro progresivo del intelecto, la función cognitiva y la conducta de las personas, que termina en detrimento de la calidad de vida al ocasionar dependencia y discapacidad. En el 2015 se estimó que 46.8 millones de personas alrededor del mundo vivían con algún tipo de demencia; este número podría duplicarse cada dos años, alcanzando los 74.7 millones en el 2030 y 131.5 millones en el 2050. La incidencia de la demencia incrementa exponencialmente con el incremento de la edad, siendo su pico máximo entre los 80-89 años para América Latina (Prince *et al.*, 2016).

De acuerdo con las proyecciones de prevalencia e incidencia, se espera que el número de personas con algún tipo de demencia en el mundo aumente, asociado al incremento en la expectativa de vida y a una disminución en las tasas de fertilidad en la mayoría de los países. Se estiman cerca de

9.9 millones de nuevos casos de demencia cada año alrededor del mundo y particularmente en México, se espera que para el año 2050 más de 3 millones de personas padezcan algún tipo de demencia (Prince *et al.*, 2015). La alta prevalencia, el impacto económico, la inexistencia de acciones terapéuticas y/o correctivas efectivas, así como el estigma y la exclusión social de las personas afectadas, han hecho que la Organización Mundial de la Salud reconozca la demencia como una prioridad en salud pública (World Health Organization, 2012).

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

A nivel mundial la forma más común de demencia es la enfermedad de Alzheimer (EA), representando el 60-80% de los casos. En un estudio poblacional llevado a cabo en México se supo que habían cerca de 800 mil personas con algún tipo de demencia, de las cuales más del 60% eran a causa de EA (Dirección General de Epidemiología, 2011).

La gran mayoría de los casos de EA es esporádica y se cree que su aparición

puede ser el resultado de múltiples factores de riesgo más que de una causa única, considerándose el envejecimiento como el principal factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (Karran *et al.*, 2014). Un pequeño grupo de los casos (<10%) resulta de la herencia autosómica dominante de mutaciones en genes que codifican a la proteína precursora amiloide (APP) y a las presenilinas (PSEN1 o PSEN2) condición conocida como Alzheimer Familiar, generalmente de aparición en edad temprana (Zhang *et al.*, 2011).

Por otro lado, estudios epidemiológicos han sugerido varias asociaciones tentativas entre la aparición temprana de la enfermedad con una capacidad de reserva disminuida del cerebro, incluidos tamaño cerebral reducido, bajos logros educativos y ocupacionales, capacidad mental baja en edades tempranas y reducida actividad física y mental durante la vida adulta. Igualmente traumas en cabeza-cráneo y enfermedades vasculares incluida la hipercolesterolemia, hipertensión, aterosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria, fumar, obesidad y diabetes, son considerados factores de riesgo para el inicio temprano del EA (Blennow *et al.*, 2006).

Para el diagnóstico clínico de la enfermedad se basan en tres etapas: la demencia debida a EA, el deterioro cognitivo leve debido a EA y el EA pre-clínico (pre-sintomático). Estudios de imágenes cerebrales usando imágenes por resonancia magnética (MRI) o tomografía de emisión de positrones (PET), junto con los niveles patológicos del péptido β -amiloide ($A\beta$) y la

proteína Tau en fluido cerebro espinal son los biomarcadores usados en EA; sin embargo, el diagnóstico clínico basado en neuroimágenes y signos de demencia es correcto solo el 80% al 90% de las veces (Hyman *et al.*, 2012).

La fase sintomática de la EA es precedida por la fase preclínica (pre EA), donde hay un deterioro de la memoria a corto plazo. En esta fase ya es posible hacer diagnóstico diferencial de otros desordenes neurodegenerativos como el Parkinson, la enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, entre otros. De acuerdo a las manifestaciones clínicas y neuropatológicas, el paciente avanza de la fase preclínica a EA temprana, caracterizada por desorientación, agnosia, apraxia y decremento en su capacidad analítica; luego en el EA moderado, se evidencian cambios en el comportamiento y estado de ánimo con deterioro cognitivo leve, para finalmente llegar a la fase de EA severa, con disminución de la memoria a largo plazo, daño oxidativo, daño neuronal severo, entre otras manifestaciones clínico-patológicas. La complejidad de la EA aumenta con la edad y las comorbilidades concomitantes, resultando en una enfermedad con un amplio rango de manifestaciones clínicas (Ferreira & Klein, 2011).

PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La neuropatología característica de la EA fue descrita por primera vez en 1907 por Alois Alzheimer. Esta se caracteriza por la presencia de placas amiloides producto del

depósito mayoritariamente extracelular de fibrillas compuestas por el A β , así como la acumulación de marañas neurofibrilares intracelulares producto de la hiperfosforilación de la proteína Tau, asociadas a inflamación, pérdida neuronal y pérdida sináptica (Karran *et al.*, 2014).

Un gran número de eventos están implicados en el inicio del daño neurológico; sin embargo, la teoría dominante ha atribuido el inicio de la enfermedad a la toxicidad de las placas amiloides, hipótesis conocida como "Hipótesis de la Cascada Amiloide" (Hardy & Higgins, 1992), donde la muerte de las células nerviosas es causada por la toxicidad de las fibrillas amiloides insolubles. Actualmente esta hipótesis se ha modificado

y se han propuesto a los agregados amiloides oligoméricos como los principales causantes de la patología (Selkoe & Hardy, 2016).

El A β componente principal de las placas amiloides, se encuentra en bajas concentraciones de manera normal en fluidos biológicos, líquido cefalorraquídeo y plasma participando de funciones biológicas. Este péptido es producto del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP), una proteína de mayor tamaño que puede ser procesada por dos vías: la no-amiloidogénica y la amiloidogénica (Figura 1). La mayor parte de la APP es procesada en la vía no-amiloidogénica por la enzima α -secretasa de la familia ADAM; el corte de esta enzima

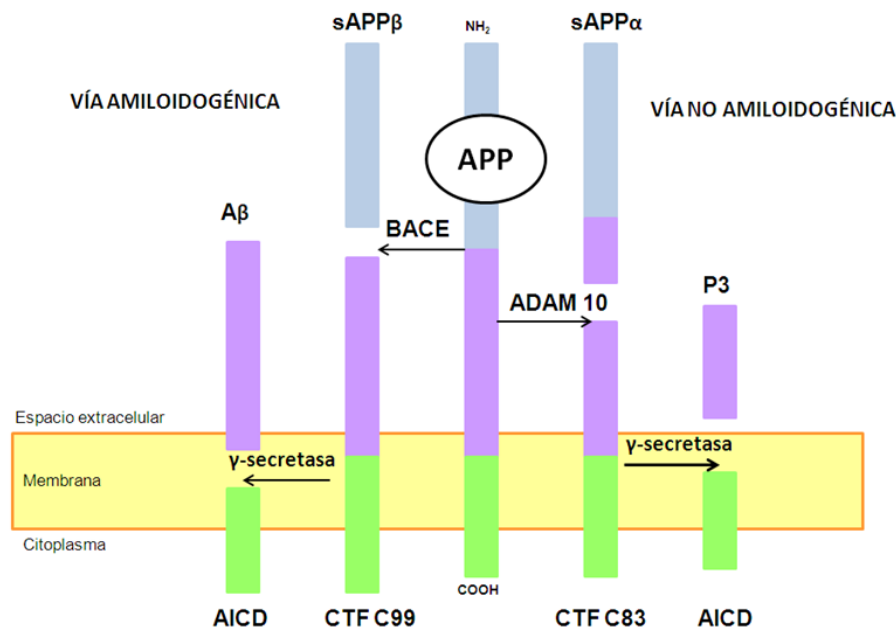


Figura 1. Esquema del procesamiento de la Proteína Precursora Amiloide. A β , Péptido β -amiloide; AICD, Dominio intracelular de APP; sAPP β , Péptido soluble N-terminal de la vía amiloidogénica; BACE, β -secretasa; CTF C99, fragmento C-terminal de 99 residuos, APP, Proteína precursora amiloide; sAPP α , Péptido soluble N-terminal de la vía no amiloidogénica; ADAM 10, α -secretasa; CTF C83, Fragmento C-terminal de 83 residuos; P3, Péptido A β _{17-40/42}. Tomada de Saraceno *et al.*, 2013.

ocurre dentro del A β con lo que a su vez se impide la formación y depósito de las placas. En la vía amiloidogénica el procesamiento de la APP ocurre por la acción conjunta de la β -secretasa (en las neuronas, la aspartil proteasa BACE) y la γ -secretasa, la cual finalmente genera especies A β de diferentes longitudes, solubilidad, estabilidad y propiedades tóxicas, siendo el A β 1-40 y A β 1-42 las formas mayoritarias (Zhang *et al.*, 2012).

En adultos mayores sin EA la mayor proporción del péptido corresponde a A β 1-40 y solo un 10% de los péptidos es A β 1-42 (Tabaton *et al.*, 2010; Saraceno *et al.*, 2013). No obstante, la progresión de pre-EA a la fase sintomática está asociada a cambios patológicos en la composición de los agregados del péptido con cambios graduales en su metabolismo, aumenta la producción total del A β e incrementa el ratio A β 42/A β 40 junto con los niveles de A β 1-42 (Karran *et al.*, 2014).

Para la formación de las placas amiloides, se acepta que la forma monomérica soluble del A β es la precursora de los agregados y que esta debe pasar a una forma oligomérica insoluble para la formación de las placas, siendo la secuencia de aminoácidos del péptido la principal responsable del autoensamble y la agregación del A β (Thal *et al.*, 2015). Múltiples evidencias demuestran que estos cambios en la producción del péptido tiene un efecto neurotóxico, causando disfunción sináptica y eventualmente la pérdida neuronal en las áreas afectadas del cerebro (Nelson *et al.*, 2012; Masters & Selkoe, 2012)

por su capacidad para inducir estrés oxidativo (Tabaton *et al.*, 2010), aumento de la respuesta inflamatoria, activación de la microglía y astrocitosis, alteración de la homeostasis neuronal y finalmente hiperfosforilación de la proteína Tau (Haass & Selkoe, 2007).

TRATAMIENTO

Aunque exactamente las bases bioquímicas de la EA no son bien entendidas, se sabe que las deficiencias del sistema colinérgico y otros neurotransmisores están presentes, por lo que medicamentos que incrementan la actividad colinérgica por inhibición de la acetilcolinesterasa muestran beneficios cognitivos en la mayoría de individuos con EA. Los medicamentos aprobados por la FDA, donepezilo (Aricept®), rivastigmina (Exelon®) y galantamina (Radadyne®) hacen parte de este grupo de medicamentos usados en EA temprano a moderado, mientras en EA severo se usa la memantina (Exiba®), un antagonista del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) que regula la actividad incrementada del glutamato y previene la entrada excesiva de iones Ca⁺² en las células (O'Brien *et al.*, 2017).

La investigación en el desarrollo de medicamentos es amplia y aunque en su mayoría tienen como blanco medular el metabolismo de la APP o de la proteína Tau, estrategias auxiliares como el uso de agentes anti-inflamatorios, estrógenos, moduladores de neurotransmisores, factores de crecimiento nervioso, consumo de ginkgo

biloba, estatinas, entre otros, se prueban para tratamiento de la EA (Lukiw, 2012).

INMUNOTERAPIA EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Los medicamentos aprobados permiten aminorar los síntomas en algunos de los pacientes por tiempo limitado, más no detienen el curso de la EA. Desde otro enfoque, estudios experimentales en modelos animales han demostrado que la inmunoterapia es una estrategia potencial para modificar el desarrollo de la enfermedad. Actualmente, las principales estrategias de intervención en inmunoterapia buscan reducir la producción del péptido, evitar su agregación y remover las placas seniles por inducción de la disolución de estas (Karran *et al.*, 2014) y así atenuar la patología secundaria al depósito de A β : la patología tau, la neuroinflamación, la disfunción dendrítica y la pérdida neuronal (Liu *et al.*, 2015).

Las primeras evidencias de que los anticuerpos dirigidos contra el A β podían disgregar las placas amiloides e inhibir la neurotoxicidad, fueron descritas por Solomon y colaboradores, quienes evaluaron en estudios *in vitro* anticuerpos monoclonales (mAb) contra diferentes regiones del péptido y encontraron que los anticuerpos dirigidos contra las regiones N-terminales interferían en las interacciones covalentes de la fibrillas amiloides y las desagregaban (Solomon *et al.*, 1997).

Los mecanismos involucrados en la disminución de las placas mediados por los anticuerpos contra el péptido A β , dependen

de la entrada de estos al sistema nervioso central (Weiner & Frenkel, 2006). Se ha propuesto que la forma en la cual actúan es por efecto directo de los anticuerpos sobre el A β , que permite la disolución de las fibrillas amiloides o la neutralización de los oligómeros (Solomon *et al.*, 1997); también es posible que los anticuerpos medien la fagocitosis por las células de la microglía a través de los receptores Fc (Schenk *et al.*, 1999) o puede haber un “consumo periférico” que implica la salida de formas A β del cerebro hacia el plasma (Maier *et al.*, 2006); sin embargo, no se descarta que estos mecanismos dependan de los sistemas experimentales estudiados (Weiner & Frenkel, 2006).

En consecuencia a este hallazgo, en la inmunoterapia pasiva para la EA se administran mAb dirigidos contra el A β , una alternativa que ha sido considerada segura y más controlable que la inmunización activa. Con los resultados obtenidos en ratones transgénicos, se ha observado una disminución significativa en los niveles de A β y beneficios cognitivos. A pesar de que hay muchas hipótesis acerca de los mecanismos principales de acción de los mAb administrados, aún no están definidos en modelo murino ni en humanos. Asimismo los altos costos, la eficiencia de los mAb para cruzar la barrera hematoencefálica, la reactividad cruzada, el desarrollo de microhemorragias cerebrales, así como la necesidad de administración crónica, crean limitantes para su uso (Wisniewski & Konietzko, 2008).

Por otro lado está la inmunoterapia activa o vacunación, en la que se busca obtener respuesta inmune específica contra un antígeno. Diferentes tipos de células inmunes están involucradas en la generación de esta respuesta. De manera general, luego de la vacunación las células presentadoras de antígeno (APC) captan, procesan y presentan el antígeno a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); posteriormente, ocurre la activación de las células T CD4⁺ y/o CD8⁺ cuando sus receptores antigénicos se unen a los péptidos presentados por las moléculas MHC clase I y II, respectivamente. Las células T CD4⁺ se convierten en células T colaboradoras (Th) que ayudan a las células B a producir anticuerpos y las células T CD8⁺ se diferencian a linfocitos T citotóxicos. Las células B reciben una señal de activación por el antígeno a través de su receptor (BCR), internalizan y presentan el antígeno procesado vía MHCII a células Th, obteniéndose así una segunda señal necesaria para la producción de anticuerpos antígeno específicos. Los linfocitos T CD4⁺ en respuesta al estímulo antigénico pueden diferenciarse a subpoblaciones celulares tipo Th1 o Th2, que llevan a la expresión de moléculas de superficie que activan otras células y a la secreción de citocinas y quimioquinas.

La inmunoterapia activa para EA consiste en la administración de un inmunógeno, generalmente conjugado con una proteína acarreadora y/o adyuvante, con el fin de estimular la respuesta inmune específica de anticuerpos contra las formas

tóxicas del A β (Winblad *et al.*, 2014; Wisniewski & Goñi, 2015). Schenk y colaboradores en 1999 inmunizaron ratones transgénicos PDAPP con el péptido A β 1-42 combinado con el adyuvante de Freund (AF), previniendo en animales jóvenes la formación de la placa, la distrofia neurítica y la astrogliosis, así como una reducción de la extensión y progresión a neuropatología de EA en animales que por su edad ya tenían placa formada, sin reporte de toxicidad evidente (Schenk *et al.*, 1999).

Este estudio sirvió para el lanzamiento en el año 2000 del ensayo clínico AN1792 (Bayer *et al.*, 2005), donde usaron el péptido A β 1-42 con QS-21, un adyuvante que genera fuerte respuesta inmune mediada por células T, similar AF en ratones. El ensayo tuvo que ser suspendido en la fase II ya que 6% de individuos desarrollaron meningoencefalitis; sumado a esto, estudios posteriores evidenciaron que solo 19.7% de los pacientes participantes desarrollaron anticuerpos tras la inmunización y estos no fueron eficientes en la remoción de los depósitos de A β o en retardar el deterioro cognitivo (Gilman *et al.*, 2005).

USO DE ADYUVANTES EN INMUNIZACIÓN ACTIVA PARA LA ENFERMEDAD DE EA

Debido a la baja inmunogenicidad del A β , para la inmunización activa se requiere de adyuvantes y/o acarreadores que induzcan una respuesta inmune efectiva. Los adyuvantes han sido definidos como compuestos o moléculas que tienen la

capacidad de estimular *in vivo* el sistema inmune (Schijns, 2000; O'Hagan & Valiante, 2003) al incrementar y/o modular la respuesta frente al antígeno acoplado (Perez *et al.*, 2012; Savelkoul *et al.*, 2015), lo que permite reducir las múltiples inmunizaciones (Sivakumar *et al.*, 2011), mejora la relación costo-efectividad de la vacuna y la hace más segura. Una gran variedad de compuestos naturales y/o sintéticos han mostrado tener capacidad adyuvante, sin embargo, debido a su toxicidad muy pocos se han aprobado para uso en humanos y solo en conjunto con vacunas específicas (Wang *et al.*, 2015).

Los casos de meningoencefalitis tras la inmunización en el ensayo clínico pionero AN1792, se han asociado con la infiltración de células T autorreactivas en los cerebros de los individuos inmunizados (Robinson *et al.*, 2004); de igual forma, cuando se estimuló *in vitro* con A β la mayoría de las células respondieron secretando IL-2 e IFN- γ , indicativo de inducción de respuesta tipo Th1 con la inmunización (Pride *et al.*, 2008). Aún no se sabe con certeza que componentes de la vacuna fueron los responsables de este evento adverso, podría ser el antígeno A β 1-42 en sí mismo, el adyuvante QS-21, la combinación de ambos o como hipotetizaron Pride y colaboradores, la adición del polisorbato 80 a la formulación.

Gran parte de los esfuerzos en inmunoterapia activa son para determinar el antígeno apropiado que estimule inmunidad protectora contra la EA, puesto que se sabe que las diferentes regiones del péptido contienen epítopes para células T que pudiesen ser la causa de respuestas pro-

inflamatorias, pero hay pocos progresos en la identificación o el desarrollo de un adyuvante efectivo, lo cual es crítico puesto que la elección del adyuvante puede dirigir el tipo de respuesta inmune adaptativa al antígeno administrado (Di Pasquale *et al.*, 2015) (Figura 2).

Se acepta entonces, que la respuesta inflamatoria tipo Th1 en la EA causa gran daño debido a la producción de citocinas pro-inflamatorias y linfocitos citotóxicos, por lo que es ideal el uso de adyuvantes que modulen la respuesta inmune induciendo respuestas anti-inflamatorias Th2, independientemente al epítipo de A β usado y/o la ruta de administración. Si el adyuvante induce inflamación sistémica, esta puede afectar el sistema nervioso central indirectamente por el transporte de citocinas pro-inflamatorias, junto con la secreción de compuestos neuroinflamatorios que pueden agravar el curso de las enfermedades neurodegenerativas (Sankowski *et al.*, 2015).

TIPOS DE ADYUVANTES USADOS EN INMUNOTERAPIA PARA EA

Adyuvantes basados en aluminio

Los compuestos de aluminio han sido usados como adyuvantes en la vacunación durante casi 90 años, por inducir inmunidad eficiente y protectora de larga duración, además del bajo costo y amplia disponibilidad en forma de tres tipos de sales: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio y potasio. Su efecto inmunoestimulante se atribuye a diferentes

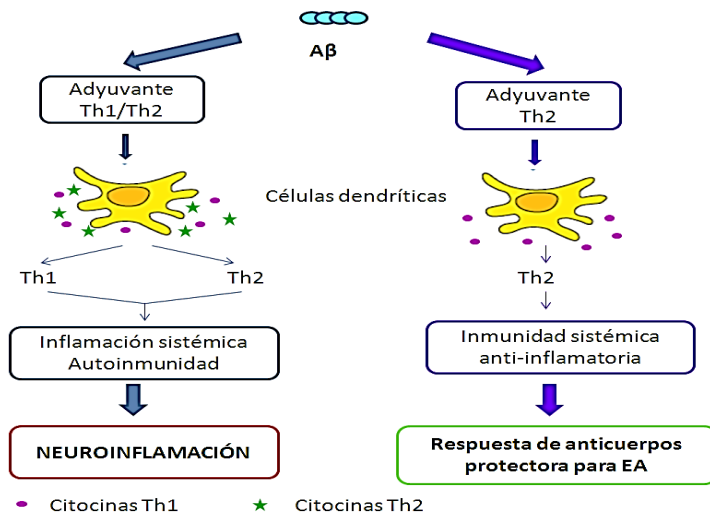


Figura 2. Respuesta inmune contra el A β en inmunización activa. La inmunización con adyuvantes Th1/Th2, como el adyuvante de Freund o QS-21, inducen la secreción por células dendríticas de citocinas Th1 y Th2, producción de inmunidad mediada por células e inmunidad humoral, causando una respuesta inflamatoria sistémica. Estas citocinas proinflamatorias luego pueden ser transportadas a través de la barrera hematoencefálica y causar daño en el sistema nervioso central. Por el contrario, los adyuvantes que desencadenan respuestas exclusivas de células Th2, inducen a las células dendríticas a secretar citocinas Th2 e inhibir la producción de citocinas Th1, generando respuestas sistémicas anti-inflamatorias así como anticuerpos protectores contra el A β (Tomado de Marciani, 2016).

mecanismos, incluidos el efecto de depósito en el sitio de la administración, la activación del inflammasoma, el aumento en la captación de antígeno por las células de la respuesta inmune y la protección del antígeno de la degradación, lo que culmina con fuertes respuestas antígeno específicas tipo Th2 (Brito *et al.*, 2013).

Debido a la edad en la que es frecuente el diagnóstico de la EA, la inmunización activa para esta enfermedad se ha previsto en población adulta mayor, lo cual representa una limitante teniendo en cuenta la inmunosenescencia asociada al envejecimiento. En un estudio en el que determinaron los niveles de anticuerpos protectores en el tiempo luego de administración de la vacuna trivalente de influenza, encontraron que la efectividad

alcanzó un 70% a 90% para individuos menores de 65 años y solo un 30% a 40% en edades mayores (Lang *et al.*, 2010). Resultados similares se observaron con la vacuna de polisacáridos conjugados frente al neumococo (PPV) (Artz *et al.*, 2003) y la vacuna para el virus herpes zoster (Weinberg *et al.*, 2009), donde la respuesta de anticuerpos tras la vacunación fue dependiente de la edad, confirmando el efecto mencionado en la calidad de la respuesta inmune.

Ratones transgénicos para EA Tg2576 fueron inmunizados con un derivado del A β (K6A β 1-30-NH₂) adsorbido a partículas de fosfato de aluminio (Adju-Phos®) por vía subcutánea. Los autores observaron que la reducción de la placa amiloide o las mejoras cognitivas tras la

inmunización fueron dependientes de la edad, con resultados positivos para los ratones inmunizados entre los 11 a 19 meses, pero nulos para los ratones de 19 a 24 meses (Asuni *et al.*, 2006), lo que demuestra que probablemente este grupo de adyuvantes no contrarreste los impactos negativos en el sistema inmune que afectan la funcionalidad de la respuesta inmune innata y adaptativa en la inmunosenescencia.

Sumado a esto, el uso de derivados de aluminio como adyuvante se ha asociado a respuestas inflamatorias locales leves como dolor, enrojecimiento, hinchazón en el sitio de la inyección y algunas veces síntomas generales como fatiga, malestar, mialgia y fiebre. Reacciones moderadas como la miofascitis macrofágica, se debe a infiltraciones de macrófagos que contienen aluminio alrededor de las fibras musculares debido a la persistencia del hidróxido de aluminio en el sitio de inyección intramuscular (Israeli *et al.*, 2011). Y de manera preocupante, se ha demostrado la neurotoxicidad del aluminio en humanos y animales tras la administración por diferentes vías (Kawahara & Kato-Negishi, 2011; Shaw & Tomljenovic, 2013).

Derivados de toxinas bacterianas

Los adyuvantes derivados de toxinas bacterianas han sido usados experimentalmente para la administración vía mucosas del A β . En el 2003, se realizó un estudio inmunizando ratones silvestres B6D2F1 por vía intranasal e intraperitoneal, con el péptido A β 1-15 o A β 1-40/42, combinado con la enterotoxina termolábil de

E. coli (LT) o su variante modificada LT(R192G), logrando obtener respuestas anti-inflamatorias tipo Th2 con predominio de anticuerpos IgG2b al usar los adyuvantes, pero IgG1 cuando se administraba el péptido libre (Leverone *et al.*, 2003).

Este mismo adyuvante ha sido usado para inmunizar ratones transgénicos hAPP_{FAD} con el fragmento N-terminal del péptido en tándem (2xA β 1-15), adicionando motivos de fijación a la fibronectina (RGD) para mejorar la adhesión a la mucosa o epitopes exógenos de células T, en todos los casos obteniendo respuestas no inflamatorias (Maier *et al.*, 2006). De igual forma, se comparó la LT(R192G) con otros adyuvantes derivados de productos bacterianos como la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) o el monofosforil lípido A (MPL) por vía mucosas, obteniendo respuestas principalmente anti-inflamatorias IgG2b, IgG1 y bajos niveles de IgG2a, pero con niveles variables de IFN- γ (Maier *et al.*, 2005).

Con estos adyuvantes el problema reside en que a pesar de que estas toxinas modificadas sean adyuvantes eficientes para inducir respuestas inmunes sistémicas y mucosas, el uso en humanos es controversial debido a su toxicidad innata; ejemplo de esto, son las reacciones adversas locales y sistémicas asociadas a su administración. Un ejemplo es la parálisis de Bell luego de la vacunación intranasal de Nasalflu® (Berna Biotech), una vacuna suiza contra la influenza que contenía como adyuvante una variante atóxica de la toxina termolábil de *E. coli* (LTK63). La parálisis del nervio facial se asoció a la entrada de las enterotoxinas al

sistema nervioso central, probablemente por la expresión de gangliósidos GM1 en las neuronas sensoriales olfatorias (Batista-Duarte *et al.*, 2011).

Además, la edad también es un factor determinante en la polarización de la respuesta inmune en este grupo de adyuvantes. Así se demostró con la administración nasal de proteínas de membrana de *Porphyromonas gingivalis* con la toxina del cólera, con inducción de respuestas predominantemente Th2 en ratones jóvenes, pero altos niveles de IFN- γ así como de IL4 en ratones envejecidos (Cai *et al.*, 2013).

Otro ejemplo de adyuvante derivado de productos bacterianos es el protollin, usado para vacunas intranasales. Este está compuesto de Proteosomas™ (proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*) en complejo no covalente con el lipopolisacárido (LPS) de *Shigella flexneri* y ha sido usado también en EA, provocando fuerte activación de las células de la microglía; el mecanismo de acción en este modelo no es bien conocido pero se relaciona con la inducción de células T que libera factores de crecimiento y/o IFN- γ , lo que implica respuesta Th1 indeseadas (Frenkel *et al.*, 2005).

Además de las respuestas inflamatorias generadas, los componentes bacterianos y virales debido a su naturaleza proteica son inmunogénicos en sí mismos, situación que podría traducirse en el desarrollo de anticuerpos neutralizantes que deroguen su capacidad adyuvante, con pérdida en la eficacia de la vacuna (Marciani,

2015). Este fenómeno, conocido como supresión epitópica inducida por el transportador (CIES) se ha descrito también para el transportador KLH (hemociacina de la lapa californiana *Megathura crenulata* – “keyhole limpet”) (Renjifo *et al.*, 1998) y las partículas similares a virus (VPL) (Jegerlehner *et al.*, 2010), a través de mecanismos diversos en cada caso. Este último punto es de vital importancia, por lo que se debería evaluar la inmunogenicidad de los adyuvantes usados cuando se desea administrar una vacuna a largo plazo.

Emulsiones oleosas

Las emulsiones son sistemas bifásicos compuestos de al menos dos componentes no miscibles, combinados con un surfactante para la estabilización. Estas pueden ser agua en aceite (W/O), en las que parámetros farmacéuticos como el tipo de aceite, el tipo de surfactante, el tamaño de las gotas y la relación agua/aceite son importantes para definir su mecanismo de acción; o emulsiones aceite en agua (O/W), que son fagocitadas por las células dendríticas estimulando la respuesta inmune innata como parte de su actividad adyuvante (Savelkoul *et al.*, 2015).

Dentro de este grupo se encuentra el adyuvante de Freund (AF), que junto con los derivados de aluminio es otro de los adyuvantes más ampliamente usados. Este tiene dos componentes: el adyuvante completo de Freund (CFA), una solución hidro-oleosa (W/O) de *Mycobacterium tuberculosis* muertas por calor, aceite mineral y monooleato de manida como aceite

surfactante y el adyuvante incompleto de Freund (IFA) que carece de las micobacterias. Este adyuvante tiene la capacidad de mediar fuerte respuesta mediada por células y por anticuerpos básicamente gracias por el efecto de depósito, que permite la liberación lenta del antígeno, la interacción con las APC que mejora la presentación y captación antigénica y por ser vehículo para el transporte de antígenos a través del sistema linfático a las células inmunes efectoras.

Este adyuvante sin embargo, no puede ser usado en humanos a causa de la gran cantidad de reacciones adversas con las que se ha vinculado, como granulomas en el sitio de la inyección, necrosis local, formación de granuloma hepático, renal y sub-pleural, dermatitis necrotizante, junto con gran dolor secundario a las lesiones (Stils, 2005); pero se ha utilizado en muchos ensayos de vacunación para EA llevados a cabo en animales.

En un estudio en el que se compara el uso de AF, TiterMax® Gold (emulsión oleosa), QS-21 (saponina) y ALUM al inmunizar ratones BALB/c con A β 1-42, los cuatro adyuvantes indujeron respuesta de anticuerpos, pero con diferencias significativas en la magnitud de la respuesta. Luego de evaluar el efecto de los diferentes adyuvantes en el perfil Th1 y Th2 de la respuesta celular, observaron que AF, TiterMax® Gold y QS-21 inducían respuestas tipo Th1, mientras solo el ALUM inducía respuesta Th2 (Cribbs *et al.*, 2003). Esta respuesta pro-inflamatoria del AF también ha sido la causante de neuroinflamación al

administrarse con péptidos fosforilados de la proteína Tau en ratones silvestres (Rozenstein-Tsalkovich, 2013).

Por su parte, el adyuvante QS-21 usado en el anterior ensayo experimental y en el ensayo clínico AN1792, es una saponina derivada de la *Quijalla saponaria* que induce la producción de anticuerpos e inmunidad mediada por células, pues es un activador potente de las células Th1 y células T CD8⁺, permitiendo la liberación de citocinas pro-inflamatorias (Marty-Roix *et al.*, 2016).

Adyuvantes usados en ensayos clínicos para EA

La mayoría de los ensayos clínicos dirigidos contra el A β se han enfocado más en seleccionar el fragmento del A β a usar que en el adyuvante asociado. Están diseñados solo con epitopes de células B del péptido β -amiloide (Cribbs *et al.*, 2003), razón por la que en su mayoría usan el N-terminal del mismo y evitan la respuesta de células T dirigidas contra la región media o C-terminal del péptido (Lemere, 2009). Tal es el caso de los ensayos CAD106 (Novartis) (Farlow *et al.*, 2015) que usa el péptido A β 1-6 con adyuvante derivado de múltiples copias de la proteína de cubierta del bacteriófago Q β ; AFFITOPE AD01-AD02 (AFFiRiS) (Mandler *et al.*, 2015) a base de péptidos sintéticos que mimetizan el fragmento A β 1-6 conjugados con la proteína KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin, proteína derivada de la hemolinfa de un gasterópodo) y absorbidos al ALUM; ACC-001 (Pfizer) que usa el fragmento A β 1-7 con adyuvante QS21

conjugado con múltiples copias de la variante atóxica de la proteína diftérica CRM-197 (Arai *et al.*, 2015).

Otro ensayo clínico, el UB-311 (United Biochemical, Inc) usa mezclas equimolares de epitopes de células T UBITH® acoplados a A β 1-14, con oligonucleótido CpG (Wang CY *et al.*, 2007), un adyuvante conocido por promover respuesta inmune tipo Th1 con la secreción

de citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-12, desarrollo de respuestas de anticuerpos isotipo IgG2a y fuerte inducción de linfocitos T citotóxicos (Weeratna *et al.*, 2000) y por su capacidad para inducir neuroinflamación (Butchi *et al.*, 2011).

Hasta el momento, estos ensayos han mostrado inducir respuestas humorales específicas para el N-terminal de A β y selectivas para los agregados amiloides, con

Tabla 1. Ensayos clínicos de inmunización activa para EA en desarrollo.

Ensayo clínico	Adyuvante	Transportador	Respuesta de células T	Antígeno	Fase de desarrollo
AN1792 (Elan/Wyett)	QS-21	Ninguno	Th1/Th2	A β 1-42	Terminado (Fase 2)
Vacutide Cridificar/ACC-001 (Pfizer/J&J)	QS-21	CRM 197	Th1/Th2	A β 1-7	Terminado (Fase 2)
V950 (Merck Sharp & Dohme Corp.)	ISCOMATRIX™ + Alum	Desconocido	Th1/Th2	A β multivalente	Terminado (Fase 1)
ACI-24 (AC Immune SA)	Liposomas + MPLA	Ninguno	Th2?	A β 1-15 tetra palmitoilado	En curso (Fase 1)
CAD106 (Novartis)	Ninguno	VLP Cubierta proteica del bacteriófago Q β	Th2?	A β 1-6	Terminado (Fase 2)
UB-311 (UBI) United Neuroscience Ltd.	CpG ON + Alum	UBITH®	Th1/Th2	A β 1-14	En curso (Fase 2)
AFFITOPE AD01 (Affiris AG)	Alum	KLH	Th2	Mimótopos A β 1-6	Terminado (Fase 1b)
AFFITOPE AD02 (Affiris AG)	Alum	KLH	Th2	Mimótopos A β 1-6	Terminado (Fase 2)
AFFITOPE AD03 (Affiris AG)	Alum	KLH	Th2	Mimótopos A β 1-6, versiones de A β piroglutamado	Terminado (Fase 1)
ABvac40 (Grifols SA)	Alum	KLH	Th2	Péptido C-terminal de A β 40	Terminado (Fase 1)
AADvac1 (Axon Neuroscience SE)	Alum	KLH	Th2	Tau C ₂₉₄₋₃₀₅	En curso (Fase 2)
Lu AF20513 (H. Lundbeck A/S)	Alum	Epítopes de células T del toxoide tetánico (P2 y P30)	Th2	A β 1-12	En curso (Fase 1)

KLH: keyhole limpet hemocyanin; VLP: partículas similares a virus; CRM 197: toxina diftérica no tóxica; UBITH®: epítopes sintéticos de células T MVT, PT, TT.; PEG: polietilenglicol; MPLA: monofosforil lípido A.

inhibición de la activación de células T indeseadas; no hay reportes de meningoencefalitis, enfermedad autoinmune o inflamación del sistema nervioso central. Sin embargo, en todos los ensayos clínicos hay eventos adversos de intensidad moderada reportados (Winblad *et al.*, 2014) y a pesar de la reducción de la placa amiloide, los beneficios clínicos en cuanto a la función cognitiva tras la inmunización, son mínimos (Wisniewski & Goñi, 2015). Estos datos sugieren entonces, que no son suficientes las modificaciones en la longitud del péptido A β para obtener los resultados inmunológicos y clínicos deseados, como ya se había mencionado previamente.

Actualmente, existen dos ensayos activos y varios en proceso de análisis. En la Tabla 1 se muestran los adyuvantes utilizados en los ensayos clínicos, desafortunadamente no todos los grupos reportan los acarreadores utilizados y tampoco han publicado la caracterización de la respuesta inmune celular inducida por las vacunas en humanos.

CONCLUSIONES

A la luz de las evidencias, no es claro el por qué adyuvantes que inducen respuestas pro-inflamatorias o asociados a reacciones adversas continúan usándose como adyuvantes para EA, además de que surgen dudas acerca de lo factible que será la aprobación de estas vacunas para su uso en humanos en los que además, los resultados van a depender de la competencia inmunológica de cada individuo.

Como previamente se dijo, la actividad inmunomoduladora Th1/Th2 de los adyuvantes no es solamente local, sino también sistémica; si se induce inflamación periférica, las citocinas y quimiocinas secretadas podrían llegar a sistema nervioso central, ocasionar neuroinflamación y exacerbar la patología amiloide. Esto crea la inminente necesidad de continuar en la búsqueda y desarrollo de adyuvantes de vacunas no solo para la enfermedad de Alzheimer sino en general, que sean no tóxicos, no inmunogénicos en sí mismos, con baja reactogenicidad, que induzcan robustas respuestas de anticuerpos protectores y capaces de compensar la inmunosenescencia si la vacuna desea aplicarse en población adulta mayor.

REFERENCIAS

- Alzheimer's Disease International (2014) *World Alzheimer Report 2014. Dementia and Risk Reduction an analysis of protective and modifiable factors*. London.
- Arai H, Suzuki H, & Yoshiyama T (2015) Vanutide cridificar and the QS-21 adjuvant in Japanese subjects with mild to moderate Alzheimer's disease: results from two phase 2 studies. *Curr Alzheimer Res.* 12(3):242-254.
- Arifuzzaman M, Rashu R, Leung DT, Hosen MI, Rahman MA, Khanam F, Saha A, Charles RC, LaRocque RC, Weil AA, Cements JD, Holmes RK, Caldewood SB, Harris JB, Ryan ET & Qadri F

- (2012) Antigen-specific memory T cell responses after vaccination with an oral killed cholera vaccine in Bangladeshi children and comparison to responses in patients with naturally acquired cholera. *Clin Vaccine Immunol.*, 19(8):1304-1311.
- Artz AS, Ershler WB, & Longo DL (2003) Pneumococcal Vaccination and Revaccination of Older Adults. *Clin Microbiol Rev.* 16(2): 308-318.
- Asuni AA, Boutajangout A, Scholtzova H, Knudsen E, Li YS, Quartermain D, Frangione B, Wisniewski T & Sigurdsson EM(2006). Vaccination of Alzheimer's model mice with A β derivative in alum adjuvant reduces A β burden without microhemorrhage. *The European journal of neuroscience.* 24(9):2530-2542.
- Batista-Duharte A, Lindblad EB, & Oviedo-Orta E (2011) Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. *Toxicology Letters.* 203: 97-105.
- Bayer AJ, Bullock R, Jones RW, Wilkinson D, Paterson KR, Jenkins L & Donoghue S (2005) Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic A β 42 (AN1792) in patients with AD. *Neurology.* 64(1):94-101.
- Blennow K, de León MJ & Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet.* 368(9533):387-403.
- Brito LA, Malyala P & O'Hagan DT (2013) Vaccine adjuvant formulations: A pharmaceutical perspective. *Seminars in Immunology.* 25:130-145.
- Butchi NB, Woods T, Du M, Morgan TW & Peterson KE (2011) TLR7 and TLR9 Trigger Distinct Neuroinflammatory Responses in the CNS. *Am J Pathol.* 179(2): 783–794.
- Cai Y, Kurita-Ochiai T, Kobayashi R, Hashizume T & Yamamoto M (2013) Nasal immunization with the 40-kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* plus cholera toxin induces protective immunity in aged mice. *J Oral Sci.* 55(2):107-114.
- Cribbs DH, Ghochikyan A, Vasilevko V, Tran M, Petrushina I, Sadzikava N, & Agadjanyan MG (2003) Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int Immunol.* 15(4):505-514.
- Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F & Garçon N (2015) Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines (Basel).* 3(2):320-343.
- Dirección General de Epidemiología (2011) El Alzheimer en México. *Epidemiología en Breve - Gobierno Federal.* 1 (7): 1-4.
- Dubois B (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* 6 (8): 734-746.
- Farlow MR, Andreasen N, Riviere ME, Vostiar I, Vitaliti A, Sovago J & Graf A

- (2015) Long-term treatment with active A β immunotherapy with CAD106 in mild Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 7(1):23.
- Ferreira ST & Klein WL (2011) The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Me.*, 96(4):529-543.
- Frenkel D, Maron R, Burt DS & Weiner HL (2005) Nasal vaccination with a proteosome-based adjuvant and glatiramer acetate clears beta-amyloid in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 115(9):2423-2433.
- Fujihashi K, Koga T, van Ginkel FW, Hagiwara Y & McGhee JR (2002) A dilemma for mucosal vaccination: efficacy versus toxicity using enterotoxin-based adjuvants. *Vaccine*, 20(19-20):2431-2438.
- Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC & Orgogozo JM (2005) Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology.* 64(9):1553-1562.
- Haass C & Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(2):101-112.
- Hardy JA & Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256(5054):184-185.
- Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigod EH, Cairns NJ, & Carrillog M (2012) National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association.* 8(1): 1–13.
- Instituto Nacional de Geriátria (2014) Plan de acción Alzheimer y otras demencias. México.
- Israeli E, Agmon-Levin N, Blank M & Shoenfeld Y (2011) Macrophagic myofasciitis a vaccine (alum) autoimmune-related disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 41(2):163-168.
- Jegerlehner A, Wiesel M, Dietmeier K, Zabel F, Gatto D, Saudan P & Bachmann MF (2010) Carrier induced epitopic suppression of antibody responses induced by virus-like particles is a dynamic phenomenon caused by carrier-specific antibodies. *Vaccine.* 28(33):5503-5512.
- Karran E, Mercken M & De Strooper B (2014) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 10 (9): 698-712.
- Kawahara M & Kato-Negishi M (2011) Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *Int J Alzheimers Dis.* 276393. doi: 10.4061/2011/276393.
- Lang PO, Govind S, Mitchell WA, Kenny N, Lapenna A, Pitts D & Aspinall R

- (2010) Influenza vaccine effectiveness in aged individuals: The role played by cell-mediated immunity. *Eur Geriatr Med.* 1(4): 233-238.
- Lemere CA (2009) Developing novel immunogens for a safe and effective Alzheimer's disease vaccine. *Prog Brain Res.* 175:83-93.
- Leverone JF, Spooner ET, Lehman HK, Clements JD & Lemere CA (2003) Abeta1-15 is less immunogenic than Abeta1-40/42 for intranasal immunization of wild-type mice but may be effective for "boosting". *Vaccine.* 21(17-18):2197-2206.
- Liu K, Solano I, Mann D, Lemere C, Mercken M, Trojanowski JQ & Lee VMY (2006) Characterization of AB11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated AB species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 112: 163-174.
- Lukiw WJ (2012) Amyloid beta (A β) peptide modulators and other current treatment strategies for Alzheimer's disease (AD). *Expert Opin Emerg Drugs.* 10.1517/14728214.2012.672559.
- Maier M, Seabrook TJ & Lemere CA (2005) Modulation of the humoral and cellular immune response in AB immunotherapy by the adjuvants monophosphoryl lipid A (MPL), cholera toxin B subunit (CTB) and E. coli enterotoxin LT(R192G). *Vaccine.* 23(44); 5149-5159.
- Maier M, Seabrook TJ, Lazo ND, Jiang L, Das P, Janus C & Lemere CA (2006) Short amyloid-beta (Abeta) immunogens reduce cerebral Abeta load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an Abeta-specific cellular immune response. *J Neurosci.* 26(18):4717-4728.
- Mandler M, Santic R, Gruber P, Cinar Y, Pichler D, Funke SA & Mattner F (2015) Tailoring the antibody response to aggregated A β using novel Alzheimer-vaccines. *PLoS One.* 10(1):e0115237.
- Marciani DJ (2015) Alzheimer's disease vaccine development: A new strategy focusing on immune modulation. *J Neuroimmunol.* 287:54-63.
- Marciani DJ (2016) A retrospective analysis of Alzheimer's disease vaccine progress-The critical need for new developments strategies. *J Neurochem.* 137:687-700.
- Marty-Roix R, Vladimer GI, Pouliot K, Weng D, Buglione-Corbett R, West K, MacMicking JD, Chee JD, Wang S, Lu S & Lien E (2016) Identification of QS-21 as an Inflammasome-activating Molecular Component of Saponin Adjuvants. *J Biol Chem.* 291(3):1123-1136.
- Masters CL & Selkoe DJ (2012) Biochemistry of Amyloid β -Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease. *Cold*

- Spring Harb Perspect Med.* 2(6): a006262.
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ & Beach TG (2012) Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *J Neuropathol Exp Neurol.* 71(5):362-381.
- O'Brien JT, Holmes C, Jones M, Jones R, Livingston G, McKeith I, Mittler P, Passmore P, Ritchie C, Robinson L, Sampson EL, Taylor JP, Thomas A & Burns A (2017) Clinical practice with anti-dementia drugs: A revised (third) consensus statement from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol.* 31(2):147-168.
- O'Hagan DT & Valiente NM (2003) Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov.* 2(9):727-735.
- Organización Mundial de la Salud (2015). Nota descriptiva N° 362. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>.
- Perez O, Batista-Duharte A, González E, Zayas C, Balboa J, Cuello M & Schijns VE (2012) Human prophylactic vaccine adjuvants and their determinant role in new vaccine formulations. *Braz J Med Biol Res.* 45(8):681-692.
- Pride M, Seubert P, Grundman M, Hagen M, Eldridge J & Black RS (2008) Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into AN1792-associated meningoencephalitis. *Neurodegener Dis.* 5(3-4):194-196.
- Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M & Karagiannidou M (2016) World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia coverage, Quality and costs now and in the future. *Alzheimer's Disease International*, London.
- Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT & Prina M (2015) The global impact of dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Disease International*, London.
- Renjifo X, Wolf S, Pastoret PP, Bazin H, Urbain J, Leo O & Moser M (1998) Carrier-Induced, Hapten-Specific Suppression: A Problem of. *J Immunol.* 161: 702-706.
- Robinson SR, Bishop GM, Lee HG & Münch G (2004) Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget. *Neurobiol Aging.* 25(5):609-615.
- Rozenstein-Tsalkovich L, Grigoriadis N, Lourbopoulos A, Nousiopoulou E, Kassis I, Abramsky O, Karussis D & Rosenmann H (2013) Repeated immunization of mice with phosphorylated-tau peptides causes neuroinflammation. *Exp Neurol.* 248:451-456.
- Sankowski R, Mader S, Valdés-Ferrer SI (2015) Systemic Inflammation and the Brain: Novel Roles of Genetic, Molecular, and Environmental Cues

- as Drivers of Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci.* 9: 28 doi: 10.3389/fncel.2015.00028.
- Saraceno C, Musardo S, Marcello E, Pelucchi S & Di Luca M (2013) Modeling Alzheimer's disease: from past to future. *Front Pharmacol.* 19;4:77. doi: 10.3389/fphar.2013.00077.
- Savelkoul HFJ, Ferro VA, Strioga MM & Schijns VEJC (2015) Choice and Design of Adjuvants for Parenteral and Mucosal Vaccines. *Vaccines.* 3:148-171.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T & Seubert P (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature.* 400(6740):173-177.
- Schijns VE (2000) Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol*, 12(4):456-463.
- Selkoe DJ & Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med.* 8(6):595-608.
- Shaw CA & Tomljenovic L (2013) Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. *Immunol Res.* 56(2-3):304-316.
- Sivakumar SM, Safhi MM, Kannadasan M & Sukumaran N (2011) Vaccine adjuvants - Current status and prospects on controlled release adjuvancity. *Saudi Pharm J.* 19(4):197-206.
- Solomon B, Koppel R, Frankel D & Hanan-Aharon E (1997) Disaggregation of Alzheimer β -amyloid by site-directed mAb. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(8): 4109-4112.
- Stils HF (2005) Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. *ILAR Journal.* 46(3):280-293.
- Tabaton M, Zhu X, Perry G, Smith MA & Gilberto L (2010) Signaling Effect of Amyloid- β 42 on the Processing of A β PP. *Exp Neurol.* 221(1): 18-25.
- Thal DR, Walter J, Saido TC & Fändrich M (2015) Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 129(2):167-182.
- Wang CY, Finstad CL, Walfield AM, Sia C, Sokoll KK, Chang TY & Windisch M (2007) Site-specific UBITH amyloid-beta vaccine for immunotherapy of Alzheimer's disease. *Vaccine.* 25(16):3041-3052.
- Wang S, Liu H, Zhang X & Quian F (2015) Intranasal and oral vaccination with protein-based antigens: advantages, challenges and formulation strategies. *Protein Cell.* 6(7):480-503.
- Weeratna RD, McCluskie MJ, Xu Y & Davis HL (2000) CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine.* 18(17):1755-1762.
- Weinberg A, Zhang JH, Oxman MN, Johnson GR, Hayward AR, Caulfield MJ, Irwin MR, Clair J, Smith JG, Stanley H,

- Marchese RD, Harbecke R, Williams HM, Chan IS, Arbeit RD, Gershon AA, Schödel F, Morrison VA, Kauffman CA, Straus SE, Schmader KE, Davis LE & Levin MJ (2009) Varicella-Zoster Virus-Specific Immune Responses to Herpes Zoster in Elderly Participants in a Trial of a Clinically Effective Zoster Vaccine. *J Infect Dis.* 200(7):1068-1077.
- Weiner HL & Frenkel D (2006) Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol.* 6(5):404-416.
- Windbland B, Graf A, Riviere ME, Andreasen N, & Ryan JM (2014) Active immunotherapy options for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 6(1):7.
- Wisniewski T & Konietzko U (2008) Amyloid- β immunisation for Alzheimer's disease. *Lancet neurol.* 7(9):805-811.
- Wisniewski T & Goñi F (2015) Immunotherapeutic approaches for Alzheimer's disease. *Neuron.* 85(6):1162-1176.
- World Health Organization (2012) Dementia a public health priority. *Alzheimer's Disease International*, London.
- Zhang YW, Thompson R, Zhang H & Xu H (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 4:3. 10.1186/1756-6606-4-3.
- Zhang H, Ma Q, Zhang YW & Xu H (2012) Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J Neurochem.* 120 Suppl 1:9-21..

UN ACERCAMIENTO A LA FISIOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE HONGOS MICORRICICOS ARBUSCULARES

Andres Uribe-Lopez, Norma Adriana Valdez-Cruz y Mauricio A. Trujillo-Roldán *

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, Ciudad de México, México, CP. 04510. Tel.: +52 55 56229192. maurotru@gmail.com, maurotru@biomedicas.unam.mx

RESUMEN

La microbiota del suelo está constituida por una amplia diversidad de microorganismos que influyen en el crecimiento de las plantas. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en ingles), las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos formadores de micorriza, son algunos de los microorganismos que desempeñan roles importantes en la rizosfera de la planta. La rizosfera se considera un ambiente dinámico en el cual se presenta una acumulación de microorganismos, los cuales son influenciados por exudados radicales como aminoácidos, enzimas, esteroides, azúcares, vitaminas y taninos, entre otros. Estos exudados influyen en el crecimiento y la actividad de la rizosfera, traduciéndose en interacciones que modifican el desarrollo de la planta.

En la rizosfera algunos hongos establecen asociaciones simbióticas mutualistas con las raíces de las plantas. El micelio del hongo, sirve a la planta como puente entre la raíz y los nutrientes del suelo que son poco accesibles, debido a que el micelio puede explorar un mayor volumen de suelo. Asimismo, la planta recibe beneficios como tolerancia al estrés hídrico, tolerancia a la toxicidad por metales pesados y exclusión de patógenos. Los Hongos Micorrizicos Arbusculares (HMA) son los que presentan mayor abundancia y se propone que alrededor del 90% de las plantas terrestres presenten este tipo de asociación simbiótica. En esta revisión, describiremos la fisiología de su ciclo de vida y los procesos productivos de HMA como alternativa en la agricultura como biofertilizante.

Palabras clave: Hongos, micorriza, biofertilizantes, simbiosis.

ABSTRACT

Soil microbiota is constituted by a wide diversity of microorganisms that influence the growth of plants. Plant growth promoting bacteria (PGPRs), nitrogen fixing bacteria and mycorrhizal fungi, are some of the microorganisms that play important roles in plant's rhizosphere. The rhizosphere is considered a dynamic environment in which an accumulation of microorganisms occurs, which are influenced by radical exudates such as amino acids, enzymes, sterols, sugars, vitamins and tannins, among others. These exudates influence the growth and activity of the rhizosphere, translating into interactions that modify the development of the plant.

In the rhizosphere some fungi establish symbiotic mutualistic associations with the roots of plants. The mycelium of the fungus serves as a bridge between the root and the soil nutrients that are inaccessible, whereby the mycelium can explore a larger volume of soil. Also, the plant obtains benefits such as tolerance to hydric stress, tolerance to heavy metal toxicity and exclusion of pathogens. Arbuscular Mycorrhizal Fungi are those that present the mayor abundance and it is proposed that about 90% of terrestrial plants present this type of symbiotic association. In this review, we describe the physiology of their life cycle and the productive processes of Arbuscular Mycorrhizal Fungi as an alternative in agriculture as a biofertilizer.

KEYWORDS: Fungi, mycorrhiza, biofertilizers, symbiosis.

1. ASPECTOS EN LA ASOCIACIÓN MICORRÍZICA

La asociación simbiótica de hongos y plantas se denomina "micorriza". Este termino literalmente significa "raíz hongo" que se deriva de dos palabras "mycos" y "rhiza" propuesto por primera vez por Frank (1885). Existen siete tipos de hongos formadores de micorriza que han sido descritos hasta ahora: arbuscular, ectomicorriza, ectendomicorriza, arbutoidoide, monotropoide, ericoide y las micorrizas de las orquídeas. De estos tipos, los arbusculares y las ectomicorrizas son las más abundantes y diseminadas en los suelos.

La micorriza arbuscular representa una de la simbiosis más antiguas, reportando su presencia, hifas y arbusculos en fósiles de *Aglaophyton* provenientes del periodo Devónico (Pirozynski & Dalpe, 1989; Remy *et al.* 1994). Igualmente, se sugiere que los Glomeromycetes surgieron entre 350-460 millones de años atrás, siendo clave ésta simbiosis para la colonización terrestre de las plantas (Simon *et al.* 1993).

De esta relación simbiótica, el principal beneficio que recibe la planta es el aumento en la captación de nutrientes inmóviles del suelo, especialmente el fósforo (Jakobsen 1999). Los HMA aumentan la acumulación de nitrógeno en los tejidos de

las plantas como resultado de la mineralización del nitrógeno orgánico del suelo (Ibijbijen *et al.* 1996). También, los HMA al interactuar con otros organismos del suelo mejoran el reuso de nutrientes y la obtención de estos por la planta (Xavier & Germida 2002). Los HMA en simbiosis incrementan el crecimiento y desarrollo de la planta, dan tolerancia al estrés hídrico y mejoran la fitosanidad al tener efecto antagónico y competitivo contra fitopatógenos del suelo. El rol ecológico de los HMA como un componente integral en los ecosistemas propone su uso en sistemas de agricultura sostenible (Schreiner & Bethlenfalvay 1995). En este sentido, los HMA interactúan con un gran número de especies de plantas de importancia agrícola tales como trigo, maíz, arroz, cultivos forrajeros, árboles frutales y algodón, entre otros (Smith & Read, 1997).

Debido a la naturaleza biotrofa de los HMA, la culminación de su ciclo de vida depende de la habilidad para colonizar una planta hospedera. Actualmente, su cultivo sin planta huésped no se ha logrado, lo que ha dificultado su producción en masa e implementación en sistemas de cultivo a gran escala (Jarstfer & Sylvia 1992). No obstante, se le ha podido cultivar de forma axénica con explantes de raíz (Diop *et al.* 1994) y con raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* (Pawlowska *et al.* 1999). El proceso de colonización fúngica que lleva a cabo el HMA en las raíces de la planta, se caracteriza por tener distintos estados que contienen una serie de cambios morfogénicos complejos en el hongo:

germinación de esporas, diferenciación hifal, formación del apresorio, penetración de la raíz, crecimiento intercelular, formación del arbusculo y el transporte de nutrientes (Figura 1).

1.1 GERMINACIÓN DE ESPORAS

Se ha sugerido que factores como el pH, la temperatura, los nutrientes orgánicos e inorgánicos, algunos microorganismos y exudados radicales, desempeñan un papel importante en la germinación de las esporas de HMA (Maia & Kimbrough 1998). La germinación de la esporas puede variar, dependiendo del género. Para el caso de *Glomus sp.*, su germinación se da por recrecimiento al final de las hifas más viejas (Mosse 1959; Walker *et al.* 1995). En contraste, para los géneros *Scutellospora*, *Gigaspora* y *Acaulospora*, el tubo germinativo emerge directamente desde la pared de la espора (Raman & Sambandan, 2000; Juniper & Abbott 2006). Las estructuras germinativas se han descrito como compartimentos periféricos densos, que contienen citoplasma y muchos núcleos, que surgen a partir de tubos germinales a través de las capas externas de la pared de la espора (Mosse 1970a, Mosse 1970b). También, las esporas pueden tener otra estrategia para incrementar la probabilidad de colonización del hospedero, conocida como “germinación múltiple”, la cual se define como la habilidad de la espора para germinar varias veces y producir tubos germinativos sucesivos, cuando los tubos germinativos iniciales han sido rotos (Koske 1981).

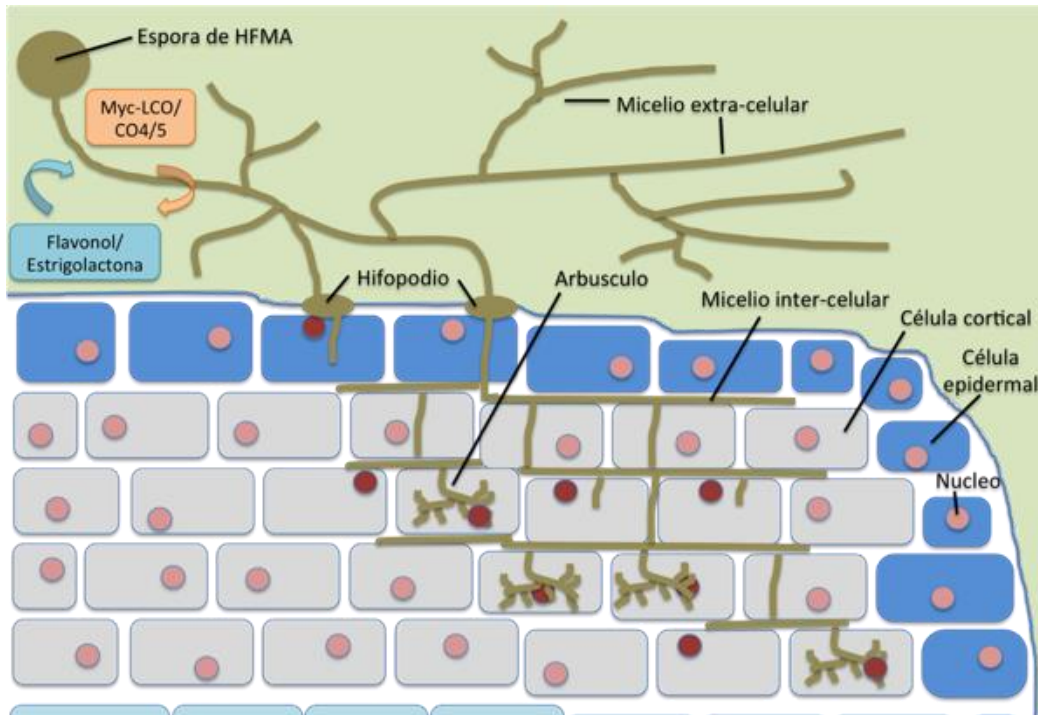


FIGURA 1. Resumen esquemático de la germinación de esporas elongación y colonización de los de Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) en raíces.

Las esporas de HMA pueden llegar a tener un tamaño de hasta 500 μm de diámetro (*Gigaspora sp.*), lo que las convierte en una de las esporas de hongo más grandes reportadas. En su interior se almacena una abundante cantidad de lípidos, algunos carbohidratos y una pared que contiene quitina y en algunos casos β 1,3-glucano (Lemoine *et al.*, 1995).

1.2 CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DEL MICELIO PRESIMBIÓTICO

Cuando las esporas germinan, se presenta el crecimiento de hifas usando únicamente los nutrientes contenidos en la espora (Bianciotto *et al.*, 1995; Bago *et al.*, 1999; Parniske 2008). La germinación de las esporas de HMA se caracteriza por el incremento de la actividad citoplasmática, involucrando esencialmente cambios

bioquímicos que activan el metabolismo inactivo. Se ha demostrado que la síntesis de proteínas es esencial para la germinación de la espora y el crecimiento de la hifa, ya que al estudiar el efecto del inhibidor "cicloheximida" en la síntesis de proteínas (Hepper 1979), se confirmó esta actividad metabólica en *G. intraradices* y *G. mosseae* (Gachomo *et al.* 2009). También se ha observado que durante la germinación y crecimiento del tubo germinativo de esporas de *G. caledonium*, se genera una red de lípidos, incrementándose la producción de ácidos grasos libres y lípidos polares, y disminuyendo los lípidos neutros (Beilby & Kidby 1980). Durante la germinación se ha medido el aumento en la actividad de las vías metabólicas centrales, tales como la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la vía de las pentosas fosfato y la gluconeogénesis (Hepper *et al.* 1986;

Saito 1995). Asimismo, se ha reportado un rápido incremento en la concentración de ATP, evidenciando la presencia de actividad en la cadena respiratoria en *G. caledonium* (Beilby & Kidby 1982). Sin embargo, la producción del micelio previo a la simbiosis es limitado, debido al contenido nutricional de la espora y al hecho de que el micelio pueda encontrar las raíces de la planta hospedera (Bianciotto *et al.*, 1995; Bago *et al.*, 1999). De hecho, en ausencia de la planta hospedero, el crecimiento de la hifa cesa, debido a la falta de moléculas señal producidas por la raíz, las cuales estimulan el crecimiento y la ramificación hifal (Besserer *et al.*, 2006). Inclusive el micelio se retrae y la espora espera otra mejor oportunidad.

1.3 MOLÉCULAS SEÑAL DE LOS HMA Y LOS RECEPTORES DE LA PLANTA

Previo al contacto con la raíz de su hospedero se producen moléculas que son reconocidas por las hifas como el ácido graso 2-hidroxitetradecanoico (2OH-C14:0) que induce la elongación de ramificaciones hifales laterales (Stumpe *et al.*, 2005). Además, la percepción de estrigolactonas radicales por parte del HMA, desencadena la ramificación hifal. A raíz de esto, los HMA liberan moléculas señal características, como los Myc-lipo-quitina-oligosacáridos (Myc-LCOs, Myc-LipoChitoOligosaccharides) y oligómeros de quitina (CO4/5, Chitin Oligomer), las cuales inducen en la planta respuestas encaminadas a la preparación para la simbiosis, a todas estas moléculas se les ha llamado factores Myc (Requena *et al.* 2007; Mailliet *et al.* 2011). Por su parte, la raíz

produce cutina que induce la diferenciación de la hifa a hifopodio posicionado sobre la membrana de las células epidermarles de la raíz (Figura 1). Cuando el hifopodio inicia la penetración de la epidermis, este atraviesa el cortex intercelularmente y continua produciendo moléculas señalizadoras hasta penetrar las células corticales y formar los arbusculos (Figura 1) (Parniske 2008; Schmitz & Harrison, 2014).

Los factores Myc inducen la activación transcripcional de genes relacionados con la simbiosis (Kosuta, *et al.* 2003), como también provocan cambios transitorios en Ca^{2+} citosólico antes del contacto. Este tipo de respuesta por parte de la planta se ha comparado con el flujo de Ca^{2+} que ocurre en la respuesta a hongos fitopatógenos debido a la Inmunidad Desencadenante de MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns) o MIT (MAMPs Triggered Immunity), en respuesta a la quitina presente en la pared celular de diferentes hongos (Navazio *et al.* 2007). Incluso en el proceso de simbiosis de los HMA en la célula cortical, las plantas deben prepararse para hacer frente a las interacciones dañinas que otro microorganismo pueda desencadenar; esto lo efectúa mediante el reconocimiento de las MAMPs. No obstante, la planta y los HMA han desarrollado estrategias conjuntas para favorecer la simbiosis, sin poner en peligro la respuesta innata contra los fitopatógenos (Jones & Dangl 2006).

Por otra parte, existen compuestos producidos por la raíz responsables de la germinación de las esporas de los HMA, el

desarrollo miceliar, modulando la fisiología fúngica y la actividad mitocondrial y determinando la ramificación hifal. Estas son análogas a las presentes en las interacciones Planta-*Rhizobium* y Planta-*Agrobacterium*, como compuestos fenólicos (Nagahashi *et al.* 1996; Douds *et al.* 1996), y estrigolactonas (Akiyama, *et al.* 2005; Parniske, 2005).

1.4. COLONIZACIÓN DE LA CÉLULA CORTICAL: LA FORMACIÓN DEL APARATO PRE-PENETRACIÓN (PPA) Y FLUJO DE NUTRIENTES

Las células corticales son muy activas cuando las hifas del hongo micorrízico ha ingresado al espacio intercelular, ya que preparan el ambiente para el paso del micelio (figura 2) (Genre *et al.* 2005). Como consecuencia de la estimulación bioquímica y mecánica de la hifa, las células corticales dan origen a la formación de un aparato pre-penetración (PrePenetration Apparatus, PPA). Este PPA

es una estructura subcelular que predetermina el paso subsecuente de la hifa a través de la planta y se forma luego de pocas horas después de la formación del apresorio o hifopodio (Figura 2). La formación del PPA es precedida por la migración del núcleo de la célula epidérmica vegetal hacia el punto de ingreso de la hifa. Luego de esto, el núcleo lidera el desarrollo del PPA a través del citoplasma de la célula cortical generando una invaginación. Alrededor de la invaginación, se reacomodan los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto, que junto con el retículo endoplasmático, forman un “tubo” el cual conecta el sitio terminal de dirección del núcleo, con el sitio de contacto del hifopodio (Genre *et al.* 2008; Siciliano *et al.* 2007). Una vez que el “túnel transcelular” está completo, la hifa del hongo penetra la célula hospedera. Sin embargo, aún se desconocen las moléculas señalizadoras que desencadenan la formación del PPA.

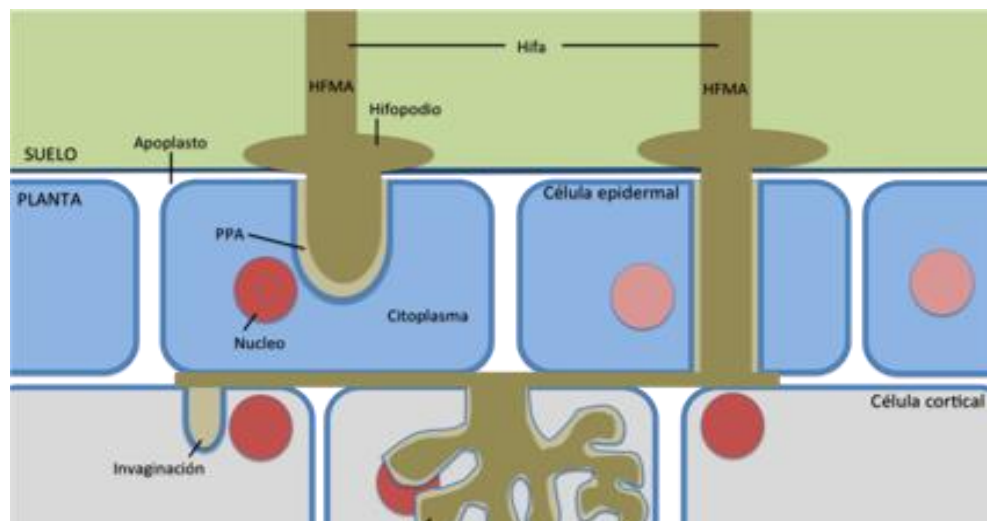


FIGURA 2. Resumen esquemático del proceso de colonización de las células corticales por parte de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA).

Cuando las hifas alcanzan las células del córtex (células corticales) se diferencian en estructuras ramificadas llamadas arbuscúlos, los cuales son el principal sitio de translocación de nutrientes entre los HMA y la raíz de la planta (Harrison 2012). La membrana de las células corticales que circunda el arbuscúlo se denomina membrana periarbuscular (Periarbuscular Membrane, PAM) y contiene transportadores de fosforó inorgánico (Pi), que recupera el Pi que liberan los HMA a la célula (Kobae & Hata 2010). Después de pocos días, el arbuscúlo comienza a degenerarse y la célula vegetal retorna a su estado normal. Esto da la oportunidad a la célula de ser, eventualmente, viable para una nueva colonización (Pumplin & Harrison 2009). Debido a que la hifa continúa su crecimiento a través del córtex radical, la generación de arbuscúlos en la células corticales no cesa, llegando a crear una matriz de células colonizadas con arbuscúlos en una variedad de estados de desarrollo. Por otro lado, en el exterior de la raíz, los HMA generan una red de micelio extraradical para captar los nutrientes desde la rizosfera y sirve de puente para trasladar dichos nutrientes a la planta hospedera (Javot *et al.* 2007).

La forma en que la planta le provee el carbono a los HMA es en forma de hexosas y principalmente como glucosa (Solaiman & Saito, 1997) a través de un transportador de hexosas localizado en el arbuscúlo y en las hifas. La base de la nutrición de los HMA en la asociación micorrízica se encuentran en el flujo del carbono y como lo debe obtener de la planta

al ser incapaz de obtenerlo del medio. El estudio realizado por Schaarschmidt *et al.* (2006), sugiere que la planta envía sacarosa al apoplasto donde es convertida a hexosas por una invertasa secretada por la planta (Figura 2). Esta hipótesis se confirmó por Tisserant *et al.* (2012) al reportar que *G. intraradices* no secreta este tipo de invertasa. Este fenómeno también se ha reportado en hongos ectomicorrízicos (Plett & Martin, 2011). Luego los transportadores de monosacáridos (MTS) importan las hexosas a lo largo del hongo para luego ser convertida a trehalosa, glucógeno y lípidos (Bago *et al.* 2000)

2. PRODUCCIÓN DE MICORRIZA

Debido a que las condiciones biotróficas obligadas de los HMA, la producción a gran escala de HMA para su uso como biofertilizante implica diferentes retos. Esto porque se busca que las metodologías que generen HMA sean eficientes en costo y que originen inóculos para biofertilizantes HMA de alta calidad, homogéneo entre lotes sin contaminantes (Budi, *et al.* 1999; Ceballos *et al.* 2013). Estas metodologías se pueden agrupar dependiendo del sustrato que se use; 1) metodología tradicional, en la que se utiliza suelo o mezclas de suelo, 2) los sistemas de cultivo libres de suelo y 3) los sistemas de cultivo *in vitro* (Figura 3).

3.1 METODOLOGÍA TRADICIONAL: IMPLEMENTACIÓN DE SUELO Y MEZCLAS DE SUELO COMO SUSTRATO

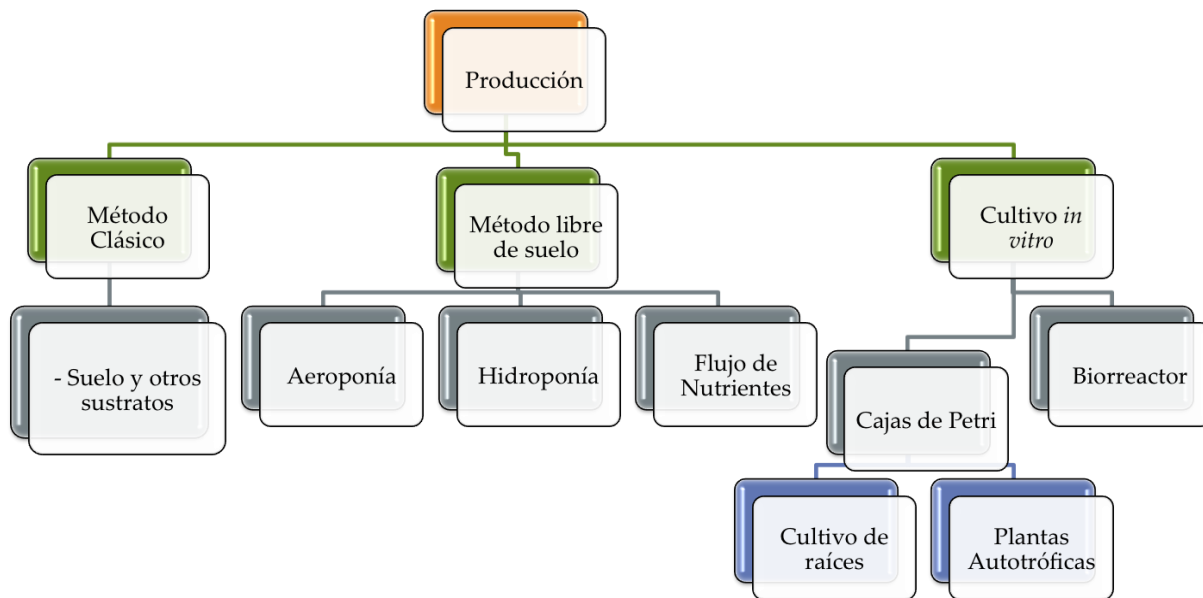


FIGURA 3. Diferentes estrategias usadas en la producción de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) para ser usados como biofertilizantes.

Esta metodología es implementada para la producción de biofertilizantes como la estándar, donde se logra un producto comercial en grandes volúmenes. No obstante esta metodología es dependiente del tipo de HMA, planta trampa y del sustrato (Ijdo *et al.* 2011). En cuanto al inóculo de HMA, se emplean esporas aisladas de un suelo/planta previamente micorrizado o mezclas de esporas y raíces micorrizadas. El suelo es el principal sustrato que se emplea, sin embargo, también se han implementado mezclas de suelo-arena, suelo-composta, suelo-arcilla, y arena-vermiculita, entre otros (Ceballos *et al.* 2013; Ijdo *et al.* 2011).

Por otro lado, la planta trampa u hospedera de los HMA también determina la calidad del biofertilizante. Plantas como la *Brachiaria decumbens* (pasto común), *Allium ampeloprasum* (puerro), *Sorghum* spp. (sorgo) y *Zea mays* (maíz), son a menudo

empleados para la producción (Coelho *et al.* 2015; Schlemper & Stürmer 2014). La escala de producción puede variar desde invernaderos bajo condiciones controladas hasta parcelas de campo. Un ejemplo de esto es el trabajo realizado por Walker & Vestberg (1994), quienes llevaron cultivos de HMA bajo condiciones controladas, donde las plantas trampa eran puestas dentro de bolsas plásticas con microfiltros para permitir el intercambio gaseoso y evitar contaminaciones ambientales. Este método da la ventaja de requerir menos riego y mantenimiento, que los cultivos al aire libre.

3.2 METODOLOGÍAS LIBRE DE SUELO

Las metodologías de cultivo hidropónico de HMA se originaron del cultivo de plantas en una solución nutritiva sin un medio sólido como soporte. No obstante, en ocasiones se ha incluido como metodologías

hidropónicas a los de sistemas agregados, que implementan el anclaje de plantas a medio con suelo y a la vez se pone una solución nutritiva en contacto con la planta. Metodologías de este tipo, permiten obtener un biofertilizante libre de suelo, facilitando separar las esporas de las raíces. El inóculo producido libre de suelo puede ser limpio, con respecto al que se produce en la metodología tradicional y el riesgo de contaminación cruzada con otras esporas de HMA es bajo. No obstante, la contaminación microbiana y desarrollo de algas es frecuente, a causa de la solución de nutrientes, siendo un punto crítico de control en el proceso (Ijdo *et al.* 2011). También, la falta de sustrato que permita su transporte afecta la velocidad de producción. Otra desventaja que tiene esta metodología es cuando la planta tiene un rápido crecimiento de la raíz, que puede derivar en una baja colonización.

Hawkins y George (1997) evaluaron la viabilidad y el porcentaje de colonización de *Linum usitatissimum* (Lino), *Sorghum bicolor* (sorgo o zahína) y *Triticum aestivum* (trigo harinero) por el HMA *Glomus mosseae* en cultivo hidropónico. El periodo de evaluación duró 4 semanas, al cabo de las cuales determinaron una alta relación de colonización micorrizal en lino, sorgo y trigo. Jarstfer y colaboradores (1988) implementaron el cultivo aeropónico para evaluar la colonización y esporulación de *Glomus* sp. (INVAM FL329) en cebolla y papa dulce. Mohammad *et al.* (2000) reportaron la comparación entre dos sistemas, atomizador aeropónico de disco y

nebulizador aeropónico, para el crecimiento de pasto Sudán (*Sorghum sudanese* Staph.) asociado a *G. intraradices*, obteniendo una producción final de esporas de 175.000 propagulos/g de inóculo seco. Una metodología alternativa para el cultivo de micorrizas es la propuesta por Elmes y Mosse (1984) llamada técnica de flujo laminar de nutrientes, NFT (por sus siglas en inglés Nutrients Flow Technique). Lee y George (2005) evaluaron esta técnica para producir lechuga (*Lactuca sativa* var. *capitata*) en invernadero empleando *Glomus mosseae* (BEG 107).

3.3 SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO*: CAJA DE PETRI O BIORREACTOR

En los años 70's Mosse y Hepper (1975) establecieron por primera vez una metodología para realizar el cultivo de HMA asociados a raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) en un medio sintético gelificado. Esta metodología fue mejorada por Becard y Fortin (1988) al emplear raíces de zanahoria (*Daucus carota*) transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*, con el fin de evitar la utilización de hormonas en el medio de cultivo. Elsen *et al.* (2003) evaluaron la interacción de *Glomus intraradice* y *Pratylenchus coffeae* empleando raíces transformadas de zanahoria en cajas de Petri. La producción aproximada de esporas fue de 16.800 esporas por caja. Sin embargo, y a pesar del número de esporas logradas, su implementación aún se restringe a investigación o pequeña escala.

La búsqueda de alternativas para la producción en masa de HMA ha llevado a explorar otras metodologías en bioprocesos. Es así como Nuutila *et al.* (1995) implementaron el uso de cultivos sumergidos en un biorreactor a pequeña escala para la producción de HMA. En este trabajo, se utilizaron raíces de fresa (*Fragaria ananassa* Duch) para el crecimiento de *Glomus fistosolum*. De igual forma, la investigación realizada por Jolicoeur *et al.* (1999) demostró que *G. intraradices* puede ser producido tanto en caja de Petri, como en un biorreactor de columna de burbujeo tipo airlift; asociándolo con raíces transformadas de zanahoria.

Hasta ahora, el cultivo de HMA como cultivo monoxénico (HMA y raíz) ha sido extensamente estudiado. De igual forma, los intentos por producir un cultivo axénico (HMA únicamente), han sido transitorios, debido a que se logra un crecimiento de la hifa germinal a un grado muy limitado (Hepper & Smith 1976; Hepper 1979; Hildebrandt *et al.* 2002). Por lo tanto, solo entendiendo la naturaleza de la relación biotrófica que establece el HMA con la raíz de la planta, se podría llegar a obtener un cultivo axénico.

BIBLIOGRAFÍA

- Akiyama K, Matsuzaki K & Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435:824-827.
- Bago B & Bécard G (2002) Bases of the obligate biotrophy of arbuscular mycorrhizal fungi. En: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM & Haselwandter K (Eds.) *Mycorrhizal Technology in Agriculture. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.* 33-48
- Bago B, Pfeffer PE, & Shachar-Hill Y (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol.* 124:949-958.
- Bago B, Pfeffer PE, Douds DDJ, Brouillette J, Bécard G & Shachar-Hill Y (1999) Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol.* 121:263-271.
- Bécard G, & Fortin JA (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108 (2):211-218.
- Beilby JP, & Kidby DK (1980) Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus caledonium*: changes in neutral and polar lipids. *J. Lipid Res.* 21:739-750.
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gómez-Roldán V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Bécard G & Séjalon-Delmas N (2006) Strigolactones stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol.* 4(7):e226.
- Bianciotto V, Barbiero G & Bonfante P (1995) Analysis of the cell-cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus by flow-cytometry and bromodeoxyuridine labeling. *Protoplasma* 188:161-169.

- Boon E, Halary S, Baptiste E & Hijri M (2015) Studying genome heterogeneity within the arbuscular mycorrhizal fungal cytoplasm. *Genome Biol Evol.* 7(2):505-21. doi: 10.1093/gbe/evv002.
- Budi SW, Blal B & Gianinazzi S (1999) Surface-sterilization of *Glomus mosseae* sporocarps for studying endomycorrhization in vitro. *Mycorrhiza* 9:65-68.
- Ceballos I, Ruiz M, Fernández C, Peña R, Rodríguez A & Sanders IR (2013) The in vitro mass-produced model mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, significantly increases yields of the globally important food security crop cassava. *PLoS One.* 8(8):e70633. doi: 10.1371/journal.pone.0070633.
- Coelho IR, Pedone-Bonfim MV, Silva FS & Maia LC (2015) Optimization of the production of mycorrhizal inoculum on substrate with organic fertilizer. *Braz J Microbiol.* 45(4):1173-1178.
- Diop TA, Plenchette C & Strullu GD (1994) Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. *Mycorrhiza* 5:17-22.
- Dodd JC, Arias I, Koomen I & Hayman DS (1990) The management of populations of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi in acidinfertile soils of savanna ecosystem. I. The effect of pre-cropping and inoculation with VAM-fungi on plant growth and nutrition in the field. *Plant Soil* 122:229–240
- Douds DD Jr. (2002). Increased spore production by *Glomus intraradices* in the split-plate monoxenic culture system by repeated harvest, gel replacement, and resupply of glucose to the mycorrhiza. *Mycorrhiza.* 12:163-167.
- Elmes RP & Mosse B (1984) Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production II Experiments with maize (*Zea mays*) and other hosts in nutrient flow culture. *Can J Bot* 62:1531–1536.
- Elsen A, Declerck S & De Waele D (2003) Use of root organ cultures to investigate the interaction between *Glomus intraradices* and *Pratylenchus coffeae*. *Appl Environ Microbiol.* 69(7):4308-4311.
- Frank B. (1885) Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 3(4):128–145. doi:10.1111/j.1438-8677.1885.tb04240.x
- Gachomo E, Allen JW, Pfeffer PE, Govindarajulu M, Douds DD, Jin H, Nagahashi G, Lammers PJ, Shachar-Hill Y & Bücking H (2009) Germinating spores of *Glomus intraradices* can use internal and exogenous nitrogen sources for de novo biosynthesis of amino acids. *New Phytol.* 184:399-411.
- Gaur A & Adholeya A (2002) Arbuscular-mycorrhizal inoculation of five tropical fodder crops and inoculum production in marginal soil amended with organic matter. *Biol Fertil Soils* 35:214–218. doi:10.1007/s00374-002-0457-5
- Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG & Bonfante P (2008) Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of

- arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* 20:1407-1420.
- Gryndler M, Jansa J, Hršelová H, Chvátalová I & Vosátka M (2003) Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl Soil Ecol* 22:283–287. doi:10.1016/S0929-1393(02)00154-3
- Harrison MJ (2012) Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* 15:691-698.
- Hawkins HJ & George E (1997) Hydroponic culture of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* with *Linum usitatissimum* L., *Sorghum bicolor* L. and *Triticum aestivum* L. *Plant and Soil* 196:143. doi:10.1023/A:1004271417469
- Helber N, Wippel K, Sauer N, Saarschmidt S, Hause B & Requena N (2011) A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp. is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell* 23(10):3812-3823.
- Hepper CM (1979) Germination and growth of *Glomus caledonium* spores: the effects of inhibitors and nutrients. *Soil Biol Biochem.* 11:269-277.
- Hepper CM & Smith GA (1976) Observations on the germination of Endogone spores. *Trans Br Mycologia Soc.* 66:189-194.
- Hepper CM, Sen R & Maskall CS (1986) Identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in roots of leek (*Allium porrum* L.) and maize (*Zea mays* L.) on the basis of enzyme mobility during polyacrylamide gel electrophoresis. *New Phytol.* 102:529-539.
- Hildebrandt U, Janetta K & Bothe H (2002) Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Appl Environ Microbiol.* 68(4):1919-1924.
- Ibijbijen J, Urquiga S, Ismaili M, Alve JR & Boddey RM (1996) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, and nitrogen fixation of three varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *New Phytol.* 134:353-360.
- Ijdo M, Cranenbrouck S & Declerck S (2011) Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. *Mycorrhiza.* 21(1):1-16.
- Jakobsen I (1999) Transport of phosphorus and carbon in arbuscular mycorrhizas. En: Varma A & Hock B (Eds), *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology*, 2nd edn. Springer, Heidelberg, 535-542.
- Jarstfer AG & Sylvia DM (1992) Inoculum production and inoculation technologies of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. In: Metting B (ed) *Soil technologies: applications in agriculture, forestry and environmental management*. Dekker, New York, pp 349-377.
- Jarstfer AG, Farmer-Koppenol SDM & Sylvia DM (1988) Tissue magnesium and calcium affect arbuscular mycorrhiza development and fungal reproduction. *Mycorrhiza* 7:237–342. doi:10.1007/s005720050186
- Javot H, Pumplin N & Harrison MJ (2007) Phosphate in the arbuscular mycorrhizal

- symbiosis: Transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ.* 30:310-322.
- Jolicoeur M, Williams RD, Chavarie C, Fortin JA & Archambault J (1999) Production of *Glomus intraradices* propagules, an arbuscular mycorrhizal fungus, in an airlift bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 63(2):224-32.
- Jones JDG & Dangi JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Juniper S & Abbott LK (2006) Soil salinity delays germination and limits growth of hyphae from propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 16(5):371-9.
- Koske RE (1981) Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. *Trans. Br. Mycologia Soc.* 76:328-330.
- Kosuta S, Chabaud M, Loughon G, Gough C, Dénarié J, Barker DG, Bécard G (2003) A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 131(3):952-962.
- Lee YJ & George E (2005) Development of a nutrient film technique culture system for arbuscular mycorrhizal plants. *HortScience* 40:378-380.
- Lemoine MC, Golotte A & Gianinazzi-Pearson V (1995) β 1-3 glucan localization in walls of the endomycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Acaulospora laevis* during colonization of host roots. *New Phytol.* 129:97-105.
- Maia LC & Kimbrough JW (1998) Ultrastructural studies of spores and hypha of a *Glomus* species. *Int. J. Plant Sci.* 159:581-589.
- Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, Martinez EA, Driguez H, Bécard G, Dénarié J (2011) Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469(7328):58-63. doi: 10.1038/nature09622.
- Mohammad A, Khan AG & Kuek C (2000) Improved aeroponic culture of inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 9:337-339.
- Mosse B (1959) The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Trans. Br. Mycologia Soc.* 42:273-286.
- Mosse B (1970a). Honey-coloured sessile *Endogone* spores. I. Life history. *Arch. Microbiol.* 70:167-175.
- Mosse B (1970b). Honey-coloured sessile *Endogone* spores. II. Changes in fine structure during spore development. *Arch Microbiol.* 74:129-145.
- Mosse B & Hepper CM (1975) Vesicular-arbuscular infections in root-organs cultures. *Physiol. Plant Pathol.* 5:215-223.
- Nagahashi G, Douds DD & Abney GD (1996) Phosphorous amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through

- its effect on root exudation. *Mycorrhiza* 6:403-408.
- Navazio L, Moscatiello R, Genre A, Novero M, Baldan B, Bonfante P & Mariani P (2007) A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. *Plant Physiol.* 144:673-681.
- Nuutila AM, Vestberg M, & Kauppinen V (1995) Infection of hairy roots of strawberry (*Fragaria ananassa Duch.*) with arbuscular-mycorrhizal fungus. *Pl. Cell Rep.* 14:505-509.
- Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Oct;6(10):763-75. doi: 10.1038/nrmicro1987.
- Pawlowska TE, Douds DD & Charvat I (1999) In vitro Propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycologia Res.* 103:1549-1556.
- Pirozynski KA & Dalpe Y (1989) Geological history of the *Glomaceae* with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* 7:1-36.
- Plett JM, & Martin F (2011) Blurred boundaries, lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends Genet.* 27:14-22.
- Posada AR, Franco LA, Cuellar AP & Sánchez W (2007) Inóculo de hongos de micorriza arbuscular en pasturas de *Brachiaria decumbens (Poaceae)* en zonas de loma y vega. *Acta Biol. Colomb.* 12(1):113-120.
- Pumplin N & Harrison MJ (2009) Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.* 151: 809-819.
- Raman N, Sambandan K. (2000) Axenic germination of *Scutellospora erythropha* and *Scutellospora nigra* in *in vitro* conditions. *Indian J Exp Biol.* 38(11):1159-1163.
- Remy W, Taylor TN, Hass H & Kerp H (1994) Four hundred million year old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11841-11843.
- Requena N, Serrano E, Ocón A & Breuninger M (2007) Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochem.* 68(1):33-40.
- Saito M (1995) Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker y Hall. *New Phytol.* 129:425-431.
- Schaarschmidt, S, Roitsch T & Hause B (2006) Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *J. Exp. Bot.* 57:4015-4023.
- Schlemper TR & Stürmer SL (2014) On farm production of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum using lignocellulosic agrowastes. *Mycorrhiza.* 24(8):571-80.
- Schmitz AM & Harrison MJ (2014) Signaling events during initiation of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Integr. Plant Biol.* 56(3):250-261.
- Schreiner RP & Bethlenfalvay GJ (1995) Mycorrhizal interactions in sustainable

- agriculture. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15:271–287.
- Siciliano V, Genre A, Balestrini R, Cappellazzo G, DeWit, PJ & Bonfante P (2007) Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiol.* 14(3):1455-66.
- Simon L, Bousquet J, Levesques RC, & Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363:67-69.
- Smith SE, & Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn. Academic, London.
- Solaiman ZM & Saito M (1997) Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytol.* 136:533-538.
- Stumpe M, Carsjens JG, Stenzel I, Göbel C, Lang I, Pawlowski K, Hause B, Feussner I (2005) Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochem* 66(7):781-791.
- Stumpe M, Carsjens JG, Stenzel I, Göbel C, Lang I, Pawlowski K, Hause B, Feussner I (2005) Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochem* 66(7):781-91.
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez SK, Koul R, Ferrol N, Fiorilli V, Formey D, Franken Ph, Helber N, Hijri M, Lanfranco L, Lindquist E, Liu Y, Malbreil M, Morin E, Poulain J, Shapiro H, van Tuinen D, Waschke A, Azcón-Aguilar C, Bécard G, Bonfante P, Harrison MJ, Küster H, Lammers P, Paszkowski U, Requena N, Rensing SA, Roux C, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Tuskan G, Young JPW, Gianinazzi-Pearson V & Martin F (2012) The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytol.* 193(3):755-769.
- Walker C & Vestberg M (1994) A simple and inexpensive method for producing and maintaining closed pot cultures of arbuscular mycorrhizal fungi. *Agric Sci Finl* 3: 233–240.
- Walker C, Giovannetti M, Avio L, Citerinesi AS & Nicolson TH (1995) A new fungal species forming arbuscular mycorrhizas: *Glomus viscosum*. *Mycologia Res.* 99:1500-1506.
- Xavier LJC, & Germida JJ (2002) Response of lentil under controlled conditions to co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia varying in efficacy. *Soil Biol. Biochem.* 34:181-188.

POTENCIAL Y LIMITACIONES DE LA MINERÍA DE GENOMAS DE ACTINOMICETOS COMO HERRAMIENTA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CLÚSTERES DE PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Silvia Guzmán-Trampe, Romina Rodríguez-Sanoja y Sergio Sánchez

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 04510. silvia.guzmantr@iibiomedicas.unam.mx

RESUMEN

A finales del siglo pasado se pensaba que la era dorada del descubrimiento de metabolitos bioactivos estaba llegando a su límite, sin embargo, gracias al desarrollo de plataformas de secuenciación masiva HTS (High Throughput Sequencing), así como de la incorporación de herramientas bioinformáticas, pero sobre todo gracias a la introducción de nuevas estrategias dirigidas a la búsqueda y elucidación de rutas biosintéticas de metabolitos secundarios tales como la Minería de genomas, se ha restableciendo una tendencia a la alza en el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios. La presente revisión se centra específicamente en el uso de esta nueva herramienta en el filo Actinobacteria, por su exitoso historial como productores de metabolitos secundarios bioactivos.

Palabras Clave: Minería de genomas, *Streptomyces*, actinomicetos, metabolitos secundarios.

ABSTRACT

High Throughput Sequencing (HTS), bioinformatics tools and biochemistry knowledge of secondary metabolites have led to improvement on new natural products discovery. The idea that discovery of bioactive metabolites golden era reached a limit was active until few years ago, when the introduction of new strategies directed to elucidation of biosynthetic pathways such as genome mining switched on research on chemical compounds with biological activity. We are specifically interested in Actinomycetes group since they are known as the largest producers of bioactive compounds in bacterial world.

Keywords: Genome mining, *Streptomyces*, actinomycetes, secondary metabolites.

INTRODUCCIÓN

Aunque la historia de metabolitos secundarios (MS) bioactivos se remonta a tiempos de los griegos y egipcios, no fue sino hasta el descubrimiento de la Penicilina en el año 1928 por Alexander Fleming, que se pensó en los microorganismos como fábricas de compuestos con utilidad farmacéutica. Años después, Selman Waksman utilizó la palabra antibiótico para definir cualquier molécula producida por microorganismos que antagonizara el crecimiento de otro microorganismo (Clardy et al 2009). Fue entonces que dio inicio la era dorada de la búsqueda de MS que involucró el descubrimiento de moléculas tales como la eritromicina, cloranfenicol, bacitracina, estreptomina, neomicina y gentamicina entre muchos otros. Hacia los años 70's los esfuerzos se concentraron en la modificación de productos naturales mediante el uso de farmacóforos para la generación de librerías químicas, así como en la síntesis química de moléculas menos tóxicas o más solubles (Demain & Sánchez, 2009).

Típicamente el descubrimiento de nuevas moléculas involucra el aislamiento de microorganismos, la extracción de las moléculas de interés a partir del medio de fermentación, bioensayos con diferentes modelos biológicos (screening), fraccionamiento biodirigido de los extractos y elucidación de la estructura. Sin embargo, el incremento en el "redescubrimiento" de viejos compuestos, aunado a las complicaciones de purificación y elucidación de estructuras, así como los costos del screening tradicional,

llevó a la disminución de la búsqueda de nuevos productos naturales (Arias *et al.*, 2011).

A pesar de lo descrito anteriormente, la prevalencia de enfermedades crónicas como el cáncer, la diabetes, la obesidad, la hipertensión y el constante surgimiento de cepas resistentes a los antibióticos de elección, nos demandan por nuevas estructuras que nos provean de compuestos bioactivos nuevos y más eficaces. Considerando que nada genera mayor diversidad que la naturaleza, pues lleva millones de años perfeccionando su maquinaria biosintética, el uso de fuentes naturales para el descubrimiento de nuevas moléculas, se mantiene como la mejor opción.

MINERÍA DE GENOMAS COMO HERRAMIENTA PARA EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS METABOLITOS SECUNDARIOS

La minería de genomas o minería de datos se refiere a la búsqueda dirigida de secuencias de DNA con la finalidad de descubrir genes de enzimas o rutas metabólicas para la síntesis de nuevos MS. Uno de los primeros trabajos que describe el término minería de genomas fue elaborado por Challis & Ravel (2000), cuando publicaron el descubrimiento de un nuevo sideróforo llamado coelichelina producido por *Streptomyces coelicolor*. Este hallazgo se completó gracias a dos eventos: primero, al profundo entendimiento de los mecanismos

enzimáticos que involucran la biosíntesis de MS y segundo, que para el año 2000, la secuenciación del genoma de *S. coelicolor* estaba casi finalizada. Es decir, el genoma de este microorganismo se encontraba prácticamente disponible, después de que casi 10 años atrás Bentley y Hopwood habían iniciado su secuenciación (Bentley *et al.*, 2002). Con respecto al primer evento, la contribución más importante fue demostrar que la mayoría de las enzimas que codifican para la producción de MS se encuentran arregladas en grupos o clústeres, y que cada una de estas enzimas posee funciones específicas en el ensamblaje final del producto, por lo cual la predicción “in silico” de MS, así como de su estructura se tornó posible (Winter *et al.*, 2011).

Hace 17 años, el clúster para la producción de coelichelina se encontró en el cósmido SCF-34 de la biblioteca ordenada de cósmidos de *S. coelicolor* (Challis & Ravel, 2000). Sin embargo, actualmente la mejor alternativa es contar con la secuencia completa de los cromosomas bacterianos gracias a los bajos costos y la rapidez con la que se pueden secuenciar los genomas utilizando plataformas como Illumina, PacBio, Ion Torrent y Nanopore (Reuter *et al.*, 2015). De acuerdo al principio básico bajo el cual operan las tecnologías de secuenciación, uno de los elementos fundamentales para el óptimo funcionamiento de la minería de genomas es contar con material de ADN genómico de alta calidad y que posteriormente la secuencia del mismo sea correctamente ensamblada y anotada

(Edwards & Holt *et al.*, 2013). Básicamente, la minería de genomas hace uso de herramientas bioinformáticas para la búsqueda de secuencias o motivos conservados que puedan sugerir enzimas involucradas en la producción de compuestos como terpenos, alcaloides, péptidos, así como derivados de ácido shikímico, de policétido sintásas (PKS) y de sintasas de péptidos no ribosomales (NRPS). La artillería bioinformática puede constar únicamente de alineamientos de los clústeres de MS conocidos con una secuencia de interés (BLASTP), buscando lo conocido o parecido, o bien modelos más complejos que utilizan algoritmos para la identificación de secuencias relacionadas con la síntesis de MS, así como el contexto genómico de cada enzima. Algunos ejemplos de plataformas para éste fin incluyen RAST, antiSMASH, NP.searcher, BAGEL y PKS/NRPS (Glass *et al.*, 2010; Tilmann *et al.*, 2015).

Después del descubrimiento de la coelichelina, se han buscado diferentes enfoques para abordar la búsqueda de nuevos MS. Entre ellos se encuentran: el diseño de oligonucleótidos degenerados que buscan secuencias específicas o motivos conservados (Ayuso-Sacido & Genilloud, 2005), el diseño de sondas, con base en el consenso del alineamiento de diferentes secuencias que codifican para la producción de la enzima diana (Peric-Concha & Long, 2003; Zazopoulos *et al.*, 2003) o bien el marcaje radiactivo de aminoácidos para la identificación de productos ribosomales y NRPS (Gross *et al.*, 2007),

A más de diez años del primer ejemplo de minería de genomas, la mayor aportación de este enfoque, ha sido el descubrir el verdadero potencial de cada microorganismo para la producción de MS, independientemente del medio de cultivo elegido, las condiciones de fermentación o de su exposición a factores ambientales (Corre & Challis, 2007; Nett *et al.*, 2009; Zerikly & Challis, 2009). Todas estas variables que habían sido limitantes para el descubrimiento de moléculas que pueden no ser expresadas o que se producen en tan poca concentración, pueden ser actualmente obviadas.

Así pues, la minería de genomas puede ser comprendido como un enfoque global, en el cual se estudia toda la secuencia de un genoma, o bien una estrategia dirigida, en la cual se buscan secuencias genes o proteínas específicas con la finalidad de encontrar homólogos de ciertos compuestos de interés.

EL USO DE LA MINERÍA DE GENOMAS EN LOS ACTINOMICETOS

El filo Actinobacteria, comprende el grupo de bacterias más exitoso para la producción de MS, ya que producen alrededor del 48% de los precursores de compuestos bioactivos que son utilizados con fines farmacéuticos. Desde el descubrimiento de la estreptomycin en el año de 1942, integrantes de este filo han sido estudiados por su gran potencial para la producción de moléculas bioactivas. Dos de las actinobacterias más estudiadas son *S.*

coelicolor, la cepa modelo para estudios de regulación y metabolismo en *Streptomyces*; y *Streptomyces avermitilis*, una cepa de mayor interés industrial ya que produce avermectina. Otros ejemplos significativo es *Saccharopolyspora erythraea*, actinomiceto productor del importante macrólido eritromicina y clasificado anteriormente como *Streptomyces erythraea*, sin embargo, tras obtener la secuencia completa del genoma, se observó que a diferencia de *S. coelicolor* y *S. avermitilis*, el cromosoma de *S. erythraea* es circular (Nett *et al.*, 2009; Doroghazi & Metcalf, 2013).

Las actinobacterias son un grupo de bacterias Gram-positivas, que tienen un alto contenido de GC en sus genomas. Comprenden un grupo tan diverso que engloba especies patógenas para el hombre (*Mycobacterium tuberculosis* y *Nocardia farcinica*, entre otras), así como los mayores productores de MS de interés industrial y farmacéutico. Están clasificadas en 5 órdenes, 11 subórdenes, 42 familias, 110 géneros y a la fecha se han reportado más de 1000 especies, por tanto, son taxonómicamente complejas.

Durante muchos años se pensó que estas bacterias eran características de suelos terrestres y por ende, se implementaron diferentes técnicas de aislamiento y se diseñaron medios de cultivo con la finalidad de obtener el mayor número posible de estos microorganismos. Sin embargo, recientemente se han aislado diferentes actinomicetos de suelos marinos que tienen la capacidad de producir una diversidad

química antes no observada en este grupo (Lam, 2006; Zotchev, 2012).

Gracias a las secuencias de ADN disponibles, se ha observado que existe una relación lineal entre el número de genes asociados a la producción de MS y el tamaño de los genomas. Usualmente, genomas más grandes comprometen más del 7% de los mismos en el ensamble de estas moléculas, mientras que los genomas más pequeños conservan sólo aquellos genes esenciales y rara vez expresan más de tres MS. Los productos más abundantes son aquellos derivados de NRPS, PKS tipo I, II y III y terpenos (Lam, 2006; Nett *et al.*, 2009). Por el contrario, los metabolitos menos frecuentes son aquellos que contienen aminoglicósidos, β -lactámicos y fosfonátos (Doroghazi & Metcalf, 2013).

A pesar de la enorme variedad de compuestos que han sido aislados a partir de actinomicetos, existen estimaciones que predicen que la capacidad de producción microbiana de MS se encuentra subestimada. Es decir, que sólo el 3% de esta ha sido develada y que aún faltan alrededor de 300,000 moléculas por ser identificadas (Watve *et al.*, 2001). Si bien este reporte es contemporáneo de aquel que publicara Greg Challis (2000), el uso de la minería de genomas reforzaría la idea de que, el verdadero potencial de producción de productos naturales es mayor de lo anteriormente reportado.

Doroghazi y Metcalf (2013), realizaron la genómica comparada de 102 genomas de actinomicetos con un enfoque

particular hacia la producción de MS. Después de un análisis filogenético exhaustivo, agruparon tanto las proteínas ribosomales de genes homólogos utilizando la plataforma OrthoMCL, como las secuencias de proteínas conservadas en todas las cepas. En ésta forma obtuvieron un árbol filogenético en el que se observan diferentes especies de actinomicetos, el tamaño estimado de su genoma y la predicción para la producción de MS. De acuerdo a los resultados obtenidos, se entiende que especies del género *Streptomyces* incluyen el grupo más prolífero para la producción de MS, seguido por *Amycolatopsis mediterranei*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptosporangium roseum* y diferentes integrantes de los géneros *Micromonospora* y *Frankia*, mientras que los genomas de actinomicetos mas pequeños tales como *Micrococcus luteus*, miembros de los géneros *Corynebacterium*, *Arthrobacter* y *Rothia*, codifican menos de cinco clústeres biosintéticos.

MINERÍA DE GENOMAS EN EL GÉNERO *STREPTOMYCES*

Los estreptomicetos, comprenden un género de bacterias que forman micelio aéreo y esporas y que, a diferencia de otros actinomicetos, presentan cromosomas lineales. Estos suelen tener tamaños de entre 6 y 11 Mb, y alrededor del 8- 10% del genoma está dedicado a la producción de MS. Dentro del grupo de actinomicetos, son los más comunes y sencillos de aislar

(Hopwood, 1999; Anderson & Wellington, 2001; Chater & Chandra, 2006).

El primer genoma secuenciado en este grupo, fue reportado para *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002) por el grupo del Dr. Hopwood, seguido muy de cerca por la publicación del genoma de *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003). Posterior a estos reportes, se han secuenciado completamente más de un centenar de genomas entre los cuales se encuentran las especies *Streptomyces griseus* (Ohnishi *et al.*, 2008), *Streptomyces lividans* (Cruz-Morales *et al.*, 2013), *Streptomyces hygrosopicus*, *Streptomyces griseoflavus* y *Streptomyces sp* SirexAA entre otros. El draft del genoma de varios streptomyces a punto de ser finalizados, se encuentra también disponible en GenBank.

Es interesante señalar que antes de contar con la técnica de minería de genomas, se conocía sobre la existencia de cuatro MS en *S. coelicolor*, actinorrodina, undecilprodigiosina (Figura 1a), antibiótico dependiente de calcio CDA (Figura 1b) y el

clúster *whiE* para la producción de pigmentos de esporas. Posteriormente, la minería de genomas, develó la existencia de 18 clústeres adicionales involucrados en la síntesis de MS, entre los cuales se encuentran los sideróforos coelichelina, coelibactina, desferroxamina y los terpenos geosmina y hopanoides (Bentley *et al.*, 2002) recientemente el policétido CDK fue también publicado. En el caso de *S. avermitilis*, se tenía reportada la producción del antihelmíntico avermectina y del policétido oligomicina (Figura 1: c y d) (Omura *et al.*, 2001). Posterior al análisis de su secuencia se encontraron 34 clústeres probables para la producción de MS, 13 de los cuales han sido corroborados experimentalmente (Ikeda *et al.*, 2003). De *Streptomyces griseus* se conocían solo cuatro metabolitos: la estreptomycinina (Figura 1e), la grixazona, un carotenoide y el pigmento de esporas melanina. Posterior al análisis de su genoma se predijeron 30 clústeres para la síntesis de MS (Ohnishi *et al.*, 2008).

Gracias a la disponibilidad de las secuencias completas de los genomas de tres *Streptomyces* (*S. griseus*, *S. avermitilis* y *S. avermitilis*), se pudo deducir que el cromosoma lineal de *Streptomyces* está compuesto por una región central conservada y sinténica de casi 6 Mb en donde se localizan los genes esenciales para el crecimiento y desarrollo y las regiones subteloméricas que son altamente variables y contienen el mayor número de clústeres para la producción de MS (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003; Paeadkar *et al.*, 2003). Los clústeres que contienen información de metabolitos poco ordinarios, generalmente se

encuentran incluidas en islas genómicas como el caso de la oligomicina y la estreptomina (Nett *et al.*, 2009). Las regiones centrales del cromosoma también sostienen la producción de algunos MS tales como el CDA en *S. coelicolor* y la geosmina, además de algunos sideróforos. En algunos casos gran parte de la producción de MS es soportada por megaplásmidos, como es el caso del plásmido de 1.8 Mb pSCL4 de *Streptomyces clavuligerus* que se postula como un plásmido dedicado a la producción de MS con la presencia de no menos de 25 clústeres (Medema *et al.*, 2010).

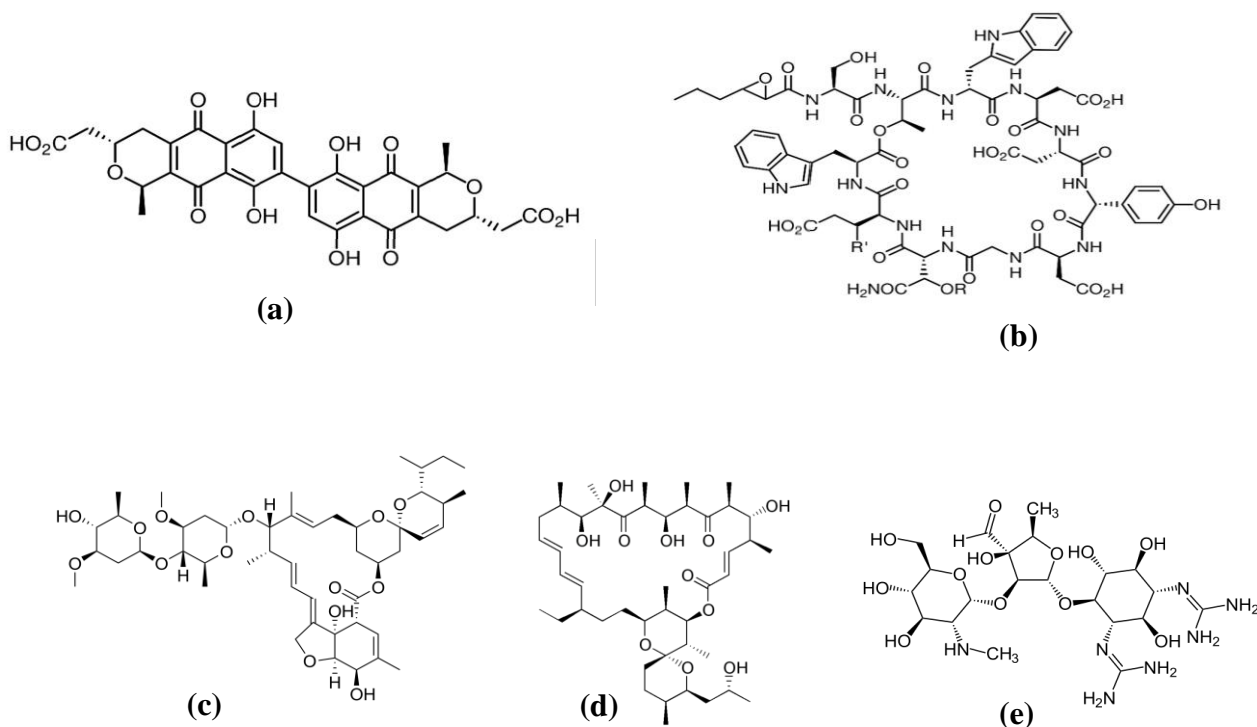


Figura 1. Estructuras de algunos de los metabolitos secundarios producidos por el género *Streptomyces*: (a) actinorrodina, (b) antibiótico dependiente de calcio CDA, (c) avermectina, (d) oligomicina y (e) estreptomina.

MINERÍA DE GENOMAS EN OTROS ACTINOMICETOS

Aunque el género *Streptomyces* ha sido el más estudiado, existen otros géneros de actinomicetos que despliegan una extensa variedad de MS, dentro de los cuales se encuentran *Frankia*, cuyo análisis de genoma predice de 3 a 17 clústeres, *Micromonospora* con 6-30 clústeres, *Kitasatospora*, 23-37 clústeres, *Saccharopolyspora*, 27 clústeres, *Krasilnikovia*, 17-19 clústeres y *Rhodococcus*, 24 clústeres (Nett *et al.*, 2009). Sin embargo, especies de estos géneros son raramente reportadas, probablemente debido a la dificultad en su aislamiento. Estudios recientes, han mostrado la gran capacidad de los actinomicetos marinos para la producción de nuevas moléculas, muchas de las cuales han mostrado actividad antiinflamatoria, citotóxica y antibacteriana (Lam, 2006).

S. erythraea es quizá una de las especies de actinomicetos más importantes a nivel industrial debido principalmente a que es la bacteria productora de eritromicina (Figura 2a), uno de los antibióticos macrólidos más utilizados en la medicina; y segunda, porque es el ejemplo clásico de PKSs modulares del tipo I (Stachelhaus & Marahiel, 1995). Esta enzima corresponde a una enorme megasintasa compuesta por 6 módulos que a su vez están conformados por diferentes dominios, cada uno de los cuales es utilizado una vez y participan en la formación de la estructura final de la

molécula. Sin embargo, posterior a la secuenciación y al uso de minería de genomas, se han reportado 25 clústeres adicionales para la producción de MS, tres de los cuales han sido corroborados experimentalmente (Oliynyk *et al.*, 2007).

Salinispora tropica y *Salinispora arenicola* son miembros marinos de la familia *Micromonosporaceae*, bacterias con cromosomas circulares de 5-8 Mb. La búsqueda de clústeres biosintéticos en éstos microorganismos ha sugerido la presencia de 19 y 29 MS, respectivamente (Udwary *et al.*, 2007). *S. tropica* produce dos potentes antitumorales clorados, la salinosporamida (Figura 2b) A y B, que además de ser nuevos productos naturales, permitieron elucidar una nueva ruta para la síntesis de compuestos halogenados. La mayoría de los clústeres en *S. arenicola* permanecen sin ser elucidados, sin embargo cinco de estos han sido corroborados experimentalmente y dentro de estos se encuentran genes para la biosíntesis de rifamicina y desferroxamina (Challis, 2008; Zerikly & Challis, 2009).

Otro actinomiceto, *Rhodococcus jostii* presenta un genoma circular de 9.7 Mb y codifica para la producción de al menos 18 clústeres, en su mayoría NRPS y PKS. Sin embargo, ningún gen para la síntesis de terpeno ha sido reportado (McLeod *et al.*, 2006).

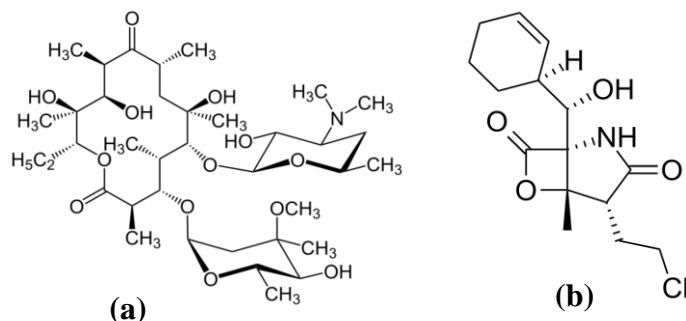


Figura 2. Estructuras de algunos de los metabolitos secundarios producidos por actinomicetos de géneros diferentes a *Streptomyces*. (a) eritromicina y (b) salinosporamida.

EJEMPLOS DE METABOLITOS DESCUBIERTOS EN ACTINOMICETOS POR MINERÍA DE GENOMAS

Existen una gran diversidad de moléculas que han sido clasificadas de acuerdo a la ruta biosintética de la cual derivan: acetato-malonato, ácido shikímico, ácido mevalónico, glucósidos, péptidos ribosomales y no ribosomales. A continuación se hace una breve descripción de cada uno según su origen:

Terpenos (Ácido mevalónico): Los terpenos son moléculas derivadas de la condensación de dos o más unidades de isopreno (moléculas de 5 carbonos). Uno de los pocos terpenos descritos en actinomicetos y quizá el mejor conocido es la geosmina (Figura 3a), molécula responsable del característico olor a tierra

mojada del suelo. Sin embargo, el potencial para la producción de terpenos fue develado recientemente mediante el uso de minería de genomas. Más de 12 terpenos distintos han sido descritos con este método y alrededor de 100 sintasas de terpenos han sido reportadas en 20 genomas de actinomicetos. Ejemplos incluyen la albaflavenona (Figura 3b), 2-metilisoborneol, pentalaneno y avermitol (Cane & Ikeda, 2012).

Péptidos no Ribosomales: La síntesis de este tipo de moléculas comprende la síntesis de moléculas peptídicas ensambladas por megasintasas. La unidad mínima de una Sintasa de Péptidos no Ribosomales (NRPS) incluye los dominios de adenilación (A), la proteína acarreadora de péptidos (PCP) y el dominio de condensación (C). El primero de estos reconoce al

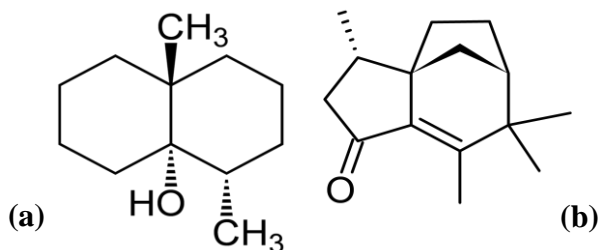


Figura 3. Estructuras de terpenos producidos por actinomicetos. (a) geosmina y (b) albaflavenona.

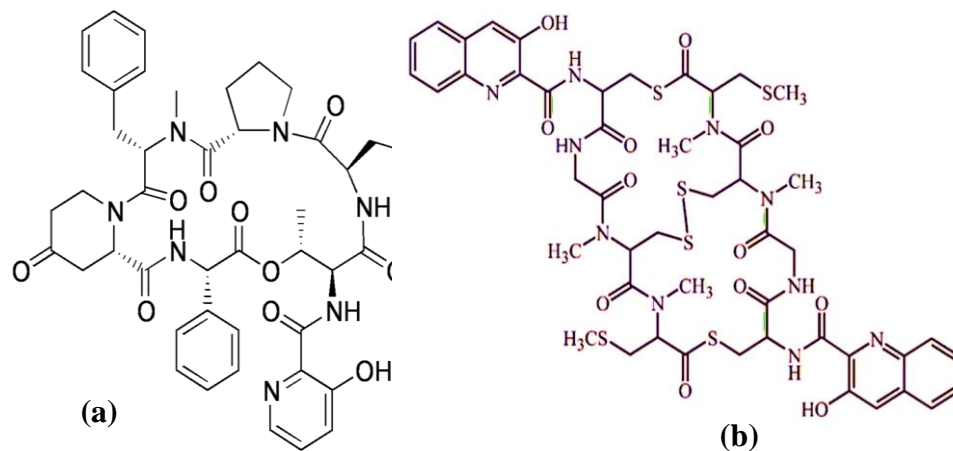


Figura 4. Ejemplos de péptidos no ribosomales producidos por actinomicetos. (a) virginiamicina y (b) tiocoralina.

aminoácido que se va a incorporar, el segundo se encarga de transportar el péptido y el último realiza el enlace entre un aminoácido y otro. Además se pueden presentar dominios adicionales para la epimerización, ciclización y metilación. A Figura 3. Estructuras de terpenos producidos por actinomicetos. (a) geosmina y (b) albaflavenona.

A menudo la síntesis del polipéptido es finalizada por una tioesterasa, que libera la cadena peptídica del complejo enzimático. El antibiótico macrólido virginiamicina (Figura 4a), aislado de un *Streptomyces* sp. marino (Hodges *et al.*, 2012) y tiocoralina (Figura 4b), un antitumoral producido por dos especies del género *Micromonospora* (Lombó *et al.*, 2006), fueron también identificadas con la minería de genomas buscando secuencias diana de NRPS.

Policétidos (Policétido Sintetas/Acetato malonato): Están

conformadas por la unidad mínima de aciltransferasa (AT), la proteína acarreadora de acilos (ACP) y la cetosintasa (KS). Dominios adicionales de cetoreductasa (KR), deshidratasa (DH), tioesterasa (TE) y enoilreductasa (ER) pueden también estar presentes. Las policétido sintetas se dividen en tres clases: PKS tipo I, que comprenden a los policétidos modulares constituidos de dominios que son utilizados una sola vez y forman los macrólidos; las PKS tipo II, que son complejos multienzimáticos en los cuales las enzimas pueden ser empleadas iterativamente y que dan lugar a moléculas como las antraciclinas y las tetraciclinas; y las PKS tipo III, homodímeros de cetosintasas que no presentan dominios ACP y cuyas enzimas son igualmente empleadas iterativamente para la elongación de la cadena carbonada. La germicidina, metabolito que inhibe la germinación de esporas, es sintetizada por una PKS tipo III en *S. venezuelae* y fue descubierta mediante

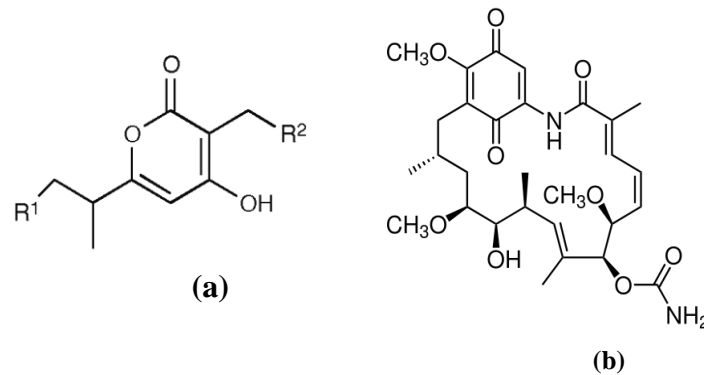


Figura 5. Estructuras de policétidos producidos por actinomicetos. (a) germicidina y (b) geldamicina.

minería de genomas (Song *et al.*, 2006). Otro compuesto descrito por éste método es la geldamicina, sintetizado por una PKS tipo I en el actinomiceto *Streptomyces hygroscopicus* (Olano *et al.*, 2009). Este metabolito inhibe la Hsp90 (Heat Shock Protein 90) y ha mostrado actividad antitumoral (Figura 5).

Péptidos ribosomales: Constituyen un grupo de metabolitos descrito recientemente que engloba a las

bacteriocinas y lantipéptidos, todos con actividad biológica. Son sintetizados por el ribosoma y con frecuencia modificados postraduccionalmente para la incorporación de aminoácidos modificados como lantionina y metilantionina. Los lantipéptidos surfactantes, SapT y SapB producidos por *Streptomyces tendae* y *Streptomyces coelicolor*, respectivamente, fueron descubiertos por minería de genomas (Figura 6) (Willey & van der Donk, 2007).

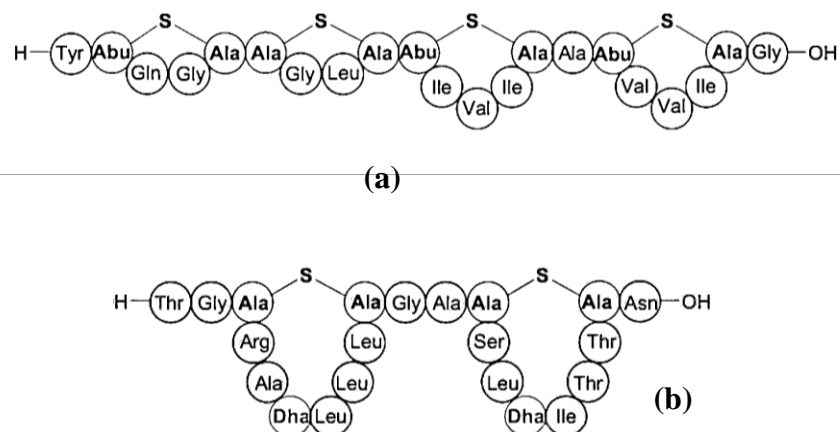


Figura 6. Ejemplos de lantipéptidos surfactantes, (a) SapT y (b) SapB producidos por bacterias del género *Streptomyces*.

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE CLÚSTERES EN ACTINOMICETOS

Diferentes estrategias se han empleado con la finalidad de determinar y corroborar la estructura de los productos que son predichos de las secuencias de ADN; enfoque genomisotópico, generación de mutantes Knock-out, reconstrucción in vitro de moléculas y predicción de propiedades fisicoquímicas *in silico* de los posibles metabolitos. Sin embargo, la estrategia empleada con mayor regularidad comprende la expresión homóloga o heteróloga del clúster de interés. Los modelos heterólogos más utilizados incluyen a *Escherichia coli*, y las cepas de *Streptomyces S. lividans* y *S. coelicolor* (Baltz, 2008; Olano *et al.*, 2008). Recientemente la generación de mutantes con grandes deleciones ha probado ser una excelente opción para la expresión heteróloga. Los ejemplos que mejor describen estos sistemas son las mutantes SUKA y SCOM1152, obtenidas a partir de *S. avermitilis* y *S. coelicolor* respectivamente, cuya eficiencia para la expresión de MS ha sido ya reportada en una gran diversidad de moléculas. En algunos casos, como es la biosíntesis de cloranfenicol en el modelo heterólogo SUKA22, la concentración del antibiótico fue 300 veces mayor que en la cepa silvestre *Streptomyces venezuelae* (Komatsu *et al.*, 2013). La principal ventaja de utilizar las mutantes SUKA22 y SCOM1152 reside en el hecho de que los genes para la producción de los principales MS en *S. avermitilis*; oligomicina y avermectina, y en *S. coelicolor*, CDK,

actinorrodina, undecilprodigiosina y el antibiótico dependiente de calcio así como de diversos terpenos, han sido eliminados haciendo más fácil para la purificación e identificación de nuevas moléculas y disminuyendo la competencia por sus precursores (Komatsu *et al.*, 2010). Finalmente el metabolito deseado se puede sobre-exresar a conveniencia insertando promotores y/o reguladores.

Una desventaja de utilizar sistemas heterólogos, es que con frecuencia los clústeres biosintéticos son grandes >50 Kb, algunos de mas de 120 Kb y pueden contener secuencias repetidas. El tamaño de inserto más grande para un cósmido es de alrededor 45 Kb, y por tanto la utilización de BACs ha resultado en la mejor estrategia. Sin embargo, la transformación con BAC es a menudo poco eficiente y difícil de manejar (Komatsu *et al.*, 2013).

CONSIDERACIONES FINALES

El uso de minería de genomas ha marcado una nueva era para la búsqueda de MS en la cual no existen limitaciones asociadas a las condiciones de crecimiento. La exploración de genomas ha revelado una sorprendente maquinaria de biosíntesis de productos naturales sin precedentes, mostrando así el verdadero potencial productor de cada microorganismo. Gracias a la minería de genomas se han implementado diferentes estrategias para hacer uso de secuencias dirigidas o bien de enzimas marcadas para la búsqueda de productos específicos. Así pues, la era de la minería de datos está apenas iniciando lo que podría

ser, el repunte de la era dorada del descubrimiento de nuevos compuestos con actividad farmacológica. Esperamos ver en un futuro no muy lejano, el surgimiento de nuevas metodologías que permitan la expresión más efectiva y rápida de estos clústeres y que con ello se facilite la purificación y elucidación de sus productos.

REFERENCIAS

- Anderson AS & Wellington EMH (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. 797–814.
- Arias AA, Craig M & Fickers P (2011) Gram-positive antibiotic biosynthetic clústeres: a review. *In*: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Mendez-Villas 977–986. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2268/177678>.
- Ayuso-Sacido A & Genilloud O (2005) New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb. Ecol.* 49: 10–24.
- Baltz RH (2008) Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8: 557–63.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J. & Hopwood DA. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 9 (417): 141-147.
- Cane DE & Ikeda H (2012) Exploration and mining of the bacterial terpenome. *Acc. Chem. Res.* 45: 463–72.
- Challis GL & Ravel J (2000) Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. *FEMS Microbiol. Lett.* 187: 111–4.
- Challis GL (2008) Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology* 154: 1555–69.
- Chater KF & Chandra G (2006) The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 651–72.
- Clardy J, Fischbach M, Currie C. (2009) The natural history of antibiotics. *Current biology* 19:R437-R441.
- Corre C & Challis GL (2007) Heavy tools for genome mining. *Chem. Biol.* 14: 7–9.
- Cruz-Morales P, Vijgenboom E, Iruegas-Bocardo F, Girard G, Yáñez-Guerra LA, Ramos-Aboites HE, Pernodet JL,

- Anné J, van Wezel GP & Barona-Gómez F (2013) The genome sequence of *Streptomyces lividans* 66 reveals a novel tRNA-dependent peptide biosynthetic system within a metal-related genomic island. *Genome Biol. Evol.* 5(6): 1165–1175.
- Demain AL & Sanchez S (2009) Microbial drugdiscovery: 80 years of progress. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 62: 5–16.
- Doroghazi JR & Metcalf WW (2013) Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC Genomics* 14: 611.
- Edwards DJ & Holt KE (2013) Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. *Microb. Inform. Exp.* 3: 2.
- Glass EM, Wilkening J, Wilke A, Antonopoulos D & Meyer F (2010) Using the metagenomics RAST server (MG-RAST) for analyzing shotgun metagenomes. *Cold Spring Harb. Protoc.* 1: pdb.prot5368 (2010).
- Gross H, Stockwell VO, Henkels MD, Nowak-Thompson B, Loper JE & Gerwick WH (2007) The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chem. Biol.* 14 (1): 53–63.
- Hodges TW, Slattery M & Olson JB (2012) Unique actinomycetes from marine caves and coral reef sediments provide novel PKS and NRPS biosynthetic gene clusters. *Mar. Biotechnol. (NY)*. 14: 270–80 (2012).
- Hopwood DA (1999) Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology* 145 (Pt 9): 2183–2202.
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M & Omura S (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* 21(5): 526–531.
- Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, Cane DE & Ikeda H (2010) Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 2646–51.
- Komatsu M, Komatsu K, Koiwai H, Yamada Y, Kozono I, Izumikawa M, Hashimoto J, Takagi M, Omura S, Shin-ya K, Cane D & Ikeda H (2013) Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth. Biol.* 2: 384–96.
- Lam KS (2006) Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 245–51.
- Lombó F, Velasco A, Castro A, de la Calle F, Braña AF, Sánchez-Puelles JM, Méndez C & Salas JA (2006) Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline

- from a marine actinomycete and its expression in two streptomyces species. *Chembiochem* 7: 366–76 (2006).
- McLeod MP, Warren RL, Hsiao WW, Araki N, Myhre M, Fernandes C, Miyazawa D, Wong W, Lillquist AL, Wang D, Dosanjh M, Hara H, Petrescu A, Morin RD, Yang G, Stott JM, Schein JE, Shin H, Smailus D, Siddiqui AS, Marra MA, Jones SJ, Holt R, Brinkman FS, Miyauchi K, Fukuda M, Davies JE, Mohn WW & Eltis LD (2006) The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 15582–7.
- Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, van den Berg, Müller U, Heijne W, Wu L, Alam MT, Ronning CM, Nierman WC, Bovenberg RA, Breitling R & Takano E (2010) The sequence of a 1.8-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol. Evol.* 2: 212–24.
- Nett M, Ikeda H & Moore BS (2009) Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.* 26: 1362–84.
- Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Sozuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M & Horinouchi S (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* 190(11): 4050–60.
- Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Osonoe T, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y & Hattori M (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *J. Bacteriol.* 183(21): 12215–12220.
- Olano C, Lombó F, Méndez C & Salas J (2008) Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab. Eng.* 10: 281–92.
- Olano C, Méndez C & Salas J (2009) Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 26: 628–60 (2009).
- Oliynyk M, Samborsky M, Lester JB, Mironenko T, Scott N, Dickens S, Haydock SF & Leadlay PF (2007) Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat. Biotechnol.* 25(4): 447–453.
- Paradkar A, Trefzer A, Chakraborty R & Stassi D (2003) *Streptomyces* genetics: a genomic perspective. *Crit. Rev. Biotechnol.* 23: 1–27.
- Perić-Concha N & Long PF (2003) Mining the microbial metabolome: a new frontier

- for natural product lead discovery. *Drug Discov. Today* 8: 1078–84.
- Reuter J, Spacek D & Snyder M (2015) High-Throughput sequencing technologies. *Mol. Cell* 58(4): 586-597.
- Song L, Barona-Gómez F, Corre C, Xiang L, Udvary DW, Austin MB, Noel JP, Moore BS & Challis GL (2006) *et al.* Type III polyketide synthase beta-ketoacyl-ACP starter unit and ethylmalonyl-CoA extender unit selectivity discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 14754–5.
- Stachelhaus T & Marahiel M (1995) A Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 125: 3–14.
- Tilman W, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E & Medema MH (2015) antiSMASH 3.0--a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.* 43 (W1): W237-W243.
- Udvary DW, Zeigler L, Asolkar RN, Singan V, Lapidus A, Fenical W, Jensen PR & Moore BS (2007) Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(25): 10376–10381.
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM & Bhole BD (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* 176: 386–90.
- Willey JM & van der Donk W (2007) Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 477–501.
- Winter JM, Behnken S. & Hertweck C (2011) Genomics-inspired discovery of natural products. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15: 22–31.
- Zazopoulos E, Huang K, Staffa A, Liu W, Bachmann BO, Nonaka K, Ahlert J, Thorson JS, Shen B & Farnet CM (2003) A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. *Nat. Biotechnol.* 21 (2): 187–90.
- Zerikly M & Challis GL (2009) Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem* 10: 625–33.
- Zotchev SB (2012) Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *J. Biotechnol.* 158: 168–75.



www.smbb.com.mx