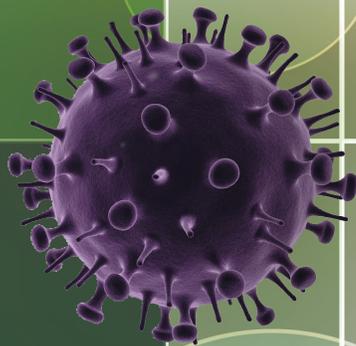




FRONTERA BIOTECNOLÓGICA

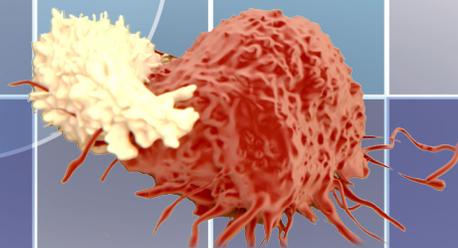


LA INFLUENZA A, COMO UN
PROBLEMA MUNDIAL:
“UNA VISIÓN DE LAS TERAPIAS
INMUNOMODULADORAS”



LOS MUSGOS COMO FÁBRICAS
BIOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN
DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS PARA
HUMANOS

CÁNCER DE PRÓSTATA:
MODULACIÓN POR MIARNAS Y
SU POSIBLE REGULACIÓN POR EL
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO



RESISTENCIA Y TOLERANCIA A ESTRÉS
ABIÓTICO: MECANISMOS SOFISTICADOS
DE ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS ANTE
DISTINTAS CONDICIONES DE ESTRÉS



Directorio Institucional

IPN

Enrique Fernández Fassnacht
Director General

Julio Gregorio Mendoza Álvarez
Secretario General

Miguel Ángel Álvarez Gómez
Secretario Académico

José Guadalupe Trujillo Ferrara
Secretario de Investigación y Posgrado

Francisco José Plata Olvera
Secretario de Extensión e Integración Social

Mónica Rocío Torres León
Secretaria de Servicios Educativos

Primo Alberto Calva Chavarría
Secretario de Gestión Estratégica

Francisco Javier Anaya Torres
Secretario de Administración

Emmanuel Alejandro Merchán Cruz
Secretario Ejecutivo de la Comisión de Operación
y Fomento de Actividades Académicas

José Luis Ausencio Flores Ruiz
Secretario Ejecutivo del Patronato de Obras e
Instalaciones

David Cuevas García
Abogado General

Jesús Ávila Galinzoga
Presidente del Decanato

CIBA IPN

Myrna Solís Oba
Directora del CIBA IPN Tlaxcala

Raúl Jacobo Delgado Macuil
Subdirector Académico y de Investigación del CIBA IPN
Tlaxcala

Erik Ocaranza Sánchez
Subdirector de Vinculación del CIBA IPN Tlaxcala

Abdu Orduña Díaz
Subdirector de Innovación Tecnológica
del CIBA IPN Tlaxcala

David Guillermo Pérez Ishiwara
Miembro Fundador de Frontera Biotecnológica

Martha Bibbins Martínez
Editor en Jefe

Gonzalo Pérez Araiza
Soporte Técnico

Pedro Ramírez Calva
Diseño y Diagramación Frontera Biotecnológica

Ismael Sánchez González
Desarrollo Web

Cintillo Legal

FRONTERA BIOTECNOLÓGICA, año 4, número 5, septiembre - diciembre 2016, es una publicación cuatrimestral editada por el Instituto Politécnico Nacional a través del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac - Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México. Tels.: 01-248-48707-65 y 66 Conmutador IPN: 57296000, Ext. 87816. <http://www.revistafronterabiotecnologica.cibatlaxcala.ipn.mx>, Editor responsable: Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo del Título No. 04-2015-120313501700-203, ISSN: en trámite, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor (INDAUTOR). Responsable de la última actualización de este número, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez., Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac - Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, fecha de última modificación, 21 de diciembre de 2016.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización del Instituto Politécnico Nacional.

CONTENIDO

MENSAJE EDITORIAL 3

LA INFLUENZA A, COMO UN PROBLEMA
MUNDIAL: “UNA VISIÓN DE LAS
TERAPIAS INMUNOMODULADORAS” 4

LOS MUSGOS COMO FÁBRICAS
BIOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN
DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS PARA
HUMANOS 8

CÁNCER DE PRÓSTATA: MODULACIÓN
POR MIRNAS Y SU POSIBLE
REGULACIÓN POR EL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO 15

RESISTENCIA Y TOLERANCIA A ESTRÉS
ABIÓTICO: MECANISMOS SOFISTICADOS
DE ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS ANTE
DISTINTAS CONDICIONES DE ESTRÉS 19



MENSAJE EDITORIAL

Diciembre del 2016

Estimados lectores,

En esta edición de **FRONTERA BIOTECNOLÓGICA**, les presentamos cuatro temáticas en las que podemos resaltar la importancia de la BIOTECNOLOGÍA para resolver o atender problemáticas en campos como la medicina y la agricultura.

En el primer artículo se aborda una problemática médica de gran importancia e impacto a nivel mundial, se trata de la **INFLUENZA A**, la influenza, es una enfermedad respiratoria contagiosa provocada por los virus de la influenza. Este virus puede causar una enfermedad leve o grave y en ocasiones puede llevar a la muerte. Por lo anterior, es de gran relevancia contar con tratamientos que puedan reducir el impacto de la influenza o favorecer la eficiencia de los tratamientos existentes como la inmunoprofilaxis o la quimioprofilaxis. Los autores del artículo presentan la revisión sobre el proceso fisiopatogénico de la enfermedad y abordan el uso de terapias inmunomoduladoras como terapia coadyuvante en el tratamiento de la INFLUENZA A.

El segundo artículo nos introduce al campo de la producción de proteínas terapéuticas para humanos, utilizando como sistema de expresión para dichas proteínas a un tipo muy importante de plantas inferiores, **LOS MUSGOS**. Los autores destacan las ventajas de estas plantas para la producción de proteínas de interés farmacéutico o con otros fines biotecnológicos, y resaltan su aplicación futura en la producción de vacunas y particularmente de vacunas específicas contra los diversos tipos de virus de la Influenza.

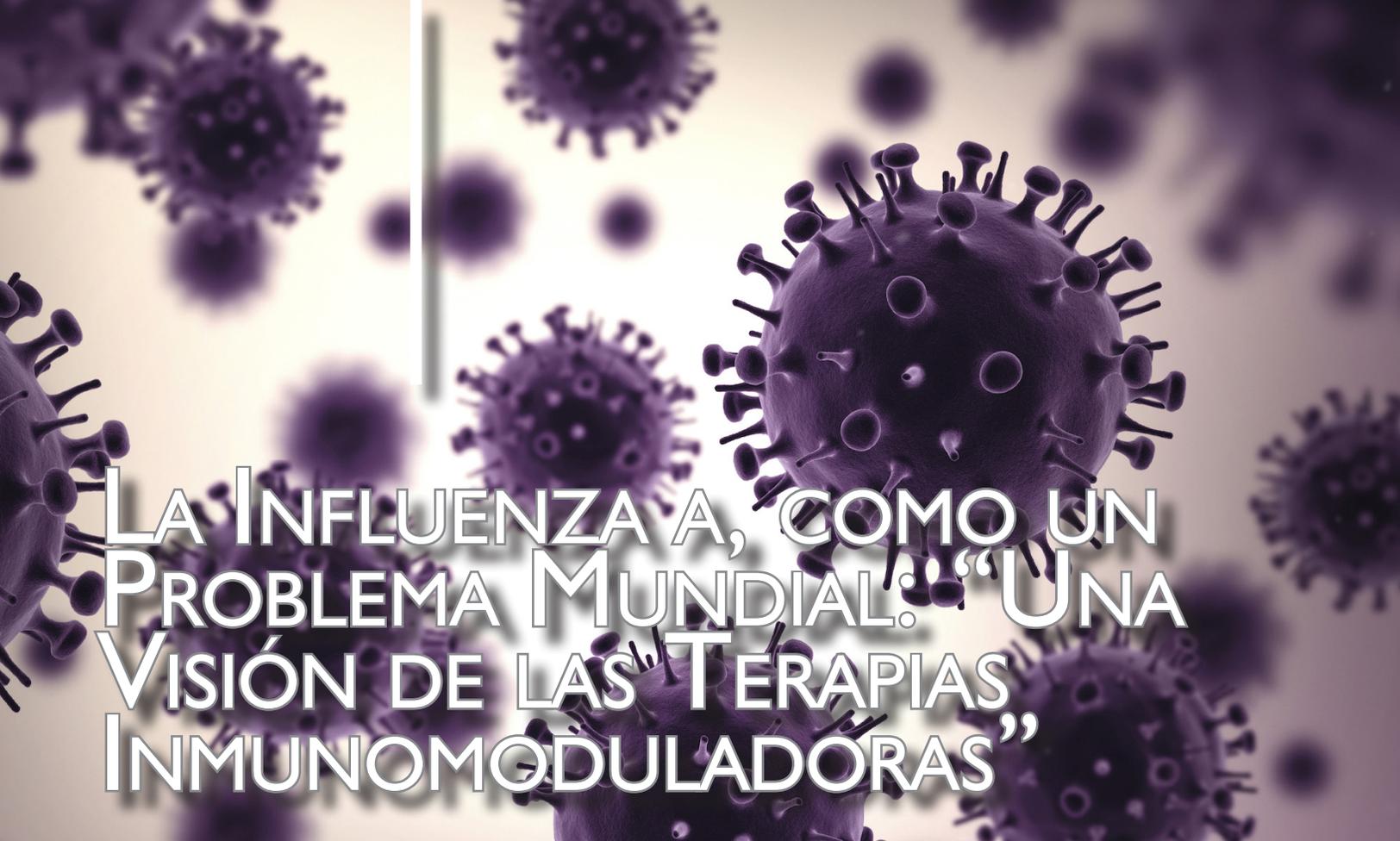
En el tercer artículo se presenta una revisión sobre la participación de microRNAs (miRNAs) y su posible regulación por proteínas virales de VPH (Virus del Papiloma Humano) en la evolución del **CÁNCER DE PRÓSTATA (CaP)**. En México este tipo de neoplasia es la primera causa de muerte por cáncer en hombres y por ello es medular contar con medidas de prevención y detección temprana de dicha enfermedad. En esta dirección, los autores concluyen que debido a que existe una fuerte evidencia que sugiere que estos miRNAs se pueden encontrar modulados por el VPH, se podrían proponer como nuevos biomarcadores de diagnóstico temprano que permitan definir si la modulación de la infección por el VPH, correlaciona con el desarrollo y evolución del CaP.

Por último, en el cuarto artículo les presentamos un tema de gran impacto para la agricultura mundial, **EL ESTRÉS ABIÓTICO**. El estrés abiótico, que incluye factores como la salinidad, la sequía, las temperaturas extremas y las deficiencias nutricionales, causa pérdidas inmensas en la producción agrícola a nivel mundial. Por lo anterior es muy importante conocer a detalle cómo es que las plantas tolerantes al estrés abiótico modifican su metabolismo en respuesta a condiciones adversas para su crecimiento. En esta revisión los autores nos presentan un breve panorama sobre las estrategias de RESISTENCIA O TOLERANCIA desarrolladas por las plantas y nos plantean que con este conocimiento, se logrará el desarrollo de estrategias para poder conferir a plantas de interés agronómico ventajas adaptativas ante diferentes condiciones de estrés, y por ende propiciar el incremento en la productividad de distintos cultivos bajo ambientes diferentes.

Los invitamos a leer y a compartir con otros investigadores, estudiantes, trabajadores y público en general, esta edición tan interesante de **FRONTERA BIOTECNOLÓGICA**.

“LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA”.

Dra. Martha Bibbins Martínez
Editor en jefe



LA INFLUENZA A, COMO UN PROBLEMA MUNDIAL: “UNA VISIÓN DE LAS TERAPIAS INMUNOMODULADORAS”

Elvia Pérez Soto¹, Daniel García Martínez¹, María del Consuelo Gómez García¹, Guillermo Pérez Ishiwara¹
1. Laboratorio de Biomedicina Molecular I, Programa Institucional de Biomedicina Molecular, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional. Guillermo Massieu Helguera No. 239, Fracc, La Escalera, Col Ticomán, Cd. De México, México. C.P.07320. Teléfono y Fax. 01(55) 5729-6300 Ext.55534.

Correspondencia: ishiwaramx@yahoo.com.mx

RESUMEN

La influenza A es una enfermedad respiratoria aguda que ocasiona altas tasas de morbi-mortalidad en todo el mundo e incluso ha generado importantes pandemias a lo largo de la historia. En este artículo hacemos una revisión del proceso fisiopatogénico de la enfermedad, resaltando la participación de la respuesta inmune innata, y como su desregulación puede provocar una “hipercitocinemia”, con la subsecuente inflamación exacerbada que conduce a la muerte del paciente. Finalmente, revisamos el uso de terapias inmunomoduladoras como la terapia coadyuvante que disminuye la inflamación, poniendo particular énfasis el hiltonol, el tocilizumab y el DLE, siendo este último una opción viable para combatir la infección viral.

Palabras clave: Influenza A, respuesta inmune innata, citocinas, inflamación, inmunomodulador.

ABSTRACT

Influenza A is an acute respiratory disease that cause high morbidity and mortality rates worldwide and has generated major pandemics through history. In this article, we review the physiopathogenic process of the disease, emphasizing the involvement of the innate immune response, and how its deregulation can cause “hypercytopenia”, with the subsequent exacerbated inflammation, leading to the death of patient. Finally, we review the use of immunomodulatory therapies as an adjuvant therapy that decreases inflammation, with emphasis on hiltonol, tocilizumab and DLE, the latter being a viable option against influenza infection.

Key words: Influenza A, Innate Immune Response, cytokines, inflammation, immunomodulatory

En las células epiteliales alveolares, el TLR7 reconoce el RNA de cadena sencilla del virus y el TLR3 reconoce al RNA de cadena doble durante la replicación del mismo. Ambas vías inducen la producción de interferón tipo I (IFN- α y β), los cuales tienen funciones antiproliferativas, inmunomoduladoras y antivirales (Fukuyama y Kawaoka, 2011) y por otro lado también inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias, en particular las Interleucinas 6 y 12 (IL-6, IL-12) y el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) (Coates et al., 2015), por la activación de factores de transcripción específicos. Los TLR 3 y 7 activan al factor de transcripción nuclear kappa B (NF κ B) y sólo el TLR3 induce la activación del factor regulador de interferón 3 (IRF-3), generando de esta forma una respuesta pro-inflamatoria sostenida que promueve una respuesta celular que intentará controlar y resolver la infección viral (Fukuyama y Kawaoka, 2011). Un tipo de receptor intracelular es NLRP3, que se encuentra en células respiratorias epiteliales, macrófagos y células dendríticas, que detectan la invasión del virus de influenza A. La activación de NLRP3 conduce al ensamblaje de una proteína multimérica compleja, denominada inflamasoma, la cual activa a la caspasa 1, que se requiere para la maduración proteolítica y la liberación de citocinas pro-inflamatorias, como son la interleucina 1 β e Interleucina

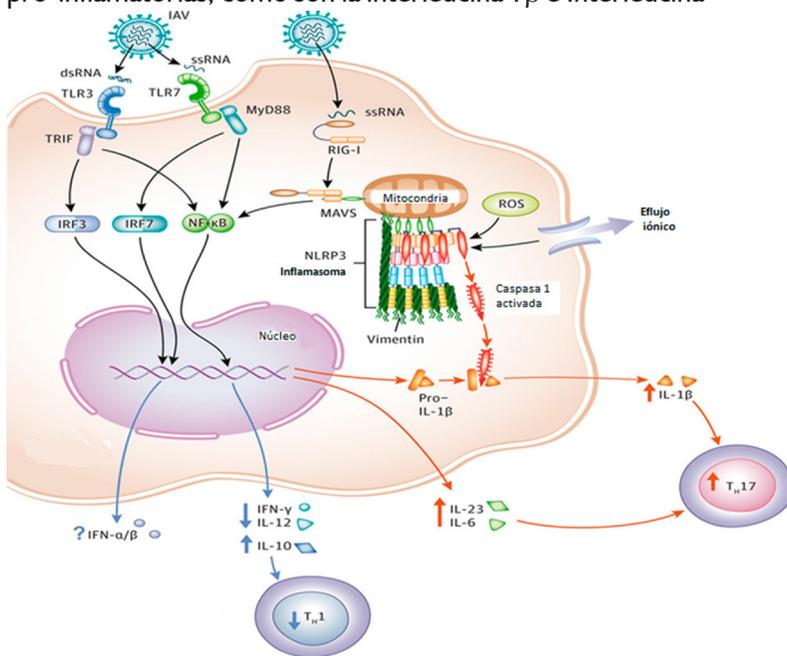


Figura 3. Vías de señalización de los PRR's involucrados en la respuesta inmune ante la infección por el virus de la influenza A (Modificada de Coates et al., 2015).

18 (IL-1 β e IL-18), como se observa en la figura 3 (Coates et al., 2015). Finalmente, el receptor de respuesta innata denominado gen inducible por ácido retinoico (RIG-I) funciona como sensor citoplásmico del RNA viral de cadena sencilla (ssRNA) que se genera después de la replicación viral y es crucial para la producción de interferón tipo I (IFN-I) en células epiteliales infectadas, células dendríticas y macrófagos alveolares (Fukuyama y Kawaoka, 2011). Una

vez que se reconoce el ssRNA, el dominio helicasa de RIG-I se enlaza al ATP, lo que facilita cambios conformacionales que permiten la unión de los dominios de reclutamiento y activación de las caspasas por la proteína adaptadora de señalización antiviral mitocondrial (MAVS). Las señales generadas por la proteína adaptadora genera la producción de citocinas pro-inflamatorias y antivirales por la activación del NF- κ B y los genes específicos estimulados por interferón (ISGs) (Fan et. al., 2012).

Como podemos ver, toda esta compleja red de la respuesta inflamatoria se activa cuando el sistema inmune de un individuo detecta ciertos patrones moleculares del virus de la influenza A, generando una respuesta inmune innata coordinada (RII), ya que activan factores de transcripción que activan vías de señalización antiviral que combaten la infección intracelular (Coates et. al., 2015). Hecho que conlleva a la infiltración de células efectoras como son neutrófilos, macrófagos, células polimorfonucleares y linfocitos T que en condiciones normales resolverán la infección y disminuirán paulatinamente el proceso inflamatorio al secretar interleucinas (IL-2, IL-4 e IL-10) e IFN- γ , para mantener la homeostasis del sistema inmune respiratorio (Sarawar y Doherty, 1994). Finalmente, los linfocitos B generan una respuesta específica contra el virus de la influenza A produciendo la memoria inmunológica contra esta particular cepa viral a la que fue expuesto el paciente.

Frecuentemente, dependiendo de la cepa viral y particularmente de las características inmunológicas del huésped, el virus de la influenza A logra evadir la RII, mediante la proteína no estructural NSI que interfiere con la vía de señalización del RIG-I; de esta forma inhibe la producción de interferón de tipo I en células infectadas (Fukuyama y Kawaoka, 2011), evitando su destrucción. Al mismo tiempo el virus de la influenza A se replica eficientemente e infecta a varios tipos celulares como son las células epiteliales respiratorias, los macrófagos alveolares y diversas subpoblaciones de linfocitos T, ocasionando una respuesta inmune desregulada y exacerbada en los pulmones (Fan et. al., 2012; Collado et. al., 2008; Sun et. al., 2009).

Derivada de la activación de diversas vías de señalización en estos tipos celulares, donde participan varios factores de transcripción entre los cuales destacan IRF-3, IRF-7 y NF κ B se ocasiona la hipercitocinemia o "tormenta de citocinas", que genera una inflamación exacerbada, la necrosis y la apoptosis del tejido pulmonar (Collado et. al., 2008). Hecho que genera un choque séptico del paciente y disfunción orgánica múltiple (Carrillo et al, 2012) e incluso la muerte (Fukuyama y Kawaoka, 2011).

El uso de inmunomoduladores como terapia coadyuvante que modula la respuesta inflamatoria exacerbada.

El estudio de mecanismos moleculares de reconocimiento de los PAMP's a través de los PRR's, así como su respuesta para mediar la infección viral a través de la modulación de la activación de factores de transcripción y citocinas, ha permitido proponer terapias inmunomoduladoras complementarias para el tratamiento de casos severos provocados por virus de la influenza A, como las que a continuación se mencionan (Kreijtz et. al., 2011).

El fármaco Poly-ICLC (Hiltonol), un ácido polinosinico-policitidílico estabilizado con poly-L-lisina y carboximetilcelulosa, es un RNA de doble cadena y un potente agonista del TLR3 con una fuerte habilidad de inducir IFN. Estudios preclínicos en ratón sugieren que es seguro y ofrece un amplio espectro de protección contra los virus de influenza A y otros virus respiratorios, incluyendo el virus sincicial respiratorio. Este fármaco se presenta, como un antiviral seguro y de amplio espectro, así como un adyuvante de las vacunas (Nigel et. al., 2012). Otra terapia moduladora del sistema inmune es el tocilizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de IL-6 (Mori et al 2012). En pacientes pediátricos, el tocilizumab mostró la disminución de la inflamación y la duración de los síntomas durante la infección por virus de la influenza (Kawada et al, 2013), sin embargo, en modelos animales se ha observado que el abatimiento total del receptor tiene efectos perjudiciales.

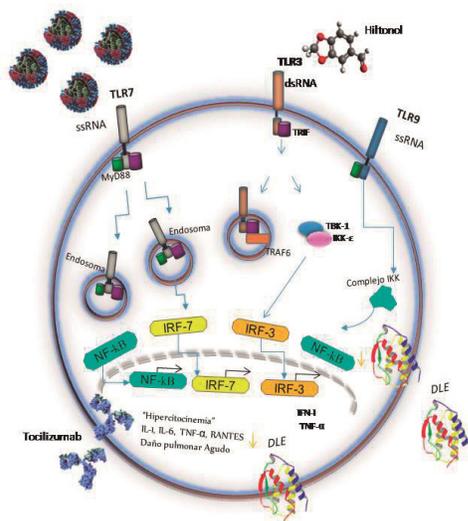


Figura 4. Terapia inmunomoduladora como coadyuvante y sus blancos terapéuticos relacionados con la modulación de la respuesta inflamatoria exacerbada ocasionada por virus de la influenza A (Modificada de Nigel et. al., 2012)

Otra opción factible de menor costo y de menores efectos secundarios es el uso de un inmunomodulador proveniente de un extracto dializable de leucocitos (DLE) que contiene moléculas bioactivas menores a 10 KDa con una actividad anti-inflamatoria importante (Acosta et. al., 2016). Diversos estudios sugieren que el inmunomodulador es efectivo en varias enfermedades causadas por virus, parásitos, hongos y micobacterias (Atanas Arnaudov & Zhivka Kostova, 2016).



Particularmente, en nuestro laboratorio estamos evaluando el efecto profiláctico del extracto en un modelo murino de influenza AH1N1 pandémica 2009, observando que este modula la activación del NF-κB e incrementa la producción de citocinas de respuesta Th1 y Th2, como son el IFN-γ y la IL-4 e IL-10, respectivamente. Sumado a ello, la terapia preventiva evita el desarrollo de un proceso fibrótico secundario, el cual generalmente se deriva de la inflamación severa inducida por el virus pandémico, disminuyendo la inflamación crónica y conservando en mayor grado la arquitectura del parénquima pulmonar (Pérez-Soto, 2013). Además, también hemos demostrado que la administración preventiva con el DLE modula la producción de citocinas pro-inflamatorias como es la IL-1 e IL-6, y disminuye el reclutamiento de linfocitos T, macrófagos y células polimorfonucleares en el pulmón (Pérez-Soto, 2016). Actualmente están siendo estudiados por nuestro grupo de investigación los mecanismos moleculares que conducen al abatimiento de la respuesta inflamatoria, hecho que nos permitirá proponer en un futuro próximo su uso como una terapia coadyuvante para las terapias antivirales o vacunales que controle y disminuya la reacción inmunológica exagerada y mal dirigida.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta P, N Pérez, E Pérez, B Correa, C Pérez, C Gómez, V Sánchez and DG Pérez 2016. Anti-inflammatory effect of dialysable leucocyte extract in a rat model of osteoarthritis: histopathological and molecular characterization, *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 45 (6).
- Atanas, A., Zhivka, K. 2015. Dialysable leukocyte extracts in immunotherapy. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 29 (6).
- Carrillo-Esper R, Carrillo-Córdova CA, Carrillo-Córdova LD, Carrillo-Córdova JR. 2010. Choque séptico y disfunción orgánica múltiple secundaria a infección por virus de influenza humana AH1N1. *MedIntMex*. 26(5):501-507.
- CDC. 2009. Images of Influenza Virus [online] <http://www.cdc.gov/flu/images.html> [Fecha de revisión 15 noviembre 2016].
- Chowell, G., Echevarría-Zuno, S., Viboud, C., Simonsen, L., Tamerius, J., Miller, M.A., Borja-Aburto, V.H. 2011. Characterizing the Epidemiology of the 2009 Influenza A/H1N1 Pandemic in Mexico. *PLoS Med* 8(5).
- Coates, B.M., Staricha, K.L., Wiese, K.M., Ridge, K.M. 2015. Influenza A Virus Infection, Innate Immunity, and Childhood. *JAMA Pediatr*, 169(10): 956–963.
- Collado, V., Porras, R., Cutuli, M., Gómez-Lucía, E. 2008. The innate immune system I: its mechanisms. *RCCV*. 2(1):1-16.
- Fan, K., Jia, Y., Wang, S., Li, H., Wu, D., Wang, G., Chen, J.L. 2012. Role of Itk signalling in the interaction between influenza A virus and T-cells. *J Gen Virol*. 93 (Pt 5):987-97.
- Fukuyama, S., Kawaoka, Y. 2011. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Current opinion in immunology*, 23:481-486.
- INEGI. 2016. Estadísticas de Mortalidad. Fecha de actualización: jueves 26 de mayo de 2016 [online] <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/sitemap.xml>. [Fecha de revisión 15 noviembre 2016].
- Kawada, J., Kitagawa Y., Iwata N., Ito Y. 2013. Clinical characteristics of influenza virus infection in juvenile idiopathic arthritis patients treated with tocilizumab. *Modern Rheumatology*. 23:972-976.
- Kreijtz, J., Kitagawa, Y., Iwata, N., Ito, Y. 2011. Immune responses to influenza virus infection. *Virus research* 162, 19-30.

- Mori, S., Yukitaka, U., Naoyuki, H., Motohiro, O., Toshihiko, H., Kazunori, O. 2012. Impact of tocilizumab therapy on antibody response to influenza vaccine in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 71(12):2006-10.
- Nigel, H., Pryde, D., Bright, H. 2012. Antiviral applications of Toll-like receptor agonists. *J Antimicrob Chemother*. 67(4):789-801.
- Pérez Soto Elvia. 2013. "Evaluación del efecto profiláctico y terapéutico del Extracto Dializable de Leucocitos en el modelo murino de influenza A". Tesis de maestría. IPN, ENMyH.
- Pérez Soto Elvia, Ocampo López Juan, Gómez García María del Consuelo, Pérez De La Mora Carlos A., Cortés Pérez Cecilia Pérez Ishiwara D. Guillermo. (2016). XXXVIII Congreso Nacional de Histología y III Congreso Iberoamericano de Histología. Temática Histopatología Experimental. Modalidad Oral. Tulancingo, Hgo, México.
- Teijaro, J. 2015. The Role of Cytokine Responses During Influenza Virus Pathogenesis and Potential Therapeutic Options. Edited by Oldstone, M. and Compans R. Springer International Publishing Switzerland. Switzerland. pp. 5-22.
- Sarawar, S. R., Doherty, P. C. 1994. Concurrent production of interleukin-2, interleukin-10, and gamma interferon in the regional lymph nodes of mice with influenza pneumonia. *Journal of virology*. 68, 3112–3119.
- SSA. DGEPI. Anuarios de morbilidad 2000-2013. [online] www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html [Fecha de revisión 15 noviembre 2016]
- Sun, J., Madan, R., Karp, C., Braciale, T. 2009. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med*. 15(3):277-84.





LOS MUSGOS COMO FÁBRICAS BIOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS PARA HUMANOS

Josefat Gregorio-Jorge¹, Analilia Arroyo-Becerra², Miguel Ángel-Villalobos López²

1 CONACYT - Instituto Politécnico Nacional-Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (IPN-CIBA) - Tlaxcala, México

Correo electrónico: jgregorioj@conacyt.mx

2 Instituto Politécnico Nacional - Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (IPN-CIBA) - Tlaxcala, Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México

Correos electrónicos: mvillalobosl@ipn.mx, alarroyo@ipn.mx

Resumen

El desarrollo de la ingeniería genética a principios de los 70's revolucionó la industria biotecnológica al permitir la producción de proteínas terapéuticas en bacterias. Con el tiempo se han empleado otros sistemas de expresión como levaduras, hibridomas, células de insecto y mamífero, animales transgénicos y plantas transgénicas. Esta evolución en los sistemas de expresión se ha reflejado en la cantidad de productos farmacéuticos (650), aprobados y comercializados hasta el 2015, para el tratamiento de diversas enfermedades humanas. Sin embargo, cada sistema de expresión presenta sus ventajas y desventajas en términos de cantidad y calidad del producto, así como en la especificidad, la bioseguridad y el costo. Aunque aún no existen en el mercado productos derivados de las plantas para su aplicación en humanos, varios

productos están siendo evaluados en pruebas clínicas para su posterior aprobación y liberación. Dentro de las plantas, los musgos presentan varias ventajas como sistemas de expresión para la producción de proteínas de interés terapéutico. En particular, *Physcomitrella patens* es un excelente sistema para la producción de glicoproteínas, principalmente porque se han adecuado sus vías de glicosilación asemejándolas a las humanas para producir proteínas de uso humano. Esta característica es de gran relevancia debido a que el 70% de los productos liberados al mercado son glicoproteínas. En conjunto, *P. patens* es un nuevo y excelente sistema para la expresión de proteínas, no solo de interés farmacéutico, sino para otras aplicaciones como la bio-remediación.

Palabras clave: biofarmacéuticos, proteína, plantas, musgos, *Physcomitrella*

Abstract

The development of genetic engineering in the early 70's revolutionized the biotech industry by allowing the production of therapeutic proteins in bacteria. Other expression systems such as yeast, hybridomas, insect and mammalian cells, transgenic animals and transgenic plants have been used over time. This evolution in expression systems has been reflected in the number of pharmaceuticals approved and marketed for the treatment of various human diseases until 2015 (650). However, each expression system presents its advantages and disadvantages in terms of quantity and quality of the product, as well as specificity, biosecurity and cost. Although there are not yet plant-based products available for use in humans,

several products are being evaluated in clinical trials for further approval and release. Among plants, mosses have several advantages as expression systems to produce proteins of therapeutic interest. Particularly, *P. patens* is an excellent system to produce glycoproteins, mainly because the moss glycosylation pathways have been modified mimicking the human ones to produce proteins for human usage. This feature is of great relevance because 70% of the products released to the market are glycoproteins. Together, *P. patens* is a new and excellent system for protein expression, not only of pharmaceutical interest, but for other applications such as bio-remediation.

Keywords: biopharmaceuticals, protein, plants, moss, *Physcomitrella*



Las enfermedades humanas resultan de la función anormal de las proteínas

El cuerpo humano está compuesto por 37 trillones de células y cada una de ellas sigue un programa de crecimiento y desarrollo coordinado en tiempo y espacio (Bianconi et al., 2013). Más importante aún, la coordinación del crecimiento y desarrollo de cada una de ellas está dictada por la información contenida en el genoma (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). El producto final de la información que se encuentra cifrado en la secuencia del genoma son las proteínas, las cuales representan la mano de obra celular y juegan un papel crucial para el buen funcionamiento de las células (Figura 1). Aunque el genoma humano posee solo 21,000 genes que codifican para proteínas, se estima que una célula humana típica contiene alrededor de 100,000 proteínas diferentes (Kim et al., 2014; Savage, 2015). Esto se debe a que las proteínas, una vez producidas, pueden ser “decoradas” con diversas modificaciones denominadas “post-traduccionales” para su correcta función y/o localización dentro de la célula (Jensen, 2004). La vasta mayoría de las proteínas experimentan modificaciones post-traduccionales, tales como fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, nitrosilación, metilación, ribosilación, acetilación, sumoilación, lipidación, y procesamiento proteolítico, así como modificaciones no enzimáticas (Figura 1).

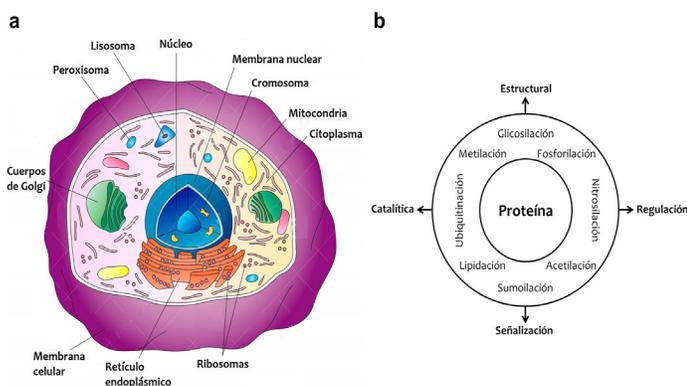


Figura 1. Representación esquemática de una célula y la importancia de las proteínas para su correcto funcionamiento. a) Una célula humana típica se compone de varios compartimentos. Toda la información genética (genoma) se almacena en el núcleo en forma de cromosomas (imagen tomada y modificada de es.dreamstime.com). b) La información del genoma se traduce a proteínas, las cuales pueden ser decoradas con varias modificaciones. Tales modificaciones son importantes para las diversas funciones que las proteínas llevan a cabo dentro de las células como, estructural, regulación, catalítica o de señalización.

La glicosilación, por ejemplo, es importante para una correcta bio-actividad, estabilidad y solubilidad

de la proteína. En resumen, cualquier alteración de las proteínas, ya sea la ausencia, el exceso o una decoración errónea, conduce a una disfunción que a menudo resulta en una enfermedad (Hingorani, 1998).

Proteínas recombinantes: ¿Qué son? ¿Cómo se producen? y ¿Para qué sirven?

Debido a que la terapia génica aún está en desarrollo y no es posible por el momento reemplazar los genes defectuosos que producen proteínas no funcionales, la solución que se ha implementado es el suministro de la “proteína funcional” al paciente de manera exógena y periódica. Tradicionalmente, la solución implicaba extraer la proteína de interés a partir de una especie animal relacionada al humano y posteriormente suministrarle al paciente para contrarrestar la enfermedad en cuestión (Deckert et al., 1974; Scott, 1912).

Afortunadamente, el desarrollo de la ingeniería genética permitió producir proteínas humanas funcionales en microorganismos, al convertirlas en fábricas biológicas mediante la manipulación genética (Berg et al., 2002). El término proteína recombinante significa que la proteína ha sido modificada y, por lo tanto, desempeña una función superior a la proteína humana nativa. Es el caso de la insulina para las personas que padecen diabetes, la cual es producida en bacterias (Vajo et al., 2001). Una de las ventajas de los microorganismos es que requieren de nutrientes simples para crecer y se multiplican en grandes cantidades en un tiempo muy corto. La bacteria *Escherichia coli* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fueron los que dominaron el mercado de la producción de proteínas recombinantes en las primeras décadas de la biotecnología (Demain y Vaishnav, 2009; Ferrer-Miralles y Villaverde, 2013).

Las ventajas de producir una proteína como proteína recombinante son varias; principalmente:

- Obtener grandes cantidades de proteínas humanas o de cualquier origen en organismos fácilmente cultivables.
- Se obtienen productos libres de patógenos y otros riesgos potenciales.
- La ingeniería genética permite modificar al azar o de manera dirigida los genes, creando así variantes de proteínas con nuevas propiedades que no existen en la naturaleza.

La producción de proteínas recombinantes empezó a desarrollarse hace más de 35 años. Durante este tiempo se han utilizado diversos organismos como sistemas de expresión para producir proteínas recombinantes tales como, bacterias, levaduras, hibridomas, células de insecto y mamífero, animales transgénicos y plantas transgénicas (Tabla 1). A pesar de la diversidad de los sistemas de expresión, las bacterias, las levaduras, los hibridomas y las células de mamífero, han dominado el mercado al producir el 98% de las proteínas recombinantes (Figura 2) (Ferrer-Miralles et al., 2009). Hasta el 2015, 650 productos farmacéuticos habían sido aprobados y comercializados en todo el mundo para el tratamiento de diversas enfermedades humanas, y otras 1300 proteínas se encuentran en desarrollo (Sánchez-García et al., 2016). Entre las enfermedades más importantes que se han atacado mediante proteínas recombinantes se encuentran los desórdenes metabólicos, los desórdenes hematológicos y el cáncer (Figura 2). Solo en el 2014, las proteínas recombinantes representaron ganancias por 52.75 billones de dólares (Sánchez-García et al., 2016).

Producción de proteínas recombinantes en plantas

Mientras que los sistemas de expresión microbianos son de fácil manejo y tienen altos rendimientos, las proteínas recombinantes producidas en estos sistemas no sufren las modificaciones correctas para una función apropiada. Por lo tanto, las células de mamífero son las predilectas cuando se trata de producir proteínas recombinantes que dependen de las modificaciones post-traduccionales para su correcta función (Tabla 1).

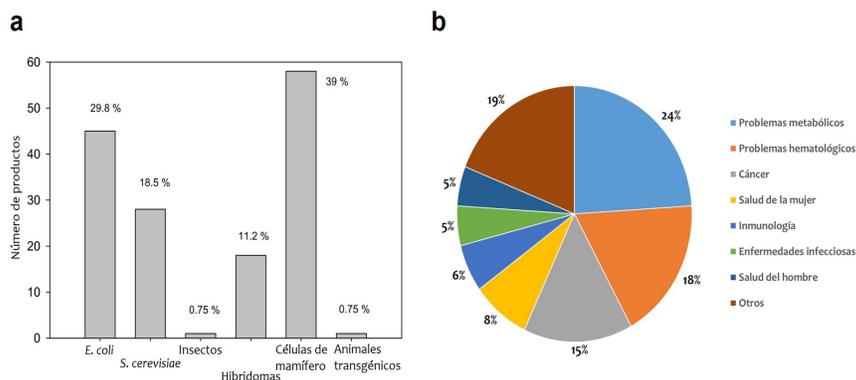


Figura 2. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes y áreas en las que se aplican. a) Los sistemas de expresión predominantemente usados para la expresión de proteínas terapéuticas son: la bacteria *Escherichia coli*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, los hibridomas y las células de mamífero. b) Áreas en las que se aplican las proteínas recombinantes. Los problemas metabólicos, los problemas hematológicos y el cáncer, son las áreas donde más se aplican. Figuras modificadas de Ferrer-Miralles et al., 2009 y Sánchez-García et al., 2016.

Las plantas por su parte, combinan las ventajas de ambos sistemas; es decir, de microorganismos y células de mamífero. Las plantas sintetizan proteínas complejas, ya que poseen la misma maquinaria que los seres humanos para el correcto plegamiento y modificación de las proteínas (Zhao, 2007). Otro punto importante es que las plantas no representan un riesgo de contaminación por agentes infecciosos, ya que las enfermedades de plantas no afectan a los seres humanos. Finalmente, el cultivo de plantas permite la producción a gran escala de proteínas farmacéuticas con un bajo costo de producción. A pesar de las ventajas descritas, las variaciones e inconsistencias en el crecimiento dependiendo del suelo y las condiciones climáticas son las principales desventajas que limitan el auge de las plantas como sistemas alternativos de expresión de proteínas recombinantes (Moshelion y Altman, 2015; Thomas et al., 2011).

Tabla 1. Comparación de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

Sistema	Costo	Tiempo de producción	Capacidad de producción a gran escala	Manipulación genética	Modificación post-traduccionales: glicosilación	Calidad del producto	Riesgo de contaminación
Bacterias	Bajo	Corto	Alta	Muy alta	Ausente	Intermedia	Endotoxinas
Levaduras	Medio	Medio	Alta	Alta	Incorrecta	Intermedia	Muy bajo
Células de mamífero	Alto	Largo	Muy baja	Baja	Correcta	Muy buena	Virus y priones
Animales	Alto	Muy largo	Baja	Muy baja	Correcta	Muy buena	Virus y priones
Plantas superiores	Muy bajo	Largo	Muy alta	Muy baja	Correcta*	Buena	Muy bajo
Plantas inferiores (musgos)	Muy bajo	Medio	Muy alta	Alta	Correcta*	Muy buena	Muy bajo

*Glicosilación correcta después de una manipulación genética del sistema.

Sin embargo, estas limitantes podrían eliminarse con el crecimiento controlado en invernaderos, o con el cultivo de células o tejidos vegetales en el laboratorio.

Actualmente, la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) es el modelo más usado para la producción de proteínas recombinantes (Tabla 2). La preferencia por la planta de tabaco como sistema de expresión se debe a que es posible insertar genes foráneos usando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Además, la producción a gran escala de plantas de tabaco puede generar 170 toneladas métricas de biomasa por hectárea. Asumiendo que los niveles de producción en laboratorio sean constantes, por cada 170 toneladas de material vegetal, 100 toneladas corresponderán a hojas. Por lo tanto, una hectárea puede producir hasta 50 Kg de inmunoglobulina IgA o 100 Kg de Glucocerebrosidas recombinante (Cramer et al., 1996).

A pesar de que no se han liberado al mercado proteínas recombinantes producidas en plantas para su uso en seres humanos, existen actualmente muchos productos que están en desarrollo o en fase de pruebas clínicas para su posterior aprobación y liberación al mercado (Tabla 2) (Ghag et al., 2016). Es importante resaltar que, en el área de plantas, las que dominan hasta ahora son las plantas denominadas como superiores (Tabla 2). Aunque se han adoptado una serie de estrategias para producir proteínas recombinantes en altas cantidades en los sistemas vegetales, una de las principales limitaciones es la difícil tarea de modificar a las plantas superiores para que

produzcan proteínas recombinantes con las apropiadas modificaciones post-traduccionales. Esto se debe a que la eliminación o el reemplazo de genes de manera dirigida aun no es posible en plantas superiores, pero ya están emergiendo nuevas tecnologías moleculares que eliminarán esta limitante en un futuro cercano (Voytas, 2013). Por ahora, la inserción del gen que está destinado a producir la proteína recombinante (transgén) no es dirigida y, por lo tanto, el sitio de inserción dentro del genoma de la planta causa una variación en los niveles de producción de la proteína de interés. Finalmente, la generación de plantas transgénicas para producir una proteína recombinante toma de meses a años.

Los musgos como una plataforma emergente en la producción de proteínas recombinantes

Uno de los sistemas vegetales que está emergiendo como una excelente plataforma para la producción de proteínas recombinantes es *P. patens*, un musgo que se clasifica dentro de las plantas inferiores (Rensing et al., 2008). *P. patens* presenta varias ventajas como sistema de expresión, tales como, ciclo de vida corto, nutrientes simples para crecer, inserción dirigida del transgén, glicosilación de proteínas igual que las proteínas humanas, condiciones establecidas en reactor para volúmenes mayores a 100 litros, y lo más importante, secreta la proteína recombinante al medio, lo que facilita mucho su purificación (Decker et al., 2014; Decker y Reski, 2008; Decker y Reski, 2012; Hohe et al., 2004; Reski et al., 2015; Reski, 1998).



Tabla 2. Proteínas recombinantes producidas en sistemas vegetales que se encuentran en fase de prueba.

Proteína	Enfermedades	Sistema vegetal	Estatus	Compañía	Referencias*
ZMapp	Ebola	Tabaco	Comercializado como fármaco intravenoso	Mapp Biopharmaceutical, Inc.	PREVAIL II Writing Group, Multi-National PREVAIL II Study Team 2016
Anticuerpo CaroRx (IgG-IgA)	Caries dental	Tabaco	Comercializado como fármaco de uso tópico	Planet Biotechnology, Inc.	Ma et al., 1998
Cocktail de anticuerpos MAPP66	Herpes y SIDA	Tabaco	Ensayos clínicos de fase I	Mapp Biopharmaceutical, Inc.	Ghag et al., 2016
Anticuerpo 2G12	SIDA	Tabaco	Ensayos clínicos de fase I	Pharma-Planta	Ma et al., 2015
Hemaglutinina y Neuraminidasa aviar	Enfermedad de Newcastle aviar	Tabaco	Ensayos clínicos	Dow AgroSciences	Yusibov et al., 2011
Hemaglutinina (HA)	Influenza viral cepa H5N1 y H1N1	Tabaco	Ensayos clínicos de fase II para HA de H5N1 y de fase I para HA de H1N1	Medicago Inc.	Landry et al., 2010 Landry et al., 2014
HAI-05	Influenza viral H5N1	Tabaco	Ensayos clínicos de fase I	Fraunhofer USA, Center for Molecular Biotechnology	Chichester et al., 2012
HAC1	Influenza viral H1N1	Tabaco	Ensayos clínicos de fase I	Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology; Walter Reed Army Institute of Research	Shoji et al., 2015; Cummings et al., 2014
Antígeno protector recombinante (rPA)	Ántrax	Tabaco	Ensayos clínicos de fase I	Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology	Mamedov et al., 2016
Pfs25-VLP	Malaria	Tabaco	Ensayos clínicos de fase I	Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology	Jones et al., 2013
Subunidad B de la enterotoxina sensible al calor	Diarrea por <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	Papa y maíz	Ensayos clínicos de fase I	University of Maryland School of Medicine	Tacket et al., 1998 Tacket et al., 2004
Proteína mayor de la cápside (NorovVAXX)	Enfermedad de Norwalk (gastroenteritis por el virus Norwalk)	Papa	Ensayos clínicos de fase I	VAXX Inc.	Tacket et al., 2004 Fischer et al., 2012
HBsAg	Hepatitis B	Papa y lechuga	Ensayos clínicos de fase I	Department of Immunology, Roswell Park Cancer Institute	Thanavala et al., 2005
Glicoproteína (GP) y Nucleoproteína (NP)	Rabia	Espinaca	Ensayos pre-clínicos con humanos	Biotechnology Foundation Laboratories at Thomas Jefferson University	Yusibov et al., 2002
Interferón α (IFNα) canino	Enfermedad periodontal canina	Fresas	Comercializado como fármaco oral	AIST	Tabayashi. y Matsumura, 2014
Taliglucerasa α (ELELYSO)	Enfermedad de Gaucher tipo 1	Zanahoria	Comercializado como fármaco intravenoso	Protalix Biotherapeutics y Pfizer	Shaaltiel et al., 2007
Anticuerpo BLX-301	Linfoma de células B no Hodgkin y Artritis reumatoide	Lenteja de agua	Ensayos clínicos de fase I	Biolex Inc.	Cox et al., 2006

Las referencias citadas se encuentran en Ghag et al., 2016.

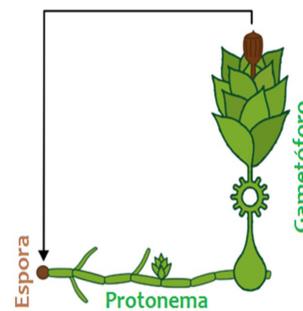
Una de las principales preocupaciones al usar plantas transgénicas superiores es la dispersión del transgén al ecosistema por medio del polen. Aunque *P. patens* produce esporas, la posibilidad de que estas se dispersen se elimina al cultivarlo en instalaciones contenidas (reactores), lo que al mismo tiempo permite controlar las condiciones para optimizar la producción de la proteína recombinante (Decker y Reski, 2007).

Aunque hasta el momento solo se han producido pocas proteínas recombinantes en *P. patens*, las proteínas que se han producido en las plantas superiores (Tabla 2) podrían producirse fácilmente en *Physcomitrella*. Dentro de las proteínas recombinantes que se han producido en *Physcomitrella* se encuentra el factor de crecimiento endotelial (VEGF), la Eritropoyetina (EPO), los epítopes de las glicoproteínas gp120 y gp41 del HIV, la inmunoglobulina IgG, así como el primer producto comercializado para su uso en investigación, el factor de crecimiento queratinocítico (KGF) (Baur et al., 2005; Kircheis et al., 2012; Niederkrüger et al., 2014; Orellana-Escobedo et al., 2015; Parsons et al., 2012).

Es importante resaltar que además de las proteínas recombinantes descritas anteriormente, tres proteínas recombinantes producidas en *Physcomitrella* se encuentran en fase pre-clínica o la fase I de pruebas clínicas. Se trata del Factor H, la Glucocerebrosidasa y la Alfa-Galactosidasa (Figura 3). El Factor H es una proteína recombinante que se planea usar para el tratamiento del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), una enfermedad genética que afecta a órganos vitales como el riñón, el corazón y el cerebro (Siegler y Oakes, 2005). El Factor H producido en *Physcomitrella* compensará la ausencia de función de esta proteína en las personas que padezcan esta enfermedad y ayudará a mejorar la calidad de vida de los pacientes (Büettner-Mainik et al., 2011). Por otro lado, la Glucocerebrosidasa tiene el propósito de curar la enfermedad de Gaucher, una afección genética que es causada por la acumulación de sustancias grasosas en el bazo, hígado, pulmones, huesos y, a veces, en el cerebro, debido a la falta de la enzima Glucocerebrosidasa (Grabowski, 2008). A diferencia del Factor H, para una función apropiada de la Glucocerebrosidasa es necesaria la glicosilación de la proteína; es decir, una modificación post-traduccional

donde se agregan azúcares a la proteína. La versión modificada de *P. patens* para el proceso de glicosilación ha permitido la producción de la Glucocerebrosidasa funcionalmente activa y se encuentra en fase de prueba pre-clínica (Niederkrüger et al., 2014). Finalmente, la Alfa-Galactosidasa, al igual que la Glucocerebrosidasa, necesita de la glicosilación apropiada para su correcta función. *P. patens* glicosila apropiadamente a la Alfa-Galactosidasa y de hecho ya se encuentra en la fase I de prueba clínica (Meng et al., 2016; Shen et al., 2015). Esta proteína recombinante está destinada a curar la enfermedad de Fabry. La enfermedad de Fabry es causada por la función disminuida o ausente de la Alfa-Galactosidasa, lo que provoca la acumulación de una sustancia llamada ceramida trihexosido (Desnick et al., 2003). La acumulación de esta sustancia se da principalmente en las células del músculo liso y causa un dolor insoportable. Por lo tanto, el suministro de la Alfa-Galactosidasa producida en *Physcomitrella* contribuirá a disminuir los niveles de la ceramida trihexosido en las personas que padecen esta enfermedad.

a



b

Proteínas recombinantes producidas en *P. patens* que se comercializan o están en fase de prueba.

Proteína	Enfermedad	Estatus	Compañía
Factor de crecimiento queratinocítico	Elfisema	Comercializado	Greenovation*
Factor H	Síndrome Urémico Hemolítico	Pre-clínica	
Glucocerebrosidasa	Enfermedad de Gaucher	Pre-clínica	
Alfa-Galactosidasa	Enfermedad de Fabry	Clínica (Fase I)	

*Compañía Alemana: <http://www.greenovation.com/>

Figura 3. *P. patens* como sistema de expresión de proteínas recombinantes.

a) *P. patens* tiene un ciclo de vida corto que inicia con la germinación de una espora. De la germinación de la espora se forma un tejido llamado protonema que está compuesto de un filamento de células que se ramifica. Finalmente, se forma el gametóforo, del cual se forman esporas y empieza de nuevo el ciclo (Figura modificada de <http://2013.igem.org/Team:TU-Munich/Project/Physcomitrella>). b) Varias proteínas recombinantes se han producido en *P. patens*. Algunas están en fase de pruebas clínicas, mientras que otras ya se comercializan.

A pesar de que *P. patens* apareció en escena hace muy poco tiempo como una alternativa para la expresión de proteínas recombinantes, todo parece indicar que, de seguir la tendencia actual, las proteínas recombinantes provenientes de este musgo serán los primeros productos derivados de plantas que serán aprobados para su uso en seres humanos.

Futuras aplicaciones de *P. patens* como sistema de expresión

Por todas las ventajas que posee *P. patens*, se anticipa que en el futuro se utilice como la plataforma predilecta para la producción de vacunas (Rybicki, 2014). En particular, vacunas específicas contra los diversos tipos de virus de la Influenza serían de gran importancia para contener epidemias como la ocasionada en México por la H1N1 en el 2009 (Fineberg, 2014). Además, se anticipa que, en los siguientes años, *P. patens* sea utilizado para procesos de bio-remediación, ya que recientemente se estableció un sistema adecuado para la expresión de proteínas destinadas a degradar contaminantes (Morath et al., 2014).

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Candy Yuriria Ramírez Zavaleta por su apoyo en la elaboración de las figuras, tablas y revisión del artículo, así como a Cátedras CONACYT I452, Instituto Politécnico Nacional y SIP IPN.

Bibliografía

1. Baur A, Reski R, Gorr G. 2005. Enhanced recovery of a secreted recombinant human growth factor using stabilizing additives and by co-expression of human serum albumin in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnol. J.* 3(3):331-340.

2. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 2002. 5th edition. New York: W H Freeman; Section 6.2. Recombinant DNA Technology Has Revolutionized All Aspects of Biology. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22480/>

3. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, Vitale L, Pelleri MC, Tassani S, Piva F, Perez-Amodio S, Strippoli P, Canaider S. 2013. An estimation of the number of cells in the human body. *Journal Annals of Human Biology.* 40(6): 463-471.

4. Büttner-Mainik A, Parsons J, Jérôme H, Hartmann A, Lamer S, Schaaf A, Schlosser A, Zipfel PF, Reski R, Decker EL. 2011. Production of biologically active recombinant human factor H in *Physcomitrella*. *Plant Biotechnol. J.* 9(3):373-383.

5. Cramer CL, Weissenborn DL, Oishi KK, Grabau EA, Bennett S, Ponce E, Grabowski GA, Radin DN. 1996. Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann N Y Acad Sci.* 25 (792): 62-71.

6. Decker EL, Reski R. 2007. Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology.* 18(5):393-398.

7. Decker EL, Reski R. 2008. Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. *Bioprocess Biosystems Engineering.* 31(1):3-9.

8. Decker EL, Reski R. 2012. Glycoprotein production in moss bioreactors. *Plant Cell Rep.* 31(3):453-460.

9. Decker EL, Parsons J, Reski R. 2014. Glyco-Engineering for biopharmaceutical production in moss bioreactors. *Front. Plant Sci.* 5:346.

10. Deckert T, Andersen OO, Poulsen JE. 1974. The clinical significance of highly purified pig-insulin preparations. *Diabetologia.* 10(6):703-708.

11. Demain AL, Vaishnav P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* 27(3):297-306.

12. Desnick RJ, Brady R, Barranger J, Collins AJ, Germain DP, Goldman M, Grabowski G, Packman S, Wilcox WR. 2003. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann Intern Med.* 138(4):338-46.

13. Durocher Y, Butler M. 2009. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20(6):700-707.

14. Ferrer-Mirallas N, Domingo-Espin J, Corchero JL, Vazquez E, Villaverde A. 2009. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact.* 8:17.

15. Ferrer-Mirallas N, Villaverde A. 2013. Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue. *Microb Cell Fact.* 12:113.

16. Fineberg HV. 2014. Pandemic preparedness and response—lessons from the h1n1 influenza of 2009. *N Engl J Med.* 370(14):1335-1342.

17. Ghag SB, Adki VS, Ganapathi TR, Bapat VA. 2016. Heterologous protein production in plant systems. *GM Crops Food.* Oct 27:0. doi.org/10.1080/21645698.2016.1244599

18. Grabowski GA. 2008. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet.* 372(9645):1263-71.

19. Hingorani AD. 1998. Protein dysfunction: cause and effect in human disease. *Molecular Medicine Today.* 4(12):517-517.

20. Hohe A, Egener T, Lucht JM, Holtorf H, Reinhard C, Schween G, Reski R. 2004. An improved and highly standardised transformation procedure allows efficient production of single and multiple targeted gene-knockouts in a moss *Physcomitrella patens*. *Curr. Genet.* 44(6):339-347.

21. International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 431:931-45.

22. Jensen ON. 2004. Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol.* 8(1):33-41.

23. Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, Madugundu AK, Kelkar DS, Isserlin R, Jain S, Thomas JK, Muthusamy B, Leal-Rojas P, Kumar P, Sahasrabudhe NA, Balakrishnan L, Advani J, George B, Renuse S, Selvan LDN, Patil AH, Nanjappa V, Radhakrishnan A, Prasad S, Subbannayya T, Raju R, Kumar M, Sreenivasamurthy SK, Marimuthu A, Sathe GJ, Chavan S, Datta KK, Subbannayya Y, Sahu A, Yelamanchi SD, Jayaram S, Rajagopalan P, Sharma J, Murthy KR, Syed N, Goel R, Khan AA, Ahmad S, Dey G, Mudgal K, Chatterjee A, Huang TC, Zhong J, Wu X, Shaw PG, Freed D, Zahari MS, Mukherjee KK, Shankar S, Mahadevan A, Lam H, Mitchell CJ, Shankar SK, Sathishchandra P, Schroeder JT, Sirdeshmukh R, Maitra A, Leach SD, Drake CG, Halushka MK, Prasad TSK, Hruban RH, Kerr CL, Bader GD, Iacobuzio-Donahue CA, Gowda H, Pandey A. 2014. A draft map of the human proteome. *Nature.* 509:575-581.

24. Kircheis R, Halanek N, Koller I, Jost W, Schuster M, Gorr G, Hajszan K, Nechansky A. 2012. Correlation of ADCC activity with cytokine release induced by the stably expressed, glyco-engineered humanized Lewis Y-specific monoclonal antibody MB314. *MAbs* 4(4):532-541.

25. Meng XL, Day TS, McNeill N, Ashcraft P, Frischmuth T, Cheng SH, Liu ZP, Shen JS, Schiffmann R. 2016. Molecular basis for globotriaosylceramide regulation and enzyme uptake in immortalized aortic endothelial cells from Fabry mice. *J Inherit Metab Dis.* 39(3):447-455.

26. Morath V, Truong DJJ, Albrecht F, Polte I, Ciccone RA, Funke LF, Reichart L, Wolf CG, Brunner AD, Fischer K, Schneider PC, Brüggenthies JB, Fröhlich F, Wiedemann G, Reski R, Skerra A. 2014. Design and characterization of a modular membrane protein anchor to functionalize the moss *Physcomitrella patens* with extracellular catalytic and/or binding activities. *ACS Synthetic Biology* 3(12):990-994.

27. Moshelion M, Altman A. 2015. Current challenges and future perspectives of plant and agricultural biotechnology. *Trends Biotechnol.* 33(6):337-342.

28. Niederkrüger H, Dabrowska-Schlepp P, Schaaf A. 2014. Suspension culture of plant cells under phototrophic conditions. In *Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells*. Meyer HP, Schmidhalter DR. (eds), pp. 259-292.

29. Orellana-Escobedo L, Rosales-Mendoza S, Romero-Maldonado A, Parsons J, Decker EL, Monreal-Escalante E, Moreno-Fierros L, Reski R. 2015. An Env-derived multi-epitope HIV chimeric protein produced in the moss *Physcomitrella patens* is immunogenic in mice. *Plant Cell Rep.* 34(3):425-433.

30. Parsons J, Altmann F, Arrenberg CK, Koprivova A, Beike AK, Stemmer C, Gorr G, Reski R, Decker EL. 2012. Moss-based production of asialo-erythropoietin devoid of Lewis A and other plant-typical carbohydrate determinants. *Plant Biotechnol J.* 10(7):851-861.

31. Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y et al. 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science.* 319(5859): 64-69.

32. Reski R. 1998. Development, Genetics and Molecular Biology of Mosses. *Bot. Acta.* 111(1):1-15.

33. Reski R, Parsons J, Decker EL. 2015. Moss-made biopharmaceuticals: From bench to bedside. *Plant Biotechnol. J.* 13(8):1191-1198.

34. Rybicki EP. 2014. Plant-based vaccines against viruses. *Virology.* 461:11-205.

35. Sanchez-Garcia L, Martín L, Mangues R, Ferrer-Mirallas N, Vázquez E, Villaverde A. 2016. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb Cell Fact* 15:33 doi 10.1186/s12934-016-0437-3

36. Savage N. 2015. High-protein research. *Nature.* 527: S6-S7.

37. Scott EL. 1912. On the influence of intravenous injections of an extract of the pancreas on experimental pancreatic diabetes. *Am J Physiol.* 29:306-310.

38. Shen JS, Busch A, Day TS, Meng XL, Yu CI, Dabrowska-Schlepp P, Schaaf A. 2015. Mannose receptor-mediated delivery of moss-made α -galactosidase A efficiently corrects enzyme deficiency in Fabry mice. *J Inherit Metab Dis.* 39(2):293-303.

39. Siegler R, Oakes R. 2005. Hemolytic uremic syndrome; pathogenesis, treatment, and outcome. *Curr Opin Pediatr.* 17(2):200-204.

40. Thomas DR, Penney CA, Majumder A, Walmsley AM. 2011. Evolution of Plant-Made Pharmaceuticals. *Int J Mol Sci.* 12(5):3220-3236.

41. Vajo Z, Fawcett J, Duckworth WC. 2001. Recombinant DNA technology in the treatment of diabetes: insulin analogs. *Endocr Rev.* 22(5):706-717.

42. Voytas DF. 2013. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu Rev Plant Biol.* 64: 327-350.

43. Zhao J. 2007. Nutraceuticals, Nutritional Therapy, Phytonutrients, and Phytotherapy for Improvement of Human Health: A Perspective on Plant Biotechnology Application. *Rec Pat Biotechnol.* 1(1):175-97.



CÁNCER DE PRÓSTATA: MODULACIÓN POR miRNAs Y SU POSIBLE REGULACIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Sandra Viridiana Salgado Hernández¹, Virginia Sánchez Monroy¹, Consuelo Gómez García¹, Olivia Medel Flores¹, y David Guillermo Pérez Ishiwara¹

1. Laboratorio de Biomedicina Molecular I, Programa Institucional de Biomedicina Molecular. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Guillermo Massieu Helguera No.239, Fracc. La Escalera, Col. Ticomán, México D.F. C.P.07320. Teléfono y Fax 5729-6300 Ext.55534.

Resumen

El cáncer de próstata (CaP), es una de las neoplasias con las mayores tasas de incidencia y mortalidad en México y en todo el mundo. Es una enfermedad heterogénea en la cual se ha evidenciado que la modulación genética desempeña un rol primordial. Recientemente, se ha sugerido que los microRNAs (miRNAs) tienen un papel fundamental en la evolución de esta patología. Los miRNAs son RNAs no codificantes, que inhiben la expresión génica de una gran variedad de genes. Diversos trabajos, sugieren que los miRNAs son regulados por algunas oncoproteínas virales como las del Virus del Papiloma Humano (VPH). La inflamación crónica y persistente resultado de la infección por VPH puede ser un factor importante para el desarrollo de la carcinogénesis de la glándula prostática. Por lo que en esta revisión nos enfocamos a mostrar diversas evidencias que documentan la modulación de la expresión génica efectuada por miRNAs en CaP, así como la posible regulación de estos miRNAs por las proteínas virales del VPH.

Abstract

Prostate Cancer (PCa) is a neoplasia with the high rates of incidence and mortality worldwide. It is a heterogeneous disease, where it has been demonstrated that genetic modulation has a fundamental role. Recently, it has been suggested that microRNAs (miRNAs) display a fundamental role in the evolution of this pathology. The miRNAs are non-coding RNAs that inhibit the genetic expression of a variety of genes. Several works, suggest that miRNAs are regulated by some virus, such as the Human Papilloma Virus (HPV). Chronic and persistent inflammation due HPV infection could be an important factor for the development of prostatic gland carcinogenesis. In this review, we focus our efforts to show different evidences about the modulation of gene expression in PCa made by miRNAs as well as the possible regulation of these miRNAs by HPV viral proteins.

Palabras clave: miRNAs, Cáncer de Próstata, VPH.

Introducción

El cáncer de próstata (CaP), es una de las neoplasias con las mayores tasas de incidencia y mortalidad en el mundo. Constituye la segunda neoplasia más frecuente en el hombre a nivel mundial y ocupa el quinto lugar en mortalidad y el segundo en incidencia. En México, es uno de los principales problemas de salud pública, que afecta a la población masculina adulta ocupando los primeros lugares en cuanto a mortalidad e incidencia (Ferlay, et al, 2015). El cáncer es una enfermedad heterogénea, en la cual se han evidenciado alteraciones moleculares como la inestabilidad cromosomal, el silenciamiento epigenético y la modulación genética, la cual consiste primordialmente en la pérdida de la capacidad para controlar la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (Sun, et al, 2015).

En años recientes se ha determinado que los microRNAs (miRNAs) tienen un papel fundamental en la modulación de la expresión genética de la glándula prostática. Los miRNAs son RNAs no codificantes, con tamaño aproximado de 22 nucleótidos, que inhiben la expresión génica a nivel post-transcripcional uniéndose por complementariedad a un mRNA. Los miRNAs fueron identificados por primera vez en *Caenorhabditis elegans* (Lee, et al, 1993).

La primera evidencia de miRNAs en la transformación tumoral fue descrita por la disminución de expresión de miRNA-15 y miRNA-16-1 en leucemias (Calin, et al, 2002), posteriormente diversos estudios han reportado cambios de expresión de miRNAs en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el de próstata (Porkka, et al, 2007; Volinia et al, 2005). Actualmente en CaP se han reportado evidencias que sugieren que ciertos perfiles de expresión de miRNAs son útiles tanto como biomarcadores de diagnóstico para su detección y clasificación (Sapre and Selth, 2013; Yin, et al, 2016), como para su pronóstico (Lo, et al, 2013) y terapia. Adicionalmente, se ha descrito un papel importante de la modulación genética de los miRNAs por algunas oncoproteínas virales tales como las del Virus del Papiloma Humano (VPH), por ejemplo, en cáncer cervicouterino y orofaríngeo (Ben, et al, 2015; Mirghani, et al, 2015).

Un meta-análisis realizado por Yang et al. (2015) ha evidenciado una correlación importante y significativa del VPH como factor de riesgo para el desarrollo y progresión del CaP. De igual manera, otros estudios han dado evidencia de la asociación entre prostatitis

y CaP (Dennis and Dawson, 2002; Jiang, et al, 2012), sugiriendo que la inflamación resultado de la infección puede ser un mecanismo importante para el inicio del desarrollo de la carcinogénesis. Otros autores han descrito que las oncoproteínas virales inducen modificaciones de las rutas celulares que promueven tumorigénesis, debido a la desregulación continua del sistema inmune y al microambiente inflamatorio creado por células inflamatorias, así como por una gran variedad de mediadores que incluyen citocinas, quimiocinas, enzimas, entre otros (Chiantore, et al, 2016; Coussens and Werb, 2002). En adición, un gran número de miRNAs involucrados en la regulación de la inflamación han sido reconocidos como moduladores en el desarrollo del cáncer y en su progresión (Williams et al, 2008).

miRNAs en CaP

Los primeros perfiles de expresión de los miRNAs asociados a CaP fueron realizados por Porkka et al. en el 2005. Actualmente, diversos estudios han descrito numerosos miRNAs que participan en el inicio y evolución CaP, pero principalmente se ha identificado la desregulación de los miR-15, miR-16, miR-34a, miR-143 y miR-145, los cuales presentan una disminución en su expresión; y de los miR-221, miR-222, miR-106a, miR-375 y miR-21, que se encuentran sobre-expresados en esta neoplasia (Lo, et al, 2013). Los miR-15 y miR-16 participan en el control de la proliferación celular, la supervivencia y la invasión y se expresan como un clúster de miRNAs (Zheng and Wang, 2011). Estos miRNAs se encuentran principalmente asociados a la progresión del cáncer y la disminución en su expresión se ha encontrado en el 80% de las neoplasias prostáticas (Jackson, et al, 2014).

Por otra parte, la expresión de miR-34a participa en la inducción del arresto del ciclo celular en la fase G1, la apoptosis y la senescencia (Duan, et al, 2015); asimismo, inhibe las características de las células madre en el carcinoma, la regeneración del tumor y la metástasis de las células (Li, et al, 2015). Lo que sugiere que este miRNA puede ejercer su función en diferentes etapas de la progresión del CaP (Lo, et al, 2013). Con respecto a miR-143 y miR-145, pueden actuar suprimiendo la proliferación, invasión / metástasis del tumor en la glándula prostática y en metástasis óseas derivadas del CaP donde se han encontrado niveles de expresión reducidos (Goto, et al, 2015).

La sobreexpresión de miR-221/miR-222 se ha encontrado frecuentemente en el CaP y esta correlacionada con los fenotipos de Carcinoma resistente a la castración metastásico. De la misma manera, se ha observado una correlación inversa entre la expresión de miR-221 / miR-222 y p27^{Kip1} en CaP primario y varios estudios demostraron que estos miRNAs pueden regular la sobre-expresión de Skp2, la ciclina A y la ciclina D1 al inhibir a p27^{Kip1}, dando lugar a la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S (le Sage, et al, 2007).

Además se ha demostrado que miR-106a, se encuentra altamente expresado en la hiperplasia benigna prostática y en el carcinoma prostático de bajo grado (Endzelinš, et al, 2016). En el caso de miR-375, se han encontrado altos niveles de expresión en pacientes con mayor puntuación de Gleason y un estadio patológico más avanzado, así como en metástasis de los ganglios linfáticos regionales (Costa-Pinheiro, et al, 2015).

Posible modulación de miRNAs por VPH

Como en otros procesos tumorales, se ha documentado que muchos virus humanos intervienen en la desregulación génica durante el proceso oncogénico y de igual manera se ha reportado que diversos virus como el del VPH producen sus propios miRNAs virales; por ejemplo, varios estudios han reportado que la regulación de algunas proteínas virales del VPH, está relacionada con la expresión celular de diversos miRNAs, algunos de los cuales son coincidentes con los ejemplificados anteriormente para el CaP (Pillai, 2012), tal y como se muestra en la figura 1.

Por un lado, en el cáncer cervicouterino se ha encontrado que la expresión de miR-15a y miR-16-1 está elevada lo que podría atribuirse a la oncoproteína viral E7, que media la degradación del gen supresor de tumores pRB (Wang, et al, 2014).

En el caso de miR-34a se ha visto que está regulado transcripcionalmente por el gen supresor tumoral p53, que se une y activa el promotor del gen que codifica el miRNA y la oncoproteína E6 de VPH, lo que conduce al aumento de la expresión de múltiples genes, que son el blanco de miR-34a (J. Chen and Zhao, 2015). La regulación positiva de estos genes aumenta la proliferación de células neoplásicas,

la supervivencia y la migración en los carcinomas asociados a la infección por VPH (Ribeiro, et al, 2015).

Los niveles de expresión de miR-143 se encuentran también disminuidos debido a la regulación por las oncoproteínas E7 y E2, lo que además aumenta los niveles de proteína de Bcl-2 (Gómez-Gómez, et al, 2016). En cuanto a miR-145, la reducción en los niveles expresión también esta mediada por E7 que puede suprimir la actividad de varios supresores de tumores celulares.

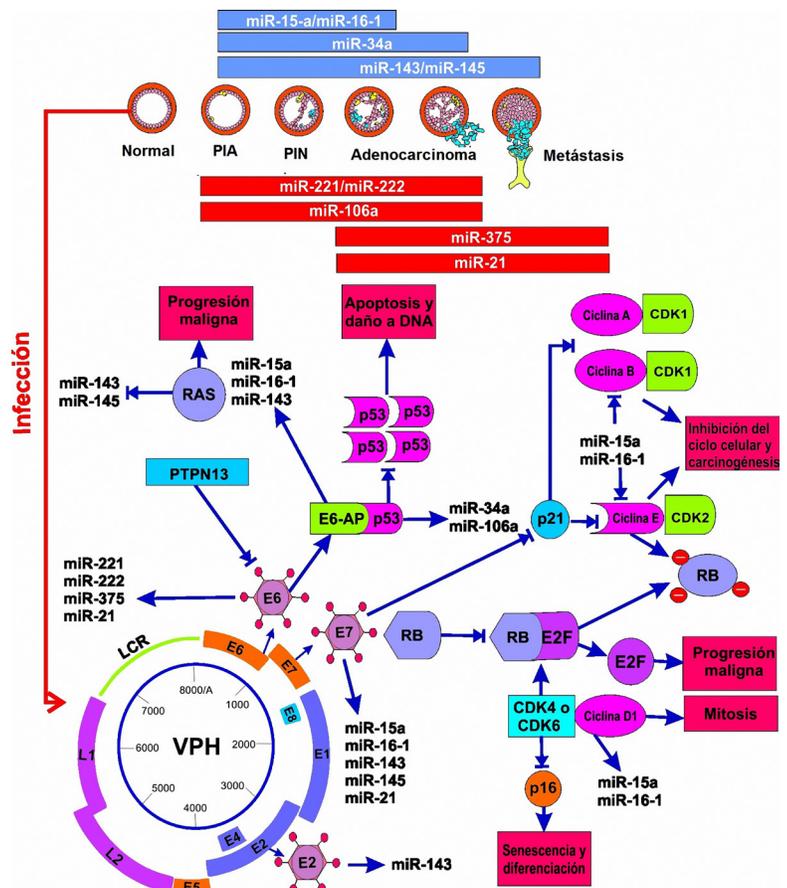


Figura 1. Modulación de proteínas virales en la expresión de miRNAs y cáncer de próstata. A. Se esquematizan los principales miRNAs que muestran una baja expresión (azul) y alta expresión (rojo) en la progresión del CaP, desde PIA (atrofia inflamatoria proliferativa), PIN (neoplasia intraepitelial prostática) hasta el desarrollo de un carcinoma metastásico. Actualmente, con base a diversas evidencias se ha propuesto que hay una relación entre la activación de la respuesta inflamatoria debido a la infección por VPH (flecha roja) y el desarrollo del CaP. B. Se representa la posible regulación de los miRNAs que participan en la infección por VPH los cuales se encuentran principalmente desregulados por las oncoproteínas virales E6, E7 y E2, permitiendo la transformación maligna ya que desregulan diferentes procesos biológicos, primordialmente aquellos relacionados con el ciclo celular.

A su vez, se ha encontrado que el clúster de los miRNAs, miR-221/miR-222 presentan una sobre-expresión en carcinomas asociados con el VPH no solo de carcinoma cervical (Chiantore et al,2016), sino también de carcinoma oral y oro-faríngeo de células escamosas, en donde se ha encontrado una regulación de estos miRNAs directamente por la oncoproteína E6 (Salazar, et al, 2014).

El miR-106a se ha evidenciado que está también regulado por p53, esta proteína se une al promotor del miRNA e induce su represión, por lo que se infiere que miR-106a además de estar regulado por p53 también está afectado directamente por la oncoproteína E6 del VPH (Díaz-González, et al, 2015). Para el caso del miR-375, se ha observado que presenta un aumento en su expresión y está desregulación se ha localizado a nivel epigenético, debido a la hipermetilación de su promotor en células de cáncer de cuello uterino, mediada por la proteína viral E6 de VPH (Song et al,2015). Por último miRNA-21, se ha encontrado sobre-expresado diferencialmente en lesiones positivas a VPH que presentaron un mayor nivel de la oncoproteína E6 (Zheng and Wang,2011).

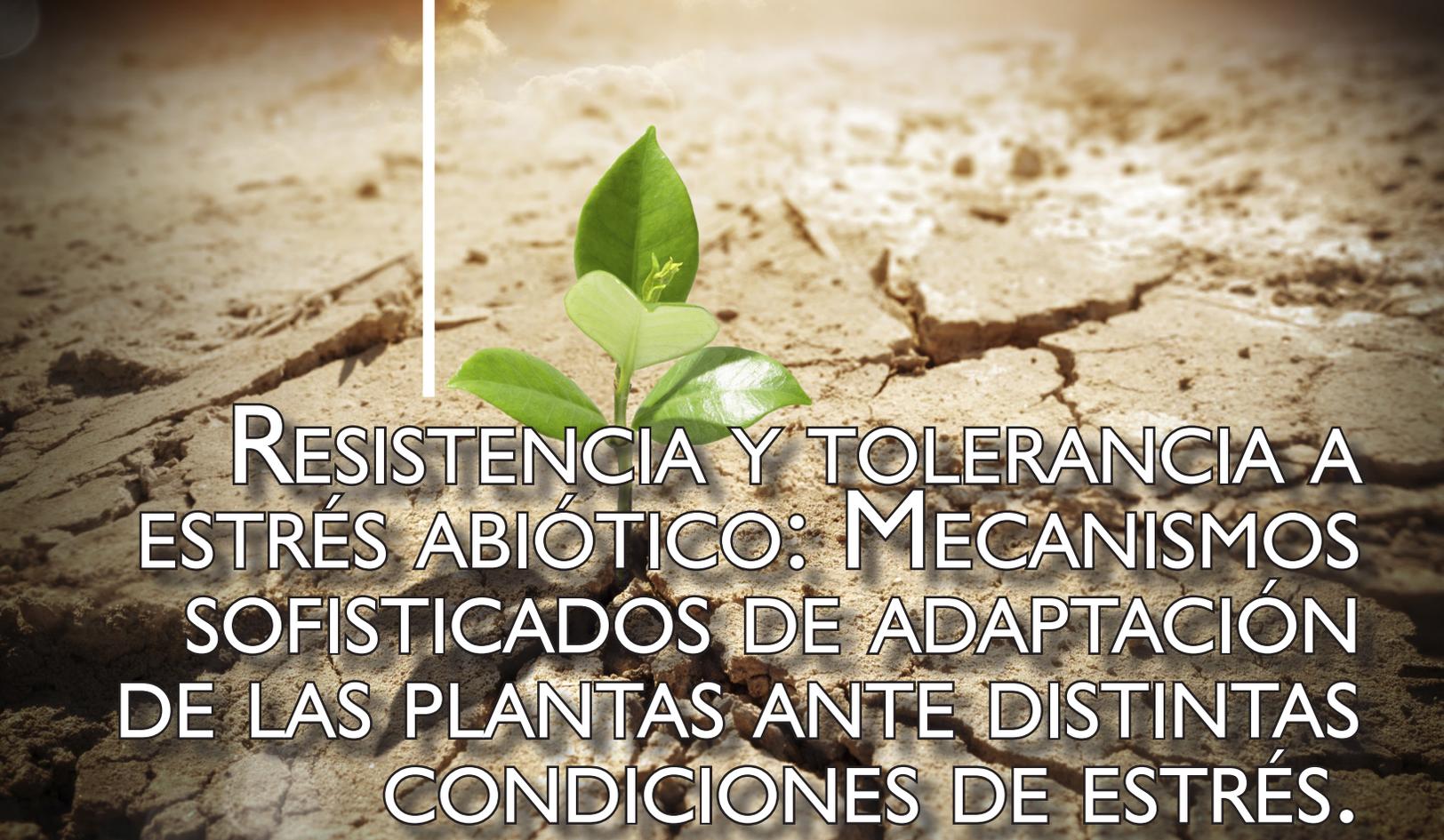
Conclusiones

En resumen, existe una fuerte evidencia que sugiere que estos miRNAs se pueden encontrar modulados por el VPH, lo que apunta fuertemente a que además de participar en la evolución y progresión del CaP, se podrían proponer como nuevos biomarcadores tempranos que permitan definir si la modulación de la infección por el VPH, correlaciona con el desarrollo y evolución del CaP.

Referencias

1. Ben, W., Yang, Y., Yuan, J., Sun, J., Huang, M., Zhang, D., and Zheng, J. 2015. Human papillomavirus 16 E6 modulates the expression of host microRNAs in cervical cancer. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 54(4): 364–370.
2. Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Croce, C. M. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(24):15524–15529.
3. Chen, J., and Zhao, K.N. 2015. HPV-p53-miR-34a axis in HPV-associated cancers. *Annals of Translational Medicine*. 3(21):331.
4. Chiantore, M. V., Mangino, G., Iuliano, M., Zangrillo, M. S., De Lillis, I., Vaccari, G., and Romeo, G. 2016. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins affect the expression of cancer related microRNAs: additional evidence in HPV induced tumorigenesis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 142(8):1751–1763.
5. Costa-Pinheiro, P., Ramalho-Carvalho, J., Vieira, F. Q., Torres-Ferreira, J., Oliveira, J., Gonçalves, C. S., Jerónimo, C. 2015. MicroRNA-375 plays a dual role in prostate carcinogenesis. *Clinical Epigenetics*. 7(1): 42.
6. Coussens, L. M., and Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*. 420(6917): 860–867.
7. Dennis, L. K., and Dawson, D. V. 2002. Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. *Epidemiology*. 13(1): 72–79.
8. Díaz-González, S. del M., Deas, J., Benítez-Bojseaneau, O., Gómez-Cerón, C.,

- Bermúdez-Morales, V. H., Rodríguez-Dorantes, M., Peralta-Zaragoza, O. 2015. Utility of microRNAs and siRNAs in cervical carcinogenesis. *BioMed Research International*, 2015, 374924.
9. Duan, K., Ge, Y.C., Zhang, X.P., Wu, S.Y., Feng, J.-S., Chen, S.L., Fu, C.H. 2015. MiR-34a inhibits cell proliferation in prostate cancer by downregulation of SIRT1 expression. *Oncology Letters*. 10(5):3223–3227.
10. Endzeliņš, E., Melne, V., Kalniņa, Z., Lietuvietis, V., Riekstina, U., Llorente, A., and Line, A. 2016. Diagnostic, prognostic and predictive value of cell-free miRNAs in prostate cancer: a systematic review. *Molecular Cancer*. 15(1): 41.
11. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 136(5): E359–E386.
12. Gómez-Gómez, Y., Organista-Nava, J., Ocadiz-Delgado, R., García-Villa, E., Leyva-Vazquez, M. A., Illades-Aguar, B., Gariglio, P. 2016. The expression of miR-21 and miR-143 is deregulated by the HPV16 E7 oncoprotein and 17β-estradiol. *International Journal of Oncology*. 49(2): 549–558.
13. Goto, Y., Kurozumi, A., Enokida, H., Ichikawa, T., and Seki, N. 2015. Functional significance of aberrantly expressed microRNAs in prostate cancer. *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association*. 22(3): 242–252.
14. Jackson, B. L., Grabowska, A., Ratan, H. L., Lee, R., Feinbaum, R., Ambros, V., Grasser, F. 2014. MicroRNA in prostate cancer: functional importance and potential as circulating biomarkers. *BMC Cancer*. 14(1): 930.
15. Jiang, Q., Yeh, S., Wang, X., Xu, D., Zhang, Q., Wen, X., Chang, C. 2012. Targeting androgen receptor leads to suppression of prostate cancer via induction of autophagy. *The Journal of Urology*. 188(4): 1361–1368.
16. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75(5):843–854.
17. le Sage, C., Nagel, R., Egan, D. A., Schrier, M., Mesman, E., Mangiola, A., Agami, R. 2007. Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *The EMBO Journal*. 26(15):3699–3708.
18. Li, J., Lam, M., Reproducibility Project: Cancer Biology, R. P. C., Abel, E., Angel, J., Kiguchi, K., Bader, A. 2015. Registered report: the microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *eLife*, 4, e06434.
19. Lo, U.G., Yang, D., and Hsieh, J.T. 2013. The role of microRNAs in prostate cancer progression. *Translational Andrology and Urology*. 2(3): 228–241.
20. Mirghani, H., Casiraghi, O., Amen, F., He, M., Ma, X.J., Saulnier, P., Vielh, P. 2015. Diagnosis of HPV-driven head and neck cancer with a single test in routine clinical practice. *Modern Pathology*. 28(12): 1518–1527.
21. Pillai, M. 2012. Interplay Between HPV Oncoproteins and MicroRNAs in Cervical Cancer. *InTech*. 347–360.
22. Porkka, K. P., Pfeiffer, M. J., Waltering, K. K., Vessella, R. L., Tammela, T. L. J., and Visakorpi, T. 2007. MicroRNA Expression Profiling in Prostate Cancer. *Cancer Research*. 67(13): 6130–6135.
23. Ribeiro, J., Marinho-Dias, J., Monteiro, P., Loureiro, J., Baldaque, I., Medeiros, R., and Sousa, H. 2015. MiR-34a and miR-125b expression in HPV Infection and Cervical Cancer Development. *BioMed Research International*. 2015, 304584.
24. Salazar, C., Calvopiña, D., and Punyadeera, C. 2014. MiRNAs in human papilloma virus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 14(8): 1033–1040.
25. Sapre, N., and Selth, L. A. 2013. Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Prostate Cancer: The State of Play. *Prostate Cancer*. 2013, 539680.
26. Song, L., Liu, S., Zeng, S., Zhang, L., and Li, X. 2015. MiR-375 Modulates Radiosensitivity of HR-HPV-Positive Cervical Cancer Cells by Targeting UBE3A through the p53 Pathway. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 21: 2210–2217.
27. Sun, T., McKay, R., Lee, G.-S. M., and Kantoff, P. 2015. The role of miRNAs in prostate cancer. *European Urology*. 68(4):589–590.
28. Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Croce, C. M. 2005. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(7):2257–61.
29. Wang, X., Wang, H.-K., Li, Y., Hafner, M., Banerjee, N. S., Tang, S., Zheng, Z.M. 2014. MicroRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(11): 4262–4267.
30. Williams, A. E., Perry, M. M., Moschos, S. A., Larner-Svensson, H. M., and Lindsay, M. A. 2008. Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochemical Society Transactions*. 36(6): 1211–1215.
31. Yin, C., Luo, C., Hu, W., Ding, X., Yuan, C., Wang, F., Wang, F. 2016. Quantitative and Qualitative Analysis of Circulating Cell-Free DNA Can Be Used as an Adjuvant Tool for Prostate Cancer Screening: A Meta-Analysis. *Disease Markers*. 2016, 1–12.
32. Zheng, Z.M., and Wang, X. 2011. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1809(11–12):668–677.



RESISTENCIA Y TOLERANCIA A ESTRÉS ABIÓTICO: MECANISMOS SOFISTICADOS DE ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS ANTE DISTINTAS CONDICIONES DE ESTRÉS.

Martínez Núñez Marcelino¹, Vera Hernández Pedro Fernando¹, Ruiz Rivas Magali¹, Villalobos López Miguel Ángel¹, Arroyo Becerra Analilia¹, Luna Suárez Silvia¹, Rosas Cárdenas Flor de Fátima^{1*}

¹Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Santa Ines Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México
Tel. +52 248-48707-65.

*Autor para correspondencia: Dra. Flor de Fátima Rosas Cárdenas, frosasc@ipn.mx

1. Resumen

Las plantas están expuestas continuamente a estímulos ambientales que influyen en su desarrollo, su rendimiento y su productividad. Las plantas han desarrollado diferentes estrategias morfológicas, fisiológicas y bioquímicas para hacer frente a diferentes situaciones de estrés, a lo largo de su historia evolutiva. Entre ellas, la resistencia y la tolerancia a menudo son utilizadas por las plantas para responder a tales situaciones estresantes. Esta pequeña revisión presenta un breve panorama de ambos conceptos en relación a una impresionante diversidad de respuestas de adaptación empleadas por las plantas ante diferentes factores de estrés.

Palabras clave: resistencia, tolerancia, estrés, plantas

2. Abstract

Plants are continuously exposed to environmental stimuli that affect their development, yield and productivity. Along its evolutionary history, plants have developed different morphological, physiological and biochemical strategies to cope at different stress conditions. Among them, resistance and tolerance are often used by plants in response to such stressing situations. This mini review shows a brief view for

both concepts, in their relation to an impressive diversity of adaptive responses used by plants against to different stress factors.

Keywords: resistance, tolerance, stress, plants

3. Introducción

Las plantas han evolucionado desde su aparición para adaptarse a los ambientes diversos a los que a menudo están expuestas. Las respuestas que las plantas muestran ante distintas tensiones les permiten detectar cambios ambientales sutiles y responder inmediatamente a condiciones complejas de estrés, minimizando los daños y conservando recursos valiosos para el crecimiento y la reproducción. Esta gran capacidad de respuesta a los cambios en el ambiente tiene mucho sentido si tomamos en cuenta que las plantas son organismos sésiles. Éstas respuestas implican cambios a nivel transcriptómico, celular y fisiológico (Atkinson y Urwin, 2012) que se traducen en la activación organizada de una red compleja de mecanismos que procuran la adaptación de la planta ante un ambiente hostil (Shabala y Pottosin, 2014).

Evidencia reciente sugiere que la respuesta que ejercen las plantas ante distintos factores de estrés como la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas y el déficit de nutrientes, entre otros; es de naturaleza multigénica. Lo anterior, indica que las respuestas celulares a menudo están interconectadas, ejerciendo así la activación sincronizada de múltiples genes que responden al estrés y que se comunican mediante vías de transducción de las señales con otros componentes metabólicos y hormonales (Tuteja, 2007; Udawat et al., 2016). La respuesta de las plantas contra cualquier tipo de estrés, puede involucrar características o mecanismos que evitan la exposición al estrés (resistencia) y/o mecanismos que permiten a la planta contender con el estrés, limitando y reparando el impacto negativo del daño que ha ocurrido a consecuencia de alguna situación de estrés (tolerancia) (Levitt, 1980; Bray et al., 2000). Ambas estrategias se han propuesto como alternativas redundantes propias de la evolución de las plantas (Agrawal et al., 2004). En éste escrito, se presenta una revisión de la aplicación y el empleo de los conceptos de resistencia y tolerancia; además se destacan características que describen a ambos conceptos haciendo alusión a los mecanismos de adaptación sofisticados que presentan las plantas ante condiciones de estrés abiótico como la sequía, la salinidad, el frío y el calor.

Factores de estrés que limitan el desarrollo óptimo de las plantas

Las plantas, al ser organismos sésiles, han desarrollado una capacidad notable para hacer frente a una gama amplia de tensiones ambientales, que de forma individual o en múltiples combinaciones (Atkinson y Urwin, 2012), pueden alterar su metabolismo y dar lugar a efectos negativos sobre su crecimiento, su desarrollo y su productividad (Levitt, 1980; Rao et al., 2006; Rejeb et al., 2014). Entre los factores de estrés pueden incluirse los factores abióticos como la sequía, los cambios drásticos de temperatura, la deficiencia o el exceso de luz, la acumulación de contaminantes, los herbicidas, los cambios en la concentración de sales y de los nutrientes en el suelo; y dentro de los factores bióticos se puede incluir, el ataque de insectos herbívoros y de patógenos (Levitt, 1980; Strauss y Agrawal, 1999; Nicot et al., 2005; Rao et al., 2006; Gill y Tuteja, 2010; Lata y Prasad, 2011; Mitchell et al., 2016). El término “resistencia” se ha acuñado a las respuestas de defensa contra patógenos en donde las plantas resistentes responden mediante mecanismos

que evitan el desarrollo de la enfermedad (inmunes), y las no resistentes (susceptibles) desarrollan la enfermedad. Sin embargo, los términos de resistencia al estrés y tolerancia al estrés, se han usado de forma intercambiable tanto para el estrés biótico como para el estrés abiótico, aunque se reconoce que el término más adecuado para referirse al estrés abiótico es el término tolerancia (antónimo-sensibilidad) (Bray et al., 2000; Rashid, 2009). Las plantas suelen responder hacia cada uno de estos factores de estrés o a la combinación de los mismos, mediante fenómenos complejos que han sido investigados intensamente (Levitt, 1980; Núñez-Farfán et al., 2007). La forma en la que las plantas responden a un entorno medioambiental cambiante suele ser distinto y depende de la etapa de desarrollo en el que se encuentren (Wahid et al., 2007; Nemeskéri et al., 2012), ello les permite adaptarse al conjunto específico de condiciones y las limitaciones presentes en un momento determinado (Lata y Prasad, 2011).

La resistencia y la tolerancia como estrategias de defensa

De forma general, algunos autores reconocen dos estrategias que a menudo utilizan las plantas para su defensa: la resistencia y la tolerancia (Mauricio et al., 1997; Núñez-Farfán et al., 2007; Stout, 2013; Mitchell et al., 2016). La resistencia la definen como “aquellas características intrínsecas de las plantas que les permiten minimizar o limitar el daño causado bajo un estado particular de estrés en un momento determinado y sin que su fenotipo se vea modificado de manera significativa” (Agrawal et al., 2004; Puijalón et al., 2011). Mientras que la tolerancia o compensación hace referencia a “la habilidad que tienen las plantas de soportar cierto nivel de daño sin reducir su rendimiento a causa de un entorno ambiental estresante”, lo que en términos de producción agrícola significa que, pese a las condiciones de estrés, los niveles de rendimiento en un cultivo tolerante se mantendrán por encima del umbral económico (Mauricio et al., 1997; Agrawal et al., 2004; Wahid et al., 2007; Puijalón et al., 2011; Stout, 2013). Ciertas consideraciones teóricas sugieren que bajo condiciones naturales todas las plantas asignan recursos simultáneamente a ambas estrategias, por lo que exhiben un patrón mixto de defensa (Núñez-Farfán et al., 2007).

Resistencia y tolerancia ¿Conceptos mutuamente excluyentes?

Algunos autores han sugerido que la resistencia y la tolerancia representan estrategias redundantes (Van der Meijden et al., 1988; Simms y Triplett, 1994; Fineblum y Rausher, 1995); sin embargo, hoy en día se plantea que ambas estrategias de defensa coexisten de forma estable, y lejos de considerarse conceptos mutuamente excluyentes, se consideran estrategias alternativas (Squeo et al., 1996; Mauricio et al., 1997; Agrawal et al., 2004). Por tal motivo, pese a que las características que hacen tolerante a una planta no impiden el daño ocasionado por los distintos factores de estrés, éstas características sí son capaces de compensar los daños que los enemigos naturales ya han ocasionado sobre ellas; protegiendo de esta manera de los efectos perjudiciales mediante mecanismos sofisticados de adaptación (Levitt, 1980; Mauricio et al., 1997). Conceptualmente los términos de resistencia y tolerancia tienen definiciones distintas; sin embargo, en la práctica es común su uso como sinónimos (Sivasankar et al., 2012), aunque el uso indistinto no ayuda en la tarea de la correcta aplicación de los términos.

Características de resistencia y tolerancia de plantas ante diferentes factores de estrés

Tanto en las estrategias de resistencia como en las de tolerancia es posible distinguir diferentes mecanismos empleados por las plantas para sobrevivir ante una gran cantidad de desafíos ambientales (Figura 1). Ambas estrategias inician inmediatamente después de la exposición a algún entorno estresante, desarrollando mecanismos complejos para percibir las señales externas y para mostrar las respuestas de adaptación que implican cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos propios de cada especie (Tabla 1) (Bohnert et al., 1995; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Estos cambios pueden manifestarse como resistencia mediante: 1) el ajuste estacional del crecimiento para evitar las condiciones de estrés; 2) las adaptaciones morfológicas y las adaptaciones fisiológicas, tales como el desarrollo de sistemas radiculares anchos y profundos, el engrosamiento del xilema, el incremento en la densidad de tricomas, el cierre de estomas y la acumulación de cera en la superficie de la hoja, entre otros. O bien como tolerancia, mediante 3) cambios metabólicos entre los que se encuentra un ajuste del potencial osmótico, la biosíntesis de

osmoprotectores y solutos compatibles, la activación de enzimas y los compuestos antioxidantes, la síntesis de poliaminas, la producción de Óxido Nítrico (NO), la modulación fitohormonal, la represión del crecimiento celular, la inducción de vías de señalización mediadas por enzimas y la reprogramación de la expresión génica mediante mecanismos dependientes o independientes de pequeñas moléculas de ácidos nucleicos conocidas como miRNAs, entre otras (Chavarría y dos Santos, 2012).

4. Conclusiones

Recientemente, muchos de los mecanismos por los que las plantas hacen frente a entornos adversos han empezado a comprenderse a profundidad. Con ello, se ha dado lugar al surgimiento de estrategias nuevas de mejoramiento que tienen como finalidad conferir ventajas adaptativas ante diferentes condiciones de estrés, y por ende propiciar el incremento en la productividad de distintos cultivos

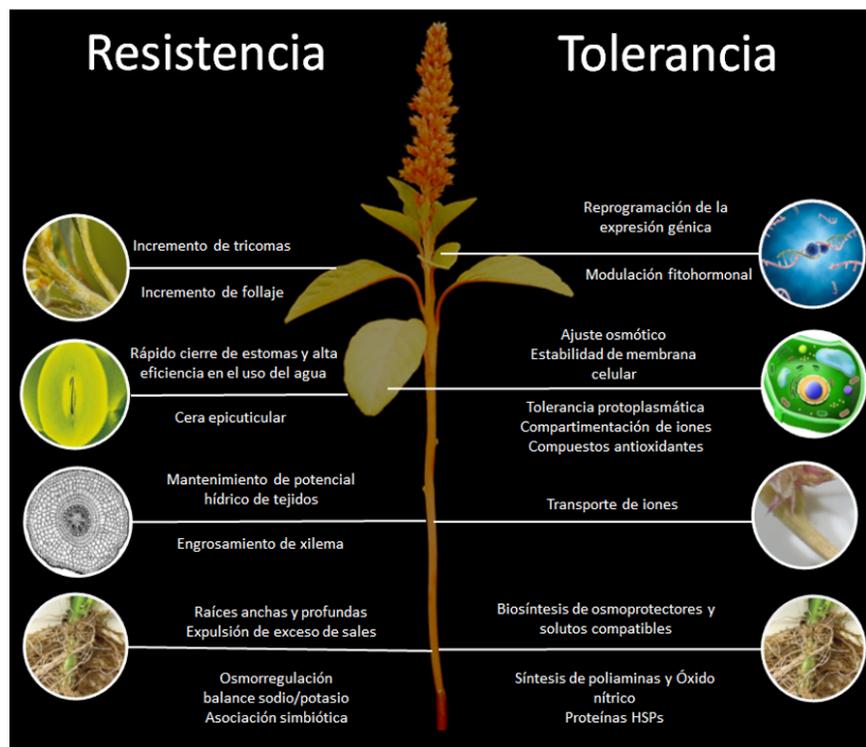


Figura 1: *Amaranthus hybridus*. Ejemplo de una planta que muestra características de resistencia y tolerancia a diferentes factores de estrés abiótico, entre ellos: Salinidad, sequía, y temperaturas extremas. Las respuestas celulares que ejercen las plantas del género *Amaranthus* ante distintos factores de estrés a menudo están interconectadas, lo que sugiere una acción sincronizada de diferentes estrategias que se comunican mediante vías de transducción de la señales con diversos componentes metabólicos y hormonales.

Tabla I. Mecanismos implicados en estrategias de resistencia y tolerancia para el manejo de diferentes factores de estrés abiótico en las plantas.

Estrategias de resistencia y tolerancia ante diferentes factores de estrés abiótico en plantas				
Estrés	Estrategias de resistencia	Referencia	Estrategias de Tolerancia	Referencia
Sequía	<ul style="list-style-type: none"> Mantenimiento del potencial hídrico de los tejidos Floración para completar el ciclo de vida antes de la sequía Desarrollo de raíces profundas Rápido cierre de estomas Alta eficiencia en la captación y uso del agua Presencia de una gruesa capa de cera epicuticular en las hojas Resistencia a fotoinhibición Biosíntesis de ácido abscísico 	(Aiken y Smucker, 1996; Price, et. al, 2002)	<ul style="list-style-type: none"> Biosíntesis de ácido abscísico Mantenimiento de turgencia y volumen celular mediante el ajuste osmótico. Estabilidad de la membrana celular. Se conserva el metabolismo celular pese a un bajo potencial hídrico Síntesis de osmoprotectores y solutos compatibles Expresión de sistemas de protección, detoxificación y reparación celular Síntesis de óxido nítrico Recambio de metabolitos, mensajeros y proteínas Reprogramación de la expresión génica mediada por miRNAs 	(Ferdous, et. al, 2015; Shukla, et. al, 2008; Tripathy, et. al, 2000)
Salinidad	<ul style="list-style-type: none"> Expulsión de exceso de sales Acumulación del exceso de sodio en las vacuolas Aumento en la captación de potasio Balance en la concentración sodio/potasio Incremento de foliaje Acidificación apoplástica Asociación simbiótica de raíces con hongos micorrízicos arbusculares Asociación de raíces con rizobacterias promotoras crecimiento vegetal 	(Farooq, et. al, 2015)	<ul style="list-style-type: none"> Homeostasis y compartimentación de iones Transporte y absorción de iones Ajuste osmótico Biosíntesis de osmoprotectores y solutos compatibles Activación de enzimas y compuestos antioxidantes Síntesis de poliaminas Producción de Óxido Nítrico (NO) Modulación fitohormonal Reprogramación de la expresión génica mediante miRNAs 	(Carillo, et. al, 2011; Deivanai, et. al, 2011; Gupta y Huang, 2014; Hoque, et. al, 2008; Shukla et. al, 2008)
Frío	<ul style="list-style-type: none"> Presencia de una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en membrana celular, lo que deriva en una inferior temperatura de transición y por ende en la función celular óptima ante bajas temperaturas Aclimatación celular a frío. Se impide la lisis inducida por la expansión celular y la formación de lípidos hexagonales de fase II 	(Jan y Andrabi, 2009; Steponkus, 1984; Wu, et. al, 1997)	<ul style="list-style-type: none"> Ajuste osmótico. Ajuste del metabolismo celular para tolerar cambios drásticos de temperatura Cambio de estructura y propiedades catalíticas de enzimas que confieren termo-estabilidad celular Estabilidad de la membrana celular. Activación de mecanismos de regulación para restaurar niveles normales de metabolitos Activación de enzimas y compuestos antioxidantes Acumulación de osmolitos para evitar deshidratación celular Síntesis de azúcares solubles, aminoácidos, ácidos orgánicos, poliaminas y lípidos Reprogramación de la expresión génica mediante miRNAs 	(Guy, 1990; Kubien, et. al, 2003; Nayyar, et. al, 2005; Shukla et. al, 2008; Yadav, 2010)
Calor	<ul style="list-style-type: none"> Reducción del tamaño de las células Movimiento circadiano de las hojas para ocultarlas del exceso de irradiación solar Cierre de los estomas para evitar la pérdida de agua Incremento en la densidad de tricomas para el mantenimiento de un microclima que proporcione sombra y conserve la humedad en la superficie de la epidermis Engrosamiento del xilema 	(Bañon, et. al, 2004; Wahid, et. al, 2007)	<ul style="list-style-type: none"> Ajuste osmótico. Homeostasis hormonal Estabilidad de la membrana celular. Detoxificación de ROS mediante biosíntesis de osmoprotectores Activación de enzimas y compuestos antioxidantes Biosíntesis y acumulación de solutos compatibles Inducción de vías de señalización MAPK y G2PK Activación de vías de señalización moduladas por chaperonas. Expresión de proteínas de choque térmico (HSPs) que permiten la mejora de procesos fisiológicos como fotosíntesis, asimilación de nutrientes y una mejor eficiencia en el uso de agua Reprogramación de la expresión génica mediante miRNAs 	(Fokar, et. al, 1998; Shanahan, et. al, 1990; Shukla, et. al, 2008; Tripathy, et. al, 2000; Wahid, et. al, 2007)

bajo ambientes diferentes. Tanto el término de “resistencia” como el de “tolerancia” son conceptos utilizados para referirse a la capacidad que tienen las plantas de manejar el estrés, y ambos representan estrategias complejas y temas de investigación estudiados ampliamente y vigentes. Por tal motivo, es esencial el conocimiento profundo de las estrategias moleculares que han desarrollado los grupos de plantas diferentes para poder manipular y mejorar la capacidad de las plantas, pues cada una de las estrategias que utilizan, ya sea individualmente o en conjunto, juegan un papel importante en la adaptación a condiciones ambientales adversas.

5. Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el proyecto financiado CB2013-221522 y al Instituto Politécnico Nacional por el proyecto financiado SIP-20160215. También agradecemos al CONACyT por las becas otorgadas a MMN, PFVH y MRR.

6. Referencias bibliográficas

• Agrawal, A.A., Conner, J.K., and Stinchcombe, J.R. 2004. Evolution of plant resistance and tolerance to frost damage. *Ecology Letters*. (7): 1199-1208.

• Aiken, R., and Smucker, A. 1996. Root system regulation of whole plant growth. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: (1) 325-346.

• Atkinson, N.J., and Urwin, P.E. 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot.* (63): 3523-3543.

• Bañon, S., Fernandez, J., Franco, J., Torrecillas, A., Alarcón, J., and Sánchez-Blanco, M.J. 2004. Effects of water stress and night temperature preconditioning on water relations and morphological and anatomical changes of *Lotus creticus* plants. *Sci. Hortic.* 101(3): 333-342.

• Bohnert, H.J., Nelson, D.E., and Jensen, R.G. 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell.* (7):1099-1111.

• Bray, E., Bailey, S.J., and Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. Cap.22 en *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan B, Gruissem W, Jones R. Eds. American Society of Plant Physiologists.

• Carillo, P., Annunziata, M.G., Pontecorvo, G., Fuggi, A., and Woodrow, P. 2011. Salinity stress and salt tolerance. *Abiotic Stress Plants-Mech. Adapt.* pp. 21-38

• Chavarria, G., and dos Santos, H.P. 2012. Plant water relations: absorption, transport and control mechanisms: INTECH Open Access Publisher. pp.106-132.

• Deivanai, S., Xavier, R., Vinod, V., Timalata, K., and Lim, O. 2011. Role of exogenous proline in ameliorating salt stress at early stage in two rice cultivars. *J Stress Physiol Biochem.*, 7(4) 157-174.

• Farooq, M., Hussain, M., Wakeel, A., and Siddique, K. H. 2015. Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms, and management. *Agron Sustain Dev.* 35(2): 461-481.

- Ferdous, J., Hussain, S.S., and Shi, B.J. 2015. Role of microRNAs in plant drought tolerance. *Plant Biotechnol J*. 13(3): 293-305.
- Fineblum, W.L., and Rausher, M.D. 1995. Tradeoff between resistance and tolerance to herbivore damage in a morning glory. *Nature*. (377): 517-520.
- Fokar, M., Nguyen, H.T., and Blum, A. 1998. Heat tolerance in spring wheat. Estimating cellular thermotolerance and its heritability. *Euphytica*, 104(1): 1-8.
- Gill, S.S., and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*. (48): 909-930.
- Gupta, B., and Huang, B. 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int J Genomics*. 2014. 1-18
- Guy, C.L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu Rev Plant Biol*. 41(1): 187-223.
- Hoque, M.A., Banu, M.N.A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., and Murata, Y. 2008. Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *J plant physiol*. 165(8): 813-824.
- Jan, N., and Andrabi, K.I. 2009. Cold resistance in plants: A mystery unresolved. *Electron J Biotechnol*. 12(3): 14-15.
- Kubien, D.S., von Caemmerer, S., Furbank, R.T., and Sage, R.F. 2003. C4 photosynthesis at low temperature. A study using transgenic plants with reduced amounts of Rubisco. *Plant Physiol*. 132(3): 1577-1585.
- Lata, C., and Prasad, M. 2011. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J Exp Bot*. (62): 4731-4748.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses: Academic Press.
- Mauricio, R., Rausher, M.D., and Burdick, D.S. 1997. Variation in the defense strategies of plants: are resistance and tolerance mutually exclusive? *Ecology*. (78): 1301-1311.
- Mitchell, C., Brennan, R.M., Graham, J., and Karley, A.J. 2016. Plant Defense against Herbivorous Pests: Exploiting Resistance and Tolerance Traits for Sustainable Crop Protection. *Front Plant Sci*. (7): 1132. 1-8.
- Nayyar, H., Chander, K., Kumar, S., and Bains, T. 2005. Glycine betaine mitigates cold stress damage in chickpea. *Agron Sustain Dev*. 25(3): 381-388.
- Nemeskéri, E., Molnár, k., Víg, R., Dobos, A., and Nagy, J. 2012. Defence Strategies of Annual Plants Against Drought: INTECH Open Access Publisher. pp.133-158.
- Nicot, N., Hausman, J.F., Hoffmann, L. and Evers, D. 2005 Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot*. (56): 2907-2914.
- Núñez-Farfán, J., Fornoni, J., Valverde, P.L. 2007. The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 38: 541-566.
- Price, A. H., Cairns, J. E., Horton, P., Jones, H. G., and Griffiths, H. 2002. Linking drought resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. *J Exp Bot*. 53(371): 989-1004.
- Puijalon, S., Bouma, T.J., Douady, C.J., Groenendael, J.V., Anten, N.P.R., Martel, E., and Bornette, G. 2011. Plant resistance to mechanical stress: evidence of an avoidance-tolerance tradeoff. *New Phytologist*. (191): 1141-1149.
- Rao, K.V., Raghavendra, A.S., and Reddy, K. 2006. Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants: Springer. pp.1-345.
- Rashid A. 2009. Stress: Perception and Tolerance. Cap. 6 en *Molecular Physiology and Biotechnology of flowering plants*. Eds. Alpha Science International Ltd. Oxford, U.K.Rejeb, I.B., Pastor, V., and Mauch-Mani, B. 2014. Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants (Basel)*. (3) :458-475.
- Shabala, S., Pottosin, I. 2014. Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiol Plant*. (151): 257-279.
- Shanahan, J., Edwards, I., Quick, J., and Fenwick, J. 1990. Membrane thermostability and heat tolerance of spring wheat. *Crop Sci*. 30(2): 247-251.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot*. (58): 221-227.
- Shukla, L.I., Chinnusamy, V., and Sunkar, R. 2008. The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses. *Biochim Biophys Acta*. 1779(11): 743-748.
 - Simms, E.L., Triplett, J. 1994. Costs and benefits of plant responses to disease: resistance and tolerance. *Evolution*. 1973-1985.
 - Sivasankar, S., Williams, R.W., and Greene, T.W. 2012. Abiotic stress tolerance in plants: an industry perspective. *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress, Volume 1 & Volume 2*:27-47.
 - Squeo, F.A., Rada, F., García, C., Ponce, M., Rojas, A., Azócar, A. 1996. Cold resistance mechanisms in high desert Andean plants. *Oecol*. (105): 552-555.
 - Steponkus, P. L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu Rev Plant Physiol*. 35(1): 543-584.
- Stout, M.J. 2013. Reevaluating the conceptual framework for applied research on host-plant resistance. *Insect Sci*. (20): 263-272.
- Strauss, S.Y., and Agrawal, A.A. 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends Ecol Evol*. (14): 179-185.
- Tripathy, J., Zhang, J., Robin, S., Nguyen, T.T., and Nguyen, H. 2000. QTLs for cell-membrane stability mapped in rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress. *Theor Appl Genet*. 100(8): 1197-1202.
- Tuteja, N. 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol*. (428): 419-438.
- Udawat, P., Jha, R.K., Sinha, D., Mishra, A., and Jha, B. 2016. Overexpression of a Cytosolic Abiotic Stress Responsive Universal Stress Protein (SbUSP) Mitigates Salt and Osmotic Stress in Transgenic Tobacco Plants. *Front Plant Sci*. 7:518.
- Van der Meijden, E., Wijn, M., Verkaar, H.J. 1988. Defence and regrowth, alternative plant strategies in the struggle against herbivores. *Oikos*: 355-363.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environ Exp Bot*. 61:199-223.
- Wu, J., Lightner, J., and Warwick, N. 1997. Low-temperature damage and subsequent recovery of fabI mutant *Arabidopsis* exposed to 2 [deg] C. *Plant Physiol*. 113(2): 347-356.
- Yadav, S.K. 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agron Sustain Dev*. 30(3): 515-527.





INVESTIGACIÓN +

POSGRADOS

- Maestría en Biotecnología Aplicada
- Maestría en Biotecnología Productiva
- Doctorado en Biotecnología Aplicada
- Doctorado en Biotecnología Productiva

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal
Tecuexcomac - Tepetitla K. 1.5, Tlaxcala, C.P. 90700, México