ISSN-1870-3690

Revista de Educación Bioquímica

REB 2017

Órgano de información de la
Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C.

Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNAM

Facultad de Medicina

EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

VOL. 36 No. 4 DICIEMBRE 2017

COMITÉ EDITORIAL

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS
Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

EDITORES

RAFAEL CAMACHO CARRANZA
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Departamento de Medicina, Genómica y Toxicología Ambiental
Universidad Nacional Autónoma de México

ALICIA GAMBOA DE BUEN
Instituto de Ecología
Universidad Nacional Autónoma de México

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

MARÍA ESTHER REVUELTA MIRANDA
Sección Bioquímica y Farmacología Humana
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

ROCÍO SALCEDA SACANELLES
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA
Instituto Nacional de Pediatría

VÍCTOR M. VALDES LÓPEZ
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

ÁNGEL ZARAIN HERZBERG
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES FUNDADORES

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
e Instituto Politécnico Nacional

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

ROCÍO SALCEDA SACANELLES
Coordinadora
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

ALEJANDRO MARTÍNEZ MARTÍNEZ
Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua

SERGIO SÁNCHEZ-ARMÁSS ACUÑA
Departamento de Fisiología y Farmacología
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

MARTHA ANGÉLICA QUINTANAR ESCORZA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina Humana, Universidad Juárez del Estado de Durango

MARÍA MALDONADO VEGA
Departamento de Investigación. Centro de Innovación Aplicada en
Tecnologías Competitivas, AC. León, Gto., Mexico

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos Periódica, Iresie, Redalyc, Latindex y Scielo.

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB), Volumen 36, Número 4, diciembre de 2017, publicación trimestral, editada por Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., Avenida Universidad No. 3000, Colonia Universidad Nacional Autónoma de México, Delegación Coyoacán, C.P. 04510. Ciudad de México, México. Correspondencia: Apartado Postal 70-281, Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México. Correo E: reb@bq.unam.mx
http://bq.unam.mx/wikidep/pmwiki.php/Reb/HomePage
http://www.facmed.unam.mx/marco/index.php?dir_ver=101
Editor responsable Dr. José Víctor Calderón Salinas. ISSN: 1870-3690. Reserva de derechos al Uso Exclusivo No. 04-2015-113014523300-203, ambos otorgados po el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Diseño: Celia Virginia Sánchez Meza, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Disponible en diciembre del 2017.

El contenido de los artículos y las opiniones expresadas en ellos son responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente las del Comité Editorial. Se autoriza la reproducción parcial o total de los textos aquí publicados siempre y cuando se cite la fuente completa y la dirección electrónica de la publicación.

Contenido

COMITÉ EDITORIAL

EDITORIAL

PRESENTE Y FUTURO DEL FINANCIAMIENTO DE LA CIENCIA EN MÉXICO: ¿HACIA DÓNDE VA LA INVESTIGACIÓN?
Angel Zarain Herzberg.....99

ARTÍCULOS

MECANISMOS MOLECULARES DE LOS FITOESTRÓGENOS Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER
Eduardo Izquierdo Torres y
Angel Zarain Herzberg.....101

LA ENZIMA GLUCÓGENO SINTASA CINASA 3 REGULA LA ACTIVIDAD DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NF-κB Y CREB DURANTE LA RESPUESTA INFLAMATORIA CAUSADA POR *Staphylococcus aureus*
Alejandro Huante Mendoza,
Octavio Silva García, Rosa Rico Mata,
María Cristina Maldonado Pichardo y
Víctor Manuel Baizabal Aguirre.....111

EFECTOS INMUNOLÓGICOS Y ADYUVANTES DE LAS PROTEÍNAS Cry1A
Marilu Torres Martínez y
Leticia Moreno Fierros.....118

LOS CÓDIGOS GENÉTICOS MITOCONDRIALES: CARACTERÍSTICAS, ORIGEN Y EVOLUCIÓN
Karen Aguilar Guerra,
Alfonso Vilchis Peluyera y
Víctor Valdés López.....129

OTRAS COMUNICACIONES

CRUCIBIOQ
AGUA Y ELECTROLITOS
Yolanda Saldaña Balmori.....141

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
AGUA Y ELECTROLITOS
Yolanda Saldaña Balmori.....144

ÍNDICE ANUAL DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2017.....145

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....147

EDITORIAL

PRESENTE Y FUTURO DEL FINANCIAMIENTO DE LA CIENCIA EN MÉXICO: ¿HACIA DÓNDE VA LA INVESTIGACIÓN?

Una de las metas del sexenio 2012-2018 fue incrementar el presupuesto para la ciencia, tecnología e innovación (CT&I) en México, del 0.4% del producto interno bruto (PIB) que se destinaba en el 2012 hasta por lo menos 1% del PIB para el 2018 (1, 2). Durante los tres primeros años del sexenio hubo un incremento hasta alcanzar el 0.6% del PIB acordes al plan nacional de desarrollo en materia de CT&I en los que participó la UNAM, el CONACYT y la iniciativa privada entre otros (3, 4). Este plan marcaba una ruta clara para que la CT&I se convirtiera en una palanca para el desarrollo económico y social que tanta falta le hace al país.

Sin embargo, a partir del 2016 debido a una contracción en la economía por factores principalmente de carácter externo, como son la caída de los precios internacionales del petróleo y el tipo de cambio del peso frente al dólar, se presentó una caída del 10% en el presupuesto para la CT&I regresando a niveles de 0.5% del PIB (5). De tal suerte que el presupuesto del CONACYT para 2017 fue de 26 mil 963 millones 512 mil 279 pesos, afectado fuertemente por la propuesta del ejecutivo con una caída de más del 25% en términos reales para el 2017 (6). El presupuesto aprobado para el CONACYT en 2018 es 0.1% menor que para el 2017, con 26 mil 925 millones 876 mil 510 pesos (7). Lo más preocupante es que los diputados no revirtieron estos ajustes, lo que refleja que hay una falta de conciencia por parte de un Gobierno y un Congreso ignorante que deja como última prioridad el apoyo a la ciencia y la tecnología.

La reducción del presupuesto del CONACYT afecta directamente al núcleo de científicos más productivos en la investigación científica básica, aplicada y tecnológica del país. De este núcleo de científicos depende la formación de nuevo capital humano, la elaboración y financiamiento de proyectos de CT&I, la preservación de la comunidad científica y el fomento a la innovación de las empresas y su desarrollo.

A pesar de que no hay un incremento en el presupuesto para CT&I en 2018, hubo una reasignación de recursos del presupuesto federal con un aumento de 4 mil 415 millones de pesos para la educación (7). En este rubro, la UNAM y el CINVESTAV obtuvieron algunos aumentos destinados para la investigación científica en este año. Estos aumentos pueden compensar en alguna forma la reducción de apoyos por parte del CONACYT. Por fortuna en la UNAM existe un sistema propio de financiamiento para proyectos de investigación, el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), lo cual permite no interrumpir nuestra investigación. Desafortunadamente, otras instituciones no cuentan con un programa similar, por lo que dependen completamente del CONACYT. De ahí la importancia de que México destine por lo menos 1% del PIB a la CT&I en el corto plazo.

Como resultado de estos recortes a la CT&I se ven afectados muchos proyectos de ciencia básica que corren el riesgo de suspenderse. De igual manera, el número de becarios de estudios de posgrado (maestría y doctorado) no creció en 2017, por primera vez desde hace 25 años (8), por lo cual los estudiantes potenciales están comenzando a migrar a otras opciones de estudios, lo que puede llevar a la falta de recursos calificados para el futuro del país. Aunque hay que reconocer que en este sexenio hubo un aumento substancial en el número de becarios apoyados por parte del CONACYT, en 2018 serán 60 mil 391 becas financiadas con 10 mil 100 millones de pesos de su presupuesto (7), se ha sacrificado el financiamiento de muchos proyectos de investigación excelentes en los cuales los estudiantes en formación deben realizar sus proyectos de tesis. Además, debemos pensar que los científicos recién graduados requieren tener donde trabajar y eso significa la creación de nuevos centros de investigación que forzosamente deben tener asignado un presupuesto que actualmente es insuficiente.

El Presidente de la República y el Congreso para el sexenio 2018-2024, tienen el reto y la responsabilidad social de apoyar a la CT&I para que México esté en condiciones de dar el brinco científico y tecnológico que requiere el país para tener una economía fuerte y ser competitivo a nivel internacional. Debemos recordar que los países desarrollados destinan entre el 2 y 4% de su PIB para la CT&I (5), lo que nos debe hacer reflexionar si vamos en el camino correcto para llegar a ser un país desarrollado.

Referencias

1. Presidencia de la República, Plan Nacional de Desarrollo 2013–2018. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5299465&fecha=20/05/2013
2. CONACYT, Programa Especial de Ciencia, Tecnología e Innovación (PECITI) 2014–2018. Disponible en: http://www.siicyt.gob.mx/index.php/normatividad/nacional/631-3-programa- especial-de-ciencia-tecnologia-e-innovacion-2014-2018/file
3. Hacia una Agenda Nacional en Ciencia Tecnología e Innovación 2012–2018. Disponible en: http://www.foroconsultivo.org.mx/documentos/agenda_nal_cti_extenso_260912.pdf
4. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, Ley de Ciencia y Tecnología 2015. Disponible en: http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/242_081215.pdf
5. Gasto en Investigación y desarrollo. Disponible en: https://datos.bancomundial.org/indicador/GB.XPD.RSDV.GD.ZS
6. CONACYT, Informe General del Estado de la Ciencia, la Tecnología, e Innovación 2015. Disponible en: http://www.siicyt.gob.mx/index.php/transparencia/informesconacyt/informe-general-del-estado-de-la-ciencia-tecnologia-e-innovacion/informe-general-2015/3814-informe-general-2015/file.
7. Proyecto de presupuesto de egresos de la federación para el ejercicio fiscal 2018. Disponible en: http://www.ppef.hacienda.gob.mx/work/models/PPEF2018/paquete/egresos/Proyecto_Decreto.pdf
8. Frixione, E and Laclette, JP (2017) Mexican basic science falls short. Science 357:260-261.

Angel Zarain Herzberg
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM

MECANISMOS MOLECULARES DE LOS FITOESTRÓGENOS Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER*

Eduardo Izquierdo Torres y Angel Zarain Herzberg**

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. **Autor de correspondencia correo E: zarain@unam.mx

RESUMEN

Los fitoestrógenos son compuestos químicos no esteroideos sintetizados en las plantas, poseen actividad estrogénica o antiestrogénica, y algunos de ellos se encuentran abundantemente en alimentos que conforman la dieta. Son de mucho interés ya que presentan una actividad biológica elevada debido a sus propiedades de modular diversos procesos celulares importantes como el ciclo y la muerte celular, la transcripción, vías de señalización, entre otros. Por resultados de estudios realizados en modelos *in vitro* y animales, así como estudios epidemiológicos en humanos, se les han atribuido beneficios a la salud para diversas condiciones patológicas. Sin embargo, debido a su capacidad de ser agonistas o antagonistas (dependiendo del contexto celular) del receptor de estrógenos, también podrían ocasionar efectos adversos a la salud. En esta revisión, nos enfocaremos en las evidencias que existen sobre los efectos de los fitoestrógenos en diversos modelos de cáncer, así como los mecanismos de acción.

PALABRAS CLAVE:
Fitoestrógenos, dieta, cáncer, vías de señalización, ciclo celular, epigenética.

ABSTRACT

Phytoestrogens are nonsteroidal chemical compounds synthesized by plants, they exert estrogenic or antiestrogenic activity, and some of them are widely found in human diets. They are subject of interest since present high biological activity due to their properties to modulate several important cellular processes such as cell cycle and death, transcription, cell signaling, among others. As a result of several *in vitro* and animal studies, as well as epidemiological studies in humans, they have been attributed health benefits for diverse conditions. However, because of their capacity to function as agonists or antagonists (depending on the cellular context) of estrogen receptor, they might also elicit adverse health effects as well. In this review, we focus on the existing evidence about the effect of phytoestrogens in various cancer models, besides their mechanisms of action.

KEY WORDS:
Phytoestrogens, diet, cancer, treatment, prevention.

INTRODUCCIÓN

Los fitoestrógenos son un grupo de sustancias derivadas de las plantas que son estructural o funcionalmente similares al estradiol. Estas moléculas han atraído el interés debido a una serie de datos epidemiológicos que sugieren un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres que habitan en países con alto consumo de fitoestrógenos, por ejemplo en Japón (1). El alto consumo de soya (una fuente abundante de fitoestrógenos) se ha asociado con menor riesgo de cáncer de mama. Además, la tasa de cáncer de mama entre inmigrantes de países con alto consumo de fitoestrógenos hacia países de bajo consumo ha ido en aumento, sugiriendo que cambios en el estilo de vida, incluyendo los cambios dietéticos en la captación de fitoestrógenos juegan un papel importante, aunque podrían no ser los únicos (1). Incluso, algunos estudios han señalado que la exposición a los fitoestrógenos durante la niñez podría proteger contra el cáncer de mama en la edad adulta (2).

También existe la preocupación de que los fitoestrógenos, a través de sus propiedades estrogénicas, puedan incrementar el riesgo de incidencia, recurrencia, o incluso estimular el crecimiento de tumo-

*Recibido: 17 de mayo de 2017 Aceptado: 11 de octubre de 2017

res ya existentes, ya que se ha observado que las isoflavonas (en particular la genisteína estimula el crecimiento de células de cáncer de mama sensibles al receptor de estrógenos (3). En modelos animales y estudios *in vitro*, los fitoestrógenos se unen débilmente a los receptores de estrógenos y pueden tener efecto estrogénico o antiestrogénico. La actividad de un fitoestrógeno depende de su estructura y su metabolismo, su concentración relativa a la de los estrógenos endógenos y a la función biológica evaluada (4).

En un estudio con aproximadamente 15,000 mujeres holandesas de entre 49 y 70 años reclutadas para un programa de seguimiento por 4-8 años con una dieta alta en lignanos e isoflavonas (dos tipos de fitoestrógenos) se identificaron 280 casos de cáncer de mama. Los puntos fuertes del estudio incluyen el uso de un detallado y validado cuestionario semi-cuantitativo de ingesta de alimentos, cuidadosamente desarrollado para detectar los niveles de fitoestrógenos consumidos. No se encontró asociación entre el consumo de isoflavonas y la incidencia de cáncer de mama. Sin embargo, se observó una disminución en el riesgo de cáncer de mama de un 30% para las mujeres que ingerían altas cantidades de lignanos (un promedio de 0.8 mg/día) (5).

Además de la relación con el cáncer de mama, en otros estudios epidemiológicos, así como en meta-análisis se ha reportado que la ingesta de isoflavonas o el consumo de soya están asociados a un menor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (6, 7); mientras que también se ha asociado a las altas concentraciones de isoflavonas en suero con menor riesgo de cáncer gástrico (8), a las dietas ricas en lignanos e isoflavonas con menor incidencia de cáncer de próstata y testicular (9-11), y menor riesgo de cáncer de tiroides en mujeres pre y postmenopáusicas (12), entre otros tipos de cáncer como cáncer de útero (13), endometrio (14) y de ovario (15).

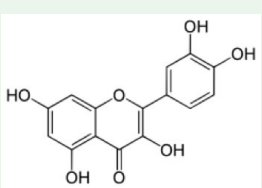
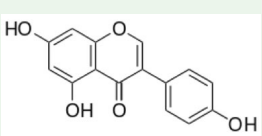
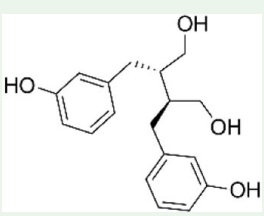
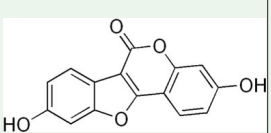
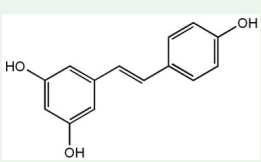
El propósito de este artículo es proporcionar al lector una visión general de los fitoestrógenos, desde sus fuentes y propiedades hasta las evidencias que existen de sus efectos en modelos de células cancerosas.

CLASIFICACIÓN, FUENTES Y METABOLISMO DE LOS FITOESTRÓGENOS

Existen varias clases principales de fitoestrógenos. En la Tabla 1 se pueden observar estas clases y la fuente en la que pueden ser encontrados. Los fitoestrógenos más estudiados son las isoflavonas, los lignanos y el estilbeno resveratrol (RSV) (16).

Los lignanos existen en muchas plantas, donde son parte fundamental de la pared celular, además de estar presentes también en las porciones leñosas de la planta y en las semillas (17). La semilla de lino es la mayor fuente dietética de lignanos,

Tabla 1
Principales clases de fitoestrógenos y sus fuentes dietéticas comunes

Flavonoides Apigenina Quercetina Narigenina Catequina	**Isoflavonoides** Genisteína Biocanina A Daidzeína	**Lignanos** Enterodiol Enterolactona	**Coumestranos** Coumestrol	**Estilbenos** Resveratrol
Fuentes Frutas amarillas y rojas, vegetales, té	**Fuentes** Soya, vegetales	**Fuentes** Linaza, granos enteros, frutas, vegetales	**Fuentes** Guisantes, frijoles, alfalfa, semillas de girasol	**Fuentes** Piel de las uvas, vino tinto, arándanos, frambuesas, moras, nueces
Estructura de un miembro representativo (Quercetina) 	**Estructura de un miembro representativo (Genisteína)** 	**Estructura de un miembro representativo (Enterodiol)** 	**Estructura de un miembro representativo (Coumestrol)** 	**Estructura de un miembro representativo (Resveratrol)** 

pero los granos enteros, las verduras y el té son también fuentes importantes y más típicamente ingeridos en la dieta occidental (18). Las isoflavonas son la forma más común de fitoestrógenos y se pueden encontrar en diversas plantas, pero mayoritariamente en la soya. Aunque otras legumbres como garbanzos y guisantes contienen también isoflavonas, sus niveles son alrededor de dos órdenes de magnitud menores con respecto a la soya (19, 20). La cantidad de fitoestrógenos en plantas varía considerablemente en función de la ubicación y condiciones del cultivo, el tiempo de cosecha, el procesamiento y la preparación (21).

En los alimentos, los fitoestrógenos se encuentran generalmente como conjugados glucosídicos biológicamente inactivos que contienen restos de glucosa o algún otro carbohidrato. Su concentración en sangre puede variar dependiendo de varios factores como las preferencias dietéticas de los individuos, así como del contenido de fitoestrógenos en alimentos procesados (22). Por ejemplo, en países asiáticos el consumo de isoflavonas puede alcanzar los 50 mg/día comparados con los 1-3 mg/día de una dieta típica en países occidentales, aunque con una dieta vegetariana o el uso de suplementos se pueden alcanzar los niveles de una dieta asiática (23, 24).

En el intestino, los fitoestrógenos son hidrolizados por glucosidasas a sus respectivas agliconas permitiendo una absorción más eficiente, aunque también algunas bacterias intestinales pueden metabolizar estos productos (24, 25). Una vez que se absorben, son conjugados principalmente con ácido glucurónico y, en menor medida, con ácido sulfúrico en el intestino y en el hígado para después desconjugarse antes de excretarse por vía urinaria (26). Solamente existe un pequeño porcentaje (alrededor del 3% del total) de fitoestrógenos libres biológicamente activos y los valores en sangre se encuentran en el orden de magnitud de ng/mL o hasta menor (23, 27). Lo anterior es la principal causa del cuestionamiento acerca de la relevancia de los estudios *in vitro* que muestran que dosis micromolares de fitoestrógenos no conjugados o dosis muy altas comparadas con la ingesta normal en modelos *in vivo* pueden inhibir la proliferación de células cancerosas, inhibir la transcripción dependiente de estrógeno o algunas vías de señalización (28-30).

La concentración de fitoestrógenos puede medirse en orina, plasma, heces, semen, bilis, saliva y leche materna. La concentración puede variar de persona a persona incluso cuando se administren de manera controlada debido al metabolismo individual (31). Se ha observado que el uso de antibióticos, así como enfermedades gastrointestinales modifican el metabolismo de fitoestrógenos, esto debido a que su metabolismo está determinado principalmente por la flora intestinal (31).

ACTIVIDAD ESTROGÉNICA DE LOS FITOESTRÓGENOS

Los fitoestrógenos tienen una actividad estrogénica muy débil, que va desde diez mil veces menor (daidzeína) hasta cien veces menor (coumestrol) por mol con respecto al 17β-estradiol (32). Sin embargo, a pesar de la débil actividad estrogénica de los fitoestrógenos, su concentración en el cuerpo es alrededor de 100-1000 veces mayor que la del estradiol endógeno en mujeres pre-menopáusicas. De hecho, la genisteína y la daidzeína han mostrado efectos estrogénicos incluso mayores que el estradiol endógeno a altas dosis *in vitro*, aunque fuera del rango de concentraciones típicamente encontradas en humanos (33-35).

Es difícil puntualizar sobre las actividades biológicas de los fitoestrógenos en modelos *in vivo* debido a una gran variedad de factores como la variabilidad en el metabolismo invidivual, entre otras. A pesar de esto, de varios estudios se ha podido concluir que niveles bajos de genisteína fisiológicamente relevantes (<10 μmol/L) estimulan tumores positivos para el receptor de estrógenos (RE+), mientras que dosis altas (>10 μmol/L) tienen el efecto opuesto. Es importante resaltar que una concentración de fitoestrógenos de 10 μmol/L es difícil de alcanzar solamente con la dieta (36, 37).

La actividad estrogénica de los fitoestrógenos también depende de la afinidad relativa por RE específicos en el cuerpo. Parece ser que los fitoestrógenos se unen preferencialmente al receptor de estrógenos beta (RE-β) (38, 39). El RE-β puede tener un papel protector en el desarrollo del cáncer de mama a través de la inhibición de la proliferación de células mamarias, así como inhibiendo los efectos estimulatorios del RE-α. Además, los fitoestrógenos también han mostrado ser inhibidores de la aromatasa (una enzima que convierte androstenediona y testosterona en estrona y estradiol, respectivamente), la cual es blanco de los inhibidores de aromatasa que actualmente se utilizan para el tratamiento de cáncer de mama (38, 40-42).

Se ha observado actividad estrogénica en la genisteína a través de ensayos con genes reporteros en células de osteosarcoma humano U20S, esta actividad es dosis-dependiente y mayor que la reportada para otros fitoestrógenos como la daidzeína, aunque sigue siendo menor que la del estradiol (43). Funcionalmente esto se traduce en

un aumento de la proliferación en células de cáncer de mama T47D pero solamente a altas concentraciones (≥ 0.5 μM), cuando la concentración es baja (20-80 nM) se observa una proliferación reducida con respecto a las células tratadas solamente con el vehículo (43). Para el caso de las células de cáncer de mama MCF-7 se observó lo contrario, dosis de genisteína ente 10 nM y 1 μM mostraron efectos mitogénicos, mientras que concentraciones de 10 μM o mayores tienden a mostrar efectos antiproliferativos (32, 44), se cree que algunos de estos efectos pueden ser explicados por las interacciones de los fitoestrógenos con las distintas isoformas del RE (45).

Sin embargo, en una amplia revisión de la literatura se llegó a la conclusión de que los fitoestrógenos son menos potentes que el estradiol para la activación tanto del RE-α como del RE-β, uniéndose preferencialmente al RE-β (46).

FITOESTRÓGENOS Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

Las principales vías de señalización que se encuentran desreguladas en cáncer pueden ser modificadas por varios fitoestrógenos. Estas incluyen el metabolismo, reparación del DNA, proliferación, apoptosis, inflamación, inmunidad, diferenciación y angiogénesis (47, 48).

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) es un complejo de proteínas que funciona como factor de transcripción que induce la expresión de muchos genes que suprimen la apoptosis, inducen transformación celular, proliferación, metástasis e inflamación (49, 50). Algunos fitoestrógenos como el RSV han mostrado capacidad para ser potentes inhibidores de NF-κB, lo cual podría explicar su actividad anti-carcinogénica (51, 52).

La angiogénesis es un proceso fisiológico normal donde existe la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes. Una angiogénesis regulada de manera deficiente promueve el crecimiento tumoral a través del incremento de oxígeno y nutrientes (53). El RSV y la curcumina reducen la angiogénesis inducida por inflamación, inhiben al factor inducible por hipoxia-1α (HIF-1α) y reducen la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) a través de la disminución de la actividad de las vías de la cinasa Akt y de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) en las líneas celulares de cáncer de ovario A2780/CP70 y OVCAR-3 (54).

Los fitoestrógenos también pueden modular la respuesta a factores de crecimiento o activar/inhibir cinasas que pueden alterar la actividad transcripcional independiente de ligando de los receptores de estrógeno y de otros factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1) (55). Por ejemplo, la genisteína y el RSV son inhibidores de cinasas de tirosina y han mostrado alterar tanto la actividad como la expresión de ERK1/2 y la vía de la fosfoinositol 3-cinasa y Akt (PI-3K/Akt) (56, 57). El tratamiento con genisteína por tiempos largos a concentraciones fisiológicas (10^{-8} mol/L) también disminuye la expresión de Akt en células de cáncer de mama MCF-7 (58).

Por otro lado, se ha visto que la activación de las vías de las MAPK y PI-3K/Akt es capaz de suprimir los efectos inhibitorios del ER-β sobre la proliferación en células de epitelio mamario y en líneas celulares de cáncer de mama (59), situando a la exposición a fitoestrógenos de la dieta como una estrategia para potenciar los efectos inhibitorios de la proliferación del ER-β.

REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR POR FITOESTRÓGENOS

En células normales la proliferación se encuentra estrictamente regulada por el balance entre las señales de crecimiento y aquellas señales que lo inhiben. Sin embargo, las células cancerosas se caracterizan por presentar una proliferación descontrolada ya sea porque adquieren la capacidad de generar sus propias señales de crecimiento o mediante la insensibilidad a las señales anticrecimiento (60).

Las ciclinas son una familia de proteínas que regulan la transición de varias fases del ciclo celular, lo hacen a través de la formación de complejos con cinasas dependientes de ciclinas (CDK, por sus siglas en inglés) modulando la transcripción de sus genes blanco. La ciclina D1, que regula la transición de la fase G1 a S del ciclo celular es una de las más estudiadas y derivado de estas investigaciones fue catalogada como un oncogén ya que se encuentra sobre-expresada en muchos tipos de cáncer (61). Varios estudios han mostrado que altas concentraciones de fitoestrógenos (≥10 μmol/L) inhiben la expresión de ciclina D1 (62, 63).

La actividad de los complejos ciclina/CDK es regulada por los inhibidores de CDK (CDI, por sus siglas en inglés), por lo que estos pueden inhibir la progresión del ciclo celular (64). Los dos CDI más estudiados son $p21^{CIP1/WAF1}$ y $p27^{Kip1}$. La expresión de p21 es regulada positivamente por el supresor tumoral p53 (64, 65). Altas dosis de fitoestrógenos han mostrado incrementar la actividad y expresión de p21, p27 y p53, provocando disminución en los niveles de ciclina D1 (66-70). Mediante análisis por microarreglos se observó que bajas concentracio-

nes de genisteína que estimulaban el crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7 no tenían efecto sobre la expresión de p53 ni sobre sus genes blanco, mientras que dosis altas (25 µmol/L) tenían el efecto contrario, promoviendo una proliferación disminuida y apoptosis (71).

INDUCCIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE FITOESTRÓGENOS

La apoptosis es quizá el arma más potente para combatir al cáncer ya que es un proceso que se encarga de eliminar células que poseen mutaciones potencialmente dañinas, entre otras funciones. Los procesos que inducen apoptosis incluyen el daño al DNA, desregulación del ciclo celular, hipoxia, desprendimiento celular de su tejido circundante y pérdida señalización mediada por factores de crecimiento (72). Las caspasas son una familia de proteasas involucradas en la iniciación y ejecución de la apoptosis. La desregulación de estas enzimas tanto en su expresión como en su actividad puede provocar enfermedades como el cáncer o procesos inflamatorios (73).

Se ha visto que fitoestrógenos como la quercetina, el RSV y la genisteína inducen apoptosis en células de cáncer de mama, involucrando tanto la vía intrínseca como la extrínseca, mientras que estos efectos no se observan en líneas celulares de tejido mamario no neoplásico como la línea MCF-10A (74, 75). También en células de cáncer de mama se observó que la quercetina y genisteína producían fracciones apoptóticas por la vía extrínseca a través de la inducción de la expresión de p53, así como mediante la inhibición de la fosforilación del inhibidor de kappa B (IκB), interfiriendo con la señalización de NF-κB (76).

En células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 se observó que el tratamiento con RSV aumentó la actividad de diversas caspasas y que las bombas de calcio SERCA son un mediador importante, ya que su silenciamiento por RNA de interferencia (RNAi) disminuyó parcialmente la apoptosis inducida por RSV (77).

En células de cáncer de pulmón A549 y H1299 se observó que cuando se les administra vino tinto (la fuente más abundante de RSV) disminuyen dramáticamente los niveles de fosforilación en Akt en el residuo de Treonina 308, modificación que es importante para su activación. De manera similar, se observó una disminución en la fosforilación de ERK1/2 en estas células con dicho tratamiento (78).

Otro restudio reciente demostró que el RSV imita estructuralmente a la tirosina y es capaz de unirse a la enzima tirosil tRNA sintetasa provocando su translocación al núcleo y la transcripción de genes protectores para el organismo, entre ellos p53 (79). Además, se demostró que en células de cáncer de mama, la unión del RSV al monómero β3 de la integrina αβV3 es esencial para la inducción de apoptosis dependiente de p53 en estas células (80).

FITOESTRÓGENOS COMO MODULADORES EPIGENÉTICOS

En los últimos años, muchos laboratorios han hecho hincapié en estudiar cómo los mecanismos epigenéticos están involucrados en el desarrollo y progresión del cáncer, muchos de estos estudios han incluido a los fitoestrógenos para intentar determinar si son o no útiles para su prevención o incluso su tratamiento (2, 81). Las modificaciones epigenéticas provocan cambios heredables en la expresión de genes sin que existan cambios en la secuencia de nucleótidos del DNA. Una gran variedad de procesos celulares son regulados a través de modificaciones epigenéticas, estos procesos incluyen la diferenciación, la impronta y el silenciamiento de grandes dominios cromosómicos como el cromosoma X. Estos cambios incluyen la metilación del DNA, modificaciones post-traduccionales de histonas y RNAs no codificantes (82).

La metilación del DNA es un proceso enzimático llevado a cabo por las DNA metil transferasas (DNMT, por sus siglas en inglés) que transfieren un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina (SAM, un donador universal de grupos metilo) hacia la posición 5 del anillo pirimídico de las citosina ubicadas en un contexto conocido como islas CpG (83). La metilación en regiones promotoras de muchos genes se ha asociado con una actividad transcripcional reprimida y se ha demostrado que las regiones que contienen DNA metilado están asociadas a regiones heterocromáticas (84).

La estructura de la cromatina también puede verse modificada por las modificaciones post-traduccionales en histonas. Se ha postulado desde hace algunos años, que las modificaciones post-traduccionales (MPT, por sus siglas en inglés) en las histonas actúan por separado y conjuntamente para formar un lenguaje o código que es leído por proteínas especializadas para facilitar las funciones río abajo de la cromatina (85). La acetilación es la modificación postraduccional más estudiada, la acetilación de los residuos de lisina presentes en las colas externas de las histonas H3 y H4 tiende a reducir las interacciones entre el DNA y los nucleosomas, permitiendo el acceso de diversos factores de transcripción. La acetilación es llevada a cabo por histonas acetiltransferasas (HAT, por sus

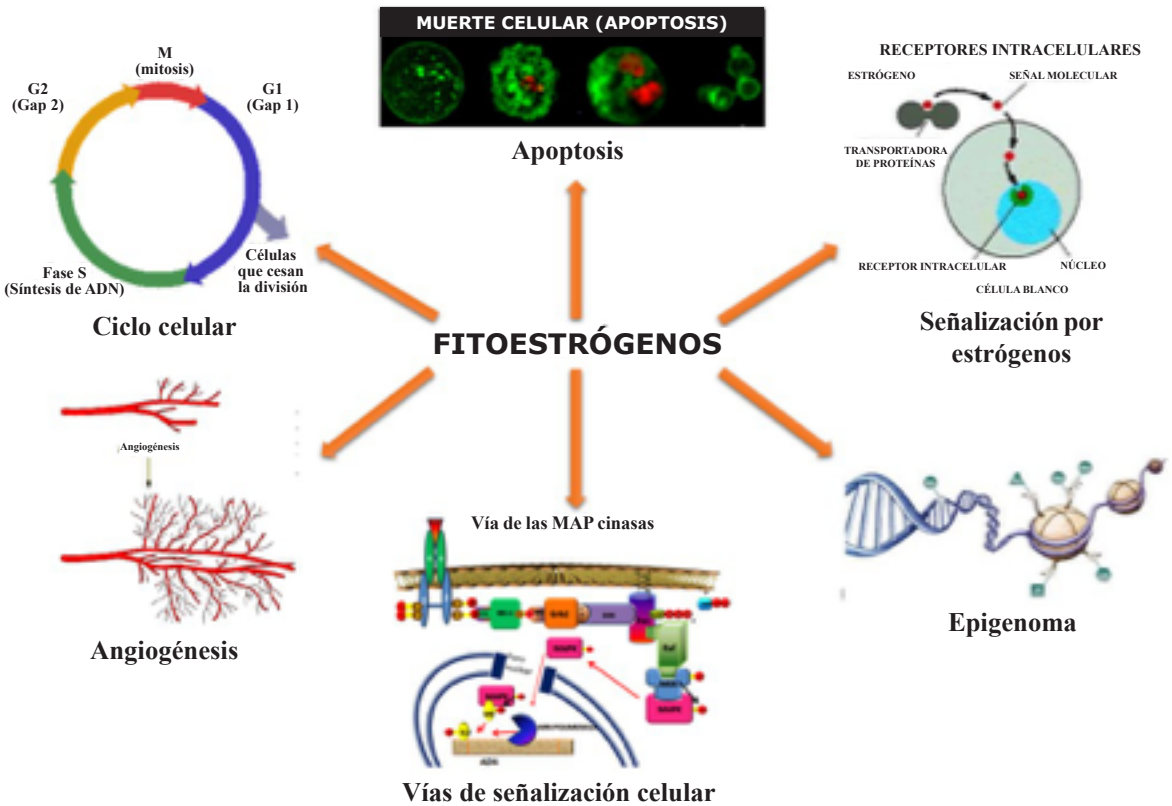


Figura 1. *Algunos blancos celulares de los fitoestrógenos. Los fitoestrógenos ejercen una gran cantidad de acciones a nivel celular. Estos efectos incluyen actividades estrogénicas o antiestrogénicas, modulación de vías de señalización, regulación del ciclo celular, inhibición enzimática, propiedades antioxidantes, angiogénesis y alteraciones epigenéticas.*

siglas en inglés) y el proceso opuesto por histonas desacetilasas (HDAC, por sus siglas en inglés) (86).

Se ha visto que en células de cáncer de mama negativas para ER-α, dosis de 20-40 µmol/L de genisteína estimulan la expresión de los supresores tumorales p21 y p16, lo cual fue asociado con una disminución en la actividad de HDAC (87). Además, se observó que la genisteína puede reactivar la expresión del ER-α en células deficientes de éste a través del enriquecimiento de las marcas de acetilación en el promotor proximal del ER-α (88).

Adicionalmente, en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 se ha visto que la genisteína, la curcumina y el RSV disminuyen la expresión de DNMT1, HDAC1 y la proteína de unión a CpG metilada 2 (MeCP2), proteínas que están involucradas con el establecimiento de heterocromatina y por lo tanto represión transcripcional, y además este efecto estuvo asociado con la reactivación transcripcional de p21 (89). Mediante análisis *in silico* se observó que el RSV tenía potencial de unirse al sitio activo de diversas HDAC de las clases I y II, y experimentalmente se determinó que disminuye la actividad de todas las HDAC conocidas en un modelo de hepatoblastoma, además de disminuir la proliferación de estas células en una manera dosis-dependiente (90).

Otro blanco del RSV es el gen del factor nuclear derivado de células eritroides 2 (*Nrf2*), que se encuentra silenciado en cáncer de mama y que codifica para un factor de transcripción que funciona como regulador de la respuesta antioxidante. Se observó que el RSV puede reactivar la expresión de *Nrf2*, así como de sus genes blanco en modelos *in vitro* e *in vivo* a través de la disminución de la metilación en la región proximal de su promotor, además de disminuir la expresión del microRNA miR-93, el cual puede unirse a la región no traducida 3´-UTR del mensajero de *Nrf2*, inhibiendo su traducción (91).

CONCLUSIONES

Los fitoestrógenos tienen múltiples blancos celulares (Fig. 1) y cada vez existe más evidencia emergente de que tienen la capacidad de modular procesos celulares que convergen en un efecto contra las células cancerosas. Los datos epidemiológicos pueden no ser tan claros, pero se observa un patrón constante

de menor incidencia de cáncer de mama (y otros tipos de cáncer) en poblaciones con alto consumo de fitoestrógenos. Es importante continuar realizando más investigaciones, para conocer a fondo sus mecanismos moleculares con la finalidad de poder desarrollar nuevas terapias ya sea solas, o en conjunto contra diversas condiciones, principalmente el cáncer; así como para entender el papel de la dieta en el establecimiento del proceso carcinogénico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto DGAPA-UNAM-PAPIIT IN217216 para A.Z.-H., y por la beca doctoral de CONACYT No. 434893 para E. I.-T.

REFERENCIAS

1. Duffy C, Perez K, Partridge A (2007) Implications of phytoestrogen intake for breast cancer. CA Cancer J Clin 57: 260-277.
2. Khan SI, Aumsuwan P, Khan IA, Walker LA, Dasmahapatra AK (2012) Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. Chem Res Toxicol 25: 61-73.
3. Messina M, McCaskill-Stevens W, Lampe JW (2006) Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. J Natl Cancer Inst 98: 1275-1284.
4. Ziegler RG (2004) Phytoestrogens and breast cancer. Am J Clin Nutr 79: 183-184.
5. Keinan-Boker L, van Der Schouw YT, Grobbee DE, Peeters PH (2004) Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. Am J Clin Nutr 79: 282-288.
6. Shimazu T, Inoue M, Sasazuki S, Iwasaki M, Sawada N, Yamaji T, Tsugane S, Group JS (2011) Plasma isoflavones and the risk of lung cancer in women: a nested case-control study in Japan. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 20: 419-427.
7. Yang WS, Va P, Wong MY, Zhang HL, Xiang YB (2011) Soy intake is associated with lower lung cancer risk: results from a meta-analysis of epidemiologic studies. Am J Clin Nutr 94: 1575-1583.
8. Ko KP, Park SK, Park B, Yang JJ, Cho LY, Kang C, Kim CS, Gwack J, Shin A, Kim Y, Kim J, Yang HK, Kang D, Chang SH, Shin HR, Yoo KY (2010) Isoflavones from phytoestrogens and gastric cancer risk: a nested case-control study within the Korean Multicenter Cancer Cohort. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 19: 1292-1300.
9. He J, Wang S, Zhou M, Yu W, Zhang Y, He X (2015) Phytoestrogens and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. World J Surg Oncol 13: 231.
10. Zhang Q, Feng H, Qluwakemi B, Wang J, Yao S, Cheng G, Xu H, Qiu H, Zhu L, Yuan M (2017) Phytoestrogens and risk of prostate cancer: an updated meta-analysis of epidemiologic studies. Int J Food Sci Nutr 68: 28-42.
11. Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM (2006) Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. Mol Cell Endocrinol 254-255: 179-186.
12. Haselkorn T, Stewart SL, Horn-Ross PL (2003) Why are thyroid cancer rates so high in southeast asian women living in the United States? The bay area thyroid cancer study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 12: 144-150.
13. Persson I (2000) Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers - evidence and hypotheses from epidemiological findings. J Steroid Biochem Mol Biol 74: 357-364.
14. Eden JA (2012) Phytoestrogens for menopausal symptoms: a review. Maturitas 72: 157-159.
15. Qu XL, Fang Y, Zhang M, Zhang YZ (2014) Phytoestrogen intake and risk of ovarian cancer: a meta- analysis of 10 observational studies. Asian Pac J Cancer Prev 15: 9085-9091.
16. Bilal I, Chowdhury A, Davidson J, Whitehead S (2014) Phytoestrogens and prevention of breast cancer: The contentious debate. World J Clin Oncol 5: 705-712.
17. Webb AL, McCullough ML (2005) Dietary lignans: potential role in cancer prevention. Nutr Cancer 51: 117-131.
18. Cornwell T, Cohick W, Raskin I (2004) Dietary phytoestrogens and health. Phytochemistry 65: 995-1016.
19. Messina MJ, Loprinzi CL (2001) Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. J Nutr 131: 3095S-3108S.

20. Liggins J, Bluck LJ, Runswick S, Atkinson C, Coward WA, Bingham SA (2000) Daidzein and genistein contents of vegetables. Br J Nutr 84: 717-725.
21. Knight DC, Eden JA (1996) A review of the clinical effects of phytoestrogens. Obstet Gynecol 87: 897-904.
22. Mortensen A, Kulling SE, Schwartz H, Rowland I, Ruefer CE, Rimbach G, Cassidy A, Magee P, Millar J, Hall WL, Kramer Birkved F, Sorensen IK, Sontag G (2009) Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects. Mol Nutr Food Res 53 Suppl 2: S266-309.
23. Patisaul HB, Jefferson W (2010) The pros and cons of phytoestrogens. Front Neuroendocrinol 31: 400-419.
24. Vitale DC, Piazza C, Melilli B, Drago F, Salomone S (2013) Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 38: 15-25.
25. Atkinson C, Frankenfeld CL, Lampe JW (2005) Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. Exp Biol Med (Maywood) 230: 155-170.
26. Karr SC, Lampe JW, Hutchins AM, Slavin JL (1997) Urinary isoflavonoid excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy-protein consumption. Am J Clin Nutr 66: 46-51.
27. Verkasalo PK, Appleby PN, Allen NE, Davey G, Adlercreutz H, Key TJ (2001) Soya intake and plasma concentrations of daidzein and genistein: validity of dietary assessment among eighty British women (Oxford arm of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition). Br J Nutr 86: 415-421.
28. Leclercq G, Jacquot Y (2014) Interactions of isoflavones and other plant derived estrogens with estrogen receptors for prevention and treatment of breast cancer-considerations concerning related efficacy and safety. J Steroid Biochem Mol Biol 139: 237-244.
29. Jenkins S, Betancourt AM, Wang J, Lamartiniere CA (2012) Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention. J Steroid Biochem Mol Biol 129: 191-200.
30. Rietjens IM, Sotoca AM, Vervoort J, Louisse J (2013) Mechanisms underlying the dualistic mode of action of major soy isoflavones in relation to cell proliferation and cancer risks. Mol Nutr Food Res 57: 100-113.
31. Murkies AL, Wilcox G, Davis SR (1998) Clinical review 92: Phytoestrogens. J Clin Endocrinol Metab 83: 297-303.
32. Wang TT, Sathyamoorthy N, Phang JM (1996) Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. Carcinogenesis 17: 271-275.
33. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Ha Ggblad J, Nilsson S, Gustafsson JK (1997) Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors alpha and beta. Endocrinology 138: 863-870.
34. Freyberger A, Schmuck G (2005) Screening for estrogenicity and anti-estrogenicity: a critical evaluation of an MVLN cell-based transactivation assay. Toxicol Lett 155: 1-13.
35. Totta P, Acconcia F, Virgili F, Cassidy A, Weinberg PD, Rimbach G, Marino M (2005) Daidzein-sulfate metabolites affect transcriptional and antiproliferative activities of estrogen receptor-beta in cultured human cancer cells. J Nutr 135: 2687-2693.
36. Magee PJ, Rowland IR (2004) Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. Br J Nutr 91: 513-531.
37. de Lemos ML (2001) Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. Ann Pharmacother 35: 1118-1121.
38. An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, Lomri N, Leitman DC (2001) Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. J Biol Chem 276: 17808-17814.
39. Brzezinski A, Debi A (1999) Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 85: 47-51.
40. Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA (2004) Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 1566-1571.
41. Rice S, Mason HD, Whitehead SA (2006) Phytoestrogens and their low dose combinations inhibit mRNA expression and activity of aromatase in human granulosa-luteal cells. J Steroid Biochem Mol Biol 101: 216-225.
42. Rice S, Whitehead SA (2006) Phytoestrogens and breast cancer--promoters or protectors? Endocr Relat Cancer 13: 995-1015.
43. Islam MA, Bekele R, Vanden Berg JH, Kuswanti Y, Thapa O, Soltani S, van Leeuwen FX, Rietjens IM, Murk AJ (2015) Deconjugation of soy isoflavone glucuronides needed for estrogenic activity. Toxicol In Vitro 29: 706-715.

44. Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG (1998) Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. Cancer Res 58: 3833-3838.
45. Lecomte S, Demay F, Ferriere F, Pakdel F (2017) Phytochemicals Targeting Estrogen Receptors: Beneficial Rather Than Adverse Effects? Int J Mol Sci 18
46. Rietjens I, Louisse J, Beekmann K (2017) The potential health effects of dietary phytoestrogens. Br J Pharmacol 174: 1263-1280.
47. Martin KR (2007) Using nutrigenomics to evaluate apoptosis as a preemptive target in cancer prevention. Curr Cancer Drug Targets 7: 438-446.
48. Mathers JC, Coxhead JM, Tyson J (2007) Nutrition and DNA repair--potential molecular mechanisms of action. Curr Cancer Drug Targets 7: 425-431.
49. Baldwin AS, Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol 14: 649-683.
50. Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene 18: 6853-6866.
51. Cal C, Garban H, Jazirehi A, Yeh C, Mizutani Y, Bonavida B (2003) Resveratrol and cancer: chemoprevention, apoptosis, and chemo-immunosensitizing activities. Curr Med Chem Anticancer Agents 3: 77-93.
52. Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, Harris D, Van Q, Kantarjian HM, Talpaz M, Aggarwal BB (2003) Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. Blood 102: 987-995.
53. Ii M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y (2006) Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. Exp Biol Med (Maywood) 231: 20-27.
54. Stakleff KS, Sloan T, Blanco D, Marcanthony S, Booth TD, Bishayee A (2012) Resveratrol exerts differential effects in vitro and in vivo against ovarian cancer cells. Asian Pac J Cancer Prev 13: 1333-1340.
55. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA (2007) Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. Physiol Rev 87: 905-931.
56. Barnes S (2010) The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. Lymphat Res Biol 8: 89-98.
57. Shimizu M, Weinstein IB (2005) Modulation of signal transduction by tea catechins and related phytochemicals. Mutat Res 591: 147-160.
58. Anastasius N, Boston S, Lacey M, Storing N, Whitehead SA (2009) Evidence that low-dose, long-term genistein treatment inhibits oestradiol-stimulated growth in MCF-7 cells by down-regulation of the PI3-kinase/Akt signalling pathway. J Steroid Biochem Mol Biol 116: 50-55.
59. Cotrim CZ, Fabris V, Doria ML, Lindberg K, Gustafsson JA, Amado F, Lanari C, Helguero LA (2013) Estrogen receptor beta growth-inhibitory effects are repressed through activation of MAPK and PI3K signalling in mammary epithelial and breast cancer cells. Oncogene 32: 2390-2402.
60. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144: 646-674.
61. Tobin NP, Bergh J (2012) Analysis of Cyclin D1 in Breast Cancer: A Call to Arms. Curr Breast Cancer Rep 4: 171-173.
62. Hsieh TC, Wu JM (2008) Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and gamma-tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. Int J Oncol 33: 851-859.
63. Rahal OM, Simmen RC (2010) PTEN and p53 cross-regulation induced by soy isoflavone genistein promotes mammary epithelial cell cycle arrest and lobuloalveolar differentiation. Carcinogenesis 31: 1491-1500.
64. Chu IM, Hengst L, Slingerland JM (2008) The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. Nat Rev Cancer 8: 253-267.
65. May P, May E (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. Oncogene 18: 7621-7636.
66. Sakamoto T, Horiguchi H, Oguma E, Kayama F (2010) Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. J Nutr Biochem 21: 856-864.
67. Seo HS, Ju JH, Jang K, Shin I (2011) Induction of apoptotic cell death by phytoestrogens by up-regulating the levels of phospho-p53 and p21 in normal and malignant estrogen receptor alpha-negative breast cells. Nutr Res 31: 139-146.

68. Choi EJ, Kim GH (2008) Daidzein causes cell cycle arrest at the G1 and G2/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-453 cells. Phytomedicine 15: 683-690.
69. Eto I (2006) "Nutritional and chemopreventive anti-cancer agents up-regulate expression of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse JB6 epidermal and human MCF7, MDA-MB-321 and AU565 breast cancer cells". Cancer Cell Int 6: 20.
70. Privat M, Aubel C, Arnould S, Communal Y, Ferrara M, Bignon YJ (2010) AKT and p21 WAF1/CIP1 as potential genistein targets in BRCA1-mutant human breast cancer cell lines. Anticancer Res 30: 2049-2054.
71. Lavigne JA, Takahashi Y, Chandramouli GV, Liu H, Perkins SN, Hursting SD, Wang TT (2008) Concentration-dependent effects of genistein on global gene expression in MCF-7 breast cancer cells: an oligo microarray study. Breast Cancer Res Treat 110: 85-98.
72. Rodriguez M, Schaper J (2005) Apoptosis: measurement and technical issues. J Mol Cell Cardiol 38: 15-20.
73. McIlwain DR, Berger T, Mak TW (2013) Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 5: a008656.
74. Chen FP, Chien MH (2014) Phytoestrogens induce apoptosis through a mitochondria/caspase pathway in human breast cancer cells. Climacteric 17: 385-392.
75. Chen FP, Chien MH (2014) Phytoestrogens induce differential effects on both normal and malignant human breast cells in vitro. Climacteric 17: 682-691.
76. Seo HS, Choi HS, Choi HS, Choi YK, Um JY, Choi I, Shin YC, Ko SG (2011) Phytoestrogens induce apoptosis via extrinsic pathway, inhibiting nuclear factor-kappaB signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. Anticancer Res 31: 3301-3313.
77. Izquierdo-Torres E, Rodriguez G, Meneses-Morales I, Zarain-Herzberg A (2017) ATP2A3 gene as an important player for resveratrol anticancer activity in breast cancer cells. Mol Carcinog 56: 1703-1711.
78. Barron CC, Moore J, Tsakiridis T, Pickering G, Tsiani E (2014) Inhibition of human lung cancer cell proliferation and survival by wine. Cancer Cell Int 14: 6.
79. Sajish M, Schimmel P (2015) A human tRNA synthetase is a potent PARP1-activating effector target for resveratrol. Nature 519: 370-373.
80. Lin HY, Lansing L, Merillon JM, Davis FB, Tang HY, Shih A, Vitrac X, Krisa S, Keating T, Cao HJ, Bergh J, Quackenbush S, Davis PJ (2006) Integrin alphaVbeta3 contains a receptor site for resveratrol. FASEB J 20: 1742-1744.
81. Huang Y, Nayak S, Jankowitz R, Davidson NE, Oesterreich S (2011) Epigenetics in breast cancer: what's new? Breast Cancer Res 13: 225.
82. Jones PA, Baylin SB (2007) The epigenomics of cancer. Cell 128: 683-692.
83. Gronbaek K, Hother C, Jones PA (2007) Epigenetic changes in cancer. APMIS 115: 1039-1059.
84. Fuks F (2005) DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. Curr Opin Genet Dev 15: 490-495.
85. Rothbart SB, Strahl BD (2014) Interpreting the language of histone and DNA modifications. Biochim Biophys Acta 1839: 627-643.
86. Fucito A, Lucchetti C, Giordano A, Romano G (2008) Genetic and epigenetic alterations in breast cancer: what are the perspectives for clinical practice? Int J Biochem Cell Biol 40: 565-575.
87. Li Y, Chen H, Hardy TM, Tollefsbol TO (2013) Epigenetic regulation of multiple tumor-related genes leads to suppression of breast tumorigenesis by dietary genistein. PLoS One 8: e54369.
88. Li Y, Meeran SM, Patel SN, Chen H, Hardy TM, Tollefsbol TO (2013) Epigenetic reactivation of estrogen receptor-alpha (ERalpha) by genistein enhances hormonal therapy sensitivity in ERalpha-negative breast cancer. Mol Cancer 12: 9.
89. Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta SD, Pandya P, Ralhan R (2013) Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins. J Breast Cancer 16: 23-31.
90. Venturelli S, Berger A, Bocker A, Busch C, Weiland T, Noor S, Leischner C, Schleicher S, Mayer M, Weiss TS, Bischoff SC, Lauer UM, Bitzer M (2013) Resveratrol as a pan-HDAC inhibitor alters the acetylation status of histone [corrected] proteins in human-derived hepatoblastoma cells. PLoS One 8: e73097.
91. Singh B, Shoulson R, Chatterjee A, Ronghe A, Bhat NK, Dim DC, Bhat HK (2014) Resveratrol inhibits estrogen-induced breast carcinogenesis through induction of NRF2-mediated protective pathways. Carcinogenesis 35: 1872-1880.

LA ENZIMA GLUCÓGENO SINTASA CINASA 3 REGULA LA ACTIVIDAD DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NF-κB Y CREB DURANTE LA RESPUESTA INFLAMATORIA CAUSADA POR *Staphylococcus aureus**

Alejandro Huante Mendoza, Octavio Silva García, Rosa Rico Mata, María Cristina Maldonado Pichardo y Víctor Manuel Baizabal Aguirre

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km. 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro s/n, C.P. 58893, Morelia, Michoacán, correos E: baizabal@umich.mx, vmbaiza@gmail.com

RESUMEN

La enzima glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) es una proteína cinasa de Ser/Thr, que regula la expresión de citocinas durante la respuesta inflamatoria. GSK3 modula la actividad del factor nuclear κB (NF-κB) y de la proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB). En esta revisión se presenta uno de los mecanismos reguladores de la actividad de GSK3 y su efecto en las infecciones por *Staphylococcus aureus*.

PALABRAS CLAVE:
GSK3, NF-κB, CREB, inflamación, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The enzyme glycogen synthase kinase 3 (GSK3) is a Ser/Thr kinase that regulates the expression of cytokines during the inflammatory response by modulating the activity of nuclear factor κB (NF-κB) and cAMP response element-binding protein (CREB). This review presents one of the mechanisms that regulate GSK3 activity and its effect on *Staphylococcus aureus* infections.

KEY WORDS:
GSK3, NF-κB, CREB, inflammation, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra agentes infecciosos, y consiste de una red interactiva de sistemas moleculares y celulares responsable de reconocer y eliminar microorganismos patógenos. Este tipo de inmunidad incluye una amplia variedad de cambios en la célula, cuyo objetivo es producir moléculas que coadyuven a eliminar al patógeno (1). La habilidad del sistema inmune innato de reconocer y responder a componentes microbianos se debe a la presencia de receptores tipo Toll (TLRs) (2, 3). Los TLR están presentes tanto en fagocitos profesionales (monocitos, macrófagos y células dendríticas) como en no profesionales como las células epiteliales y endoteliales. Estos receptores pueden discriminar entre distintos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que conducen a la activación de una variedad de vías de transducción de señales, las cuales regulan la naturaleza, magnitud y duración de la respuesta inflamatoria (4). La reacción inflamatoria es muy importante en la respuesta inicial a la infección y en ella participan neutrófilos, monocitos, macrófagos, moléculas del complemento, citocinas, quimiocinas, así como también proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana, que contribuyen coordinadamente a eliminar al patógeno del tejido infectado. Aunque la producción de citocinas pro-inflamatorias es importante para regular la defensa inicial del hospedero contra los patógenos invasores, la incapacidad de modular la intensidad o duración de la respuesta inflamatoria puede ser perjudicial y dar lugar a enfermedades inflamatorias crónicas (5).

En la última década, el interés se ha enfocado en explicar el mecanismo por el que las células participantes en la respuesta inflamatoria inicial

*Recibido: 6 de septiembre de 2017 Aceptado: 21 de octubre de 2017

expresan citocinas pro-inflamatorias (p.ej. interleucina 8, IL-8) y más tarde apagan esta expresión y activan la síntesis de citocinas anti-inflamatorias (p.ej. IL-10), disminuyendo con ello la inflamación. En este sentido, se ha observado que uno de los principales mecanismos moduladores de la expresión de citocinas con actividad pro- y anti-inflamatoria es el que está mediado por la vía de señalización constituida por las enzimas fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), Akt (denominada también proteína cinasa B, PKB) y glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), activada por TLR (6, 7). Se ha propuesto que la activación de GSK3 es fundamental para inducir la producción de citocinas que promueven la inflamación (IL-8) o la disminuyen (IL-10), por medio de un mecanismo que involucra la participación de los factores de transcripción factor nuclear-kappa B (NF-κB) y la proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB) (7).

En este trabajo se explicarán brevemente algunos de los principales conceptos de la respuesta inflamatoria, para después discutir la función de GSK3 como una enzima mediadora importante de la vía de transducción PI3K/Akt. Con esta información abordaremos con mayor detalle algunos aspectos mecanísticos de GSK3, lo que dará lugar a entender mejor la regulación que ejerce esta enzima sobre NF-κB y CREB en la respuesta inflamatoria. Por último, se describirán algunos resultados de nuestro laboratorio, donde evaluamos la regulación de la expresión de citocinas por GSK3 y una de las perspectivas de investigación que tenemos a mediano plazo.

LA RESPUESTA INFLAMATORIA

La inflamación es el primer proceso fisiológico de respuesta a un daño o infección de un tejido y es fundamental tanto para la inmunidad innata como la adaptativa. Cuando un tejido es infectado por bacterias patógenas se activa un programa de respuesta que incluye la expresión de citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos y aminas bioactivas por diversos tipos de células como monocitos, células dendríticas, células asesinas naturales ("*natural killer cells*") y mastocitos. Entre las múltiples funciones de estos factores, una muy importante es el incremento de la permeabilidad vascular que conduce a la extravasación de leucocitos polimorfonucleares al sitio de infección. La mayor cantidad de información molecular que se tiene hasta ahora sobre el proceso inflamatorio proviene de estudios sobre componentes de las vías de transducción activados por el receptor al factor de necrosis tumoral (TNFR), el receptor a IL-1 y los TLR (8). Las citocinas pro-inflamatorias predominantemente producidas son el factor de necrosis tumoral (TNF), IL-1, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23 e IL-27 (9). Estos péptidos activan procesos citotóxicos, celulares, humorales y alérgicos, que en conjunto tienen la finalidad de eliminar al agente causal del daño al tejido.

Es importante mencionar que la respuesta inflamatoria está sujeta a una regulación estricta, de tal forma que, una vez cumplido el objetivo de eliminar la causa de la inflamación, las mismas células involucradas cambian su programa genético para expresar ahora mediadores anti-inflamatorios, cuyo objetivo es restaurar la homeostasis. Cuando este programa anti-inflamatorio falla puede haber daño al tejido, lo que en ocasiones deriva en inflamación crónica y enfermedad (10). Se han identificado citocinas que tienen principalmente una función anti-inflamatoria, por ejemplo el antagonista del receptor a IL-1 (IL-1Ra), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), IL-10 e IL-35 (11).

Tal cambio de actividad celular pro-inflamatoria a anti-inflamatoria resulta relativamente fácil de entender si echamos andar nuestra lógica al formular preguntas como ¿qué sucedería si la respuesta inflamatoria continuara indefinidamente? La respuesta creo que es obvia, nuestros órganos se alterarían a tal grado que se perderían las funciones que mantienen al organismo en homeostasis. Para explicar el tránsito de mecanismos pro-inflamatorios a anti-inflamatorios, lo primero que se pensó fue que a medida que transcurría la inflamación, el tejido iba recuperando la homeostasis porque los mediadores pro-inflamatorios se iban degradando. Es decir, no se consideraba que las mismas células iniciadoras de la inflamación pudieran ser capaces de inhibir la expresión de moléculas pro-inflamatorias y activar la expresión y secreción de moléculas anti-inflamatorias. Esta forma de conceptualizar la respuesta inflamatoria ha cambiado y ahora se acepta que hay moléculas que son críticas para controlar el cambio de actividad pro- a anti-inflamatoria. Una de estas moléculas es la enzima GSK3 descubierta en 1980 por su efecto regulador de la síntesis de glucógeno (12). Sin embargo, la evidencia acumulada indica, sin lugar a dudas, que GSK3 tiene múltiples funciones, como su participación en el control de la inflamación (13). Durante la respuesta inflamatoria la activación de Akt regula la actividad de GSK3, por lo que a continuación estudiaremos un poco acerca de la vía de transducción que activa a Akt.

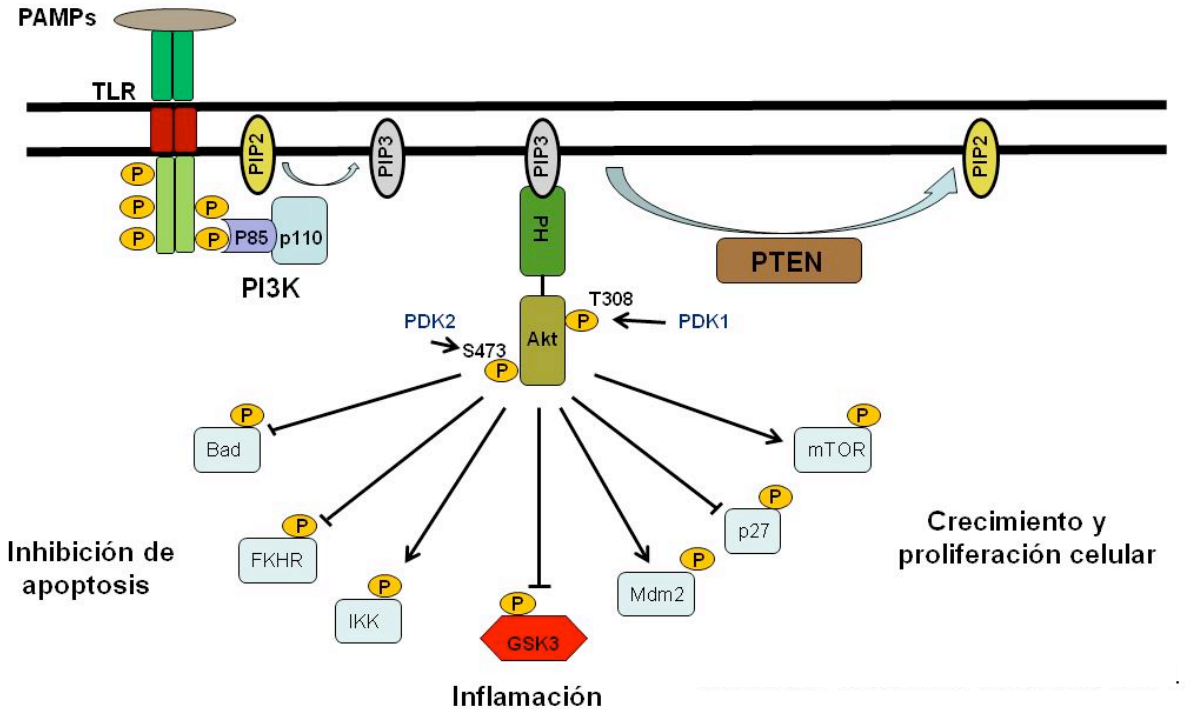


Figura 1. Modificado de referencia 14

CARACTERÍSTICAS Y MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN PI3K/Akt/GSK3

La enzima PI3K es un heterodímero constituido por una subunidad catalítica de 110 kDa (p110) y una subunidad reguladora de 85 kDa (p85). De acuerdo con su estructura y mecanismo de activación las PI3K se clasifican en varias familias. Las enzimas de la clase IA (principales responsables de la producción de 3'-fosfoinosítidos) son activadas por receptores que tienen actividad de tirosina cinasa (RPTKs) y las que pertenecen a la clase IB por receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Dentro de la clase IA se han caracterizado tres isoformas de p110, denominadas α, β y γ, y siete isoformas de p85 que se sintetizan por procesamiento alternativo de tres genes, *p85*α, *p85*β y *p85*γ (14). La segunda enzima de la vía, denominada Akt/PKB, fue caracterizada como un homólogo del oncogén viral *v-akt*, que se considera responsable de causar leucemia en ratones (15). Debido a que *v-akt* y su contraparte en humanos presentan similitud con PKA y PKC, a esta nueva proteína cinasa de Ser/Thr se le llamó inicialmente PKB. Existen tres isoformas de Akt, Akt1, Akt2 y Akt3, con un 80% de homología entre ellas, aunque son codificadas por genes diferentes. Las tres Akt tienen en su región N-terminal un dominio de unión a plekstrina (PH) de aproximadamente 100 aminoácidos, que le permite anclarse a la membrana plasmática mediante su interacción con 3'-fosfoinosítidos. Para activarse al 100%, Akt debe ser fosforilada en Thr 308 (localizada en su dominio catalítico) y en Ser 473 (localizada en su región C-terminal). La interacción de factores de crecimiento con RPTKs y de PAMPs (p.ej. péptidoglicano, PGN; ácido lipoteicoico, LTA y lipopolisacárido, LPS) con TLRs da lugar a la activación de Akt (16, 17).

La activación de la vía PI3K-Akt se inicia cuando un estímulo (p.ej. factores de crecimiento o PAMPs) promueve la fosforilación de residuos de Tyr en el dominio citosólico de los receptores (Fig. 1). Estas fosfo-Tyr son reconocidas por el dominio SH2 de p85, lo que trae como consecuencia la activación alostérica de p110 y la producción de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP_3). La presencia de PIP_3 en la capa interna de la membrana plasmática funciona como un mediador esencial para el funcionamiento de la vía PI3K-Akt, en la que participan PI3Ks de la clase IA. En esta vía, las dos enzimas que contienen dominios PH y, por lo tanto, pueden reconocer a PIP_3 son la cinasa de Ser/Thr dependiente de 3'-fosfoinosítido (PDK1), constitutivamente activa, y Akt. La interacción del dominio PH de Akt con PIP3 cambia la conformación de Akt y expone sus sitios de fosforilación Thr308 y Ser473, los cuales son fosforilados por PDK1 y PDK2 (denominada también complejo diana de rapamicina de mamíferos, mTORC2), respec-

tivamente. Una vez activada, Akt fosforila una diversa variedad de sustratos, entre los cuales se encuentra GSK3, modulando así una variedad de procesos celulares como apoptosis, proliferación y sobrevivencia celular, e inflamación.

GSK3 MODULA LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS CON ACTIVIDAD PRO- Y ANTI-INFLAMATORIA

GSK3 es una enzima constitutivamente activa muy importante en múltiples procesos biológicos, debido a que es el punto de convergencia de varias vías de señalización y porque regula la actividad de más de 50 sustratos (18). Su secuencia de aminoácidos está altamente conservada en eucariontes y se han caracterizado dos isoformas α y β, que aparentemente no son redundantes porque la interrupción de la isoforma β en ratones resulta en letalidad embrionaria; esto significa que GSK3α es incapaz de compensar la pérdida de GSK3β (19). Debido a la amplia influencia que GSK3 tiene en diversas funciones celulares, la actividad de GSK3 está regulada por diferentes mecanismos. Por ejemplo, su actividad puede ser inhibida por la fosforilación de residuos de Ser en la región N-terminal (Ser21 en GSK3α y Ser9 en GSK3β). Además, la actividad de GSK3 también está controlada por su asociación con proteínas de anclaje y su localización intracelular (6). Se ha demostrado que la activación o inhibición de GSK3 tiene una función importante en la regulación de la respuesta inmune al ejercer un control, mediado por TLRs, de la producción de citocinas con actividad anti- y pro-inflamatoria (7).

Las vías de señalización activadas por TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9 son fundamentales para regular la producción de las citocinas pro-inflamatorias (p.ej. IL-1β, TNF-α, IL-8) y anti-inflamatoria (p.ej. IL-4, IL-10) (20, 7, 21). El mecanismo por el que estos TLR regulan la expresión de citocinas que intervienen en la inflamación se estudió en monocitos estimulados con LPS (7). Los datos obtenidos indicaron que la inhibición de GSK3β, pero no de GSK3α, redujo los niveles de las citocinas pro-inflamatorias y aumentó la expresión de IL-10, en respuesta a los agonistas de TLR, LTA (TLR2), lípido A sintético (TLR4), flagelina (TLR5) y CpG (TLR9). La inhibición de GSK3 ejerció un efecto regulador diferencial en la asociación de NF-κB (promueve la expresión de citocinas pro-inflamatorias) y CREB (promueve la expresión de citocinas anti-inflamatorias) con el co-activador nuclear, proteína de unión a CREB (CBP), es decir, GSK3 inactiva causó un aumento en la actividad de unión de CREB al DNA y, al mismo tiempo, inhibió apreciablemente la actividad nuclear de NF-κB (7). De esta manera, la interacción de NF-κB y CREB con CBP, regulada por la actividad de GSK3, ocupa un lugar preeminente con respecto a la naturaleza y magnitud de la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias, lo que resulta en la modulación adecuada y precisa de la inflamación.

GSK3α Y GSK3β REGULAN DIFERENCIALMENTE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN CÉLULAS ENDOTELIALES INFECTADAS CON *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram$^+$ causante de importantes enfermedades infecciosas en seres humanos y animales. Esta bacteria expresa una amplia variedad de factores de virulencia y PAMPs que inducen inflamación y son responsables de dañar al tejido (22). Las células del hospedero reconocen los PAMPs de *S. aureus* por medio del receptor TLR2. La interacción de estos PAMPs con TLR2 activa la vía de señalización PI3K/Akt/GSK3, lo cual da lugar a cierto número de respuestas celulares tales como proliferación, diferenciación, sobrevivencia, apoptosis e inflamación (23).

La participación de GSK3α y GSK3β en infecciones por *Staphylococcus aureus* se observó por primera vez cuando la internalización de esta bacteria en células endoteliales produjo un incremento en la fosforilación e inhibición de la actividad de ambas isoformas de GSK3 (24). Un aspecto interesante de ese estudio fue que GSK3α alcanzó un nivel de fosforilación y de inhibición mayor que GSK3β. Esta evidencia experimental indicó que no solo GSK3β está involucrada en procesos de infección e inflamación causados por bacterias patógenas, como se ha descrito ampliamente en la literatura (13), sino que también GSK3α podría tener una función preponderante. Más adelante se pudo demostrar que ambas isoformas de GSK3 regulan la expresión de IL-12p40 en células endoteliales estimuladas con PGN de *S. aureus* (25). Esta citocina es muy importante porque controla la respuesta inmune innata durante la infección bacteriana y determina el tipo y duración de la respuesta inmune adaptativa. IL-12p40 es altamente inducible por LPS, LTA y PGN, por su interacción con TLRs y activación de la vía NF-κB (26). Aunque la función de IL-12p40 promueve un desarrollo apropiado de la respuesta inflamatoria inicial, su sobreexpresión es perjudicial para el tejido. Por ello, las células contrarrestan los efectos de esta citocina produciendo IL-10, que disminuye la actividad de NF-κB y aumenta la actividad de CREB. Los datos de Cortés-Vieyra et al. (25) indicaron que la vía PI3K/Akt/GSK3 se activó por efecto de PGN, lo que se correlacionó con cambios en la actividad de GSK3α y GSK3β. Los autores pudieron establecer que la inhibición de la actividad de GSK3α indujo un incremento en la expresión de IL-12p40, mientras

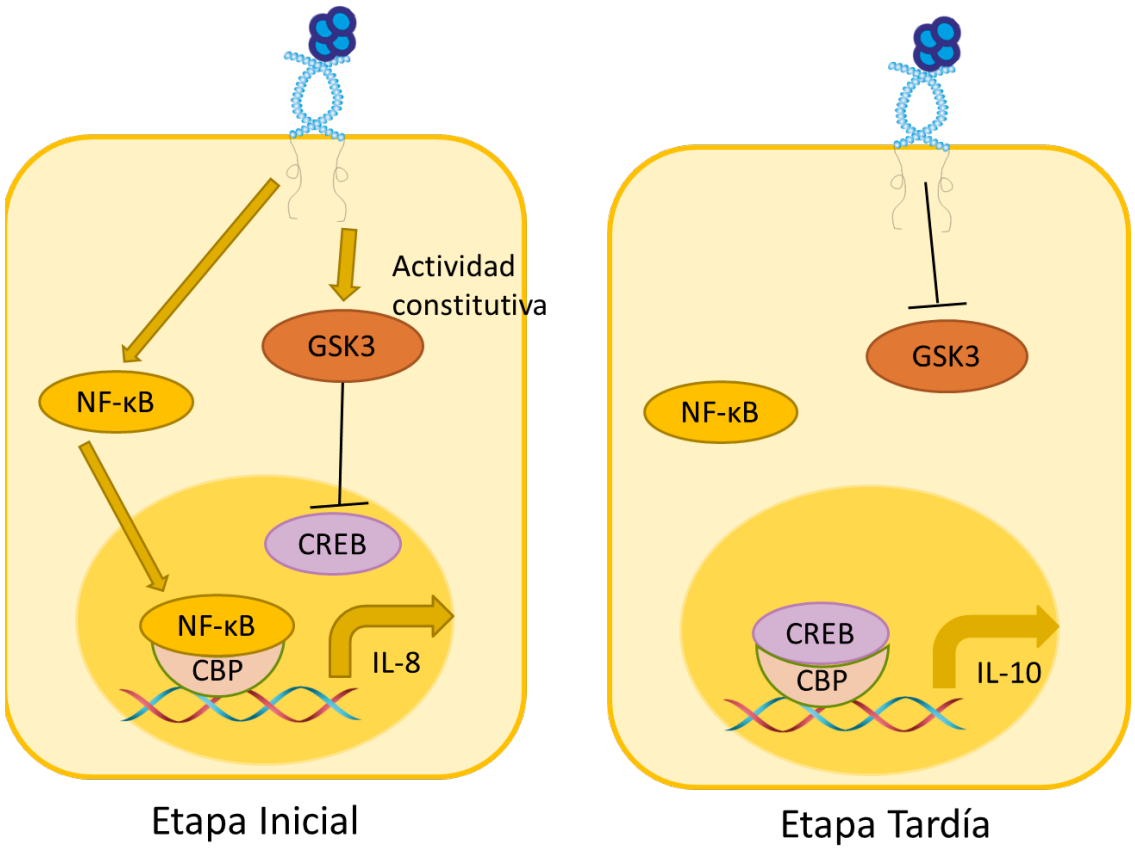


Figura 2.

que la inhibición de la actividad de GSK3β resultó en una expresión disminuida de esta citocina.

Los resultados más recientes obtenidos en nuestro grupo (Silva-García O y Baizabal-Aguirre VM, manuscrito enviado) han mostrado que la actividad de GSK3α y, en menor grado, GSK3β en células endoteliales infectadas por *S. aureus* durante 60 min ejerció un efecto inhibidor de la activación de CREB, limitando con ello su actividad transcripcional y promoviendo la actividad de NF-κB, el cual a su vez indujo la expresión de la citocina pro-inflamatoria IL-8. Cuando se ensayaron tiempos de infección de 120 min observamos que GSK3α/β alcanzó su fosforilación e inhibición máxima por Akt, lo cual inhibió indirectamente la actividad transcripcional de NF-κB. Esto causó un aumento en la actividad transcripcional de CREB, lo que estimuló la expresión de la citocina anti-inflamatoria y tolerogénica IL-10, y disminuyó simultáneamente la expresión de IL-8 (Fig. 2). Con base en estos resultados creemos que este mecanismo de "*switch*" molecular de la activación de un factor transcripcional pro-inflamatorio (NF-κB) en la fase inicial de la infección, a la activación de un factor transcripcional anti-inflamatorio (CREB) en la fase tardía de la infección por *S. aureus* explicaría en parte por qué las infecciones causadas por esta bacteria transitan de una fase de inflamación aguda a una fase de inflamación crónica.

Estos datos plantean la posibilidad de que GSK3α y GSK3β ejerzan una regulación diferencial de la expresión de genes pro- y anti-inflamatorios, por medio de la modulación de la actividad transcripcional de NF-κB, CREB y probablemente otros factores, dependiendo del tipo de célula infectada y de la bacteria en turno. En este contexto, uno de los objetivos a mediano plazo en nuestro laboratorio es realizar un análisis transcriptómico y proteómico global de los genes regulados por cada una de las isoformas de GSK3 cuando *S. aureus* infecta células endoteliales y epiteliales de humano. Esta evaluación *ómica* se combinará también con la identificación de factores de virulencia expresados por la bacteria y que son los responsables de activar NF-κB en fase temprana y CREB en fase tardía de la infección. Toda esta información que se genere sentará las bases para diseñar una estrategia biotecnológica cuya finalidad será eliminar *S. aureus* y promover la recuperación de la homeostasis celular.

AGRADECIMIENTOS

VMBA agradece los apoyos recibidos por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Ciencia Básica 152518), y Coordinación de la Investigación

Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). RRM, recibió beca de CONACYT para estancia posdoctoral. AHM recibió beca de CONACYT para estudios de doctorado y MCMP recibe beca de CONACYT para estudios de maestría.

REFERENCIAS

1. Gomperts BD, Kramer IM, Tatham PER (2003) Signal Transduction. Academic Press. Elsevier Science, Orlando, FL, USA.
2. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 388: 394–397.
3. Yang RB (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. Nature 395: 284–288.
4. Dinarello CA (2000) Proinflammatory cytokines. Chest 118: 503–508.
5. O'Neill LA, Dinarello CA (2000) The IL-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. Immunol Today 21: 206–209.
6. Jope RS, Johnson G (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. Trends Biochem Sci 29: 95-102.
7. Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM (2005) Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. Nat Immunol 6: 777-784.
8. Lawrence T, Fong C (2010) The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. Int J Biochem Cell Biol 42: 519–523.
9. Steinke JW, Borish L (2006) Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol 117: S441–S445.
10. Lawrence T, Gilroy DW (2007) Chronic inflammation: a failure of resolution? Int J Exp Pathol 88: 85–94.
11. Commins SP, Borish L, Steinke JW (2010) Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. J Allergy Clin Immunol 125: 53–S72.
12. Embi N, Rylatt DB, Cohen P (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. Eur J Biochem 107: 519–527.
13. Cortés-Vieyra R, Bravo-Patiño A, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Finlay BB, Baizabal-Aguirre VM (2012) Role of glycogen synthase kinase-3 beta in the inflammatory response caused by bacterial pathogens. J Inflamm (Lond) 9: 23.
14. Fresno-Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M (2004) PI3K/AKT signaling pathway and cancer. Cancer Treat Rev 30: 193-204.
15. Staal SP (1987) Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 84: 5034–5037.
16. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. EMBO J 15: 6541–6551.
17. Ruse M, Knaus UG (2006) New players in TLR-mediated innate immunity. Immunol Res 34: 33-48.
18. Beurel E, Michalek SM, Jope RS (2009) Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3).Trends Immunol 31: 24-31.
19. Chan MM, Cheung BK, Li JC, Chan LL, Lau AS (2009) A role for glycogen synthase kinase-3 in antagonizing mycobacterial immune evasion by negatively regulating IL-10 induction. J Leukoc Biol 86: 283-291.
20. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Quresshi N, Michalek SM, Vogel SN (2001) Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. Infect Immun 69: 1477–1482.
21. Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J (2001) Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. J Immunol 167: 5067–5076.
22. Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM (2007) Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. J Infect 54: 399-409.
23. Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 4: 499-511.
24. Oviedo-Boyso J, Cortés-Vieyra R, Huante-Mendoza A, Yu HB, Valdez-Alarcón JJ, Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez M, Finlay BB, Baizabal-

Aguirre VM (2011) The phosphoinositide-3-kinase-Akt signaling pathway is important for Staphylococcus aureus internalization by endothelial cells. Infect Immun 79: 4569–4577.

25. Cortés-Vieyra R, Silva-García O, Oviedo-Boyso J, Huante Mendoza A, Bravo-Patiño A, Valdez-Alarcón JJ, Finlay BB, Baizabal-Aguirre VM (2015) The glycogen synthase kinase 325. Cortés-Vieyra R, Silva-García O, Oviedo-Boyso J, Huante Mendoza A, Bravo-Patiño A, Valdez-Alarcón JJ, Finlay BB, Baizabal-Aguirre VM (2015) The glycogen synthase kinase 3α and β isoforms differentially regulates interleukin12p40 expression in endothelial cells stimulated with peptidoglycan from Staphylococcus aureus. PLoS ONE 10(7): e0132867. doi:10.1371/journal.pone.0132867.
26. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ 2003 The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. Cytokine Growth Factor Rev 14: 361–368.

EFECTOS INMUNOLÓGICOS Y ADYUVANTES DE LAS PROTEÍNAS Cry1A*

Marilu Torres Martínez y Leticia Moreno Fierros

Laboratorio de inmunología en mucosas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Tlanepantla. Estado de México. México. Correo E: lemofi@unam.mx

RESUMEN

Las proteínas Cry1A de *Bacillus thuringiensis*, pudieran ser utilizadas como una estrategia para incrementar la eficacia de las vacunas debido a que; son inmunogénicas y son adyuvantes efectivos capaces de incrementar protección a nivel sistémico y de mucosas, no son tóxicas en vertebrados y presentan bajos costos de producción. Esta revisión resume los estudios reportados hasta el momento sobre las propiedades inmunogénicas de las proteínas Cry1A..

PALABRAS CLAVE:
Proteína Cry, *Bacillus thuringiensis*, adyuvantes, inmunógenos.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis Cry1A proteins could be used as a strategy to increase the efficacy of vaccines as they are; immunogenic and effective adjuvants able to increase protection at the systemic and mucosal levels, they are non-toxic in vertebrates and have low production costs. This review summarizes the studies reported so far on the immunogenic properties of Cry1A proteins.

KEY WORDS:
Cry protein, adjuvants, immunogens.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas Cry son producidas por la bacteria Gram positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt) en cristales paraesporales; una característica importante de estas proteínas es que presentan algún efecto tóxico específico hacia algún organismo, habitualmente insectos; mientras que no son tóxicas para vertebrados ni para otros insectos no blanco. Estas proteínas son producidas por Bt como protoxinas cristalinas, que, al ser ingeridas por larvas de insectos susceptibles, son solubilizadas y procesadas proteolíticamente por proteasas presentes en el intestino medio, generándose las toxinas Cry (tCry). Se han identificado algunas proteínas Cry que son selectivamente tóxicas para diferentes órdenes de insectos tales como Lepidóptera, Coleóptera, Himenóptera, Homóptera, Ortóptera y Mallophaga, así como nemátodos (1), por lo que han sido ampliamente utilizadas comercialmente como insecticidas, para el control de insectos plaga que atacan a los cultivos; y también para el control de insectos vectores causantes de enfermedades como la malaria y el dengue (2). El mecanismo por el cual las proteínas Cry ejercen su acción bioinsecticida ha sido ampliamente estudiado (3–7); ya que muchos de los estudios reportados han sido encaminados a evaluar su toxicidad en insectos. Sin embargo, los estudios dirigidos a determinar sus efectos en mamíferos son limitados y la mayoría consisten de estudios clínicos orientados a determinar los efectos tóxicos potenciales (8), que en general indican que no son tóxicas en mamíferos.

Se ha reportado que varias proteínas Cry, particularmente las proteínas Cry1Ab, Cry1Aa y Cry1Ac, son inmunogénicas, ya que son capaces de inducir anticuerpos específicos hacía la proteína al ser administradas por diferentes vías. Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado particularmente en estudiar las propiedades inmunológicas de las proteínas Cry1Ac y ha demostrado que la protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) de Bt es inmunogénica tanto a nivel sistémico como de mucosas (9–11) y actúa como adyuvante en mucosa, ya que al coadministrarla con antígenos de diferentes naturaleza, proteica (12, 13) y polisacárida (14), es capaz de potenciar o modular la respuesta inmune hacia el antígeno con el cual se coadministra. Se ha reportado que en modelos murinos puede incrementar la protección en varios modelos de infecciones parasitarias y

*Recibido: 7 de septiembre de 2017 Aceptado: 1 de noviembre de 2017

Tabla 1
Priopiedades inmunopotenciadoras de las proteínas Cry1A

Proteína /especie	Vía de administración	Efectos	Referencias
Bt como insecticida	Trabajadores expuestos	Presentaron anticuerpos IgE e IgG específicos contra células vegetativas.	23, 24, 25
pCry1Ac recombinante de Bt HD73 (forma soluble y cristalina)	Intragástrica e intraperitoneal	pCry1Ac tiene propiedades inmunogénicas y adyuvantes al potenciar la respuesta inmune contra antígenos coadministrados (toxina de cólera y la albúmina de suero bovino (BSA).	11
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intragástrica e intraperitoneal	pCry1Ac tiene propiedades inmunogénicas y adyuvantes al potenciar la respuesta inmune contra antígenos coadministrados (antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y la albúmina de suero bovino (BSA).	13
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intranasal	pCry1Ac induce anticuerpos IgM, IgG e IgA en suero y lavados vaginales y traqueobronquiales, en los fluidos del intestino grueso e intestino delgado y aumentó el título de anticuerpos frente a polisacáridos neumocócicos.	14, 28
pCry1Ac, pCry1 Ab, pCry1Aa	Intranasal e intraperitoneal	Induce anticuerpos IgM, IgG e IgA en diferentes compartimentos mucosales y en sangre	46
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intranasal	Adyuvante. Induce protección contra *Brucellas abortus*	15
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intranasal e intraperitoneal	Adyuvante. Induce protección contra *Naegleria fowleri*	32, 35, 36
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intraperitoneal	Adyuvante. Induce protección contra modelo de *Taenia crassiceps*	34
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intraperitoneal	Adyuvante. Induce protección contra modelo de *Plasmodium chabaudi* y *Plasmodium berghet* ANKA As	33
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intranasal	pCry1Ac induce respuestas de células de anticuerpos significativas, y aumentó la activación de las células T y la producción de citocinas en el tejido linfoide asociado a nariz y los linfocitos de los conductos nasales	37
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Ensayos *in vivo* e *in vitro*	pCry1A activa induce la activación de macrófagos murino obtenidos de diferentes sitios mucosales.	40
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Ensayos en línea celular RAW 264.7	pCry1Ac se endocita vía clatrina, colocaliza con RAb5 y RAb7 y se une a proteínas HSPs, vimentina, α-enolasa y actina. HSP 70 participa en la activación de macrófagos .inducida por pCry1Ac	45
tCry1Ac,tCry1 Ab, tCry1Aa	Intranasal e intraperitoneal	Induce anticuerpos IgG e IgA en diferentes compartimentos mucosales y en sangre	46
tCry1Aa recombinante y una mutante Cry1Aa8	Intranasal	Ambas toxinas generaron respuestas inmunes celulares en ratones y promovieron la producción de IFN-γ	31
tCry1Ab	Intraperitoneal	Es inmunogénica y puede inducir una respuesta inmune Th1 / Th2 mixta, con intensa producción de anticuerpos anti Cry1Ab IgG1 e IgG2a	48
tCry1Ab	Intranasal	Aumento título de anticuerpo	49
tCry1Ac	Ensayos *in vitro* y línea celular RAW 264.7	tCry1Ac activa macrófagos de bazo y de la línea celular RAW 264.7. Activa MAPKs y el factor de transcripción NF-κB	50

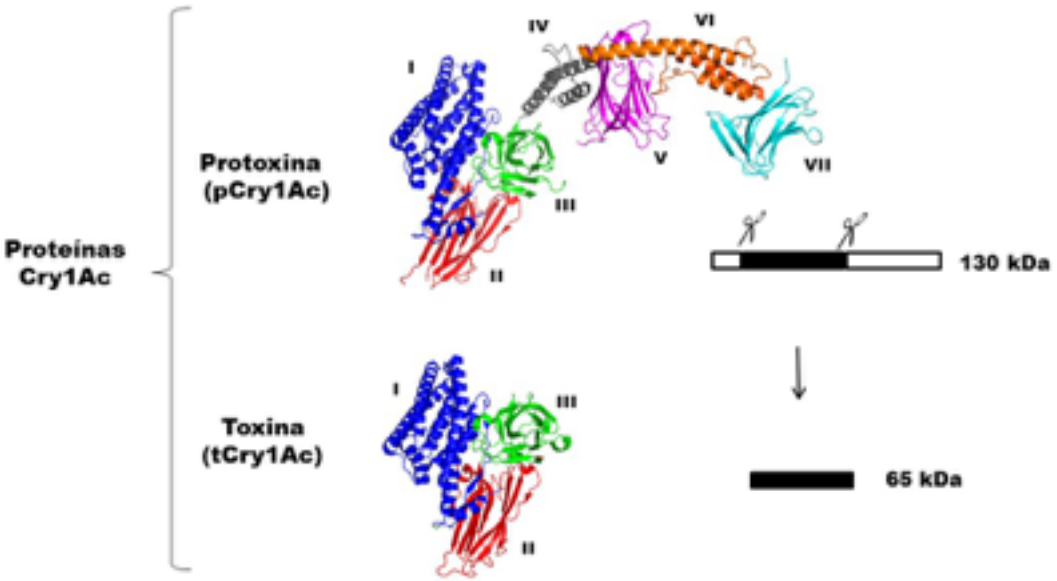


Figura 1. *Estructura obtenida por difracción de rayos x de la protoxina (pCry1Ac) y toxina Cry1Ac (tCry1Ac) donde se muestran en números romanos los VII y III dominios que componen la protoxina y toxina respectivamente. La estructura tridimensional de la tCry1Ac está compuesta por tres dominios (I, II y III). El dominio I: haz de siete α-hélices, seis de las cuales rodean a la hélice 5. Dominio II: Prisma beta de tres hojas β antiparalelas alrededor de un núcleo hidrofóbico con algunas regiones de asas expuestas y el dominio III, es un sándwich β, compuesto por dos hojas β antiparalelas (51). La pCry1Ac muestra que en su región N-terminal una estructura similar a lo dominios I, II y III que presenta la tCry1Ac, y en la región carboxilo terminal, muestra 4 dominios. Los dominios IV y VI son alfa-hélices y los dominios V y VII tienen una conformación de barril beta tipo rollo (52). La figura fue realizada con las coordenadas depositadas en el PDB para protoxina, con código 4W8J y para toxina, con código 4ARX, utilizando el programa PyMOL. La tCry1Ac (con peso aproximado de 65 kDa) se genera luego que la protoxina (peso de 130 kDa) es procesada proteolíticamente.*

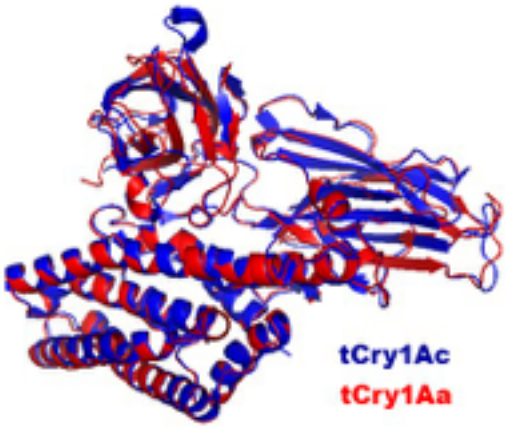
bacterianas (15) por lo que se propone como una herramienta valiosa para incrementar la eficacia de vacunas induciendo inmunoprotección en mucosas, si se emplea ya sea como adyuvante, o como inmunomodulador. El objetivo de la presente revisión es hacer una recopilación breve de los estudios reportados hasta el momento de las propiedades inmunogénicas de las proteínas Cry1A. En la tabla 1 se muestra un resumen de los reportes sobre los efectos inmunopotenciadores de las proteínas Cry1A.

LAS PROTEÍNAS Cry

Las proteínas Cry son delta endotoxinas producidas por la bacteria del suelo Bt en la etapa de crecimiento durante su fase de esporulación (16) y se han usado comercialmente como bioinsecticidas. Las formulaciones agrícolas que contienen Bt usadas contra insectos se han aplicado en forma de pulverización y generalmente están compuestos por una mezcla de esporas secas y las proteínas cristalinas que se aplican en áreas como las hojas y las raíces, donde se alimentan los insectos y sus larvas (17). También se han utilizado en forma de polvos humectables, líquidos concentrados, cebos, polvos, y anillos de liberación prolongada. Pero el modo de aplicación transgénico de Bt, en el cual se expresan la forma de toxina Cry activa, ha demostrado ser más eficaz que la forma de pulverización (17–20) .

pCry es proteína de un peso de 130 kDa que después de ser procesada proteolíticamente pierde aproximadamente 600 residuos de su extremo carboxilo terminal y entre unos 20 y 50 residuos de su extremo amino terminal generando la toxina activa de 60 kDa (21) (Fig. 1).

Las proteínas Cry se clasifican en base a la homología de su secuencia de aminoácidos. Las toxinas que pertenecen a cada grupo comparten entre un 40-45% de identidad en su secuencia de aminoácidos y se representan con un número arábigo (Cry1, Cry2….Cry70). En cada grupo las toxinas que comparten un 70% de identidad se agrupan asignándole una segunda letra en mayúscula (Cry1A, Cry1B, etc), y una letra minúscula aquellas que presentan entre un 70% a 95% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc) (22) (Fig. 2).



A

Toxinas Cry	% de identidad entre la secuencias de aminoácidos
tCry1Ac - tCry1Ab	91.66
tCry1Ac - tCry1Aa	84.79
tCry1Ab - tCry1Aa	89.29

B

Figura 2. ***A****. Superposición de la estructura cristalográfica de la toxina Cry1Ac (tCry1Ac)-azul y la toxina Cry1Ab (tCry1Ab)-rojo, donde se muestra la similitud estructural entre ambas proteínas. Las estructuras fueron visualizadas a través del programa PyMOL con las coordenadas depositadas en "Protein Data Bank" para tCry1Ac con código 4ARX y para la tCry1Aa con código 1CIY. Hasta la fecha no se ha logrado difractar la estructura de Cry1Ab.* ***B****. Porcentaje de identidad entre las secuencias de proteínas de Cry1Ac, Cry1Ab y Cry1Aa. El alineamiento de la secuencia se realizó a través de CLUSTALW.*

PROPIEDADES INMUNOGÉNICAS Y ADYUVANTES DE LAS PROTEÍNAS Cry

Los primeros reportes acerca a los efectos inmunológicos inducidos por las proteínas Cry fueron determinados por la presencia de anticuerpos en el suero de trabajadores que se encontraban expuestos a productos comerciales de Bt, la bacteria que produce Cry. Se ha reportado que poblaciones y trabajadores que fueron expuestos a la pulverización de Bt, presentaron niveles de anticuerpos elevados (23–25). Del mismo modo, Bernstein y cols. encontraron anticuerpos IgG e IgE específicos contra células vegetativas de Bt en trabajadores que estaban altamente expuesto a insecticidas que contenían Bt (25).

Asimismo, se ha reportado que las proteínas Cry aisladas de cristales de Bt parecían tener actividad anti-tumoral contra las células del sarcoma ascites de Yoshida, posiblemente relacionados con su capacidad para mejorar la inmunidad general (26). Los mismos autores mostraron que los cristales de insecticidas de esporas Bt mejoran la respuesta inmune a los ovinos de glóbulos rojos (27).

Nuestro grupo ha demostrado que la pCry1Ac recombinante es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes tan potentes como los de la toxina del cólera tanto a nivel mucoso como sistémico (11, 13, 28, 29). En un inicio se evaluó, el efecto inmunogénico tanto de la pCry en forma cristalina como soluble, y se observó que ambas formas de pCry1Ac (Bt var kurstaki HD73) eran inmunogénicas, ya que eran capaces de inducir una repuesta inmune a nivel sistémico al ser administradas por vía intraperitoneal o intragástrica. Sin embargo, la forma soluble fue más eficiente que la forma cristalina en la inducción de una respuesta mucosal por vía intragástrica. Aunque por vía intraperitoneal ambas formas (soluble y cristalina) inducen respuestas de anticuerpos IgG e IgM en suero de magnitudes similares (11). En este mismo estudio se evaluaron los títulos de anticuerpos en heces y suero después que ambas formas fueran administradas solas y coadministradas con la toxina de cólera, un potente adyuvante mucoso ampliamente estudiado, sin embargo, tóxico. Al coadministrar la pCry1Ac con la toxina de cólera por vía intraperitoneal, se observó un aumento de las respuestas antitoxina de cólera, en anticuerpo de heces, lo que sugirió que las proteínas Cry pueden tener un efecto adyuvante cuando se administraba con otros antígenos.

Adicionalmente a la administración intragástrica e intraperitoneal, la inmunogenicidad de pCry1Ac soluble se ha evaluado aplicando a la proteína por otras rutas de inmunización: intranasal rectal, y vaginal, determinando su capacidad para inducir respuestas de anticuerpos específicos significativas en suero y en secreciones de mucosas recuperadas de lavado intestinal, broncoalveolar y vaginal de ratones BALB/c (11, 28, 30). Se ha observado también que la respuesta de anticuerpos inducida en suero, vagina e intestino grueso por la aplicación de intraperitoneal y vaginal de Cry1Ac en diestro y estro, no se modifica debido al estadío del ciclo estral (30).

EFECTOS ADYUVANTES DE LA PROTOXINA Cry1Ac

Los efectos adyuvantes de pCry1Ac se han evaluado con respecto a las respuestas de anticuerpos específicos alcanzadas tanto a nivel sistémico y mucosas hacia antígenos coadministrados de diferente naturaleza, tales como el antígeno de superficie de hepatitis B (13), péptidos de HIV (29) y polisacáridos neumocócicos (14). Se observó que el efecto adyuvante en mucosas inducido por pCry1Ac depende de la vía de administración y del antígeno utilizado e incluso puede ser tan potente como el provocado por la toxina del cólera.

pCry1Ac tiene efectos adyuvantes mucosos y sistémicos al inducir la respuesta de anticuerpos intestinales y sistémicos cuando se coadministra con proteínas como la albumina de suero bovino (BSA) y un antígeno de superficie de hepatitis B (HbsAg) en ratones Balb/c por las vías oral e intraperitoneal (13).

La capacidad de Cry1Ac de inducir respuestas sistémicas y en distintos sitios mucosos, incluyendo la mucosa vaginal que es un sitio en el que es difícil inducir respuestas inmunes significativas por la aplicación de proteínas solubles, sugería que podría utilizarse como acarreador de antígenos, de esta manera se evaluó y demostró el potencial de esta proteína como acarreador vacunal de un polisacárido capsular 6B (14) y de un epítope de la toxina diftérica (31).

pCry1Ac es adyuvante y puede funcionar como un acarreador de vacuna, ya que la inmunización intranasal de polisacáridos de pneumococos coadministrados o conjugados con la proteína Cry1Ac indujo respuestas de anticuerpos séricos y en lavados traqueopulmonares significativamente mayores a las obtenidas por la administración de polisacáridos solos (14).

Se evaluó el potencial de pCry1Ac como adyuvante y vector vacunal de péptidos vacunales de HIV. La capacidad de Cry1Ac para incrementar la respuesta inmune humoral y celular en mucosas y sistémicas hacia péptidos fue modesta, sin embargo se aportó evidencia de que el efecto adyuvante de Cry1Ac y de toxina de cólera en la respuesta inmune local y sistémica depende del péptido coadministrado (29).

EFECTO PROTECTOR DE LA pCry1Ac

Se había demostrado que la Cry1Ac era inmunogénica y que tenía efectos adyuvantes en la respuesta inmune de anticuerpos (a nivel de mucosas y a nivel sistémico) cuando se coadministraba con antígenos de distinta naturaleza (proteínas y polisacáridos), así que posteriormente se evaluó si como adyuvante incrementaban la protección en modelos de infecciones en mucosas y sistémicos, lo que mostraría su utilidad potencial como un coadyuvante protector prometedor capaz de mejorar la eficacia de las vacunas.

Se observó que la pCry1Ac soluble ya sea sola o coadministrada como coadyuvante, confiere protección en varios modelos de infecciones parasitarias en ratón, como los causados por *Naegleria fowleri*, *Taenia crassiceps*, *Plasmodium chabaudi* y *Plasmodium berghei* ANKA AS (32–34), y que además, aumentaba la inmunoprotección conferida por la vacuna RB51 en ratones desafiados con la cepa virulenta *Brucella abortus* 2308 (15).

La inoculación intranasal de *Naegleria fowleri* en ratones, provoca la meningoencefalitis amibiana primaria de una forma muy similar a la que se presenta en el humano (32). La infección es rápida y fatal, mata al 100% de los ratones infectados en 7 días. Interesantemente la pCry1Ac tiene un efecto adyuvante protector en el modelo de meningoencefalitis amibiana primaria en ratón; ya que al coadministrar la pCry1Ac con antígenos de *Naegleria fowleri* por vía intranasal incrementó a un 100% la protección ante la infección con esta amiba. Se indujeron respuestas significativas de anticuerpos IgG e IgA en suero y lavados traqueopulmonares por la inmunización intranasal e intraperitoneal, sin embargo, los títulos de anticuerpos en suero no parecen correlacionarse con el grado de protección, ya que el máximo grado de protección se logró por la vía intranasal mientras que los máximos títulos de anticuerpos se indujeron por la ruta intraperitoneal. Mientras que los títulos de anticuerpos IgG e IgA inducidos en lavados nasales y traqueopulmonares si se correlacionan con el grado de protección (32). Asimismo, la aplicación intranasal sola de pCry1Ac confiere a los ratones un alto nivel de protección contra la infección por *Naegleria fowleri* (60%), comparable al que se obtiene mediante la inmunización intranasal con extracto de proteínas totales de trofozoítos de *Naegleria fowleri* (32, 35, 36).

Estos resultados sugerían que tanto las respuestas de anticuerpos como los mecanismos inmunes innatos podían estar participando en los efectos protectores observados. Posteriormente, utilizando ratones deficientes en STAT-6 se encontró que la respuesta Th2 es indispensable en la protección conferida por la inmunización Cry1Ac coadministrada con extractos, ya que los ratones deficientes en STAT-6 no sobrevivieron a la infección a pesar de presentar respuestas Th1 más altas que las presentadas por los ratones silvestres que presentan preferentemente respuestas Th2 (36)

Por estos hallazgos y ante la necesidad del desarrollo de adyuvantes necesarios para mejorar la eficiencia de protección de las vacunas existentes se consideró importante evaluar el efecto adyuvante protector de la pCry1Ac en otros modelos de infección de patógenos que representaran un problema importante de salud para la población a nivel nacional y mundial.

Se evaluó el efecto inmunoprotector de Cry1Ac en un modelo de malaria murino, determinando si la pCry1Ac era capaz de inducir la respuesta inmune innata para inducir la protección contra *Plasmodium chabaudi* (no letal) y *Plasmodium berghei* ANKA AS (letal). Encontrándose que el pretratamiento con pCry1Ac induce protección contra ambas especies de Plasmodium ya que reduce la parasitemia , incrementa el tiempo de sobrevida, modula la expresión de mRNA de citocinas proinflamatorias como IFN-γ y TGF-β e incrementa los niveles de anticuerpo específicos IgG e IgM en ambas especies de Plasmodium en ratones (33).

De forma similar se determinó si la pCryAc como adyuvante inducía protección en un modelo murino experimental de cistercosis por *Taenia crassiceps*. Al evaluar el efecto de la administración intarperitoneal de lisados solos, pCry1Ac sola, o pCry1Ac coadministrada con lisados de metacéstodos, se encontró que la pCry1Ac coadministrada con el extracto metacéstodos confirió protección por encima del 47% , sin embargo la pCry1Ac sola no provee protección (34), a diferencia del efecto protector inducido por pCry1Ac sola en los dos modelo de infección anteriormente descritos de *Naeglaeria fowleri* (32) y *Plasmodium* (33).

De forma importante también se observó que la proteína Cry1Ac usada como un adyuvante mucosal administrada por vía intranasal puede ser una alternativa prometedora para mejorar la vacuna RB51 contra la brucelosis, ya que al coadministrar pCry1Ac con la cepa vacunal RB51 de *Brucella abortus* y después de un desafío intranasal con la cepa virulenta *B. abortus* 2308 en ratones BALB / c aumentó la inmunoprotección conferida por la vacuna. Pues se observó una disminución de la carga bacteriana esplénica cuando se desafía intranasalmente con la cepa virulenta *B. abortus* 2308; se generó *in vivo* una mayor actividad citotóxica en respuesta a la transferencia de células previamente infectadas, se indujo proliferación de células TCD8 + citotóxicas en respuesta a la estimulación con bacterias inactivadas por calor; aumentó la producción de TNF-α e IFN-γ; y se indujo una respuesta significativa de IgG2a (15).

MECANISMO INMUNOMODULADOR DE pCry1Ac

El encontrar que la administración de la proteína Cry1Ac sola confería protección en algunos modelos de infección sugería que esta proteína tiene la capacidad de activar la respuesta inmune innata. De la misma manera se consideró que las propiedades inmunopotenciadoras de la pCry1Ac podrían estar relacionadas con su capacidad para activar linfocitos y células presentadoras de antígeno.

Al evaluar los efectos de la pCry1Ac en la producción de citocinas en linfocitos obtenidos de diferentes compartimientos mucosales intestinales y nasales; y en la expresión de marcadores de activación, proliferación, moléculas de adhesión en linfocitos. Se encontró que esta proteína tiene la capacidad de inducir preferentemente la activación de linfocitos B y TCD4$^+$, así como de inducir la producción de citocinas o de modificar el patrón existente de citocinas producidas constitutivamente en linfocitos de los distintos compartimientos mucosales. Se encontró que la aplicación intranasal de pCry1Ac favorece la inducción de respuestas de citocinas tipo Th2 en linfocitos nasales obtenidos del tejido linfoide asociado nariz (NALT) y pasajes nasales (37).

Para continuar la caracterización del efecto inmunoestimulador de la pCry1Ac y en virtud de que varios adyuvantes de origen microbiano ejercen parte de su actividad a través de inducir la expresión de moléculas coestimuladores y la producción de citocinas por parte de células presentadoras de antígeno (38, 39), se evaluó si la pCry1Ac era capaz de activar a los macrófagos e inducir estos efectos. Se demostró que pCry1Ac es capaz de activar macrófagos murinos de cultivos primarios y de la línea celular celular RAW 264.7 en ensayos *in vivo* e *in vitro*, induciendo la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 y la sobreproducción de citocinas proinflamatorias IL-6, TNF-α y la quimiocina MCP-1. Se observó que al administrar pCry1Ac por vía intranasal e intraperitoneal en ratones BALB/c, se induce una respuesta de activación en macrófagos de diferentes sitios sistémicos y mucosos como peritoneo, bazo, nódulos linfáticos mesentéricos, o en pulmón y lavados traqueoalveolares. Asímismo, los ensayos *in vitro* realizados con células adherentes obtenidas de diferentes mucosas, mostraron que esta proteína era capaz de inducir la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 e inducir la producción de citocinas proinflamatorias TNF-α, Il-6 y MCP-1, obteniendo en varios casos efectos comparables a los obtenidos con el lipopolisacárido

(LPS). Mediante el uso de inhibidores de MAPKs se sugirió la participación de las vías de las MAPKs ERK1/2 y p38 en la sobrexpresión de las moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas inducidas por pCry1Ac (40), posteriormente se confirmó la capacidad de pCry1Ac de inducir la activación de las MAPKs ERK1/2, JNK y p38 en macrófagos (44).

Las toxinas del grupo Cry1A se unen a los receptores encontrados en la membrana de las células epiteliales del intestino medio de insectos (41) tales como la aminopeptidasa N de 120 kDa (APN) (42) y una glicoproteína de tipo cadherina de 210 kDa (43) y recientemente se ha publicado que la pCry1Ac tiene también sitios de unión en el intestino medio del insecto, proponiéndose un nuevo modelo dual de acción de las proteínas Cry (6). Sin embargo, no se sabe si estas glicoproteínas funcionan como receptores de toxinas Cry1A en vertebrados. Se ha informado de que la pCry1Ac se une a los enterocitos de ratón in vitro (44), pero la unión no fue inhibida por la GalNAc, la manosa o la biotina, lo que sugiere que otro tipo de moléculas están interactuando con las proteínas Cry (31).

Hasta recientemente no se había mostrado evidencia que sugiriera la existencia de posibles receptores para las proteínas Cry1Ac en mamíferos. Sin embargo, dado los hallazgos que demostraban la capacidad de pCry1Ac de activar macrófagos y que las MAPKs median algunos de los efectos inducidos por pCry1Ac; y conociendo que las vías de las MAPKs se activan principalmente a través de las interacciones ligando-receptor, nos dimos a la tarea de identificar proteínas de unión a pCry1Ac que pudieran ser potenciales receptores. Primero se demostró que la pCry1Ac muestra una unión saturable específica a la superficie de los macrófagos lo que evidencia la presencia de posibles receptores en este tipo celular. Encontramos también que la internalización de pCry1Ac es mediada por endocitosis mediada por clatrina ya que es inhibida por monodansilcadaverina y pCry1Ac colocaliza con las proteínas de endosomas tempranos y tardíos Rab5 y Rab7 respectivamente. A través de ensayos de inmunoprecipitación y posterior identificación por MALDI-TOF-TOF se encontraron varias proteínas de unión a pCry1Ac, tales como proteínas de choque térmico (HSPs), vimentina, α-enolasa y actina. Se confirmó la interacción de HSPs70 con pCry1Ac y su colocalización en la superficie celular de los macrófagos. Además, se encontró que la activación de macrófagos inducida por Cry1Ac es parcialmente mediada por HSP70 de superficie ya que el pretratamiento con anticuerpos anti HSP70 inhibe la fosforilación de ERK1 y la producción de MCP1 inducida por Cry1Ac en macrófagos. Además, la participación *in vivo* de HSP70 de superficie en los efectos de Cry1Ac en macrófagos se evaluó en ratones tratados con feniletilsulfonamida, un inhibidor funcional de HSP70, los resultados apoyan la función de HSP70 ya que el inhibidor disminuyó la migración de macrófagos inflamatorios inducida por Cry1Ac en la cavidad peritoneal. Sin embargo es necesario determinar la participación funcional de otras proteínas de unión a pCry1Ac en macrófagos como posibles receptores (45).

PROPIEDADES INMUNOLÓGICAS DE LA tCry1Ac

La mayoría de los estudios basados en las propiedades inmunológicas de las proteínas Cry, se han centrado en la pCry1Ac (9, 14, 44). Sin embargo, se ha demostrado que parte de la inmunogenicidad (evaluada por la respuesta inmune humoral) de estas toxinas reside en la región del extremo N-terminal (46). Guerrero (31), evaluaron qué implicaciones tenía la región del extremo N-terminal de la pCry1Ac (que corresponde a la estructura y secuencia de la tCry1Ac) en las propiedades inmunológicas de la varias pCry. Al comparar la inmunogenicidad de las diferentes familias de protoxinas y toxinas Cry: Cry1 (Aa, Ab y 1Ac) y la proteína Cry3A se encontró que las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac eran capaces de inducir respuestas específicas de anticuerpos IgG e IgA en el suero y varios sitios de mucosas (intestino delgado, el intestino grueso y en los lavados traqueo-pulmonales) después de administrarse vía intraperitoneal o vía intranasal, lo que demostraba que las tCry1A también son inmunogénicas tanto a nivel sistémico como mucosal, como la protoxina. Al realizar ensayos de inhibición de la reactividad de anticuerpos anti protoxina por competencia con toxina Cry, se encontró que gran parte de los anticuerpos que se generaban hacia la protoxina iban dirigidos a la región de la toxina. Lo que sugería que la región que corresponde a las toxina Cry en la protoxina, es importante en los efectos inmunológicos inducidos por la protoxina (46).

Asimismo, se ha demostrado el potencial de las toxinas Cry1A de funcionar como vector vacunal, ya que en un estudio se mostró, que la inmunización con unas proteínas mutantes de la toxina Cry1Aa como la denominada Cry1Aa8, en la que un motivo hidrofóbico de ocho aminoácidos en la α-hélice 7 del dominio I de la toxina Cry1A silvestre, se intercambió por un epítopo de toxina diftérica, indujo respuestas de anticuerpos que reconocieron a la toxina diftérica. Además se observó tanto la toxina Cry1Aa silvestre, como la mutante Cry1Aa8, fueron capaces de generar respuestas inmunitarias

celulares y aumentar la producción de citocinas, principalmente IFN-γ e IL-12 después de una estimulación intranasal (47) .

Posteriormente, se confirmó la inmunogenicidad de la toxina Cry1Ab, en un modelo de ratón BALB/c, al mostrar que está proteína genera respuestas específicas de anticuerpos tanto IgG1 e IgG2a, indicando que induce una respuesta inmune mezclada Th1/Th2 cuando se administra intraperitonealmente (48). De la misma manera, Andreassen y cols., confirmaron la inmunogenicidad de Cry1Ab por la vía intranasal, previamente reportada por Guerrero (31, 49).

Asimismo, recientemente se demostró que la tCry1Ac es capaz de activar los macrófagos de bazo y de la línea celular RAW264.7, induciendo la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 e ICOS-L y la producción de las citocinas proinflamatorias Il-6, TNF-α y la quimiocina MCP-1. Además se demostró la capacidad de tCry1Ac de inducir la activación de las MAPKs ERK1/2, p38 y JNK y la translocación al núcleo del factor de transcripción NF-κB ; así como la participación de las MAPKs en algunos de los efectos de activación inducidos por tCry1Ac, a través del usos de inhibidores específicos de esta vía (50).

CONCLUSIONES

Dentro de las estrategias actuales para desarrollar vacunas mucosales efectivas y/o inmunoterapias se encuentra la búsqueda de formas más eficientes de administración de antígenos al sistema inmune de mucosas y el descubrimiento de adyuvantes de mucosas y sistémicos seguros y provean inmunidad. Considerando antecedentes ya reportados sobre la pCry1Ac se pudiera proponer como una herramienta valiosa para incrementar la eficacia de vacunas induciendo inmunoprotección en mucosas, si se emplea ya sea como adyuvante, o como inmunomodulador, así como para caracterizar la compartimentalización del sistema inmunitario de las mucosas.

La mayoría de los estudios de las propiedades inmunológicas se han realizado en las proteínas del grupo Cry1Ac, sin embargo, se ha observado que la protoxina y toxina del grupo Cry1Aa y Cry1Ab, también son inmunogénicas induciendo respuesta a nivel de mucosas y sistémico, considerando el alto porcentaje de identidad entre estas proteínas como se aprecia en la (Fig. 2) en la que se muestra la superposición de la estructura cristalográfica de la toxina Cry1Ac y de la toxina Cry1Ab. Además, podría profundizarse en el estudio de las propiedades adyuvantes de las protoxinas CryAb y Cry1Aa, así como de las toxinas de los tres grupos. Asimismo, creemos necesario evaluar la respuesta de tipo celular que puede generar estás proteínas, ya que existen pocos estudios al respecto. También es importante identificar si existen otros receptores en mamíferos para los cual las proteínas Cry podrían ser ligandos; así como caracterizar las vías de señalización que pueden estar activando como parte de la caracterización del mecanismo inmunomodulador de las proteínas Cry.

AGRADECIMIENTOS

Al financiamiento otorgado por los siguientes proyectos: SEP, proyecto CB177612, UNAM PAPIIT, proyecto IN219416, Proyecto PAPCA 2016-No.28, al posgrado en "Ciencias Bioquímica" de la UNAM. MTM recibió una beca de CONACYT con número 209662.

REFERENCIAS

1. De Bortoli S A, Vacari A M, Polanczyk RA, Carolina A, Veiga P, Goulart R M (2017) "Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus" pp. 67–77.
2. Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M (2011) Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide. Insect Biochem Mol Biol 41:423–31.
3. Pardo-López L, Soberón M, Bravo A (2013) Bacillus thuringiensis insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiol Rev 37:3–22.
4. Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV (1992) The Mode of Action of Bacillus thuringiensis Endotoxins. Ann Rev Entomol 37:615–34.
5. Adang MJ, Crickmore N, Jurat-Fuentes JL (2014) Diversity of Bacillus thuringiensis Crystal Toxins and Mechanism of Action. Adv Insect Physiol 39-87 p.
6. Tabashnik BE, Zhang M, Fabrick J a., Wu Y, Gao M, Huang F (2015) Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. Scientific Reports. Nature Publishing Group 5:15107.
7. Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA (2006) A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of Bacillus thuringiensis. Proc Natl Acad Sci 103:9897–902.
8. Rubio-Infante N, Moreno-Fierros L (2016) An overview of the safety and biological effects of Bacillus thuringiensis Cry toxins in mammals. J Appl Toxicol 36:630–48.
9. Moreno-Fierros L, Garcia N, Gutierrez R, Lopez-Revilla R, Vazquez-Padron RI (2000) Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from Bacillus thuringiensis induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. Microbes Infect 2:885–90.
10. Moreno-Fierros L, Pérez-Ordóñez I, Palomar-Morales M (2002) Slight influence of the estrous cycle stage on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from Bacillus thuringiensis in mice. Life Sci 71:2667–80.
11. Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, de la Riva GA, Lopez-Revilla R (1999) Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from Bacillus thuringiensis induces systemic and mucosal antibody responses in mice. Life Sci 64:1897–912.
12. Esquivel-Perez R, Moreno-Fierros L (2005) Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides are different and depend on the antigen co-administered. Viral Immunol 18:695–708.
13. Vázquez RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, De La Riva G a., López-Revilla R, (1999) Bacillus thuringiensis Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. Scand J Immunol 49:578–84.
14. Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, Lopez-Revilla R, Pina-Cruz S (2003) Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of Streptococcus pneumoniae polysaccharides in mice. Scand J Immunol 57:45–55.
15. Gonzalez-Gonzalez E, Garcia-Hernandez AL, Flores-Mejia R, Lopez-Santiago R, Moreno-Fierros L (2015) The protoxin Cry1Ac of Bacillus thuringiensis improves the protection conferred by intranasal immunization with Brucella abortus RB51 in a mouse model. Vet Microbiol 175:382–8.
16. Feitelson JS, Payne J, Kim L (1992) Bacillus thuringiensis: Insects and Beyond. Nat Biotech Nature Pub Co 10:271–5.
17. Chattopadhyay A, Bhatnagar NB, Bhatnagar R (2004) Bacterial Insecticidal Toxins. Crit Rev Microbiol 30:33–54.
18. Chattopadhyay A, Bhatnagar NB, Bhatnagar R (2016) Critical Reviews in Microbiology Bacterial Insecticidal Toxins Bacterial Insecticidal Toxins. Bacterial Insecticidal Toxins. Crit Rev Microbiol 7828:33–5433.
19. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops (2016).
20. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P (2011) Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications. Plant Biotechnol J 9: 283–300.
21. De Maagd R a., Bravo A, Crickmore N (2001) How Bacillus thuringiensis has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends Genet 17:193–9.

22. Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D (1998) Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev 62:807–13.
23. Samples JR, Buettner H (1983) Ocular infection caused by a biological insecticide. J. Infect. Dis. 148:614.
24. Green M, Heumann M, Sokolow R, Foster LR, Bryant R, Skeels M (1990) Public health implications of the microbial pesticide Bacillus thuringiensis: An epidemiology study, Oregon, 1985-86. Am J Public Health 80:848–52.
25. Bernstein IL, Bernstein JA, Miller M, Tierzieva S, Bernstein DI, Lummus Z (1999) Immune responses in farm workers after exposure to Bacillus thuringiensis pesticides. Environ. Health Perspect 107:575–82.
26. Prasad SSS V., Shethna YI (1976) Mode of Action of a Purified Antitumor Protein from the Proteinaceous Crystal of Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis on Yoshida Ascites Sarcoma Cells. Antimicrob Agents Chemother 10:293–8.
27. Prasad SS, Shethna YI (1975) Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of Bacillus thuringiensis var thuringiensis. Biochem Biophys Res Commun 62:517–23.
28. Moreno-Fierros L, García N, Gutiérrez R, López-Revilla R, Vázquez-Padrón RI, Garcia N (2000). Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from Bacillus thuringiensis induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. Microbes Infect 2:885–90.
29. Esquivel-Perez R, Moreno-Fierros L, Esquivel-Pérez R, Moreno-Fierros L (2005) Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides are different and depend on the antigen co-administered. Viral Immunol 18:695–708.
30. Moreno-Fierros L, Pérez-Ordóñez I, Palomar-Morales MM, Perez-Ordonez I, Palomar-Morales MM (2002) Slight influence of the estrous cycle stage on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from Bacillus thuringiensis in mice. Life Sci 18:2667–80.
31. Guerrero GG, Russell WM, Moreno-Fierros L (2007) Analysis of the cellular immune response induced by Bacillus thuringiensis Cry1A toxins in mice: Effect of the hydrophobic motif from diphtheria toxin. Mol Immunol 44:1209–17.
32. Rojas-Hernández S, Rodríguez-Monroy M a., López-Revilla R, Reséndiz-Albor A ., Moreno-Fierros L (2004) Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against Naegleria fowleri meningoencephalitis. Infect Immun 72:4368–75.
33. Legorreta-Herrera M, Meza RO, Moreno-Fierros L (2010) Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of Plasmodium-infected CBA/Ca mice. J Biomed Biotechnol 2010:198921.
34. Ibarra-Moreno S, García-Hernández A. L, Moreno-Fierros L (2014) Coadministration of protoxin Cry1Ac from Bacillus thuringiensis with metacestode extract confers protective immunity to murine cysticercosis. Parasite Immunol 36:266–70.
35. Jarillo-Luna A., Moreno-Fierros L, Campos-Rodriguez R, Rodriguez-Monroy MA, Lara-Padilla E, Rojas-Hernandez S (2008). Intranasal immunization with Naegleria fowleri lysates and Cry1Ac induces metaplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion. Parasite Immunol 30:31–8.
36. Carrasco-Yepez M, Rojas-Hernandez S, Rodriguez-Monroy MA, Terrazas LI, Moreno-Fierros L (2010) Protection against Naegleria fowleri infection in mice immunized with Cry1Ac plus amoebic lysates is dependent on the STAT6 Th2 response. Parasite Immunol 32:664–70.
37. Rodriguez-Monroy M a., Moreno-Fierros L (2010) Striking activation of NALT and nasal passages lymphocytes induced by intranasal immunization with Cry1Ac protoxin. Scand J Immunol 71:159–68.
38. Lavelle EC (2005) Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. Cell Mol Life Sci 62:2750–70.
39. Williams NA, Hirst TR, Nashar TO (1999) Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. Immunol Today 20:95–101.
40. Moreno-Fierros L, García-Hernández ALAL, Ilhuicatzi-Alvarado D, Rivera-Santiago L, Torres-Martínez M, Rubio-Infante NN (2013) Cry1Ac protoxin from Bacillus thuringiensis promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF-α cytokines. Int Immunopharmacol 17:1051–66.

41. Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, Ji TH, Bulla LA (1995) Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. J Biol Chem 270:5490–4.
42. Knight PJ, Crickmore N, Ellar DJ (1994) The receptor for Bacillus thuringiensis CrylA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran Manduca sexta is aminopeptidase N. Mol Microbiol 11:429–36.
43. Nagamatsu Y, Koike T, Sasaki K, Yoshimoto A, Furukawa Y (1999) The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the Bacillus thuringiensis insecticidal CryIAa toxin. FEBS Lett 460:385–90.
44. Vázquez-Padrón RI, Gonzáles-Cabrera J, García-Tovar C, Neri-Bazan L, Lopéz-Revilla R, Hernández M (2000) Cry1Ac protoxin from Bacillus thuringiensis sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. Biochem Biophys Res Commun 271:54–8.
45. Rubio-Infante N, Ilhuicatzi-Alvarado D, Torres-Martínez M, Reyes-Grajeda JP, Nava-Acosta R, González-González E (2017) The Macrophage Activation Induced by Bacillus thuringiensis Cry1Ac Protoxin Involves ERK1/2 and p38 Pathways and the Interaction with Cell-Surface-HSP70. J Cell Biochem Jun 13.
46. Guerrero GG, Dean DH, Moreno-Fierros L (2004) Structural implication of the induced immune response by Bacillus thuringiensis Cry proteins: role of the N-terminal region. Mol Immunol 41:1177–83.
47. Guerrero GG, Moreno-Fierros L (2007) Carrier potential properties of Bacillus thuringiensis Cry1A toxins for a diphtheria toxin epitope. Scand J Immunol 66:610–8.
48. Adel-Patient K, Guimaraes VD, Paris A, Drumare MF, Ah-Leung S, Lamourette P, Nevers MC, Canlet C, Molina J, Bernard H, Créminon C, Wal JM (2011) Immunological and metabolomic impacts of administration of Cry1Ab protein and MON 810 maize in mouse. PLoS One 27:e16346.
49. Andreassen M, Rocca E, Bøhn T, Wikmark O-G, van den Berg J, Løvik M (2015) Humoral and cellular immune responses in mice after airway administration of Bacillus thuringiensis Cry1Ab and MON810 Cry1Ab -transgenic maize. Food Agric Immunol 26:521–37.
50. Torres-Martínez M, Rubio-Infante N, García-Hernández AL, Nava-Acosta R, Ilhuicatzi-Alvarado D, Moreno-Fierros L (2016) Cry1Ac toxin induces macrophage activation via ERK1/2, JNK and p38 mitogen-activated protein kinases. Int J Biochem Cell Biol 78:106-115.
51. Derbyshire DJ, Ellar DJ, Li J (2001) Crystallization of the Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 57:1938-44.
52. Evdokimov AG, Moshiri F, Sturman EJ, Rydel TJ, Zheng M, Seale JW, Franklin S (2014) Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals. Protein Sci 23:1491-7.

LOS CÓDIGOS GENÉTICOS MITOCONDRIALES: CARACTERÍSTICAS, ORIGEN Y EVOLUCIÓN*

Karen Aguilar Guerra[1], Alfonso Vilchis Peluyera[2], Víctor Valdés López[2]**

[1]Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, D.F. México.
[2]Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, D.F. México. **Autor de correspondencia correo E: vvaldes@unam.mx

RESUMEN

La mitocondria, un organelo altamente especializado, presente en casi todas las células eucariontes, encargado principalmente de la producción de energía celular a través de fosforilación oxidativa y que además participa en diferentes procesos celulares, tiene como característica que presenta su propio genoma, cuya estructura, tamaño y contenido génico varía de especie a especie. Desde la descripción del primer genoma mitocondrial, se observó que existen organismos en los que se presentan variantes del código genético universal, las cuales asignan significados diferentes a ciertos codones. Hoy en día la lista de variantes ha ido en aumento, y en esta revisión se hace un análisis de las variantes mitocondriales encontradas hasta el momento y cómo estas son reconocidas por los sistemas de traducción de estos organelos. Adicionalmente, se analizan las diferentes hipótesis postuladas sobre cómo han surgido estas variantes.

PALABRAS CLAVE: Mitocondria, código genético, variantes del código.

ABSTRACT

The mitochondrion is a highly specialized organelle, present in almost all eukaryotic cells that carry out the energy production through oxidative phosphorylation and also takes part in many cellular processes. Mitochondria has its own genome, whose size, structure and genetic content varies in different organisms, Since the first mitochondrial genome description, it was shown that many organisms exhibit genetic code variants, which give different meanings to some codons. Nowadays, the number of variants has increased. In this work we analyze the code variants that have been found, focusing on mitochondrial variants and how they are recognized for the translation systems in these organelles. We also analyzed the different hypothesis on the origin of these variants.

KEY WORDS: Mitochondria, genetic code, code variants.

INTRODUCCIÓN

La mitocondria es un organelo altamente especializado, presente en casi todas las células eucariontes, principalmente encargado de la producción de energía celular a través de fosforilación oxidativa. Adicionalmente, la mitocondria participa en diferentes procesos celulares, entre ellos, múltiples rutas metabólicas la cascada de señalización de calcio, crecimiento celular, diferenciación, control del ciclo celular, muerte celular, regulación del metabolismo celular, síntesis del grupo hemo y síntesis de esteroides (1). Este organelo, al igual que el cloroplasto, presenta su propio genoma, el cual se encuentra empacado en complejos de DNA-proteína conocidos como nucleoide, que a su vez están asociados a la membrana interna mitocondrial y esparcidos uniformemente a lo largo de las crestas (2). El DNA mitocondrial (mtDNA), es 'DNA multicopia' dado que una célula puede contener miles de copias de mtDNA repartidas en cientos de mitocondrias (3) cuyo número varía según la demanda de energía de ese tipo celular específico.

*Recibido: 12 de septiembre de 2017 Aceptado: 10 de noviembre de 2017

Mediante reconstrucciones filogenéticas usando secuencias de proteínas como HSP70 o Cpn60 y árboles filogenéticos del rRNA de la subunidad pequeña del ribosoma, se ha determinado que la mitocondria forma un conjunto monofilético formando un clado separado de las especies bacterianas. Sin embargo, estas comparaciones indican que filogenéticamente su pariente más cercano pertenece al grupo de las α-proteobacterias (4), lo cual reafirma la hipótesis de que las mitocondrias tienen un origen bacteriano, tal cual fue postulado originalmente por Lynn Margulis en 1967 (5).

La secuenciación de genomas ha mostrado que el genoma mitocondrial, y por ende la mitocondria, surgió una sola vez en la evolución. Lo anterior se dedujo ya que en cualquier genoma mitocondrial se observan genes con función asignada, que son un subconjunto de los genes encontrados en el genoma mitocondrial de *Reclinomonas americana*, eucariote unicelular que presenta un genoma mitocondrial con un alto grado de semejanza a los genomas bacterianos, en particular α-proteobacterias. Hasta el año 2013, se había reportado a *Reclinomonas americana* como el organismo con el mayor número de genes mitocondriales, 96 genes asignados, y 2 ORFs (Marcos de lectura abierto) de más de 100 residuos (6). Entre los genes que codifica este genoma mitocondrial, está el RNA ribosomal 5S (rRNA 5S), una RNA polimerasa de tipo bacteriano, a diferencia de la polimerasa presente en la mitocondria del resto de los organismos estudiados hasta la fecha, que es una RNA polimerasa con alta identidad con la RNA polimerasa de los fagos T3 y T7 - (6). Sin embargo, actualmente se reconoce que el genoma mitocondrial de otro protista jacóbido, *Andalucia godoyi*, muestra el mayor número de genes identificados, alcanzando la cifra de 100 (6). Las características de organización genómica de este grupo de protistas jacóbidos y su similitud con genomas bacterianos probablemente arrojarán luz sobre su ancestría y evolución. Adicionalmente, en el genoma de estos organismos eucariontes unicelulares se observan grupos de genes que conservan el orden (sintenia) de sus homólogos bacterianos.

Con excepción de los mitosomas y la gran mayoría de los hidrogenosomas -organelos sin genoma derivados de mitocondrias presentes en algunos eucariontes unicelulares anaerobios como *Entamoeba histolytica*- (7, 8, 9) los organismos eucariontes presentan gran variedad en la organización y estructura de su genoma mitocondrial así como de tamaño y contenido génico (presentando desde 96 genes codificadores de proteínas y RNAs estables en *R. americana*, hasta 3 genes codificantes de proteínas, en organismos pertenecientes al *phylum Apicomplexa*) (10). En las células de vertebrados, el mtDNA está organizado como una molécula circular de doble hebra de entre 14,000-20,000 pb (2). En las células animales el DNA mitocondrial (mtDNA) usualmente codifica componentes de la cadena respiratoria y componentes de la maquinaria para la traducción de proteínas mitocondriales. La secuenciación del genoma mitocondrial humano ha mostrado que posee 16,569 pares de bases entre las cuales se encuentran 13 genes codificantes para proteínas, la mayor parte involucradas en los mecanismos de transporte de electrones en el proceso de la fosforilación oxidativa; también presenta los genes para las subunidades ribosomales 12S y 16S (rRNA), así como 22 genes para RNAs de transferencia (tRNAs). Una característica relevante del genoma mitocondrial humano es su economía: prácticamente no existen o hay muy pocas bases no codificantes entre los genes; esta compactación del genoma mitocondrial humano recuerda a la que exhiben los genomas procariontes (11).

La cantidad tan pequeña de genes que presenta el DNA mitocondrial se debe a que la mayoría de los genes del "simbionte" se transfirieron al núcleo del hospedero, o se perdieron por completo. Tal transferencia, parece haber sido gradual, emergiendo de esta manera un patrón de reducción secuencial de los genes codificados en el mtDNA. Un número considerable de linajes eucariontes han adoptado de manera secundaria un estilo de vida anaerobio, con la consecuente modificación de la mitocondria formando así hidrogenosomas o mitosomas. Esta modificación se ha acompañado por la pérdida parcial o completa del genoma mitocondrial. La pérdida de genes del DNA mitocondrial pudo deberse a la sustitución de su función por genes no relacionados codificados en el DNA nuclear. Por otro lado, pudo haber una pérdida completa de genes mitocondriales determinados y, por ende, de sus funciones correspondientes, sin ningún complemento funcional nuclear (4).

Se han identificado aproximadamente 1500 proteínas que conforman la estructura y función de una mitocondria (12). La replicación y mantenimiento del DNA mitocondrial es llevado a cabo totalmente por proteínas codificadas por el DNA nuclear (nDNA). Sin embargo, para mantener una formación y función correctas de la mitocondria, se requiere de la coordinación de la expresión de genes codificados en el DNA mitocondrial y nuclear (1). Es importante recalcar que el genoma mitocondrial, igualmente presenta diversas características que lo diferencian de otros genomas, entre ellas, su tamaño reducido, su bajo contenido en GC, así como el uso de variantes del código genético en algunos organismos.

VARIANTES MITOCONDRIALES DEL CÓDIGO GENÉTICO ESTÁNDAR

En los años que siguieron al desciframiento del código genético, se observó que los organismos examinados, desde bacterias hasta humanos, usaban esencialmente el mismo código genético, por lo que se planteó que éste era universal, y que había persistido desde hacía miles de millones de años, desde antes que los tres dominios, archea, bacteria y eukarya, divergieran a partir de un ancestro común (13). Crick, en 1968, propuso la hipótesis del "accidente congelado", en la que menciona que la correspondencia entre codones y aminoácidos se podría haber debido al azar; pero una vez que se estableció, fue tan fundamental para la vida, que cualquier cambio hubiera desencadenado una catástrofe (14), ya que una alteración mayor en el código daría lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas sintetizadas, lo cual, podría ser letal para la célula (13). A esta hipótesis le siguieron otras más para explicar la naturaleza, el origen y la evolución del código genético: la "teoría estereoquímica" (15), la "teoría adaptativa" (15, 16) y la "teoría de coevolución" (15, 17). Actualmente se piensa que estas hipótesis (con excepción de la teoría estereoquímica, para la cual no se ha encontrado evidencia de que ocurra en la naturaleza) no son mutuamente excluyentes, sino que, por el contrario, podrían juntas dar una explicación de la existencia del código genético.

A medida que se fueron analizando un mayor número de genomas, específicamente, cuando se empezaron a estudiar genomas mitocondriales, se observó que existe cierto número de ellos que presentan variantes del código, los cuales, asignan a ciertos codones significados diferentes; estas variantes pueden representar aminoácidos diferentes a los asignados en el código genético "universal" o bien representar codones de término en lugar de ser codificantes de aminoácidos (11), descubrimiento que dejó en evidencia que el código no está "fosilizado" (o congelado), sino que ha evolucionado, y lo sigue haciendo. Por consiguiente, la correspondencia entre codones y aminoácidos no ha sido obra de la casualidad, sino que es resultado de la selección natural, de igual manera que lo es la robustez del código genético minimizando el impacto de mutaciones y errores durante la traducción. Una característica altamente conservada del código genético "universal" es su "degeneración", entendiéndose por este término el hecho de que, con excepción de dos codones monocodificantes, varios codones codifiquen el mismo aminoácido; esta característica también se observa en los codones de término. Por otra parte, el código genético "universal" no exhibe ambigüedad; esto es, un codón no especifica más de un solo aminoácido; esta característica es esencial para el funcionamiento y mantenimiento de la correspondencia de significado entre un codón y su aminoácido respectivo. La no ambigüedad también se observa en los codones de término, con excepción de cuando los codones de término UGA y UAG sufren una recodificación post-transcripcional y son traducidos como los aminoácidos selenocisteína y pirrolisina, respectivamente (18, 19). Las características anteriores de degeneración y no ambigüedad pueden haber sido objeto de procesos de selección natural sobre el código genético para minimizar efectos mutacionales en los genes (degeneración) y para evitar la existencia de significados múltiples en la codificación entre codones y aminoácidos (no ambigüedad). Fue en 1979 que se describieron las primeras variantes del código genético estándar en la mitocondria de humano (20), observándose que, en mitocondrias de células humanas, el codón UGA codifica para Trp y no se usa como un codón de paro como en el código estándar; y que el codón AUA codifica para Met y no para Ile (21). Hoy en día, se sabe que existen variantes del código en genomas mitocondriales de todos los eucariontes (excepto plantas superiores), así como en genomas de bacterias, en genomas nucleares de algunos hongos, diplomonadas, protozoos ciliados y algas verdes (22). En la actualidad, se conocen 26 variantes del código estándar. Hasta la fecha se han identificado 18 de ellas en genomas mitocondriales y las 8 restantes están presentes en genomas nucleares. En la Figura 1, se muestra el código genético estándar y sus variantes reportadas en la literatura; el significado de cada codón se encuentra de color azul para el código estándar, rosa para las variantes mitocondriales y verde para las variantes de genomas nucleares y bacterianos. El número subíndice que acompaña a cada variante del código se refiere a los números asignados para los diferentes códigos genéticos usados en diversos organismos, tanto en genomas nucleares y bacterianos, como en genomas mitocondriales en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Es interesante observar que algunos codones tienden a ser reasignados con mayor frecuencia; sin embargo, sus significados varían. El codón UGA ha sido reasignado de codón de paro a codificante de Gly, Cys, y Trp; los codones AGA y AGG han sido reasignados de Arg a Ser, Gly, Lys y codones de paro; en el caso particular del codón AGG, se ha perdido su uso en el hemicordado *Balanoglosus carnosus*. Es importante mencionar que todos los

Primer nucleótido	Segundo nucleótido: U	Segundo nucleótido: C	Segundo nucleótido: A	Segundo nucleótido: G	Tercer nucleótido
U	UUU, UUC: F	UCU, UCC: S	UAU, UAC: Y	UGU, UGC: C	U C A G
	UUA: L, St_{12}	UCA: S, St_{11}	UAA: St, Q_7, Y_{18}	UGA: St, W_2, C_3, G_4, Y_{27} $W_{6,7,13-22}$	
	UUG: L	UCG: S	UAG: St, $Q_{6,7}$, A_9, $L_{10,11}$	UGG: W	
C	CUU, CUC, CUA: L, T_{14}	CCU, CCC, CCA, CCG: P	CAU, CAC: H	CGU, CGC, CGA: R, $-_{14}$	U C A G
	CUG: S_8, A_{26}		CAA, CAG: Q	CGG: R	
A	AUU, AUC: I	ACU, ACC, ACA, ACG: T	AAU, AAC: N	AGU, AGC: S	U C A G
	AUA: I, $M_{14,19-22}$		AAA: K, $-_{15}$, N_{17-19}	AGA: R, S_{15-20}, G_{21}, $-_{22}$	
	AUG: M		AAG: K	AGG: R, $-_{15,22}$, K_{16}, S_{17-20}, G_{21}	
G	GUU, GUC, GUA, GUG: V	GCU, GCC, GCA, GCG: A	GAU, GAC: D	GGU, GGC, GGA, GGG: G	U C A G
			GAA, GAG: E		

Figura 1. *Representación del código genético estándar y sus variantes. En esta figura se utiliza la nomenclatura de una sola letra de los aminoácidos; "St" se usa para marcar los codones de paro; se usa un guion corto (-) para marcar los codones que están ausentes en esos organismos. En color azul, se observa el significado de los codones en el Código genético estándar; en color verde, las variantes del código usadas en genomas nucleares y bacterianos; y en color rosa, se observan las variantes mitocondriales del código. El número subíndice que acompaña a cada variante del código, se refiere a los números asignados para los diferentes códigos genéticos usados por los organismos en la base de datos del National Center for Biotechnology Information [NCBI] (25). Imagen modificada y actualizada de (23).*

codones que han sido reasignados en genomas nucleares, también corresponden a reasignaciones en los genomas mitocondriales (23).

Además, es posible observar que cambios iguales se presentan en linajes diferentes, por ejemplo, la reasignación de UGA de codón de paro a Trp en mitocondrias de eucariontes, como mohos y levaduras, así como en equinodermos, platelmintos, trematodos, artrópodos, urocordados y vertebrados. Adicionalmente, esta reasignación se ha dado no solo en genomas mitocondriales de organismos eucariotas, sino también en genomas bacterianos, ejemplo de ellos, es su reasignacion en *Mycoplasma*, así como en la α-proteobacteria *Candidatus Hodgkim ciadicola*, organismo simbionte del insecto Cicada, que presenta un genoma muy reducido, de 144 kb (24). Hay que recordar que se ha determinado que el pariente más cercano de las mitocondrias pertenece al filo de α-proteobacteria (8). Asimismo, existen variantes, que tienen el mismo significado en *phyla* diferentes, un ejemplo de ello, es la reasignación del codón AUA de Ile a Met en levaduras, así como trematodos, artrópodos, urocordados y vertebrados (los últimos cuatro sí están relacionados, no así las levaduras).

Igualmente, se puede ver que ciertas modificaciones han surgido específicamente en ciertos grupos, como los organismos del *phylum* Phlatyhelminthes, que son los únicos organismos que presentan la reasignación del codón AAA de Lys a Arg. O bien, en el caso de las levaduras, la reasignación de la familia de codones CUN de Leu a Thr.

En la mitocondria de vertebrados, y de manera específica de humano, los codones AGA/G, son codones no asignados, ya que no hay tRNAs que sean específicos para estos codones; además, no hay presencia de proteínas en la mitocondria de humano que los reconozcan directamente como codones de paro; por lo tanto, no codifican para codones de paro como anteriormente se creía y como se había reportado inclusive en la compilación "The Genetic Codes" del NCBI (25).

Como es evidente, hay un mayor número de variantes del código en los genomas mitocondriales

que en los genomas nucleares o bacterianos. Se piensa, que esto se debe a que el tamaño de los genomas mitocondriales es reducido, de hasta 300 kbp (9), presenta un número reducido de genes codificantes (2), lo cual permite que, si ocurre un cambio en el código, el número de genes (codificantes de proteínas) que serían afectados por dicho cambio, sea menor. Adicionalmente, el genoma mitocondrial presenta un alto contenido de A-T, lo cual se ha sugerido, que tiene un alto impacto en la preferencia para el uso de codones (26).

Se ha determinado que los cambios de correspondencia de codones ocurren principalmente en codones de paro (27). Ejemplos de estas variantes son la traducción del codón UGA como Trp, así como la reasignación de los codones UAG y UAA que en lugar de ser codones "universales" de paro, cambian a codones que codifican para Gln (Glutamina) en *Diplomonadas*, ciliados y algas verdes (22). Se cree que el hecho de que las variantes del código estén concentradas en codones de paro, se debe a que en estas posiciones no hay sustituciones de aminoácidos, y por ende no se dan cambios que podrían ser deletéreos en las proteínas; además, se piensa que, si un codón se utiliza raramente, su uso para otros propósitos será más probable, como es el caso de los codones de paro que solo se presenta uno por mRNA (23).

Existen dos casos en los que codones de paro, UAG y UGA, son usados para especificar aminoácidos inusuales. Tales aminoácidos son: selenocisteína (Sec), que se encuentra en proteínas redox de organismos de todos los tres dominios, y pirrolisina (Pyl), presente en algunas bacterias y arqueas del género *Methanosarcina*. Cabe aclarar que solamente codones de paro son reinterpretados en este sentido por el aparato traductor. En estos casos, se ha observado que el significado del codón es influenciado por su contexto en el mRNA y que existe un tRNA con el anticodón respectivo (18, 19, 28). En estos casos, tales codones de paro tienen un significado dual, lo que quiere decir que durante la traducción de algunos mRNAs pueden servir para la inserción de uno de estos aminoácidos y en otros, son leídos como señal de paro (29). El caso anterior, es diferente a lo que ocurre en la reasignación de codones, (las variantes del código estándar revisadas en este trabajo), en donde un codón que en el código estándar significa un aminoácido específico, es reinterpretado en todos los casos como un aminoácido diferente.

Para entender cómo es que se da el reconocimiento de estas variantes del código en la mitocondria de los diversos organismos eucariontes, se investigó la existencia de información sobre la secuencia del anticodón en los aminoacil-tRNAs que permiten dicho reconocimiento. En la Tabla 1, se muestran algunas de las variantes mt del código genético y la secuencia del anticodón que las reconoce.

Como se puede ver, algunos de los anticodones en los tRNAs mitocondriales, presentan alguna base modificada; es importante observar que tales modificaciones solamente están presentes en la primera posición del anticodón; un ejemplo de ello, es la presencia de 5-formilcitidina (5fC) en la primera posición del anticodón del $tRNA^{M}$ (C*AU), modificación presente en diversos organismos como mamíferos, moluscos, nemátodos y artrópodos. Es importante resaltar el caso del $tRNA^{Trp}$ (U*CA), el cual presenta diferentes modificaciones en la primera posición del anticodón, dependiendo del organismo en el que se encuentra; 5-carboximetilaminometil-2-thiouridina (cmnm(5)s(2)U) en el nematodo *Ascaris suum* (30), cmnm5U en *Saccharomyces cerevisiae* (31) y en el ciliado *Tetrahymena thermophila* (32), 5-taurinometiluridina (τm^5U) en el Ascidia *Halocynthia roretzi* (33), o C a U en *Leishmania tarentolae* [organismo en el cual este tRNA está codificado en su genoma nuclear y donde se ha observado que es modificado por uno de los sistemas de edición de RNAs presente en la mitocondria, una vez que este tRNA es importado del citoplasma] (34, 35).

Las modificaciones aquí presentadas no son las únicas en estas moléculas, ya que los tRNAs son moléculas que presentan, en todos los organismos, modificaciones químicas post-transcripcionales (aproximadamente el 17% del total de sus nucleótidos están modificados); las cuales afectan su estabilidad y plegamiento interfiriendo en su estructura y función. Estas modificaciones se clasifican en relación a cómo alteran la función de un tRNA, pudiendo afectar la estructura completa del tRNA, o bien, afectando solamente a los centros funcionales de los tRNAs. Debido a lo anterior, tales modificaciones tienen efectos en la decodificación y en la síntesis de proteínas (36). Algunas de estas modificaciones son importantes para la discriminación entre los codones que codifican para un mismo aminoácido en una misma familia de codones, por ejemplo, AAA/G para Lys contra AAU/C para Asn (37). Otras modificaciones permiten a los organismos aumentar la capacidad decodificante de los tRNAs (36), un ejemplo de ello, es la modificación de una adenina en Inosina –un análogo de la guanosina - en la primera posición del anticodón, que puede interaccionar con A, C o U de la tercera posición del codón, permitiendo así que un mismo tRNA pueda decodificar tres diferentes codones, los cuales codifican para el

Tabla 1

tRNAs que reconocen variantes del código genético en mitocondrias. Se muestran los diferentes tRNAs que reconocen las variantes del código genético observadas en los genomas mitocondriales de diversos organismos. Se indica la secuencia del anticodón que reconoce los codones cuyo significado varía al del código estándar, así como en los organismos se ha identificado la presencia de tales tRNAs. Algunos tRNAs, pueden presentar modificaciones post-transcripcionales en la secuencia del anticodón y la posición en la que ocurren tales modificaciones se ha marcado con un (*); además, en estos casos, se indica cual es la modificación en ese tRNA en específico.

tRNAs que reconocen variantes del código genético en mitocondria			
tRNA	**Anticodón**	**Codón**	**Organismo donde se encontró**
Thr	UAG	CUN	Levadura *S. cerevisiae*
Met	C*AU *5-formilcitidina (f5C)	AUR	Mamíferos; nematodo *Ascaris suum*; *D. melanogaster*; molusco *Loligo breekeri*
Leu	CUA	UAG	Alga de la familia *Scenedesmaceae*, *Scenedesmus obliquus* hongo *chytridiomycete Spizellomyces punctatus*
Asn	GU*U *Pseudouridina (Ψ)	AAA/U/C	Equinodermos como *Asterina pertinifera* y platelmintos
Trp	UCA	UGA	Levaduras
Trp	C*CA *Modificada a U en la mitocondria	UGA	*Leishmania tarentolae*
Trp	U*CA *5-taurinometiluridina (τm^5U) o 5-taurinometil-2-tiouridina (τm^5s^2U)	UGR	Ascidia *Halocynthia roretzi*
Trp	U*CA *5-carboximetilaminometil-2-tiouridina (cmnm(5)s(2)U) o 5-carboximetilaminometiluridina (cmnm5U)	UGR	cmnm(5)s(2)U en nemátodo *Ascaris suum*; cmnm5U en *S. cerevisiae*, en el ciliado *Tetrahymena thermophila*
Ser	G*CU *7-metilguanosina (m^7G)	AGN	Estrella de mar; molusco *Loligo bleekeri*
Ser	GCU	AGY/ AGN	Platelmintos. Moluscos de la clase bivalva.
Ser	GCU	AGU/C/A	*D. melanogaster*
Gly	U*CU	AGR	Urocordados[100]

* Modificación post-transcripcional. N Los cuatro nucleótidos (A, G, C, U); Y Pirimidinas (U/C); R Purinas (A/G)

mismo aminoácido, evitando de esta manera, la necesidad del uso de un mayor número de tRNAs (38).

Estos anticodones modificados, como se puede ver, en algunos casos permiten el reconocimiento de diversas bases, por ejemplo, el $tRNA^{Ser}$ (G*CU) que en molusco (39, 40) y estrellas de mar (41), presentan 7-metilguanosina (m^7G) en la primera posición, la cual, permite el reconocimiento de A, U, G o C en la tercera posición del codón. En otros casos, la modificación del anticodón permite que solamente se reconozcan bases púricas (A y G); ejemplo de ello son las modificaciones cmnm(5) s(2)U, cmnm5U, y τm^5U en la primera posición del $tRNA^{Trp}$ (U*CA) o 5fC en la primera posición del anticodón del $tRNA^{Met}$ (C*AU). Un caso particular es el del $tRNA^{Asn}$ (GU*U) en donde la uridina en segunda posición es modificada a pseudouridina, lo cual permite el reconocimiento del codón AAA como Asn (42, 43).

No en todos los tRNAs se encuentra modificada la base de la primera posición del anticodón y, sin embargo, se observa que estos tRNAs pueden reconocer más de una base en la tercera posición del codón. Por ejemplo, el $tRNA^{Thr}$ (UAG) que puede reconocer las bases A, U, G o C en la tercera posición del codón en *S. cerevisiae* (44), el $tRNA^{Lys}$ (CUU) que permite reconocer A o G en *Drosophila melanogaster* (42), o el $tRNA^{Ser}$ (GCU) que permite reconocer pirimidinas en platelmintos (45); además el tRNASer (GCU) permite el reconocimiento de U, C, G o C en moluscos de la clase bivalva (46). Este

hecho muestra que un mismo tRNA puede reconocer a más de un codón, y que, además, parece que la capacidad para decodificar codones de un tRNA varía de un organismo a otro.

El hecho de que el código genético consista de 64 codones, 61 de los cuales representan aminoácidos, mientras que tres son señales de paro, implica la existencia de codones que codifican para un mismo aminoácido (el código, es pues degenerado), y que, en ciertos casos, el nucleótido de la tercera posición del codón no es determinante para el significado de dicho codón. Esta observación llevó a diversos investigadores a plantear diferentes modalidades en la interacción codón-anticodón. En la actualidad, se sabe que en algunos organismos y organelos (todos ellos con genomas reducidos) el número de tRNAs es menor a 61, por lo que un mismo tRNA se encarga de reconocer a más de un aminoácido; de igual manera, se conoce la existencia de tRNAs isoaceptores (tRNAs diferentes, los cuales son cargados con el mismo aminoácido).

Ya en 1966, Francis Crick propuso la "hipótesis del bamboleo" ("The Wobble Hypothesis"); en ella plantea que, en las dos primeras posiciones de un triplete, el apareamiento de bases se da estrictamente entre los pares de bases estándar (G/C y A/T); sin embargo, en la tercera posición, se da un cierto "bamboleo" en el apareamiento de las bases, debido a que hay más de una posición de apareamiento posible entre ellas (47). Lo anterior se debe a que la estructura del sitio A (aceptor) del ribosoma - sitio en que se da el apareamiento codón-anticodón - permite un aumento en la flexibilidad de este primer nucleótido del anticodón (47).

De acuerdo a esta hipótesis del bamboleo, se requiere un mínimo de treinta y un tRNAs (excluyendo el iniciador) para reconocer los sesenta y un codones que codifican para aminoácidos en el código genético estándar, ya que se requieren al menos dos tRNAs por cada familia de cuatro codones; además, se requiere de un tRNA por par de codones o único codón. No obstante, genomas reducidos de ciertos organismos como *Mycoplasma* o bien de organelos como la mitocondria, codifican para un número menor de tRNAs (48); por ejemplo, el genoma mitocondrial de mamíferos codifica sólo para 22 tRNAs, de los cuales 18 codifican cada uno para un sólo aminoácido, 2 para Ser y 2 para Leu (49). Adicionalmente, se sabe que no hay importación de tRNAs codificados en el genoma nuclear en humanos, con la posible excepción de $tRNA^{Gln}$, importado a mitocondrias en células de individuos con epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (49). Se ha demostrado, por otra parte, la importación de tRNAs en *Tetrahymena*, tripanosomátidos, levaduras, plantas y marsupiales (50), por lo que se infiere que debe haber modificaciones en las reglas de bamboleo para la traducción de mRNAs en el ribosoma mitocondrial.

Es interesante observar que en la mitocondria de mamíferos está presente una uridina no modificada en la primera posición del anticodón, la cual puede aparearse con cualquiera de las cuatro bases en la tercera posición del codón; dicha uridina está presente en los tRNAs específicos para ocho familias de cuatro codones: Pro, Thr, Ala, Ser, Leu, Val, Gly, y Arg. Esto reduce el número total de tRNAs requeridos en la mitocondria por ocho, y la conversión de AGA y AGG a codones de término elimina la necesidad de otro tRNA, obteniéndose así un total de 22 tRNAs requeridos.

Las diferentes normas de bamboleo para la traducción mitocondrial y nuclear, muy probablemente, surgen de las diferencias en la estructura detallada del sistema que traduce los dos genomas. Cabe mencionar que las mitocondrias presentan tRNAs con estructuras "truncadas" de forma inusual. Son más cortos que los tRNAs citoplásmicos, y con frecuencia, no presentan nucleótidos que están conservados o semi-conservados y que tienen un importante papel en el plegamiento de la estructura terciaria en forma de "L" (38); además, como ya se ha mencionado en puntos anteriores, la gran mayoría de los codones que han tenido un cambio en su significado, han ocurrido en la mitocondria. Se cree que estas características se deben al acortamiento de los genomas mitocondrial (51). Además, se ha postulado que algunas de estas variantes del código, hacen al código más "simple", como en casos en los que dos codones que tienen diferente significado, son reemplazados por un par que codifica para el mismo aminoácido. Por ejemplo, UGG y UGA (ambos codones codifican para Trp en los genomas mt de todos los eucariontes excepto en plantas, en lugar de que uno codifique para Trp y el otro ser un codón de paro); otro caso son los codones AUG y AUA (ambos codifican para Met en algunos *phyla* de animales y levaduras, en lugar de codificar para Met e Ile respectivamente).

En el caso de los codones AGA/G en mitocondria de humano, que anteriormente se creía eran codones de paro en los ORFs: MTCO1 y MTND6, y que no son reconocidos por ningún tRNA mitocondrial, actualmente se sabe que los ribosomas mitocondriales de humano utilizan un mecanismo de desplazamiento del marco de lectura del ribosoma (ribosome frameshifting), de tal manera que al estar precedidos estos codones AGA/G por una "U", el ribosoma puede posicionar el codón UAG en el sitio A, utilizando de esta manera solamente

los codones de paro canónicos; también existe evidencia de que los factores de liberación que forman parte de la familia de 4 miembros hasta ahora conocidos que son transportados a mitocondria (mtRF1, mtRF1a, ICT1, c12orf65), ninguno es capaz de reconocer los codones AGA/G como codones de paro, aunque ICT1 podría estar involucrado en la terminación de la traducción. Se ha postulado que este mecanismo se puede dar por tres razones: la pausa del ribosoma mitocondrial en los codones AGA/G que no son reconocidos por tRNAs, por la presencia de secuencias "resbaladizas" ("slippery" sequences) río arriba, o bien por la formación de estructuras secundarias en 3' (52). Sin embargo, aún existen dudas al respecto, dado que se ha observado que ICT1 y C12orf65 son esenciales en el proceso de traducción mitocondrial, y que ICT1 podría funcionar de tal manera que permitiría el paro de la síntesis de proteína. Lamentablemente, aún no existen modelos de traducción mitocondrial *in vitro* en vertebrados, por lo que no hay hasta la fecha manera en que estas hipótesis puedan probarse (53).

PROPUESTAS DEL ORIGEN DE LOS CÓDIGOS GENÉTICOS MITOCONDRIALES

Diversos autores han propuesto algunas formas en las que pudieron haber surgido las diferentes variantes del código genético ahora presentes en los organismos. Estos trabajos, se basan en las variantes mitocondriales del código, ya que superan en número a las presentes en genomas nucleares y bacterianos. Por un lado, figuran las hipótesis que proponían que los códigos mitocondriales representaban formas primitivas anteriores a la fijación del código universal, así como las que sostenían que las reasignaciones de codones observadas en mitocondrias se habrían dado por evolución del código universal. Los descubrimientos de los años subsecuentes, indican que muy probablemente, tales cambios en el código genético de genomas mitocondriales, así como de procariontes y eucariontes, han surgido a partir del código universal (26).

Se considera que los genomas mitocondriales podrían mostrar predisposición a cambios debido a que presentan características que los diferencian de los genomas bacterianos y nucleares. Las mitocondrias presentan un genoma pequeño, el cual codifica para pocas proteínas que son esenciales para el proceso de respiración, no para su propia replicación o mantenimiento. Este hecho permite deducir que los genomas mitocondriales no deben estar bajo fuerte presión de selección para la exactitud de la traducción, por lo cual podría haber mayor libertad a cambios de significado de codones en comparación con genomas nucleares o bacterianos. Además, usualmente son genomas ricos en A-T, lo cual permite que haya preferencia en el uso de codones (23, 54). Estas características del genoma mitocondrial son la base de diferentes teorías que se han postulado para entender cómo han surgido los cambios en el código genético dando lugar a los diferentes códigos mitocondriales que existen hoy en día. Dichas teorías se presentan a continuación:

En la teoría de captura de codón, propuesta por Osawa y Jukes en 1992 (55) se plantea la desaparición temporal de un codón de un aminoácido o bien un codón de paro de los marcos de lectura mediante el cambio a un codón sinónimo así como la pérdida o modificaciones del correspondiente tRNA que traduce dicho codón; o en el caso de codones de paro, por modificaciones o pérdida en el factor de liberación (RF) que lo reconoce; produciéndose de esta manera un codón no asignado (el cual ya no es reconocido por ningún tRNA ni por RFs). Este codón, más tarde reaparece en los marcos de lectura abiertos por el cambio de otro codón, y aparece, además, un tRNA que va a reconocer a este codón que reapareció, pero ahora con una asignación diferente, esto es, un tRNA ya existente, por mutación va a ser capaz de reconocer a este codón, pero con un significado diferente al que tenía inicialmente (55). Un ejemplo claro de la posibilidad de que este mecanismo se lleve a cabo, es el caso de la reasignación del codón UGA, un codón de paro, que, en la mitocondria de diversos organismos, así como en *Mycoplasma*, codifica para Trp. UGA es un codón de paro poco utilizado en las bacterias, y, como se mencionó anteriormente, por presión mutacional, es posible que los pocos codones de paro UGA, desaparecieran en un inicio por mutación a un codón de paro UAA, para así disminuir el contenido de GC de los genomas de estos organismos. El RF que reconociera el codón UGA, perdería dicha función, convirtiéndose de esta manera en un codón no asignado. Posteriormente, el anticodón del $tRNA^{Trp}$ (CCA), igualmente habría mutado, bajo presión mutacional A-T, a UCA; este anticodón, puede reconocer los codones UGA y UGG, ambos específicos para Trp en mt de diversos organismos (55).

En la teoría del intermediario ambiguo, propuesta por Schultz y Yarus en 1994, se argumenta que el codón a reasignar, no necesariamente debe desaparecer; sino que por el contrario, existe un periodo de transición en el que este codón se traduce ambiguamente como dos aminoácidos distintos (50). Esto es, que la reasignación de codones ocurre mediante un estado intermediario

en el que un codón particular se decodifica ambiguamente tanto por un tRNA afín, como por un tRNA mutado. Como resultado, tal decodificación ambigua, así como la competencia entre los dos tRNAs, podría llevar a la eliminación del gen que codifica al tRNA afín, así como la decodificación del codón por el tRNA mutado. De igual manera, se propone que este mismo mecanismo también aplica para la reasignación de codones de paro a codones con sentido, en los que surge un tRNA que reconoce un codón de paro por mutación y compite por el codón de paro para ser reconocido por el factor de liberación (15). Un ejemplo de este mecanismo es la reasignación del codón AAA de Lys a Asn observada en genomas mitocondriales de equinodermos, platelmintos y tremátodos (56). Este codón es frecuentemente más utilizado que su codón sinónimo AAG en organismos donde codifica para Lys, hecho por el cual se cree, sería difícil su desaparición. En equinodermos y platelmintos el $tRNA^{Lys}$ (UUU) ha mutado a CUU, reconociendo solamente AAG; además, el $tRNA^{Asn}$ (GU*U) presenta modificaciones, una de ellas, una uridina en la segunda posición del anticodón que permite el reconocimiento del codón AAA; adicionalmente, en algunos equinodermos, se presenta la modificación en la base inmediata al anticodón en posición 5', de U a C, lo cual se piensa igualmente ayuda en el reconocimiento de este codón (57). Por lo tanto, se cree que el proceso pudo haber comenzado por una ganancia de función del $tRNA^{Asn}$, por lo que presentó la capacidad para reconocer el codón AAA; en estos organismos dejó de ocurrir la modificación del $tRNA^{Asn}$ (G*UU), donde G es modificada a Q para evitar errores al distinguir entre G y A en la tercera posición del codón. Entonces, cambios sucesivos en el $tRNA^{Asn}$ incrementarían el número de codones AAA traducidos como Asn, y mutaciones en el $tRNA^{Lys}$ lo harían no funcional, eliminándose así la ambigüedad al leer dicho codón (40).

La teoría de la racionalización del genoma sugiere que los cambios en los códigos de genomas mitocondriales, así como de parásitos intracelulares obligados, se debe a selección para minimizar sus aparatos de traducción (23). La presión selectiva para minimizar el genoma mitocondrial produce reasignaciones de codones específicos, en particular, uno de los tres codones de paro (15). Además, predice una simplificación del repertorio de tRNAs así como enzimas modificadoras. Por ejemplo, una misma familia de codones puede ser reconocida por un único tRNA que presenta una U en la primera posición del anticodón (23).

Como es claro, las variantes del código han surgido por diferentes mecanismos en diferentes linajes y en diversos momentos de la evolución, observándose modificaciones en las propiedades de reconocimiento de tRNAs así como cambios en el aparato de término de la traducción en el caso de codones de paro. Algunos de estos cambios observados, parecen proveer de cierta ventaja selectiva en circunstancias particulares, lo cual muestra que el código genético no está "congelado", y en algunos linajes, ha seguido evolucionando, permitiendo así cambios adaptativos.

El estudio de las variantes del código genético, probablemente proporcionará nuevas ideas sobre la manera en que la fidelidad en la decodificación del mRNA interfiere con la composición de bases del genoma, el uso de codones y su reasignación, proporcionándose las bases para investigaciones sobre la estructura del código y el proceso de evolución molecular, haciendo posible explorar la relación entre las reglas de codificación y la evolución de los genomas (23, 26).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la M. en C. Ana Paulina Mendoza von der Borch y a la Q. Viviana Escobar Sánchez, del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias por su valioso apoyo en la revisión crítica de este trabajo y la configuración de las imágenes.

REFERENCIAS

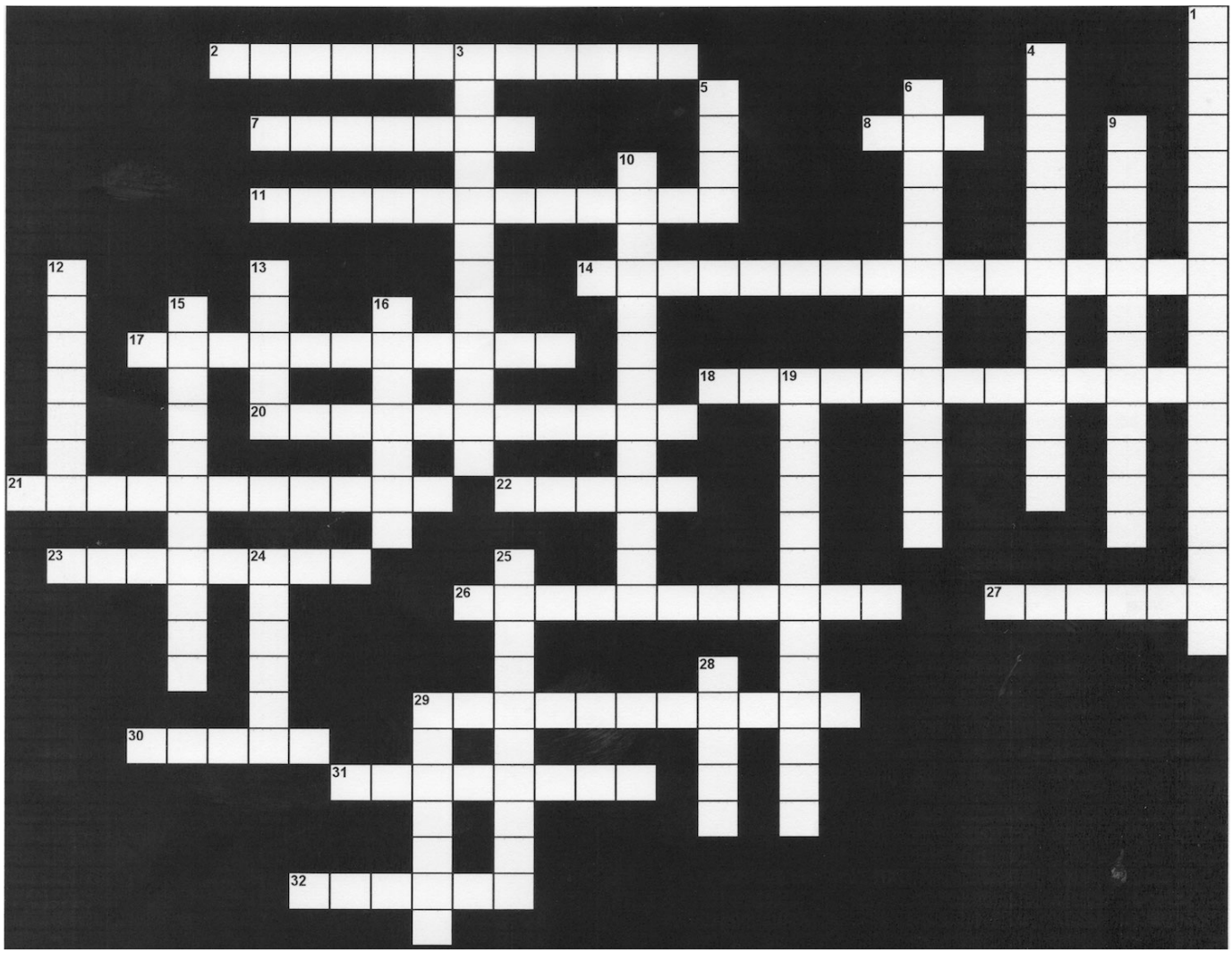
1. Osellame L, Blacker T, Duchen M (2012) Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 26:711-723.
2. Chinnery P, Hudson G (2013) Mitochondrial genetics. Br Med Bull 106:135-159.
3. Kasiviswanathan R., Collins T, Copeland W (2012) The interface of transcription and DNA replication in the mitochondria. Biochim Biophys Acta 1819:970 - 978.
4. Gray M, Burger G, Lang B (2001) The origin and early evolution of mitochondria. Genome Biol 2: REVIEWS 1018.1- 1018.5.
5. Hirt R, Horner D (ed.) (2004) Organelles, Genomes and Eukaryote Phylogeny: An Evolutionary Synthesis in the Age of Genomics. CRC Press, New York, p 400.
6. Burger G, Gray M, Forget L, Lang B (2013) Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists. Genome Biol Evol 5:418-438.
7. Avila G, Tovar J (2004) Mitosomes of Entamoeba histolytica are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. Microbiol 150:1245–1250.
8. Van der Giezen M, Tovar J, Clark C (2005) Mitochondrion-derived organelles in protists and fungi. Int Rev Cytol 244:175–225.
9. Boxma B, de Graaf R, van der Staay G, van Alen T, Ricard G, Gabaldón T, van Hoek A, Moon-van der Staay S, Koopman W, van Hellemond J, Tielens A, Friedrich T, Veenhuis M, Huynen M, Hackstein J (2005) An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. Nature 434: 74 –79.
10. Barbrook A, Howe C, Kurniawan D, Tarr S (2010) Organization and expression of organellar genomes. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 365:785-797.
11. Anderson S, Bankier A, Barrell B, de Bruijn M, Coulson A, Drouin J, Eperon I, Nierlich D, Roe B, Sanger F, Schreier P, Smith A, Staden R, Young I (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290: 457–465.
12. Zhang J, Lin A, Powers J, Lam M, Lotz C, Liem D, Lau E, Wang D, Deng N, Korge P, Zong N, Cai H, Weiss J, Ping P (2012) Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: mitochondrial proteome design: from molecular identity to pathophysiological regulation. J Gen Physiol 139:395-406.
13. Marshall W. Nirenberg - Nobel Lecture: The Genetic Code. Nobelprize.org.Nobel Media AB 2013. Web 1 Jun 2014. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1968/nirenberg-lecture.html
14. Freeland S, Hurst L (2004) Evolution encoded. Sci Am 290:84-91.
15. Koonin E, Novozhilov A (2009) Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma. IUBMB Life 61, 99-111.
16. Woese C (1965) On the evolution of the genetic code. Proc Natl Acad Sci U S A 54: 1546-1552.
17. Wong J (1975) A co-evolution theory of the genetic code. Proc Natl Acad Sci U S A 72:1909-1912.
18. Baranov P, Gesteland R, Atkins J (2002) Recoding: Translational Bifurcations in Gene Expression. Gene 286: 187–201.
19. Srinivasan G, James C, Krzycki J (2002) Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. Science 296:1459–1462.
20. Bender A, Hajieva P, Moosmann B (2008) Adaptive antioxidant methionine accumulation in respiratory chain complexes explains the use of a deviant genetic code in mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A 105:16496-16501.
21. Barrell B, Bankier A, Drouin J (1979) A different genetic code in human mitochondria. Nature 282:189-194.
22. Vallabhaneni H, Fan-Minogue H, Bedwell DM, Farabaugh PJ (2009) Connection between stop codon reassignment and frequent use of shifty stop frameshifting. RNA 15:889-897.
23. Knight R, Freeland S, Landweber L (2001) Rewiring the keyboard: evolvability of the genetic code. Nat Rev Genet 2:49-58.
24. McCutcheon J, McDonald B, Moran N (2009) Origin of an alternative genetic code in the extremely small and GC-rich genome of a bacterial symbiont. PLoS Genet 5, e1000565.
25. Elzanowski A, Ostell J. The Genetic Codes. National Center for Biotechnology. 18 Nov 2016. Web. 05 Jun 2017. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi?mode=c
26. Santos M, Moura G, Massey S, Tuite M (2004) Driving change: the evolution of alternative genetic codes. Trends Genet 20:95-102.

27. Lekomtsev S (2007) Non-standard genetic codes and translation termination. Mol Biol (Mosk) 41:964-972.
28. Parker J (1989) Errors and alternatives in reading the universal genetic code. Microbiol Rev 53:273-298.
29. Lobanov A, Turanov A, Hatfield D, Gladyshev V (2010) Dual functions of codons in the genetic code. Crit Rev Biochem Mol Biol 45:257-265.
30. Sakurai M, Ohtsuki T, Suzuki T, Watanabe K (2005) Unusual usage of wobble modifications in mitochondrial tRNAs of the nematode Ascaris suum. FEBS Lett 579:2767-2772.
31. Martin RP, Sibler A, Gehrke C, Kuo K, Edmonds C, McCloskey J, Dirheimer G (1990) 5-[[(carboxymethyl)amino]methyl]uridine is found in the anticodon of yeast mitochondrial tRNAs recognizing two-codon families ending in a purine. Biochemistry 29:956-959.
32. Hekele A, Beier H (1991) Nucleotide sequence and functional characterization of a mitochondrial tRNA(Trp) from Tetrahymena thermophila. Nucleic Acids Res 19:1941.
33. Suzuki T, Miyauchi K, Suzuki T, Yokobori S, Shigi N, Kondow A, Takeuchi N, Yamagishi A, Watanabe K (2011) Taurine-containing uridine modifications in tRNA anticodons are required to decipher non-universal genetic codes in ascidian mitochondria. J Biol Chem 286:35494-35498.
34. Alfonzo J, Blanc V, Estevez A, Rubio M, Simpson L (1999) C to U editing of the anticodon of imported mitochondrial tRNA(Trp) allows decoding of the UGA stop codon in Leishmania tarentolae. Embo J 18:7056-7062.
35. Simpson L, Thiemann O, Savill N, Alfonzo J, Maslov D (2000) Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A 97:6986-6993.
36. Jackman J, Alfonzo J (2013) Transfer RNA modifications: nature's combinatorial chemistry playground. Wiley Interdiscip Rev RNA 4:35-48.
37. Agris P. (2004) Decoding the genome: a modified view. Nucleic Acids Res 32:223-38.
38. Christian B, Spremulli L (2012) Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. Biochim Biophys Acta 1819, 1035-1054.
39. Tomita K, Ueda T, Watanabe K (1998) 7-Methylguanosine at the anticodon wobble position of squid mitochondrial tRNA(Ser)GCU: molecular basis for assignment of AGA/AGG codons as serine in invertebrate mitochondria. Biochim Biophys Acta 1399:78-82.
40. Ohira T, Suzuki T, Miyauchi K, Suzuki T, Yokobori S, Yamagishi A, Watanabe K (2013) Decoding mechanism of non-universal genetic codes in Loligo bleekeri mitochondria. J Biol Chem 288:7645-7652.
41. Matsuyama S, Ueda T, Crain P, McCloskey J, Watanabe K (1998) A novel wobble rule found in starfish mitochondria. Presence of 7-methylguanosine at the anticodon wobble position expands decoding capability of tRNA. J Biol Chem 273:3363-3368.
42. Tomita K, Ueda T, Watanabe K (1999) The presence of pseudouridine in the anticodon alters the genetic code: a possible mechanism for assignment of the AAA lysine codon as asparagine in echinoderm mitochondria. Nucleic Acids Res 27:1683-1689.
43. Watanabe K, Yokobori S (2011) tRNA Modification and Genetic Code Variations in Animal Mitochondria. J Nucleic Acids 623095.
44. Su D, Lieberman A, Lang B, Simonovic M, Söll D, Ling J (2011) An unusual tRNAThr derived from tRNAHis reassigns in yeast mitochondria the CUN codons to threonine. Nucleic Acids Res 39:4866-4874.
45. Garey J, Wolstenholme D (1989) Platyhelminth mitochondrial DNA: evidence for early evolutionary origin of a tRNA(serAGN) that contains a dihydrouridine arm replacement loop, and of serine-specifying AGA and AGG codons. J Mol Evol 28:374-387.
46. Yu H, Li Q (2011) Mutation and selection on the wobble nucleotide in tRNA anticodons in marine bivalve mitochondrial genomes. PLoS One 6, e16147.
47. Crick FH (1966) Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis. J Mol Biol 19:548-555.
48. Alkatib S, Sharff L, Rogalski M, Fleischmann T, Matthes A, Seeger S, Schöttler M, Ruf S, Bock R (2012) The contributions of wobbling and superwobbling to the reading of the genetic code. PLoS Genet 8, e1003076.
49. Bilbille Y, Gustillo E, Harris K, Jones C, Lusic H, Kaiser R, Delaney M, Spremulli L, Deiters A, Agris P (2011) The human mitochondrial tRNAMet: structure/function relationship of a unique modification in the decoding of unconventional codons. J Mol Biol 406:257-274.
50. Rubio M, Rinehart J, Krett B, Duvezin – Caubet S, Reichert A, Söll D, Alfonzo J (2008) Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 9186-9191.

51. Watanabe, K. (2010) Unique features of animal mitochondrial translation systems. The non-universal genetic code, unusual features of the translational apparatus and their relevance to human mitochondrial diseases. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 86, 11-39.
52. Lightowlers R, Chranowska-Lightowlers Z (2010) Terminating human mitochondrial protein synthesis. A shift in our thinking. RNA Biol 7:282-286.
53. Lind C, Sund J Åqvist J (2013) Codon-reading specificities of mitochondrial release factors and translation termination at non-standard stop codons. Nat Commun 4:1-8.
54. Lang B, Burger G. Thraustochytrium aureum. Mitochondrial genome organization, gene content, genetic code. OGMP. 23-Oct-2007. Web. 1-Jun-2014. http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/taure/gen.html
55. Osawa S, Jukes T, Watanabe K, Muto A (1992) Recent Evidence for Evolution of the Genetic Code. Microbiol Rev 56:229-264.
56. Cantatore P, Roberti M, Rainaldi G, Gadaleta M, Saccone C (1989) The complete nucleotide sequence, gene organization, and genetic code of the mitochondrial genome of Paracentrotus lividus. J Biol Chem 264:10965-10975.
57. Sengupta S, Yang X, Higgs P (2007) The mechanisms of codon reassignments in mitochondrial genetic codes. J Mol Evol 64:662-688.

CRUCIBIOQ®
AGUA Y ELECTROLITOS

Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: balmori@bq.unam.mx



HORIZONTALES

2 En este espacio que representa aproximadamente el 20% del peso corporal, se encuentran los líquidos intersticial, linfático, gastrointestinal, cefalorraquídeo, plasma y orina.

7 El agua tiene la capacidad de interactuar tanto con este tipo de moléculas como con las iónicas, con las primeras porque éstas se intercalan fácilmente en el agua y con las segundas porque los iones resultantes reaccionan ante las cargas del agua.

8 Mecanismo de regulación del contenido de agua en el organismo en el que intervienen los osmorreceptores del hipotálamo cuando la concentración osmótica dentro de la célula es alta o cuando el volumen total del líquido fuera de ella, disminuye.

11 Hormona que regula la presión sanguínea, el volumen del líquido extracelular y el balance de sodio y potasio; uno de sus efectos es la liberación de vasopresina

14 Es la ingesta excesiva de agua que consecuentemente conduce al aumento en la excreción urinaria, lo que produce hiponatremia, puede llegar a producir inflamación cerebral que se expresa como letargia, agitación y convulsiones.

17 La deshidratación puede ser de este tipo si no hay una adecuada hidratación oral, el sodio se encuentra aumentado en el espacio extracelular sin que se pueda compensar por transferencia al interior de la célula.

18 La vasopresina es la hormona _____ que promueve la retención de agua en el riñón, se libera principalmente como respuesta a los cambios en la osmolaridad del plasma o en el volumen de la sangre, aumenta la resistencia vascular periférica y la presión arterial; la ingesta de etanol la inhibe lo que induce la diuresis del alcohólico.

20 Es una familia de proteínas que se encuentra presente en la mayoría de las células, permiten el paso de agua a través de las membranas celulares; en el túbulo renal tiene a su cargo la reabsorción del agua.

21 Mediante este proceso el organismo mantiene el equilibrio de múltiples funciones como es la compartimentalización de electrolitos, la temperatura corporal, el nivel de glucemia y la eliminación de desechos orgánicos hacia el riñón, entre otras.

22 Su concentración en el plasma es de 140 mmol/l, es un ion que contribuye de manera importante a mantener la osmolaridad del líquido extracelular y a determinar la distribución de agua dentro y fuera de la célula.

23 El hipotálamo es la región del _____ que regula el equilibrio del agua en el organismo por diferentes mecanismos como la sed, sudoración y su retención o excreción vía renal, entre otros.

26 La angiotensina es un potente vasoconstrictor, actúa sobre la corteza suprarrenal incrementando la secreción de _____, hormona que aumenta la reabsorción del sodio de la orina, sudor, saliva y secreciones gástricas.

27 Forma parte de la sangre, está compuesto aproximadamente por 90% de agua, los iones más importantes presentes son sodio, potasio, calcio, cloruro, fosfato y bicarbonato; además contiene 8% de proteínas donde las principales son albuminas, globulinas, fibrinógeno, lipoproteínas y las que transportan nutrientes, hormonas y algunos metales.

29 Con este término se define a la concentración total de solutos en disolución; así, un mol/L de NaCl tiene una _____ de 2 Osm/L ya que al disolverse tanto Na^+ como Cl^- éstas son partículas osmóticamente activos.

30 Es una unidad de medida que define al número de moles de un compuesto químico que permite que se mantenga una presión osmótica de una disolución.

31 La presión _____ es la fuerza que debe aplicarse para contrarrestar el flujo del agua del sitio de menor al de mayor concentración de solutos, depende del número de partículas del soluto y no de su naturaleza.

32 Enzima que cataliza la conversión del angiotensinógeno en angiotensina I, que por otra enzima se convierte en angiotensina II, esta última molecula induce la liberación de aldosterona que actúa sobre el sistema nervioso central mediante la liberación de la hormona antidiurética.

VERTICALES

1 Esta característica del oxígeno permite que el agua sea una molécula polar con cargas parciales negativas en el oxígeno y positivas en los hidrógenos, esto conduce a la formación de puentes de hidrógeno, a la atracción entre las moléculas (tensión superficial) y a su alta capacidad de disolución.

3 Así se designan a los iones inorgánicos que están disueltos en los líquidos de los diferentes espacios del organismo; mantienen un gradiente de iones a través de las membranas y regulan el balance de agua.

4 El sudor contiene menor cantidad de sodio que el que está presente en el líquido extracelular, durante la sudoración acentuada al eliminarse una mayor cantidad de agua conduce a una _____ en el líquido vascular.

5 Molécula fundamental de los seres vivos, entre sus múltiples funciones está la de regular el pH, mantener la temperatura corporal, transportar sustancias dentro del organismo y facilitar la excreción de los productos de desecho.

6 El _____ de agua por los individuos depende de edad, sexo, actividad física, naturaleza de los alimentos, clima y estado de salud.

9 La sudoración es la forma en la cual el organismo realiza el mecanismo de _____ ya que junto con la evaporación hay pérdida de calor.

10 Los osmorreceptores _____ regulan la entrada y salida de agua gracias a la sed y a la participación de la hormona antidiurética que incrementa la reabsorción de agua.

12 El _____ de sodio es el principal componente del líquido extracelular se encuentra a una concentración próxima al 0.9%.

13 Este cuadro que ocasiona inflamación, se produce cuando un exceso de líquido vascular se filtra de los vasos sanguíneos hacia el espacio intersticial sin la correspondiente reabsorción, unas de las posibles causas es la disminución de proteínas plasmáticas las que disminuyen la presión oncótica de la sangre o bien, por el aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos.

15 Es la diminución del volumen sanguíneo la que puede deberse a deshidratación o por sangrados, su detección la realizan los receptores presentes en los vasos sanguíneos que envían la señal al hipotálamo y actúan sobre los núcleos supraóptico y paraventricular donde se produce la hormona antidiurética, lo que conduce a un aumento en la reabsorción del agua.

16 Es el principal catión del líquido intracelular a una concentración de 110 mmol/l, mientras que en el líquido extracelular su presencia es aproximadamente 30 veces menor.

19 La Na^+/K^+-ATPasa es un _____ iónico que hidroliza a una molécula de ATP, la energía que se libera impulsa la salida de tres iones de sodio desde el interior de la célula y la entrada de dos iones de potasio.

24 En un individuo _____, aproximadamente el 60% del peso corporal es agua de la cual el 40% es intracelular y el 20% extracelular; así para un sujeto de 70 kg su volumen total de agua es de 42 litros (28 l dentro de la célula y 14 l por fuera), el líquido extracelular está repartido en el volumen intravascular (plasma) y el extravascular (líquido intersticial).

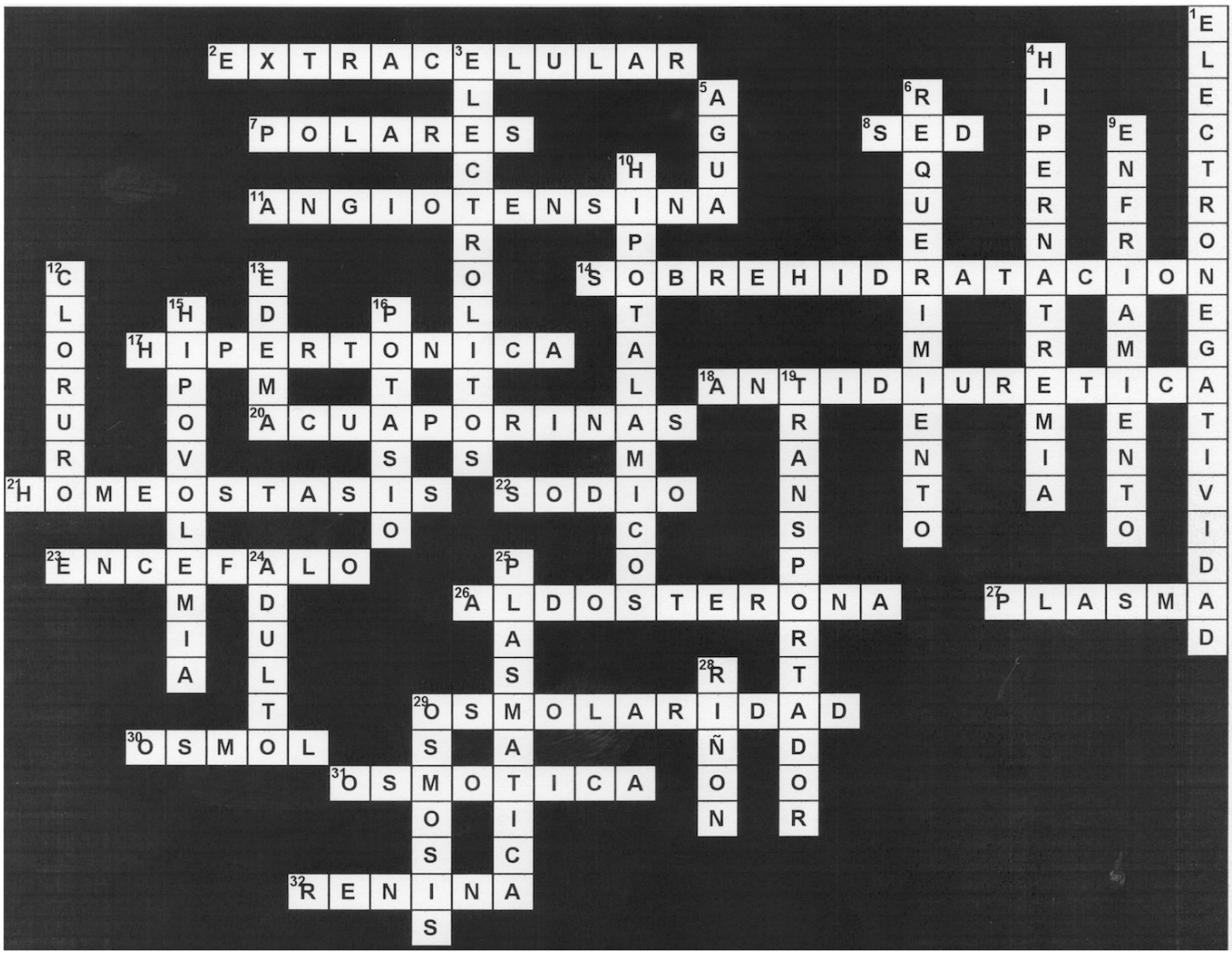
25 Se designa como osmolaridad _____ a la concentración de partículas que son capaces de ejercer la presión necesaria para detener el flujo de agua a través de una membrana semipermeable, en un individuo sano oscila entre 275 y 290 mosm/kg.

28 Esté órgano participa en el mantenimiento del contenido de agua en el cuerpo y la presencia adecuada de iones tanto dentro como fuera de la célula; además, cuando hay un exceso en la pérdida de líquido se detona el mecanismo de respuesta que la inhibe.

29 Así se designa al proceso mediante el cual el agua difunde a través de una membrana semipermeable desde el lado donde la concentración es más alta al otro, donde la concentración es inferior.

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ®
AGUA Y ELECTROLITOS

Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: balmori@bq.unam.mx



ÍNDICE ANUAL DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2017

AUTORES DE EDITORIALES

Alcaraz Peraza Luis David, Segal Kischinevzky Claudia, Escobar Sánchez Viviana, Alba Lois Luisa y Valdés López Víctor. (2017) Más allá de la secuenciación. REB 36(2):37-38

Calderón Salinas José Víctor. (2017) El fraude organizado invade los métodos de publicación científica. REB 36(3):71-72

Camacho Carranza Rafael y Calderón Salinas José Víctor. (2017) La distancia sana entre ciencia y política. REB 36(1):1

Zarain Herzberg Ángel. (2017) Presente y futuro del financiamiento de la ciencia en México: ¿Hacia dónde va la investigación?. REB 36(4):99-100

AUTORES DE LOS ARTÍCULOS

Aguilar Guerra Karen, Vilchis Peluyera Alfonso, Valdés López Víctor. (2017) Los códigos genéticos mitocondriales: Características, origen y evolución. REB 36(4):129-140

Coutiño Elda María del Rocío, Ávila Lagunes Lucerito y Arroyo Helguera Omar. (2017) Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. REB 36(2):39-54

Estrada Rodríguez Ana Esther y Zomosa Signoret Viviana Chantal. (2017) Papel de la agregación del péptido beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer. REB 36(1):2-11

Fuentes Sánchez Gisselle Adriana y Arredondo Peter Raúl. (2017) La dihidrolipoamida deshidrogenasa: estructura, función y patología. REB 36(3):82-88

Hernández Juárez Jesús, Gallegos Belem, Pérez Campos Mayoral Eduardo, Pérez Campos Eduardo, Pina Socorro y Hernández Cruz Pedro. (2017) Efecto de la hiperglucemia en la actividad plaquetaria. REB 36(2):55-64

Huante-Mendoza Alejandro, Silva García Octavio, Rico Mata Rosa, Maldonado Pichardo María Cristina y Baizabal-Aguirre Víctor Manuel. (2017) La enzima glucógeno sintasa cinasa 3 regula la actividad de los factores de transcripción NF-kB y CREB durante la respuesta inflamatoria por Staphylococcus aureus. REB 36(4):111-117

Izquierdo-Torres Eduardo y Zarain-Herzberg Ángel. (2017) Mecanismos moleculares de los fitoestrógenos y su relación con el cáncer. REB 36(4):101-110

Ondarza Beneitez Mauricio Alfredo. (2017) Revisión en glicobiología (el lenguaje de la vida). REB 36(3):73-81

Saldaña Balmori Yolanda, Méndez Ramírez Ignacio y Delgadillo Gutiérrez Héctor Javier. (2017) Comparación del rendimiento de aprendizaje en bioquímica de dos grupos de estudiantes de generaciones diferentes con dos tipos de bachillerato. REB 36(1):12-20

Torres Martínez Marilú, Moreno Fierros Leticia. (2017) Efectos inmunológicos y adyuvantes de las proteínas Cry1A. REB 36(4):118-128

AUTORES DE OTRAS COMUNICACIONES

Benítez Ramírez Fátima Eréndira. (2017) ¡Abracadabra, el aparato de golgi se genera de novo!. REB 36(3):93-95

Ondarza Vidaurreta Raul N. (2017) Lupus eritematoso sistémico (LES). REB 36(1):21-27

Saldaña Balmori Yolanda. (2017) Enfermedades Metabólicas II. CRUCIBIOQ y su Solución REB 36(1):28-31 y 33

Saldaña Balmori Yolanda. (2017) Ciclo Krebs. CRUCIBIOQ y su Solución. REB 36(2):65-67

Saldaña Balmori Yolanda. (2017) Nutrición. CRUCIBIOQ y su Solución. REB 36(3):89-92 y 96

Saldaña Balmori Yolanda. (2017) Agua y electrolitos. CRUCIBIOQ y su Solución. REB 36(4):141-143 y 144

Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C. (2017) Convocatoria para presentar candidaturas de socios numerarios para la mesa directiva. REB 36(1):32

TÍTULOS DE EDITORIALES

distancia sana entre ciencia y política. La (2017) Camacho Carranza Rafael y Calderón Salinas José Víctor. REB 36(1):1

fraude organizado invade los métodos de publicación científica. El (2017) Calderón Salinas José Víctor. REB 36(3):71-72

Más allá de la secuenciación (2017) Alcaraz Peraza Luis David, Segal Kischinevzky Claudia, Escobar Sánchez Viviana, Alba Lois Luisa y Valdés López Víctor. REB 36(2):37-38

Presente y futuro del financiamiento de la ciencia en México: ¿Hacia dónde va la investigación?. (2017) Zarain Herzberg Ángel. REB 36(4):99-100

TÍTULOS DE LOS ARTÍCULOS

códigos genéticos mitocondriales: Características, origen y evolución. Los (2017) Aguilar Guerra Karen, Vilchis Peluyera Alfonso, Valdés López Víctor. REB 36(4):129-140

Comparación del rendimiento de aprendizaje en bioquímica de dos grupos de estudiantes de generaciones diferentes con dos tipos de bachillerato. (2017) Saldaña Balmori Yolanda, Méndez Ramírez Ignacio y Delgadillo Gutiérrez Héctor Javier. REB 36(1):12-20

dihidrolipoamida deshidrogenasa: estructura, función y patología. La (2017) Fuentes Sánchez Gisselle Adriana y Arredondo Peter Raúl. REB 36(3):82-88

Efecto de la hiperglucemia en la actividad plaquetaria. (2017) Hernández Juárez Jesús, Gallegos Belem, Pérez Campos Mayoral Eduardo, Pérez Campos Eduardo, Pina Socorro y Hernández Cruz Pedro. REB 36(2):55-64

Efectos inmunológicos y adyuvantes de las proteínas Cry1A. (2017) Torres Martínez Marilu, Moreno Fierros Leticia. REB 36(4):118-128

enzima glucógeno sintasa cinasa 3 regula la actividad de los factores de transcripción NF-kB y CREB durante la respuesta inflamatoria por Staphylococcus aureus. La (2017) Huante-Mendoza Alejandro, Silva García Octavio, Rico Mata Rosa, Maldonado Pichardo María Cristina y Baizabal-Aguirre Víctor Manuel. REB 36(4):111-117

Mecanismos moleculares de los fitoestrógenos y su relación con el cáncer (2017) Izquierdo-Torres Eduardo y Zarain-Herzberg Ángel. REB 36(4): PENDIENTE

nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. Las (2017) Coutiño Elda María del Rocío, Ávila Lagunes Lucerito y Arroyo Helguera Omar. REB 36(2): 39-54

Papel de la agregación del péptido beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer (2017) A Estrada Rodríguez Ana Esther y Zomosa Signoret Viviana Chantal. REB 36(1): 2-11

Revisión en glicobiología (el lenguaje de la vida) (2017) Ondarza Beneitez Mauricio Alfredo. REB 36(3):73-81

TÍTULOS DE OTRAS COMUNICACIONES

¡Abracadabra, el aparato de golgi se genera de novo! (2017) Benítez Ramírez Fátima Eréndira. REB 36(3):93-95

Agua y electrolitos. CRUCIBIOQ y su Solución (2017) Saldaña Balmori Yolanda. REB 36(4):141-143 y 144

Ciclo de Krebs. CRUCIBIOQ y su Solución. (2017) Saldaña Balmori Yolanda. REB 36(2):65-67

Convocatoria para presentar candidaturas de socios numerarios para la mesa directiva (2017) Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C. REB 36(1): 32

Enfermedades metabólicas II. CRUCIBIOQ y su Solución. (2017) Saldaña Balmori. Yolanda. REB 36(1):28-31 y 33

Lupus eritematoso sitémico (LES) (2017) Ondarza Vidaurreta Raul N. REB 36(1):21-27

Nutrición. CRUCIBIOQ y su Solución. (2017) Saldaña Balmori Yolanda. REB 36(3):89-92 y 96

Instrucciones para los Colaboradores de la Revista de Educación Bioquímica (REB)

La REB es una revista dedicada a la divulgación, difusión, discusión, análisis y presentación de resultados derivados de investigaciones originales en temas relevantes en el campo de la bioquímica y áreas afines. La Revista está dirigida a investigadores, profesores y estudiantes de posgrado, licenciatura y educación media superior. Los trabajos que se someten a evaluación para su posible publicación no deben de haberse presentado total o parcialmente en otras publicaciones.

Se aceptan únicamente contribuciones originales con estricto contenido científico en forma de artículos de investigación, de revisión, de crítica, de análisis y otras comunicaciones que tengan que ver con diversas formas de estimular el aprendizaje de la bioquímica y sirvan de apoyo a investigadores, profesores y alumnos, tanto en aspectos de investigación, académicos y de actualización.

I. Los artículos se deben ajustar a los siguientes lineamientos editoriales:

1) Portada. En el primer párrafo incluir el título, el cual debe de ser claro, simple, atractivo y evitar las abreviaturas o en su caso, definirlas al inicio del texto. En el siguiente párrafo se anotarán los nombres completos de los autores, iniciando por el nombre propio completo. La afiliación de los autores se escribirá en el siguiente párrafo, indicando departamento, institución, ciudad, estado y país y la dirección de correo electrónico del autor responsable. La afiliación de los autores se indicará con números entre paréntesis. Se proporcionará un título breve con un máximo de 60 caracteres.

2) Resumen. Se deberán incluir dos resúmenes, uno en idioma español y uno en inglés (Abstract) de no más de 350 caracteres.

3) Palabras clave. Se deberá proporcionar de tres a seis palabras clave en idioma español y en inglés.

4) Texto. El artículo deberá ser escrito en el procesador de textos "Word", con una extensión máxima recomendada de 15 cuartillas a doble espacio, en "Times New Roman 12" como fuente de la letra, sin formato de texto, tabuladores o pies de página. Las figuras y tablas se presentarán separadas del texto.

5) Referencias. Se indicarán en el texto con números entre paréntesis de acuerdo a su orden de aparición. Las referencias se enlistarán al final del trabajo y deben contener para los artículos: apellidos e iniciales de todos los autores, año de publicación entre paréntesis, título completo del artículo y después de un punto, el nombre oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, número del volumen y antecedido por dos puntos, el número de la primera y última páginas, de acuerdo con el siguiente ejemplo: Martin GM, Austad SN, Johnson TE (1996) Generic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. Nature Gen 113:25-34. Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma: Wood KJ (1992) Tolerance to alloantigens. En: The Molecular Biology of Immunosuppression. Editor: Thomson A W. John Wiley and Sons Ltd, Ann Arbor, Michigan, USA, pp 81-104. Los libros podrán incluir las páginas totales o las consultadas y se citarán de acuerdo con este ejemplo: Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1993) Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

6) Figuras y Tablas. Las figuras se pueden presentar en formato "jpg" o integradas en un archivo de "Power Point" o del mismo "Word" separadas del texto del artículo. Las figuras pueden presentarse en colores, con fondo y sombreado. Las tablas deben de estar en "Word" sin formatos especiales y separadas del texto del artículo. Las figuras y las tablas se deberán numerar con arábigos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán presentar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja tamaño carta; las letras y números más pequeños no deben ser menores de dos milímetros después de la reducción. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá darse el crédito correspondiente y en su caso

obtener el permiso para su publicación. Las figuras dentro del texto deberán mencionarse con minúsculas, la palabra entera y sin paréntesis; cuando se haga referencia a ellas deberá citarse con la abreviatura, la primera letra mayúscula y entre paréntesis (Fig. 2). Las tablas siempre llevarán la primera letra a mayúscula y entre paréntesis (Tabla 2).

7) Abreviaturas. Las abreviaturas seguirán las normas de la IUPAC, aquellas específicas o poco comunes deberán definirse entre paréntesis, la primera vez que se utilicen.

II. Otras comunicaciones incluyen: resúmenes de artículos científicos interesantes, relevantes o significativos, información científica o académica de interés general, avisos de reuniones académicas y cursos, problemas teóricos, ejercicios prácticos, juegos didácticos con orientación educativa, bolsa de trabajo o comentarios de artículos publicados previamente en la REB, cartas al editor, entre otras. Éstas deberán seguir los siguientes lineamientos:

1) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.

2) Se aceptará un máximo de 10 referencias que se citarán entre paréntesis en el texto, como se indica en el inciso I-5. Se podrán incluir figuras o tablas, con las características que se indican en el inciso I-6.

Los manuscritos que no cumplan con las especificaciones de la Revista no serán aceptados de primera instancia para su revisión.

Los manuscritos serán evaluados por lo menos por tres revisores seleccionados por el Comité Editorial a quienes se les enviará el trabajo con los autores en anónimo y quienes en todo momento permanecerán anónimos para los autores y entre ellos; los revisores opinarán sobre la relevancia del trabajo en un lapso no mayor a un mes. Las correcciones y sugerencias de los revisores serán enviadas con anonimato entre ellos al Editor en Jefe. El resultado de la evaluación puede ser: rechazado, enviado para correcciones o aceptado. Una vez obtenida una evaluación global, el Editor en Jefe enviará las evaluaciones al autor responsable para que corrija e incorporé en el manuscrito las diferentes observaciones o en su caso, indique su opinión a observaciones que considere discutibles en los dictámenes de los revisores. El manuscrito corregido por los autores deberá ser devuelto a la Revista, en un lapso no mayor a 30 días naturales; de otra forma se considerará como un manuscrito enviado por primera vez. De ser necesario el Comité Editorial podrá enviar nuevamente el manuscrito corregido a los revisores para tener una nueva ronda de revisión, todo ello continuando con el anonimato. Una vez aceptado el trabajo, las pruebas de galera, se enviarán al autor responsable.

Los archivos electrónicos se deberán enviar a la Revista de Educación Bioquímica como archivos adjuntos (reb@bq.unam.mx), con atención al Editor en Jefe y a partir de una dirección de correo electrónico que será considerada como la dirección oficial para la comunicación con los autores. El autor responsable deberá indicar plenamente su adscripción con teléfono, dirección electrónica y postal para comunicaciones posteriores. En el texto del mensaje enviado se deberá expresar la solicitud para considerar la posible publicación del artículo, el título del mismo, los nombres completos de los autores y su adscripción institucional, así como el número, tipo y nombre de los archivos electrónicos enviados. En el mismo texto se debe de aclarar que el trabajo no ha sido enviado a otra revista en su forma total o parcial, para su evaluación o que el mismo está en proceso de publicación en otra revista o en otro tipo de publicación. De igual manera se debe de aclarar que no existe conflicto de intereses entre los autores que envían el trabajo.