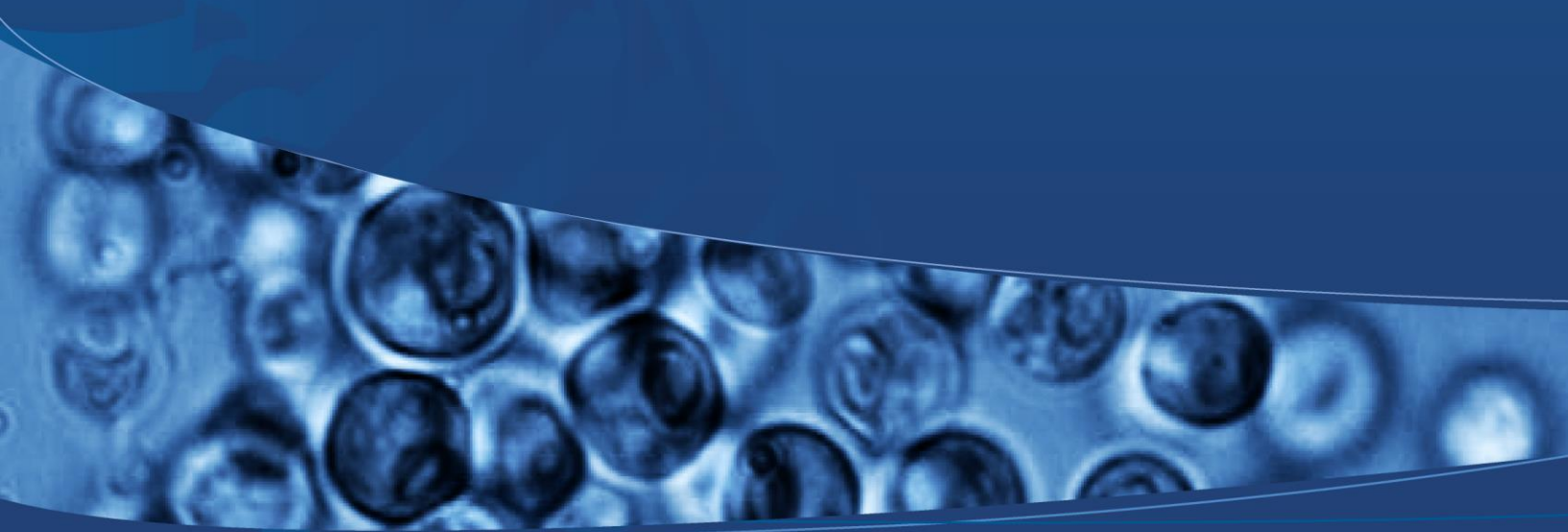
Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.

Año 2016, Volúmen 20, Número 1
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

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

MESA DIRECTIVA

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Presidente

Dr. Carlos Regalado González
Vice-Presidente

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Secretario

Dra. María Teresa Torres Mancera
Tesorero

Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz
Subsecretario

Dr. Jose Luis Martínez Hernández
Vocal Profesional

M.C. Olga Berenice Álvarez Pérez
Vocal Estudiante

TRABAJO DE EDICIÓN

M. C. Olga Berenice Álvarez Pérez

COMITÉ EDITORIAL

Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Editor en Jefe
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
CINVESTAV

Dr. Fernando Luis García Carreño
CIBNOR

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
UAM-I

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Sara Solís Pereira
Instituto Tecnológico de Mérida

Dra. Elizabeth Langley McCarron
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Víctor Manuel Loyola
Centro de Investigación Científica de Yucatán

DISEÑO GRAFICO E IMAGEN

Lic. Nayeli Quinto **(SODIO NET)**

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título04-1999-082516265000-101. Los Conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. o a la siguiente dirección electrónica smbb1982@gmail.com

Índice

EDITORIAL

El cartero siempre llama dos veces. Algunas veces más

Víctor M. Loyola-Vargas **5**

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES **13**

ARTÍCULOS

Ingeniería de Proteínas Como una Herramienta en Ingeniería de Vías Metabólicas

Dulce Catalina Díaz, Francisco Bolívar y Adelfo Escalante **18**

Uso de Micropartículas de Polímeros Como Vehículo de Antígenos

Silvia Moreno-Mendieta y Romina Rodríguez-Sanoja **38**

IN MEMORIAM

En Memoria a un Amigo y Colega Excepcional, el Dr. Federico Sánchez Rodríguez

Miguel Lara Flores **58**

El cartero siempre llama dos veces. Algunas veces más.

INTRODUCCIÓN

Seguramente hay científicos alrededor del mundo que hayan recibido la carta de aceptación de su artículo sin ningún comentario y felicitándoles por la investigación realizada. Yo sólo conozco un caso. El 99.99% restante de nosotros hemos recibido el rechazo de alguna de nuestras propuestas de publicación, algunas veces más de una vez.

El título de este editorial está inspirado en el título de la novela “The postman always rings twice” de James M. Cain. Cuenta el autor que cada vez que le llegaba una carta de rechazo por parte de algún editor, el cartero siempre llamaba dos veces. Eso le inspiró a cambiar el título original de la novela por el que finalmente fue publicada.

Rechazos a publicaciones literarias

El rechazo a las publicaciones, ya sea obras literarias o científicas no es nuevo. Herman Melville, Gustave Flaubert, Rudyard Kipling, H. G. Wells, son solo algunos autores cuyas algunas de sus obras, ahora consideradas clásicos de la literatura, fueron rechazadas por los editores del siglo XIX (Cuadro 1). La lista completa da para escribir libros completos, como el publicado por

Andre Bernard (2002). Entre los autores que podemos encontrar en dichas listas de “rechazos”

Cuadro 1. Lista de algunas obras cuya publicación fue rechazada inicialmente.

Año	Autor	Obra
1851	Herman Melville	Moby Dick
1856	Gustave Flaubert	Madame Bovary
1889	Rudyard Kipling[PN]	Sin título
1895	H. G. Wells	La máquina del tiempo
1912	Ezra Pound	Retrato d’un femme
1928	D. H. Lawrence	El amante de LadyChatterley
1931	William Faulkner[PN]	Santuario
1934	James M. Cain	El cartero siempre llama 2 veces
1945	George Orwell	Rebelión en la granja
1962	Octavio Paz[PN]	El laberinto de la soledad
1966	Isaac Bashevis Singer	En la corte de mi padre

Fuente:http://www.revistaarcadia.com/libros/articulo/famosos-rechazos-literarios/29226; http://www.comoescribirunlibro.com/50-autores-famosos-rechazados-editoriales/; http://www.iberlibro.com/blog/index.php/2013/08/06/10-escritores-famosos-que-fueron-rechazados-antes-de-triunfar/; http://www.libropatas.com/listas/13-cartas-de-rechazo-recibidas-por-escritores-luego-famosos/.

es frecuente encontrar escritores galardonados con premios como el Nobel (PN), el Cervantes o el Príncipe de Asturias, como Octavio Paz (PN, 1995), Rudyard Kipling (PN, 1907; el más joven en recibir el premio en el campo de la literatura), William Faulkner (PN, 1949), Gabriel García Márquez (PN, 1982), Camilo José Cela (PN, 1989), Pearl S. Buck (PN, 1938), Isaac Bashevis Singer (PN, 1978), William Golding (PN, 1983) entre muchos otros. Como puede observarse hay diferentes nacionalidades, edades, sexo, etc. entre los autores galardonados con el PN y "premiados" con rechazo a algunas de sus obras.

Algunas obras han sido rechazadas múltiples veces (Cuadro 2) antes de ser aceptadas. En algunos casos, como el de la escritora Agatha Christie, pasaron varios años antes de que le publicaran la primera de sus 79 novelas, de las cuales se han vendido más de cuatro mil millones. Algunos autores, como Marcel Proust (En busca del tiempo perdido), tuvieron que pagar por la publicación de su obra dado que nadie quería publicarla.

Cuadro 2. Lista de algunas obras cuya publicación fue rechazada inicialmente múltiples veces

Rechazos	Autor	Obra
76	Jasper Fforde	The eyre affair
38	Margaret Mitchell	Gone with the wind
23	Frank Herbert	Dunes
22	James Joyce	Dubliners
22	Laurence J. Peter	The Peter principle
20	William Golding	El señor de las moscas
16	Irving Stone	Lust for life
15	Anne Frank	The diary of a young girl
14	E. E. Cummings	Poems
12	J. K. Rowling	Harry Potter
10	Vladimir Nabokov	Lolita

Si ya el rechazo de la obra es estresante y frustrante, los comentarios que algunas veces acompañan a la carta lo hace más difícil.

En el cuadro 3 he realizado una pequeña compilación de algunas de las joyas escritas por los

Cuadro 3. Algunos comentarios enviados por los editores al rechazar la publicación de una obra

Obra	Comentario
Madame Bovary.	Usted ha sepultado a su novela bajo un montón de detalles que están bien hechos pero que son completamente superfluos.
Santuario.	Por Dios, yo no puedo publicar esto. Usted y yo iríamos a la cárcel.
Sin título.	Lo siento señor Kipling, usted simplemente no sabe cómo usar la lengua inglesa.
El amante de Lady Chatterley.	Por su propio bien no publique este libro.
Granja de animales.	Es imposible vender historias de animales en Estados Unidos.
El laberinto de la soledad.	No veo que el libro en su totalidad pueda interesarles a los lectores estadunidenses. Esto se debe a que está dirigido a los mexicanos.
Ulises.	Por obsceno. Prohibido en los Estados Unidos.
Moby Dick.	Lamentamos decirle que nuestra opinión unánime es por completo adversa al libro ya que pensamos que de ningún modo encajaría en el mercado juvenil (Inglaterra). Es muy largo, más bien pasado de moda, y en nuestra opinión no merece la reputación de la que al parecer goza.
Retrato d'une femme.	El verso inicial contiene demasiadas erres.
La máquina del tiempo.	No tiene ni suficiente interés para el lector común ni la profundidad suficiente para el lector científico.
En la corte de mi padre.	Demasiado pedestre.
En busca del tiempo perdido.	Mi querido amigo, puede que esté muerto de cuello para arriba, pero aun así no veo por qué un tío puede necesitar 30 páginas para describir cómo cambia de postura en la cama antes de dormir.
Fiesta	Si puedo ser sincero, señor Hemingway, encuentro sus esfuerzos tanto tediosos como ofensivos. Usted es un hombre, hombre, ¿o no lo es? No me sorprendería descubrir que
Banderas sobre el polvo	Mi principal objeción que parece que no tiene ninguna historia que contar y sostengo que una novela tiene que contar una historia y contarla bien.
El gran Gatsby	Tendrá un buen libro si se libra del personaje de Gatsby.

editores en las cartas de rechazo enviadas a los escritores

Las listas mencionadas son sólo un pequeño ejemplo de lo que pasa en la industria editorial mundial. Es claro que la inmensa mayoría de la industria trabaja para obtener ganancias. Sin embargo, también está claro que el criterio de los editores deja mucho que desear. Un ejemplo muy reciente ilustra este hecho. En enero de este año, The Sunday Time (Reino Unido) publicó los resultados de un experimento realizado para determinar qué tan bueno es el criterio de los editors al escoger que obras van a publicar y cuáles no.

El periódico envió, con otro nombre, los primeros capítulos de dos manuscritos a 41 editoriales y agentes literarios. Tras la concebida espera, recibió 20 respuestas. Todas menos una eran de rechazo. Una agente literaria había expresado interés, pero sólo en una de las obras. La otra, aunque la reconocía como original, no le pareció lo bastante interesante. ¿Conclusión? Un 98% de rechazo, ya fuera en forma de silencio o, casi siempre, de una carta estándar con motivos educados.

Los capítulos pertenecían a dos novelas que habían ganado el premio Booker, el premio más prestigioso de la Commonwealth. Una de las novelas era *In a free state* de V. S. Naipaul (ganador 1971 y PN de Literatura 2001) y la otra *Holiday* de Stanley Middleton (ganador 1974). El libro por el que se interesó la agente fue el de Middleton. La escritura del premio Nobel se encontró con un 100% de rechazo por parte de los editores. Los resultados hablan por sí mismo.

Rechazos a publicaciones científicas

Ahora la pregunta es ¿qué pasa en el mundo de la ciencia respecto a las publicaciones? La respuesta más simple es que prácticamente no hay diferencia. Unos pocos ejemplos para ilustrar la situación.

En el año 1960 T. H. Maiman envío a la revista Physical Review Letters la descripción del primer láser. No fue aceptado. Fue publicado en la revista Nature y actualmente tiene más de 4,430[3] citas. La teoría del origen de las células eucarióticas, escrito por Lynn Sagan/Margulis y publicado bajo el título "*On the origin of mitosing cells*" (Sagan, 1967) fue publicado en J. Theor. Biol., no antes de haber sido enviado a 15 revistas científicas que lo rechazaron. Lynn platicaba que recibió 800 solicitudes de reimpresos para dicha publicación. Actualmente tiene más de 800 citas. La publicación sobre el análisis de conglomerados de patrones de expresión genética, liderada por David Botstein y rechazada por Science se ha convertido, como él acertadamente le predijo a la editora de Science cuando trató de revertir la decisión, en un clásico. Ahora tiene más de 15,700 citas (Eisen et al., 1998). Recientemente, el Dr. Mojica del Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante, vio cómo su artículo sobre "*Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats, CRISPR*" era rechaza por Nature, PNAS, Microbiology and Nucleic Acid Research. Finalmente, fue publicada en el Journal of Molecular Evolution (Mojica et al., 2005). Hoy en día, este descubrimiento es una de las herramientas más poderosas para la modificación y edición de genomas y está teniendo múltiples aplicaciones.

En 1933, Enrico Fermi, ganador del Premio Nobel de Física en 1938 por sus aportaciones "…a la demostración de la existencia de nuevos elementos radiactivos producidos por irradiación con neutrones…."[4] sometió para su eventual publicación, a la revista Nature, un documento titulado "*Versuch einer Theorie der β-Strahlen*. [*An attempt of a theory of β radiation*]" (interacción débil). La revista lo rechazó porque "…contiene especulaciones tan remotas de la realidad como para ser de interés para los lectores…" El artículo publicado eventualmente en la revista Zeitschrift für Physik tiene más de 1,200 citas (Fermi, 1934), y desde luego la interacción débil, una de las cuatro fuerzas, es un componente central en el funcionamiento del universo y no "una especulación desligada de la realidad".

El Dr. Fermi no es el único Premio Nobel que ha visto rechazado su trabajo por alguna revista. La lista de ganadores de este galardón y cuyos trabajos han sido rechazados es larga. En algunos casos, los artículos no aceptados incluyen el descubrimiento por el cual fueron premiados.

El Dr. Hans Krebs sometió su artículo sobre el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, o mejor conocido como el Ciclo de Krebs, a la revista Nature (Krebs & Johnson, 1937). El trabajo fue regresado con una diplomática nota que rezaba que tenían demasiados trabajos esperando ser publicados, por lo que su trabajo podría sufrir un importante retraso en su publicación. En 1988, uno de los editores de Nature publicó una carta indicando que el rechazo del trabajo de Krebs había sido el error más grande cometido por la revista. En realidad ha rechazado varios trabajos que más tarde sus autores han sido reconocidos con el Premio Nobel.

La revista Journal of Chemical Physics rechazó el trabajo por el cual el Dr. Richard Robert Ernst recibió el Premio Nobel en el año 1991. Este trabajo ha sido citado más de 1,500 veces. Algo similar pasó con la publicación del Dr. Paul C. Lauterbur (PN 2003) finalmente publicada en Nature y con más de 3,600 citas.

Otros científicos cuyas publicaciones han sido rechazadas y más tarde ganaron el Premio Nobel son el Dr. Leland H. Hartwell quien recibió el PN en el año 2001 por "sus descubrimientos de los reguladores claves del ciclo celular" junto con los Drs. Tim Hunt y Paul M. Nurse (Hartwell et al., 1974). El artículo fue rechazo por Nature sin revisión. La publicación tiene ahora cerca de 1,000 citas. Dos últimos ejemplos. Los Drs. Kary B. Mullis y Michael Smith compartieron el Premio Nobel de Química del año 1993. Ambos investigadores no solo compartieron el PN, sino que vieron rechazadas sus publicaciones en las que reportaban los descubrimientos por las que ganaron el PN. En el caso del Dr. Smith su publicación sobre la mutación puntual, fue rechazada por Cell con el comentario de que "no era de interés general"; fue publicada en el Journal of Biological Chemistry y tiene cerca de 500 citas (Hutchison et al., 1978). En el caso del Dr. Mullis, quien obtuvo el premio "por su invención del método para amplificar el ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa" o PCR, el manuscrito fue rechazado por varias revistas y finalmente fue publicado en la serie Methods in Enzymology (Mullis & Faloona, 1987). Un año antes apareció en las memorias de la reunión del Cold Spring Harbor. Sumando las citas de estas publicaciones, así como las hechas a las patentes que protegieron la invención, la técnica cuenta con más de 20,000 citas. Hay más

ejemplos, pero los descritos ilustran claramente el punto sobre la publicación de los resultados de investigación por parte de los científicos.

Para finalizar este aspecto del análisis debo mencionar que ahora existen sitios en la red, como The Grigorieff Lab[5] en la que se puede ver en tiempo real los artículos que son rechazados por algunas revistas y aceptados por otras.

¿Qué hacer cuando nos rechazan una propuesta para publicar?

Si la razón es que la publicación no cae dentro de las especialidades publicadas por la revista, lo lógico es buscar una revista que si contemple el campo de la publicación. Algo muy importante es evitar que esto suceda. La revista a la cual se desea enviar una publicación debe escogerse muy cuidadosamente. Es un error frecuente que, dejándonos guiar por el factor de impacto de la revista, enviemos nuestra publicación a una revista que no contempla el campo de investigación en la cual cae la investigación realizada.

Si la razón para el rechazo es la escasez de datos o un análisis insuficiente u otras razones técnicas, deberán tomarse en cuenta y resolver todos los cuestionamientos y observaciones de los evaluadores. En general, una buena evaluación mejora sustancialmente el artículo.

Si los autores están convencidos que los revisores se equivocaron al evaluar el artículo, o no lo entendieron, entonces deberán hacerse un par de cosas. La primera es revisar cuidadosamente los argumentos expuestos en el artículo, es posible que la falta de entendimiento de los revisores se deba a una mala redacción o argumentación. Por el otro lado, si ese no es el problema, deberá escribirse una carta al editor contra argumentando los puntos de los revisores.

Si los argumentos de los revisores son convincentes, deberá evitarse enviar el artículo a otra revista hasta no haber corregido las fallas en la investigación.

Escribir, lo mismo que leer, es una herramienta conceptual para el análisis, interpretación y comunicación de ideas científicas. Escribir es una de nuestras actividades más importante. Escribimos para convencer a nuestros pares que aprueben nuestros proyectos, o para que publiquen nuestros resultados. En resumen, escribimos para informar y persuadir. Debemos dar un mucho mayor peso específico a esta primordial actividad de nuestra vida diaria.

Escribir conlleva una importante responsabilidad. Actualmente, prácticamente todos los días, vemos casos de mala conducta en las revistas científicas, desde autoplagio, plagio, hasta la invención de datos, su alteración y mal uso, y sobre todo la más dispersa de todas las faltas éticas, el ser autor de artículos en los que no se debería serlo. Hoy en día, la mayoría de las grandes revistas siguen las normas sugeridas por el International Committee of Medical Journal Editors[6]. Entre los aspectos más importantes contenidos en las recomendaciones está el hecho de que aportar recursos

[3] En todos los casos las citas fueron obtenidas en Google Scholar durante el mes de abril de 2016.
[4] Todas las citas de los ganadores del Premio Nobel provienen de la Nobel Foundation: http://www.nobelprize.org/nobel_organizations/nobelfoundation/
[5] http://grigoriefflab.janelia.org/rejections
[6] http://www.icmje.org/recommendations/

económicos o materiales, colectar datos o ser el supervisor general de la investigación, no es suficiente para ser autor de la publicación. Para ser autor del artículo se requiere haber contribuido sustancialmente a la concepción y diseño de la investigación, a la adquisición de los datos, o al análisis e interpretación de ellos, así como escribir el artículo o revisarlo críticamente en su contenido intelectual.

La Ética es una parte cosustancial a la actividad científica. Debemos enseñarla a nuestros estudiantes. La actividad científica sin ética, ni responsabilidad de ningún tipo, está vacía. No es humana. Debemos hacer de la actividad científica una actividad llena de contenido humano.

Bibliografía

Bernard A, (2002) Rotten rejections: The letters that publishers wish they'd never sent. Robson Books Ltd., London.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO & Botstein D, (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 95: 14863-14868.

Fermi E, (1934) Versuch einer Theorie der b-Strahlen. I, Z. Phys. 88: 161-177.

Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR & Reid BJ, (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast, Science. 183: 46-51.

Hutchison CA, Phillips S, Edgell MH, Gillam S, Jahnke P & Smith M, (1978) Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence, J. Biol. Chem. 253: 6551-6560.

Krebs HA & Johnson WA, (1937) The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissue, Enzymologia. 4: 148-156.

Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J & Soria E, (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements, J. Mol. Evol. 60: 174-182.

Mullis KB & Faloona FA, (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, Meth. Enzymol. 155: 335-350.

Sagan L, (1967) On the origin of mitosing cells, J. Theor. Biol. 14: 225-274.

Dr. Víctor M. Loyola-Vargas

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas
Centro de Investigación Científica de Yucatán
Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México
Email: vmloyola@cicy.mx

.

[6] http://www.icmje.org/recommendations/

Guía de Autores

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

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

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

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

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

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

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

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

1. ¿Qué es y para qué sirve la Biotecnología?. Es decir: descripciones que ilustren y divulguen los distintos campos de la biotecnología, sus alcances y limitaciones, su historia y sus perspectivas.

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

3. Aplicaciones de la Biotecnología para resolver problemas o atender necesidades de la sociedad, con especial atención a sus aplicaciones ya vigentes en México. Esta sección será dedicada a una empresa o institución (pública o privada) que desee difundir los logros obtenidos en algún campo de la biotecnología. Por ejemplo: empresas productoras de antibióticos o productos biológicos, empresas de ingeniería ambiental que usen procesos biotecnológicos, empresas agropecuarias, forestales o de acuacultura que usen tecnologías biológicas avanzadas, o empresas de transformación de alimentos que utilicen enzimas, cultivos de microorganismos, etc. Esta lista es indicativa pero no exhaustiva.

4. Problemas de bioseguridad, bioética y biodiversidad relacionados con las aplicaciones de la biotecnología a la sociedad. Por ejemplo: análisis y comentarios sobre los debates acerca del uso de semillas transgénicas, los problemas de conservación y explotación de la biodiversidad mediante la biotecnología, los riesgos del uso de organismos transgénicos en diversos campos de la industria, los problemas de bioseguridad del uso de antibióticos y otros productos biotecnológicos.

5. La educación, la cultura y la difusión tecnológica en relación con la biotecnología. Por ejemplo: comentarios de planes y programas, de estilos y necesidades de la enseñanza, del enfoque interdisciplinario, en carreras o planes de estudio directamente ligados con la biotecnología. También necesidades y modalidades sobre programas de extensión educativa para la industria, para el público consumidor o para grupos selectos de personas interesadas en la biotecnología (políticos, funcionarios de empresas, líderes de opinión). El uso de la informática en la difusión de la biotecnología, y en general, el análisis de necesidades, métodos y alternativas para difundir los conocimientos de la biotecnología.

6. Oportunidades y propuestas para mejorar la cooperación y el desarrollo biotecnológicos. Por ejemplo: Análisis de las oportunidades vigentes de intercambio académico o comercial en biotecnología. Propuestas de nuevas formas de cooperación entre los sectores de investigación y la industria biotecnológica. Análisis y propuestas del uso óptimo de recursos humanos, financieros o materiales para mejorar la cooperación o el desarrollo de la biotecnología. En esta sección se dará espacio a los análisis, críticas o propuestas de los aspectos legales y fiscales que afecten e incluso puedan mejorar el desarrollo de la biotecnología en México. Tales como: la propiedad industrial, el régimen fiscal de las empresas, el costo del desarrollo biotecnológico y los subsidios o estímulos económicos para el desarrollo de la biotecnología.

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

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

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

dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como el e-mail del autor corresponsal.

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

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

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

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

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

Para revistas:

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

Para libros y capítulos de libros:

(Libro)

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

(Capítulo de libro)

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *In:* Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology

(EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Para patentes:

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

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

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

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

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

Revistas electrónicas:

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

Para tesis de pre y posgrado:

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

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

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad

intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos. Los trabajos solamente se reciben vía correo electrónico al Comité Editoral encabezado por el Dr. Sergio Sánchez Esquivel en la dirección sersan@biomedicas.unam.mx Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal, por lo que se pide Incluir una dirección de correo electrónico para este fin, así como para mantener comunicación con el editor sobre la evolución de la revisión y sobre la aceptación del mismo.

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

Ingeniería de Proteínas Como una Herramienta en Ingeniería de Vías Metabólicas

Dulce Catalina Díaz, Francisco Bolívar y Adelfo Escalante

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México. E-mail: dcdiaz@ibt.unam.mx

RESUMEN

La utilización de microorganismos como fábricas celulares para la producción industrial de diversos compuestos requiere normalmente implementar estrategias de ingeniería de vías metabólicas (IVM) como sobre-expresar e inactivar genes para re-dirigir el flujo de carbono y energía a las vías de interés. En conjunto con esta aproximación, la ingeniería de proteínas es una herramienta promisoria que permitiría diversificar el espectro de compuestos sintetizados más allá del repertorio natural y optimizar los sistemas de producción, enriqueciendo las estrategias y alcances de la IVM. Por otro lado, la aplicación de ingeniería de proteínas permite construir vías sintéticas novedosas, aumentar la eficiencia de la producción al mejorar las propiedades catalíticas de enzimas, promoviendo la canalización de sustratos o alterando elementos de regulación, así como generando sistemas con respuestas moduladas. En esta contribución, se presenta una revisión de la metodología general utilizada para el diseño, construcción y optimización de cepas bacterianas sobreproductoras de compuestos de interés industrial por IVM. Posteriormente se describen los fundamentos de la ingeniería de proteínas considerando el diseño racional, aleatorio y computacional exponiendo de forma particular el caso de la evolución dirigida para mejorar las propiedades funcionales de una proteína de interés. Finalmente se presentan diversos ejemplos donde se describe la aplicación exitosa de la ingeniería de proteínas y de IVM para la obtención de fábricas celulares.

Palabras clave: Ingeniería metabólica, ingeniería de proteínas, evolución dirigida

ABSTRACT

The utilization of microorganisms as cellular factories suitable for industrial production of several compounds commonly requires the implementation of metabolic pathway engineering (MPE) strategies like over-expression and deletion of genes in order to re-direct energy and carbon flux through the desired pathway. Added to such traditional approaches protein engineering is a promising tool that might allow a wider spectrum of cell-synthetized compounds (beyond the natural repertory) as well as production system's optimization broadening the MPE strategies and scopes. Protein engineering can be used for the construction of novel pathways and enhancement of efficiency by

improving the catalytic properties of enzymes, prompting of metabolic channeling, modifying the cellular regulatory machinery and generating modulated-response systems. Herein we introduce the generalities of the methodology employed for the design, building and optimization of industrially important overproducer bacterial strains by MPE. Next, we describe protein-engineering fundamentals considering rational, aleatory and computational design pinpointing directed evolution as a strategy for protein features improvement. Finally, we show cases that exemplify the successful application of protein engineering and MPE to achieve the development of cellular factories.
Key words: Metabolic engineering, protein engineering, directed evolution

INTRODUCCIÓN

La utilización de microorganismos como fábricas celulares para la producción de moléculas de interés en la industria química, farmacéutica y agrícola; permitiría producir de forma sustentable una gran cantidad de compuestos que actualmente derivan de recursos naturales escasos o no renovables (Fisher, Freedman, Bevan, & Senger, 2014) La ingeniería de vías metabólicas (IVM) es una disciplina que permite optimizar y regular el metabolismo celular con el objetivo primordial de producir compuestos de interés a través de procesos biotecnológicos. La IVM combina el análisis sistemático de vías metabólicas o de mecanismos de regulación con técnicas de biología molecular para mejorar las propiedades celulares a partir de modificaciones genéticas (Koffas, Roberge, Lee, & Stephanopoulos, 1999).

En la generación de un organismo sobreproductor normalmente se requiere caracterizar el metabolismo celular de una forma integral a fin de localizar puntos de modificación, incluir componentes no nativos (que pueden ir desde una proteína hasta vías metabólicas completas) y optimizar el sistema para aumentar su capacidad de síntesis. La posibilidad de diversificar el espectro de compuestos que se pueden sintetizar más allá del repertorio natural, así como obtener catalizadores mejorados enriquecería las estrategias y alcances de la IVM. En este sentido la ingeniería de proteínas podría ser una alternativa complementaria a las herramientas tradicionales de IVM para la producción de compuestos de alto interés industrial. (Abatemarco, Hill, & Alper, 2013).

A continuación, se revisa la metodología general utilizada para el diseño, construcción y optimización de cepas por IVM haciendo mención de las diferentes herramientas computacionales que auxilian dichas etapas. Posteriormente se muestra a la ingeniería de proteínas como una estrategia adicional y en algunos casos determinante para el éxito en IVM considerando los métodos para diseñar proteínas y finalmente se describen algunos ejemplos de la importancia de la modificación de proteínas en la obtención de fábricas celulares.

INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS

Para la obtención de una cepa sobreproductora de compuestos de interés biotecnológico es necesario definir la serie de reacciones que permitan la síntesis del compuesto de interés, una vez que se ha construido la vía en el organismo se procede a caracterizar el fenotipo, determinando velocidades de producción y crecimiento, lo que en conjunto con diversos análisis como determinación del transcriptoma, proteoma, metaboloma y fluxoma permiten guiar las modificaciones genéticas a realizar en la optimización de la producción (Figura 1). Las aproximaciones generales de IVM para generar cepas sobreproductoras implican cambios encaminados a mejorar la capacidad de asimilación de sustratos, incrementar la disponibilidad de intermediarios, disminuir la pérdida de materia y energía a vías no esenciales, etc. Finalmente, el nuevo fondo genético se evalúa empleando diferentes técnicas según las propiedades fisicoquímicas del compuesto a fin de obtener un organismo adecuado para la producción.

REDES METABOLICAS

Las redes metabólicas son una representación del conjunto de reacciones

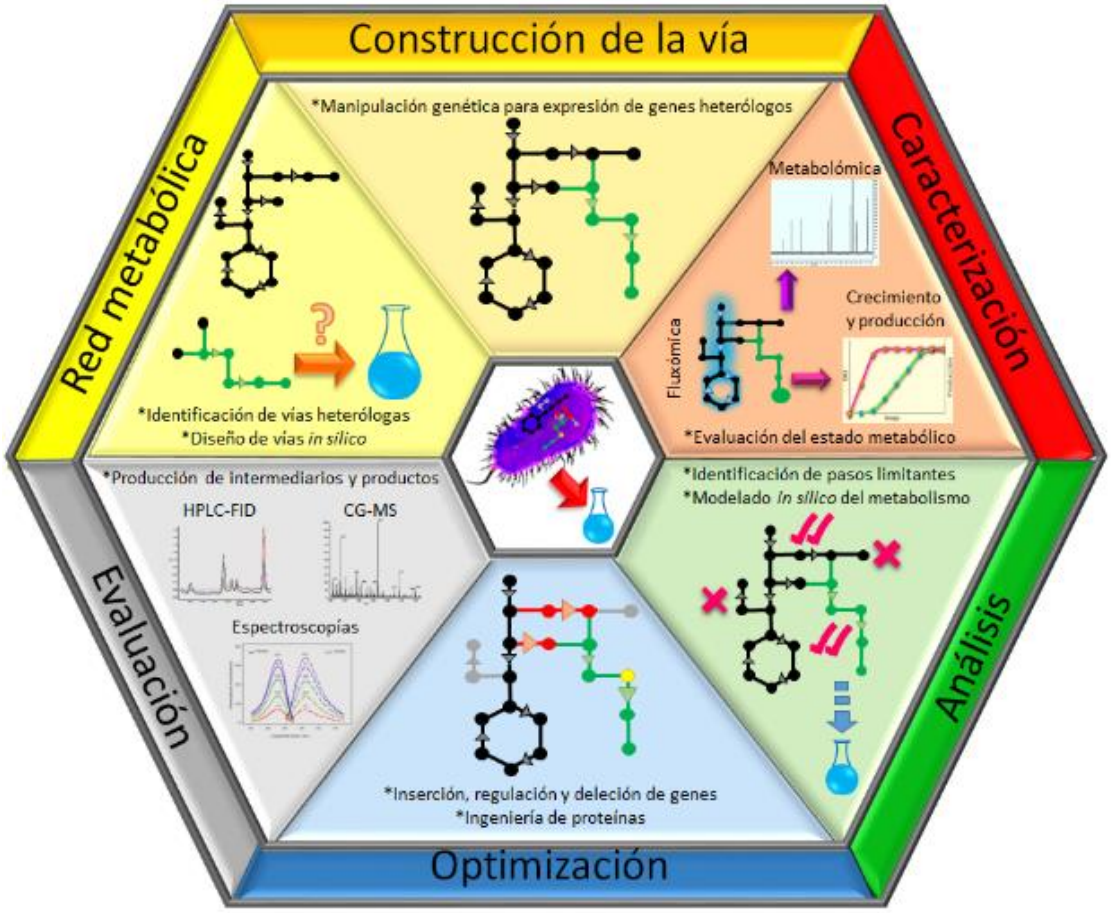


Fig. 1. Diseño, construcción y optimización de cepas en ingeniería de vías metabólicas.Basado en (Ng et al., 2015)

que integran el metabolismo de un organismo en que se describe la identidad y función de proteínas, genes y regulación involucrada, que son utilizadas en IVM a fin de elucidar asociaciones entre los componentes del sistema o puntos de modificación. Las fuentes de dicha información son generalmente bases en las que se integran datos bioquímicos, genómicos, enzimáticos y de interacción con moléculas (Zhou, 2013). Entre las bases de datos especializadas en enzimas, su nomenclatura, propiedades y reacciones se encuentran ENZYME (www.enzyme.expasy.org) y BRENDA (www.brenda-enzymes.org). UNIPROT (www.uniprot.org) contiene las secuencias, modelos estructurales y anotaciones funcionales de proteínas de diversos organismos. Algunas bases de datos comúnmente utilizadas en la búsqueda de vías metabólicas y genomas son BioCyc (http://BioCyc.org), KEGG (www.genome,jp/kegg/) y REACTOME (www.reactome.org). El análisis de las bases de datos mencionadas y otras permitieron, hasta 2013, reconstruir redes metabólicas de más de 90 organismos (http://systemsbiology.ucsd.edu/InSilicoOrganisms/OtherOrganisms).

VIAS METABÓLICAS SINTÉTICAS

Si bien el repertorio de moléculas que un organismo puede sintetizar es basto, también es limitado, por lo cual al aplicar una estrategia de IVM se pueden incluir vías metabólicas sintéticas. La construcción de vías metabólicas sintéticas parte del conocimiento sobre la actividad de enzimas probadas experimentalmente, modificadas o diseñadas *in silico* para integrarlas en un conjunto de reacciones con el objetivo de dotar a un organismo hospedero de la capacidad metabólica para producir compuestos que de forma natural no sintetiza utilizando para éste fin la expresión heteróloga de diversos genes (Na, Kim, & Lee, 2010). Los genes que comprenden las vías sintéticas pueden proceder de organismos cuyos genomas no han sido completamente secuenciados de tal manera que una vez identificadas las nuevas vías puedan ser expresadas en un organismo que sea más adecuado para la producción a nivel industrial (Bumpus, Evans, Thomas, Ntai, & Kelleher, 2009). Herramientas computacionales como OptStrain (Pharkya, Burgard, & Maranas, 2004), BNICE (Hatzimanikatis et al., 2005) y GEM-Path (Campodonico, Andrews, Asenjo, Palsson, & Feist, 2014) permiten automatizar el diseño de vías metabólicas sintéticas *in silico*. Dado un compuesto de interés, se realiza la búsqueda de posibles reacciones que deriven en dicho compuesto, tomando en cuenta la máxima producción a partir del mínimo de pasos no-nativos a introducir en un organismo y las implicaciones termodinámicas del sistema. Utilizando vías metabólicas sintéticas se ha logrado la producción de biocombustibles como propano (Menon et al., 2015), precursores de plásticos (Borodina et al., 2015), terapéuticos como artemisinina y resveratrol (Krivoruchko & Nielsen, 2014) e incluso el diseño de vías optimizadas para la

fijación de CO^2 en plantas (Bar-Even, Noor, Lewis, & Milo, 2010).

FLUXOMICA Y METABOLÓMICA

Considerando que el objetivo principal de la ingeniería de vías metabólicas es alcanzar la máxima producción celular de un compuesto de interés, se debe seguir una estrategia lógica de manipulaciones genéticas para obtener el fenotipo deseado, sin embargo, la complejidad celular hace que la elección sistemática de las modificaciones a realizar resulte difícil, por ejemplo, la caracterización del estado metabólico de la célula. El estado metabólico de una célula refleja la actividad celular asociada a la regulación de genes, transcritos, proteínas y metabolitos, y puede evaluarse con estudios de metabolómica o fluxómica (Toya & Shimizu,2013).

La fluxómica integra el análisis de flujos metabólicos en que se estiman las velocidades de reacción (flujos) de una red de reacciones y mapas estequiométricos de dicha red para determinar el flujo de carbono en las vías metabólicas, obteniéndose una representación cuantitativa del estado metabólico de la célula (Winter & Krömer, 2013). El análisis de flujos metabólicos de ^{13}C se realiza comúnmente en estado estacionario (la concentración de componentes intracelulares no varía con el tiempo) las células se cultivan en presencia de sustratos marcados como azúcares o ácidos orgánicos, que al ser metabolizados se distribuyen en la célula hasta formar parte de los esqueletos de carbono de biomoléculas y metabolitos (Antoniewicz, 2015). La distribución del flujo se refleja en el enriquecimiento isotópico de aminoácidos proteinogénicos que pueden ser medidos empleando resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia de masas (EM). Los flujos se estiman del patrón generado por los metabolitos marcados, construyendo un modelo matemático (mapa de flujo) que simule el enriquecimiento de ^{13}C en los metabolitos y se ajuste a los resultados experimentales. La obtención de mapas de flujo permite identificar blancos de modificación en las vías, evaluar el impacto de manipulaciones genéticas previamente realizadas en el organismo o analizar el metabolismo energético de la célula (Wiechert, 2001).

A la determinación y análisis global de los metabolitos que componen un sistema vivo se le denomina metabolómica (Dromms & Styczynski, 2012). Los metabolitos celulares incluyen azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, alcoholes, coenzimas y lípidos. Tan sólo en la base de datos del metaboloma de Escherichia coli hay registradas 2708 moléculas (Guo et al., 2013). La medición del metaboloma implica extraer los metabolitos una vez interrumpida la actividad celular, separarlos utilizando técnicas cromatográficas o electroforesis y caracterizar los compuestos por RMN, EM u otro tipo de espectroscopia (Alonso, Marsal, & Julià, 2015). Los datos metabolómicos permiten identificar la acumulación de intermediarios que estarían asociados a cuellos de botella en las vías metabólicas, aunque existen reportes en que

la concentración de metabolitos no se perturba al manipular genéticamente a la célula debido a la utilización de vías alternas o regulación enzimática (Ishii et al., 2007).

OPTIMIZACION Y CONSTRUCCIÓN DE CEPAS EN INGENIERIA DE VÍAS METABOLICAS

1.- IDENTIFICACIÓN DE BLANCOS DE MODIFICACIÓN

Una vez definida la red metabólica (que integre o no vías sintéticas) para generar un compuesto, se debe optimizar la producción a partir de redirigir los recursos celulares desde el metabolismo primario o secundario hacia la conversión de un producto deseado, suprimiendo además el flujo de carbono y energía hacia vías no esenciales. Se han desarrollado diversos métodos computacionales para predecir el comportamiento metabólico de un sistema utilizando modelos estequiométricos, cinéticos o híbridos (Tomar & De, 2013). Una aproximación que emplea modelos estequiométricos es el análisis de balance de flujos (ABF) en que se predice un fenotipo metabólico simulando distribuciones de flujo basadas en restricciones. En ABF las reacciones metabólicas y sus coeficientes estequiométricos se representan matemáticamente en forma de una matriz, estequiometrica que delimita el balance de flujo en el sistema, posteriormente se define una función objetivo que sea relevante al problema en estudio, por ejemplo si la variable en estudio es maximizar el crecimiento la función objetivo es la producción de biomasa, para el caso en que además se quiera sobreproducir un compuesto es posible acoplar la producción de biomasa a la generación de dicha molécula en forma de subproducto, finalmente la serie de ecuaciones generadas se resuelven con algoritmos de programación lineal para traducirlas en flujos (Orth, Thiele, & Palsson, 2010). La optimización de una cepa partiendo del modelamiento *in silico* utilizando ABF se auxilia de programas como OptKnock (Burgard, Pharkya, & Maranas, 2003), OptGene (Patil, Rocha, Förster, & Nielsen, 2005) y COBRA (Becker et al., 2007) que permiten identificar genes candidatos a inactivar para lograr la producción de un compuesto asociado a la maximización del crecimiento. OptReg (Pharkya & Maranas, 2006) y EMILiO (Yang, Cluett, & Mahadevan, 2011) permiten la búsqueda de genes no sólo a deletar sino a regular de forma positiva o negativa. En la literatura se encuentran revisiones exhaustivas de métodos computacionales empleados para la optimización de cepas en ingeniería de vías metabólicas y ejemplos exitosos de su utilización (Bordbar, Monk, King, & Palsson, 2014; Ng, Khodayari, Chowdhury, & Maranas, 2015; Zomorrodi, Suthers, Ranganathan, & Maranas, 2012).

2.- RECONFIGURACION DEL METABOLISMO

Tomando en cuenta las modificaciones sugeridas por el modelamiento *in silico* y los resultados de fluxómica o metabolómica, se procede a la manipulación directa de los

constituyentes celulares que incluye sintetizar ácidos nucleicos para expresar proteína(s) de interés o alterar su concentración en la célula, modificar propiedades en las proteínas mutando la secuencia de DNA, etc. (Copeland et al., 2012). Algunas estrategias para modificar la concentración de una proteína expresada heterólogamente son: 1) optimizar el uso de codones a los del organismo hospedero, la secuencia optimizada se puede obtener con Gene Designer (Villalobos, Ness, Gustafsson, Minshull, & Govindarajan, 2006), 2) introducir genes en plásmidos de expresión, los componentes del vector pueden ser elegidos o diseñados con GenoCAD (Czar, Cai, & Peccoud, 2009), 3) modificar la estabilidad de transcritos, NuPack (Zadeh et al., 2010) y Vienna RNA Websuite (Gruber, Lorenz, Bernhart, Neuböck, & Hofacker, 2008) auxilian en el diseño y predicción de la estructura del RNA y 4) modificar el sitio de unión al ribosoma del mRNA, dada una secuencia RBS Calculator (Salis, 2011), puede predecir la velocidad del inicio de la transcripción y proponer secuencias modelo que se ajusten a una velocidad requerida.

Las herramientas clásicas de ingeniería genética que permiten modificar la expresión de un gen y la concentración de una proteína no son eficientes para resolver pasos limitantes originados por propiedades inherentes a las proteínas como retroinhibición y promiscuidad enzimática (Chen & Zeng, 2013). Además, en la integración de vías metabólicas sintéticas comúnmente no se obtiene la eficiencia esperada debido a la incompatibilidad de las proteínas heterólogas con el hospedero. Aunado a lo anterior dos problemáticas comunes en IVM son el flujo ineficiente hacia la vía deseada debido a cuellos de botella asociados a la regulación enzimática, baja actividad catalítica o a la expresión inadecuada de proteínas y la pérdida de intermediarios por difusión o competencia con otras vías metabólicas. En este sentido la ingeniería de proteínas se ha utilizado para la obtención de enzimas con propiedades mejoradas (mayor eficiencia catalítica, menor inhibición, mayor estabilidad, etc.) así como el desarrollo de andamios sintéticos o “scaffolds” sobre los cuales se reclutan proteínas con diferentes actividades enzimáticas que al estar espacialmente cercanas generan la canalización de sustratos e intermediarios disminuyendo o previniendo la pérdida de los metabolitos y optimizando el flujo hacia la vía de interés (Dueber et al., 2009).

INGENIERÍA DE PROTEÍNAS

La ingeniería de proteínas se refiere al diseño y modificación de diversas propiedades estructurales y/o funcionales en dichas biomoléculas (Lutz, 2010). Obtener enzimas que han sido sometidas a ingeniería, es una forma de sobrepasar los obstáculos naturales de enzimas nativas para generar un catalizador optimizado con propiedades deseadas que se ajusten a los requerimientos del sistema (Otte & Hauer, 2015). Las modificaciones a una proteína se realizan a partir del diseño racional, aleatorio o computacional; aunque estudios en que se combinan estas aproximaciones subrayan el

potencial aditivo de dicha estrategia por sobre el uso de los diseños individuales (Currin, Swainston, Day, & Kell, 2014).

DISEÑO RACIONAL

En el diseño racional se identifican regiones de interés en la proteína y se reemplazan aminoácidos de sitios específicos que han sido seleccionados a partir del conocimiento estructural y mecanístico de la enzima. Las metodologías empleadas para cambiar la secuencia de DNA en forma sitio-dirigida hacen uso de oligonucleótidos que codifican la mutación deseada y han sido revisadas en la literatura (Antikainen & Martin, 2005; Ling & Robinson, 1997). Actualmente el modelamiento por homología, acoplamiento molecular y dinámica molecular se combinan para sugerir el sitio y naturaleza de posibles mutaciones (Ferrari, Lee, & Fraaije, 2015). La información requerida para implementar una aproximación de diseño racional restringe el número de proteínas que pueden ser estudiadas pero al delimitar los aminoácidos mutados se reduce significativamente el número de variantes a ser analizadas. Haciendo uso de mutaciones sitio-dirigidas es posible modificar la especificidad de enzimas (Petschacher et al., 2014), aumentar la actividad enzimática (Dutta, Dattagupta, & Biswas, 2013), modificar la termoestabilidad (Farrokh, Yakhchali, & Karkhane, 2014) o invertir la enantioselectividad (F. Guo, Franzen, Ye, Gu, & Yu, 2014), entre otros.

MUTAGENESIS AL AZAR

Los cambios lejanos al sitio catalítico que no pueden ser racionalizados pueden tener una influencia sobre la catálisis enzimática (Morley & Kazlauskas, 2005). La mutagénesis al azar es una aproximación que permite generar proteínas, enzimas, vías metabólicas o incluso genomas enteros con propiedades mejoradas sin requerir información estructural previa (Labrou, 2010). Modificar aleatoriamente la identidad de uno o pocos aminoácidos en sitios específicos se realiza con mutagénesis a saturación (Siloto & Weselake, 2012), mientras que cambios múltiples de secuencia se logran empleando PCR propensa al error (epPCR), recombinación homóloga, DNA shuffling, cepas mutagénicas, nucleótidos con bases degeneradas, agentes físicos y químicos (Neylon, 2004; Nordwald, Garst, Gill, & Kaar, 2013). Introduciendo mutaciones al azar es posible obtener enzimas con la capacidad de catalizar reacciones en ambientes no naturales como solventes orgánicos (Dror, Shemesh, Dayan, & Fishman, 2014), modificar el estado oligomérico de proteínas (Gurskaya et al., 2001), eliminar mecanismos de regulación enzimática como la retro-inhibición (Lu & Stephanopoulos, 2005), cambiar el uso de cofactores (Pick, Ott, Howe, Schmid, & Sieber, 2014), etc.

EVOLUCIÓN DIRIGIDA

La evolución dirigida es un tipo de diseño aleatorio en que se realizan rondas de mutagénesis y selección de variantes con la acumulación concomitante de modificaciones benéficas simulando un proceso de evolución darwiniana (Abatemarco et al., 2013). La evolución dirigida es una herramienta poderosa para evaluar combinaciones de cambios en secuencia que puedan tener impacto en el plegamiento y función de una proteína. El primer paso es diversificar la secuencia construyendo bibliotecas de mutantes generadas por técnicas como epPCR (Figura 2). En la técnica de epPCR se amplifica un gen en presencia de DNA polimerasas de baja fidelidad y/o condiciones que disminuyan la fidelidad de la enzima (variando las concentraciones de Mn^{2+}, Mg^{2+} y nucleótidos) a fin de promover la incorporación errónea de nucleótidos en la reacción, pudiendo variar además la frecuencia de mutación en el gen (Leemhuis, Kelly, & Dijkhuizen, 2009). Un segundo paso implica diferenciar las proteínas con propiedades deseadas desde una población en que dichas características no han cambiado. En la selección se aplican condiciones para analizar todos los miembros de la biblioteca de manera simultánea en que sólo las clonas con la característica deseada puedan prevalecer (por ejemplo ensayos de complementación o de resistencia a un antibiótico). En la selección de mutantes se evalúan y analizan las variantes

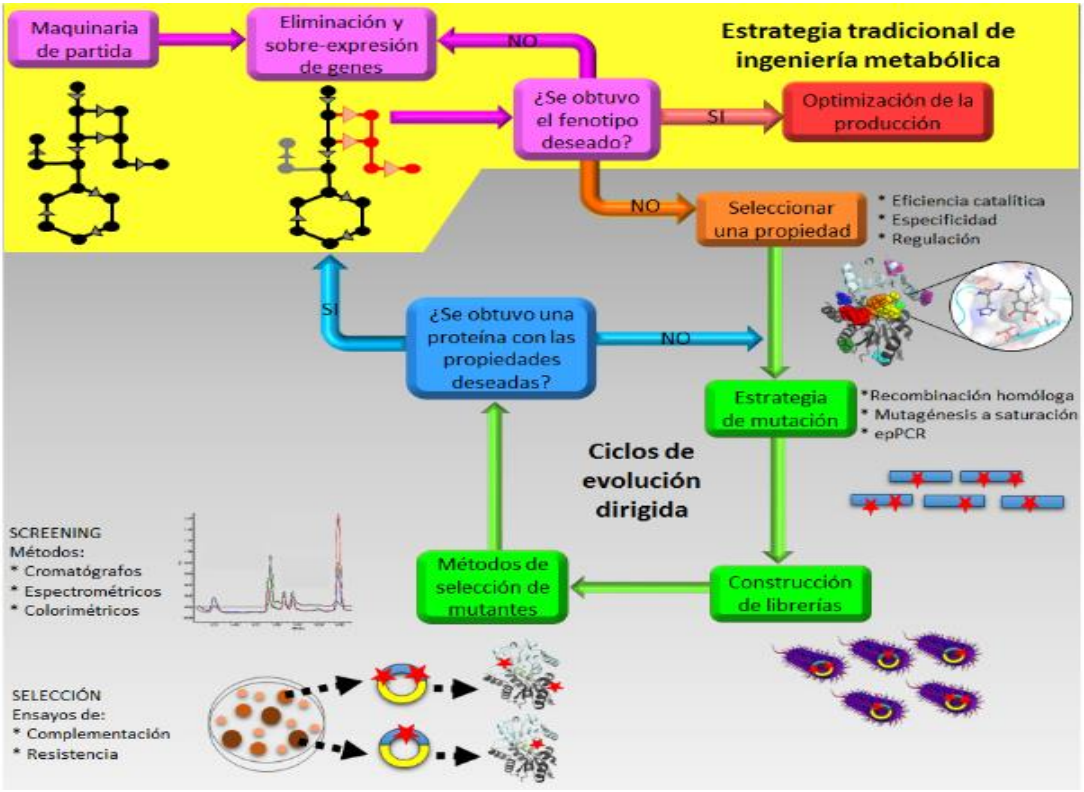


Fig. 2. Estrategia general para implementar evolución dirigida como una herramienta de ingeniería de vías metabólicas. Basado en (Abatemarco et al., 2013).

individualmente desde librerías de 10^2-10^4 miembros, aunque el uso de tecnologías como FACS (fluorescence activated cell sorter) permite el análisis de 10^7 eventos/h (Aharoni, Griffiths, & Tawfik, 2005). FACS es un tipo de citometría de flujo en que se separan uno a uno los miembros de una biblioteca, seleccionándolos según la fluorescencia emitida por partículas que interaccionan con componentes de la superficie celular, ésta técnica es muy útil cuando se mutan proteínas de membrana celular. Una vez seleccionadas mutantes individuales, el tercer paso en una estrategia de evolución dirigida es identificar las variantes que exhiban mayor impacto en la obtención de las propiedades deseadas, la secuencia nucleotídica de dicha mutante puede someterse a posteriores rondas de mutagénesis-selección- evaluación y con esto acumular cambios en secuencia que se reflejen en mejores propiedades enzimáticas.

DISEÑO COMPUTACIONAL

Dada una proteína de 100 aminoácidos existirían 20^{100} mutantes, aún empleando métodos actuales para la construcción de librerías que almacenan 10^{15} variantes, todas las diferentes secuencias realmente analizadas están subrepresentadas en el diseño aleatorio (Jäckel, Kast, & Hilvert, 2008). De las tres estrategias utilizadas en ingeniería de proteínas, el diseño computacional es la aproximación con el mayor potencial de análisis combinatorio, pudiendo evaluar *in silico* 10^{80} secuencias en algunas horas (Hayes et al., 2002). El diseño computacional de proteínas se basa en la combinación de campos de fuerza y algoritmos de búsqueda para identificar soluciones termodinámicamente óptimas (secuencias individuales o combinaciones de secuencias) compatibles con la estructura tridimensional de una proteína y/o sus posibles propiedades funcionales (Van der Sloot, Kiel, Serrano, & Stricher, 2009). La aproximación computacional ha encontrado aplicación en muchos campos de ingeniería de proteínas dirigidos al estudio de plegamientos, re-diseño y optimización de propiedades enzimáticas así como diversificación y generación de nuevas funciones catalíticas (Mak & Siegel, 2014; Saven, 2011).

INGENIERIA DE PROTEÍNAS COMO HERRAMIENTA EN INGENIERIA DE VÍAS METABÓLICAS

La ingeniería de proteínas se puede utilizar como herramienta en IVM para construir vías sintéticas novedosas al generar enzimas con funciones que no se encuentran en la naturaleza o con diferente especificidad de sustrato, optimizar la vía al mejorar las propiedades enzimáticas, alterar la regulación modificando la función de factores transcripcionales o proteínas alostéricas, aumentar la eficiencia de producción con andamios proteicos y modificar vías de señalización (Chen, Wilmanns, & Zeng, 2010; Lee et al., 2012). Diversas aplicaciones de ingeniería de proteínas en IVM y las aproximaciones metodológicas utilizadas se muestran en la Tabla 1.

Un ejemplo en que se integran estrategias de IVM e ingeniería de proteínas es el trabajo de Wittmann y colaboradores para la generación de una cepa de *Corynebacterium glutamicum* sobreproductora de lisina (J. Becker, Zelder, Häfner, Schröder, & Wittmann, 2011). El diseño racional de dicha cepa se basó en análisis de flujo de ^{13}C a fin de identificar blancos de modificación en el metabolismo caracterizando su impacto en la producción de lisina, una vez realizada la modificación (sobreexpresión, inactivación o mutación de genes) se obtuvo el mapa de flujo de la nueva cepa que permitía caracterizar su estado metabólico y con esto se seleccionó la siguiente modificación. Los cambios realizados al metabolismo de *C. glutamicum* se muestran en la Figura 3. Considerando que la vía de síntesis de lisina está inhibida por lisina y treonina se introdujo una mutante de la enzima aspartoquinasa resistente a retro-inhibición y se aumentó el flujo a través de la vía sobre-expresando a la enzima diaminopimelato deshidrogenasa. Con el fin de aumentar la disponibilidad del sustrato oxalacetato se inactivó el gen *pck*. El flujo de carbono en la vía de síntesis de lisina se incrementó al sobre-expresar proteínas que se encuentran en reacciones iniciales, intermedias o finales de la vía y se disminuyó la pérdida de carbono hacia la vía de síntesis de treonina expresando una mutante de la enzima homoserina deshidrogenasa con menor actividad. La principal enzima anaplerótica en la producción de lisina es la enzima piruvato carboxilasa, que sintetiza oxalacetato desde piruvato y CO^2, para aumentar el flujo a través de ésta proteína se realizaron modificaciones en el gen ^{pyc} que dan lugar a una enzima con mejores propiedades cinéticas y posteriormente se substituyó su promotor natural por uno fuerte. Estás últimas modificaciones no incrementaron la producción de lisina a pesar de que los mapas indicaban mayor flujo a través de la enzima piruvato carboxilasa, pudiéndose explicar con la observación de que el oxalacetato estaba siendo re-dirigido a la glucólisis, por lo cual se decidió disminuir la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos cambiando el codón de inicio ATG por el codón raro GTG en el gen *icd* que codifica para la enzima isocitrato deshidrogenasa. Los flujos en esta nueva cepa mostraban una respuesta celular que reflejaba la demanda de NADPH impuesta por la producción de lisina, para incrementar el poder reductor en la célula se sobre-expresaron genes de la vía de las pentosas fosfato consiguiendo así una cepa capaz de producir hasta 120 g/L de lisina en cultivos por lote alimentado.

CONCLUSIONES

La construcción de fábricas celulares competentes para la producción industrial de compuestos normalmente requiere implementar diversas estrategias de IVM como sobre expresar e inactivar genes para re-dirigir el flujo de carbono y energía a las vías de interés. En conjunto con dichas aproximaciones tradicionales la ingeniería de proteínas es una herramienta promisoria que permitiría diversificar el tipo de compuestos sintetizados y optimizar los sistemas de

Tabla 1. Aplicaciones de la ingeniería de proteínas en ingeniería de vías metabólicas

ZZZ	Aproximación	Ejemplo	Metodología	Referencia
Construcción de vías novedosas	Modificación de residuos o motivos determinantes de la especificidad para emplear diferentes sustratos	Construcción de una vía *de novo* para la síntesis de 1,3-propanediol a partir de homoserina	La mutación *in silico* de los residuos importantes para la especificidad en la enzima glutamato deshidrogenasa sugirió combinaciones de secuencia para obtener una desaminasa de homoserina sin equivalente en la naturaleza.	(Chen, Geng, & Zeng, 2015)
	Utilización de enzimas promiscuas para obtener enzimas en que se diversifique el uso de sustratos, catálisis o síntesis de compuestos	Obtención de enzimas que sintetizan sesquiterpenos particulares desde un parental que produce hasta 52 compuestos diferentes	Se utilizó un algoritmo para recombinar mutaciones de sitios específicos en la enzima γ-humuleno sintasa, asociando el análisis a la síntesis de terpenos. Las combinaciones sugeridas se construyeron por mutagénesis a saturación permitiendo obtener nuevas sintasas de terpenos	(Yoshikuni, Ferrin, & Keasling, 2006)
	Obtención de nuevas actividades catalíticas con el diseño *de novo* de proteínas	Generación de una nueva vía para la fijación de carbono que puede ser ligada al metabolismo central	Empleando un diseño computacional, se rediseño el sitio de unión de la enzima benzaldehído liasa para aumentar su especificidad por formaldehído. La formolasa cataliza la carboligación de tres moléculas de formaldehído para sintetizar dihidroxiacetona	(Siegel et al., 2015)
Optimización de vías metabólicas	Modificación de la regulación enzimática	Eliminación de la retro-inhibición de un paso limitante en la síntesis de L-lisina	Comparado la estructura y secuencia de dihidrodipicolinato sintasas resistentes o no a la inhibición por L-lisina, se identificaron aminoácidos a mutar puntualmente, eliminando la regulación alostérica.	(Geng, Chen, Zheng, Sun, & Zeng, 2013)
	Cambio en la especificidad de cofactores o isómeros	Optimización de cepas productoras de etanol	Considerando la estructura de una xilosa reductasa que utiliza NADH, se modificó racionalmente a una xilosa reductasa dependiente de NADPH obteniendo mutantes que emplean NADH	(Bengtsson, Hahn-Hägerdal, & Gorwa-Grauslund, 2009)

	Aumento en la eficiencia catalítica de enzimas	Aumento en la actividad de enzimas heterólogas que son cuello de botella en la producción de compuestos de interés farmacéutico	Empleando mutagénesis a saturación en el sitio de unión de la enzima levopimaradieno sintasa y evolución dirigida de la enzima geranilgeranil difosfato sintasa se aumentó la eficiencia catalítica de las enzimas que al expresarse con otros genes incrementan 2600 veces la producción de levopimaradieno	(Leonard et al., 2010)
Construcción de sistemas dinámicos para regular el metabolismo	Ingeniería de factores transcripcionales o enzimas alostéricas para regular la actividad de vías metabólicas	Desarrollo de un sistema sensor-regulador para la producción de biodiesel	Se realizó la ingeniería del factor transcripcional FadR, modificándolo para sensar la concentración de acil-CoA y posteriormente activar la transcripción de enzimas de la vía de síntesis de etilester ácidos grasos	(Zhang, Carothers, & Keasling, 2012)
Modificación de vías de señalización y canalización de metabolitos	Utilización de andamios proteicos	Aumento en la producción de compuestos de interés para la industria química	Enzimas heterólogas implicadas en la vía sintética de producción de ácido D-glutárico en *E. coli* se conjugaron en un andamio proteico. La cepa que expresa el andamio produjo 5 veces más ácido glutárico que la contraparte con enzimas libres.	(Moon, Dueber, Shiue, & Prather, 2010)

producción.

Si bien la ingeniería de proteínas como una ciencia individual ha reportado numerosos casos de éxito en el desarrollo de procesos biocatalíticos aplicados en industrias farmacéuticas como Pfizer, Novartis y Sanofi-Aventis (Bornscheuer et al., 2012) su utilización en IVM ha sido limitada a pesar de los diferentes puntos de aplicación que se han expuesto en esta revisión.

Si bien la ingeniería de proteínas como una ciencia individual ha reportado numerosos casos de éxito en el desarrollo de procesos biocatalíticos para la obtención de fármacos e intermediarios de atorvastatina, pregabalina, atazanavir y otros aplicados en industrias farmacéuticas como Pfizer, Novartis y Sanofi-Aventis (Bornscheuer et al., 2012) su utilización en IVM ha sido limitada a pesar de los diferentes puntos de aplicación que se han expuesto en esta revisión.

Con el avance de las ciencias “omicas”, la biología sintética, el diseño de herramientas computacionales potentes y el desarrollo de tecnologías empleadas en ingeniería de proteínas; la IVM se ha posicionado como una alternativa real para la generación de compuestos desde un enfoque biotecnológico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con el apoyo del Proyecto CONACYT-Ciencia Básica 240519

REFERENCIAS

Abatemarco, J., Hill, A., & Alper, H. S. (2013). Expanding the metabolic engineering toolbox with directed evolution. Biotech J., 8, 1397–410.

Aharoni, A., Griffiths, A. D., & Tawfik, D. S. (2005). High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes. Curr. Opin. Chem. Biol., 9, 210–6.

Alonso, A., Marsal, S., & Julià, A. (2015). Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. Front. Bioeng. Biotechnol., 3, 23.

Antikainen, N. M., & Martin, S. F. (2005). Altering protein specificity: techniques and applications. Bioorg. Med. Chem., 13(8), 2701–16.

Antoniewicz, M. R. (2015). Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 42, 317–25.

Bar-Even, A., Noor, E., Lewis, N. E., & Milo, R. (2010). Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 107, 8889–8894.

Becker, J., Zelder, O., Häfner, S., Schröder, H., & Wittmann, C. (2011). From zero to hero--design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. Met.Eng., 13, 159–68.

Becker, S. A., Feist, A. M., Mo, M. L., Hannum, G., Palsson, B. Ø., & Herrgard, M. J. (2007). Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox. Nat. Protoc., 2, 727–38.

Bengtsson, O., Hahn-Hägerdal, B., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2009). Xylose reductase from Pichia stipitis with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Biofuels, 2, 9.

Bordbar, A., Monk, J. M., King, Z. a, & Palsson, B. O. (2014). Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. Nat. Rev. Genet., 15, 107–20.

Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., & Robins, K. (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. Nature, 485, 185–194.

Borodina, I., Kildegaard, K. R., Jensen, N. B., Blicher, T. H., Maury, J., Sherstyk, S., … Nielsen, J. (2015). Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in Saccharomyces cerevisiae via β-alanine. Metab. Eng., 27, 57–64.

Bumpus, S. B., Evans, B. S., Thomas, P. M., Ntai, I., & Kelleher, N. L. (2009). A proteomics approach to discovering natural products and their biosynthetic pathways. Nat. Biotechnol., 27, 951–956.

Burgard, A. P., Pharkya, P., & Maranas, C. D. (2003). OptKnock: A bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. Biotechnol. Bioeng., 84, 647–657.

Campodonico, M. A., Andrews, B. A., Asenjo, J. A., Palsson, B. Ø., & Feist, A. M. (2014). Generation of an atlas for commodity chemical production in *Escherichia coli* and a novel pathway prediction algorithm, GEM-Path. Metab. Eng., 25, 140–158.

Chen, Z., Geng, F., & Zeng, A.-P. (2015). Protein design and engineering of a *de novo* pathway for microbial production of 1,3-propanediol from glucose. Biotechnol. J., 10, 284–9.

Chen, Z., Wilmanns, M., & Zeng, A. P. (2010). Structural synthetic biotechnology: From molecular structure to predictable design for industrial strain development. Trends Biotechnol., 28, 534–542.

Chen, Z., & Zeng, A.-P. (2013). Protein design in systems metabolic engineering for industrial strain development. Biotechnol. J., 8, 523–33.

Copeland, W. B., Bartley, B. A., Chandran, D., Galdzicki, M., Kim, K. H., Sleight, S. C.,Sauro, H. M. (2012). Computational tools for metabolic engineering. Metab. Eng., 14, 270–280.

Currin, A., Swainston, N., Day, P. J., & Kell, D. B. (2014). Synthetic biology for the directed evolution of protein biocatalysts: navigating sequence space intelligently. Chem. Soc. Rev., 44, 1172–1239.

Czar, M. J., Cai, Y., & Peccoud, J. (2009). Writing DNA with GenoCAD. Nucl. Acid. Res., 37, 1–8.

Dromms, R. a, & Styczynski, M. P. (2012). Systematic applications of metabolomics in metabolic engineering. Metabolites, 2, 1090–122.

Dror, A., Shemesh, E., Dayan, N., & Fishman, A. (2014). Protein engineering by random

mutagenesis and structure-guided consensus of *Geobacillus stearothermophilus* Lipase T6 for enhanced stability in methanol. Appl. Environ. Microbiol., 80, 1515–27.

Dueber, J. E., Wu, G. C., Malmirchegini, G. R., Moon, T. S., Petzold, C. J., Ullal, A. V, … Keasling, J. D. (2009). Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. Nat. Biotechnol., 27, 753–759.

Dutta, S., Dattagupta, J. K., & Biswas, S. (2013). Enhancement of proteolytic activity of a thermostable papain-like protease by structure-based rational design. PloS One, 8, e62619.

Farrokh, P., Yakhchali, B., & Karkhane, A. A. (2014). Rational design of K173A substitution enhances thermostability coupled with catalytic activity of *Enterobacter sp.* Bn12 lipase. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 24, 262–9.

Ferrari, A. R., Lee, M., & Fraaije, M. W. (2015). Expanding the substrate scope of chitooligosaccharide oxidase from *Fusarium graminearum* by structure-inspired mutagenesis. Biotechnol Bioeng., 112, 1074-80.

Fisher, A. K., Freedman, B. G., Bevan, D. R., & Senger, R. S. (2014). A review of metabolic and enzymatic engineering strategies for designing and optimizing performance of microbial cell factories. Comput. Struct. Biotechnol. J., 11, 91–99.

Geng, F., Chen, Z., Zheng, P., Sun, J., & Zeng, A. P. (2013). Exploring the allosteric mechanism of dihydrodipicolinate synthase by reverse engineering of the allosteric inhibitor binding sites and its application for lysine production. Appl. Microbiol. Biotechnol., 97, 1963–1971.

Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. Nucl. Acid. Res., 36, 70–74.

Guo, A., Jewison, T., Wilson, M., Liu, Y., Knox, C., Djoumbou, Y Wishart, D. (2013). ECMDB: The *E. coli* Metabolome Database. Nucl. Acid. Res., 41, 625–630.

Guo, F., Franzen, S., Ye, L., Gu, J., & Yu, H. (2014). Controlling enantioselectivity of esterase in asymmetric hydrolysis of aryl prochiral diesters by introducing aromatic interactions. Biotechnol. Bioeng., 111, 1729–39.

Gurskaya, N. G., Fradkov, A. F., Terskikh, A., Matz, M. V., Labas, Y. a., Martynov, V. I., … Lukyanov, S. a. (2001). GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. FEBS Lett., 507, 16–20.

Hatzimanikatis, V., Li, C., Ionita, J. A., Henry, C. S., Jankowski, M. D., & Broadbelt, L. J. (2005). Exploring the diversity of complex metabolic networks. Bioinformatics, 21, 1603–1609.

Hayes, R. J., Bentzien, J., Ary, M. L., Hwang, M. Y., Jacinto, J. M., Vielmetter, J., … Dahiyat, B. I. (2002). Combining computational and experimental screening for rapid optimization of protein properties. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 99, 15926–31.

Ishii, N., Nakahigashi, K., Baba, T., Robert, M., Soga, T., Kanai, A., … Tomita, M. (2007). Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. Science, 316, 593–7.

Jäckel, C., Kast, P., & Hilvert, D. (2008). Protein design by directed evolution. Annu. Rev. Biophys., 37, 153–73.

Koffas, M., Roberge, C., Lee, K., & Stephanopoulos, G. (1999). Metabolic engineering. Annu. Rev. Biomed. Eng., 1, 535–557.

Krivoruchko, A., & Nielsen, J. (2014). Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Opin. Biotechnol., 35C, 7–15.

Labrou, N. E. (2010). Random mutagenesis methods for *in vitro* directed enzyme evolution. Curr. Protein Pept. Sci., 11, 91–100.

Lee, J. W., Na, D., Park, J. M., Lee, J., Choi, S., & Lee, S. Y. (2012). Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. Nat. Chem. Biol., 8, 536–546.

Leemhuis, H., Kelly, R. M., & Dijkhuizen, L. (2009). Directed evolution of enzymes: Library screening strategies. IUBMB Life, 61, 222–8.

Leonard, E., Ajikumar, P. K., Thayer, K., Xiao, W.-H., Mo, J. D., Tidor, B., … Prather, K. L. J. (2010). Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 107, 13654–13659.

Ling, M. M., & Robinson, B. H. (1997). Approaches to DNA mutagenesis: an overview. Anal. Biochem., 254, 157–178.

Lu, T., & Stephanopoulos, G. (2005). Feedback inhibition of chorismate mutase / prephenate dehydrogenase (TyrA) of escherichia coli : generation and characterization of tyrosine-insensitive mutants. Appl Environ Microbiol, 71, 7224–7228.

Lutz, S. (2010). Beyond directed evolution--semi-rational protein engineering and design. Curr. Opin. Biotechnol., 21, 734–43.

Mak, W. S., & Siegel, J. B. (2014). Computational enzyme design: Transitioning from catalytic proteins to enzymes. Curr. Opin. Struct. Biol., 27, 87–94.

Menon, N., Pásztor, A., Menon, B. R., Kallio, P., Fisher, K., Akhtar, M. K., … Scrutton, N. S. (2015). A microbial platform for renewable propane synthesis based on a fermentative butanol pathway. Biotechnol. Biofuels, 8, 61.

Moon, T. S., Dueber, J. E., Shiue, E., & Prather, K. L. J. (2010). Use of modular, synthetic scaffolds for improved production of glucaric acid in engineered *E. coli*. Metab. Eng., 12, 298–305.

Morley, K. L., & Kazlauskas, R. J. (2005). Improving enzyme properties: when are closer mutations better? Trends Biotechnol., 23, 231–7.

Na, D., Kim, T. Y., & Lee, S. Y. (2010). Construction and optimization of synthetic

pathways in metabolic engineering. Curr. Opin. Microbiol., 13, 363–370.

Neylon, C. (2004). Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. Nucl. Acid. Res., 32, 1448–59.

Ng, C. Y., Khodayari, A., Chowdhury, A., & Maranas, C. D. (2015). Advances in *de novo* strain design using integrated systems and synthetic biology tools. Curr. Opin. Chem. Biol., 28, 105–114.

Nordwald, E. M., Garst, A., Gill, R. T., & Kaar, J. L. (2013). Accelerated protein engineering for chemical biotechnology via homologous recombination. Curr. Opin. Biotechnol., 24, 1017–1022.

Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). What is flux balance analysis? Nat. Biotechnol., 28, 245–248.

Otte, K. B., & Hauer, B. (2015). Enzyme engineering in the context of novel pathways and products. Curr. Opin. Biotechnol., 35, 16–22.

Patil, K. R., Rocha, I., Förster, J., & Nielsen, J. (2005). Evolutionary programming as a platform for *in silico* metabolic engineering. BMC Bioinf., 6, 308.

Petschacher, B., Staunig, N., Müller, M., Schürmann, M., Mink, D., De Wildeman, S., … Glieder, A. (2014). Cofactor specificity engineering of *Streptococcus mutans* NADH oxidase 2 for NAD(P)(+) Regeneration in Biocatalytic Oxidations. Comput. Struct. Biotechnol. J., 9, e201402005.

Pharkya, P., Burgard, A. P., & Maranas, C. D. (2004). OptStrain: A computational framework for redesign of microbial production systems. Genome Res., 14, 2367–2376.

Pharkya, P., & Maranas, C. D. (2006). An optimization framework for identifying reaction activation/inhibition or elimination candidates for overproduction in microbial systems. Metab. Eng., 8, 1–13.

Pick, A., Ott, W., Howe, T., Schmid, J., & Sieber, V. (2014). Improving the NADH-cofactor specificity of the highly active AdhZ3 and AdhZ2 from *Escherichia col*i K-12. J. Biotechnol., 189, 157–65.

Salis, H. M. (2011). The ribosome binding site calculator. In Methods Enzymol. (Vol. 498, pp. 19–42).

Saven, J. G. (2011). Computational protein design: Engineering molecular diversity, nonnatural enzymes, nonbiological cofactor complexes, and membrane proteins. Curr. Opin. Chem. Biol., 15, 452–457.

Siegel, J. B., Smith, A. L., Poust, S., Wargacki, A. J., Bar-Even, A., Louw, C., … Baker, D. (2015). Computational protein design enables a novel one-carbon assimilation pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 112, 3704–9.

Siloto, R. M. P., & Weselake, R. J. (2012). Site saturation mutagenesis: Methods and applications in protein engineering. Biocatal. Agric. Biotechnol., 1, 181–189.

Tomar, N., & De, R. K. (2013). Comparing methods for metabolic network analysis

and an application to metabolic engineering. Gene, 521, 1–14.

Toya, Y., & Shimizu, H. (2013). Flux analysis and metabolomics for systematic metabolic engineering of microorganisms. Biotechnol. Adv., 31, 818–826.

Van der Sloot, A. M., Kiel, C., Serrano, L., & Stricher, F. (2009). Protein design in biological networks: from manipulating the input to modifying the output. Protein Eng. Des. Sel., 22, 537–42.

Villalobos, A., Ness, J. E., Gustafsson, C., Minshull, J., & Govindarajan, S. (2006). Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. BMC Bioinf.s, 7, 285.

Wiechert, W. (2001). ^{13}C metabolic flux analysis. Metab. Eng., 3, 195–206.

Winter, G., & Krömer, J. O. (2013). Fluxomics - connecting 'omics analysis and phenotypes. Environ. Microbiol., 15, 1901–1916.

Yang, L., Cluett, W. R., & Mahadevan, R. (2011). EMILiO: A fast algorithm for genome-scale strain design. Metab. Eng., 13, 272–281.

Yoshikuni, Y., Ferrin, T. E., & Keasling, J. D. (2006). Designed divergent evolution of enzyme function. Nature, 440, 1078–1082.

Zadeh, J. N., Steenberg, C. D., Bois, J. S., Wolfe, B. R., Pierce, M. B., Khan, A. R., … Pierce, N. A. (2010). NUPACK: Analysis and Design of Nucleic Acid Systems. J. Comput. Chem., 31, 170–173.

Zhang, F., Carothers, J. M., & Keasling, J. D. (2012). Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids. Nat. Biotechnol., 30, 354–359.

Zhou, T. (2013). Computational reconstruction of metabolic networks from KEGG. Methods Mol. Biol., 930, 235–49.

Zomorrodi, A. R., Suthers, P. F., Ranganathan, S., & Maranas, C. D. (2012). Mathematical optimization applications in metabolic networks. Metab. Eng., 14, 672–686.

Uso de Micropartículas de Polímeros Como Vehículo de Antígenos

Silvia Moreno-Mendieta* y Romina Rodríguez-Sanoja

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

E-mail: moreno.sa@biomedicas.unam.mx

RESUMEN

La asociación de proteínas o péptidos con micropartículas de polímeros, tanto naturales como sintéticos, es una estrategia para la administración de antígenos por vía parenteral y mucosas y su transporte hasta los sitios de procesamiento e inicio de la respuesta inmune. No sólo se puede estabilizar y retener la actividad biológica del péptido o proteína inmovilizada, sino que también se puede inducir respuesta inmune a nivel local y/o sistémico. Incluso, así como sucede con otros sistemas particulados más complejos, es posible potenciar y modular dicha respuesta por lo que también pueden utilizarse como adyuvantes. Sin embargo, los procesos de inmovilización sobre micropartículas generalmente requieren la preparación del soporte y el uso de compuestos químicos y métodos complejos para favorecer la unión covalente del antígeno. En consecuencia, se pueden presentar preocupaciones relacionadas con la inocuidad y un incremento en los costos. Por esta razón, en el campo de desarrollo de sistemas de transporte de antígenos que puedan ser utilizados en humanos, se buscan materiales con propiedades como la biocompatibilidad, biodegradabilidad e inocuidad, que en su mayoría poseen los polímeros naturales, así como métodos de preparación más simples, ambientalmente amigables y que puedan escalarse más fácilmente a nivel industrial. En este trabajo se analiza el estado actual del uso de micropartículas de polímeros como vehículos de antígenos, se abordan sus ventajas y las perspectivas de esta tecnología en el campo de la vacunación.

Palabras clave: Micropartículas, Polímeros, Vacunas

ABSTRACT

The association of proteins or peptides with microparticles of natural and synthetic polymers is a strategy for the parenteral and mucosal administration of antigens and their transport to the sites for processing and initiation of the immune response. Not only it is possible to stabilize and retain the biological activity of the immobilized protein or peptide, but it is also possible to induce immune responses at local and/or systemic levels. As with other more complex particulate systems, they can even enhance and modulate that response, making it possible to use them as adjuvants. However, the processes of immobilization on microparticles generally require the preparation of the matrix and the use of chemicals and complex methods to promote the covalent attachment of the antigen. Consequently, there may be safety concerns and increased costs. For this reason, there is a continuous search to find new materials

with properties, such as biocompatibility, biodegradability and safety, for the development of antigen carrier systems that can be used in humans. Additionally, it is important to find simpler methods of preparation that are environmentally friendly and easy to scale at industrial levels. This paper describes the current status of the use of polymer microparticles as antigen carriers and discusses their advantages and the prospects of this technology in the field of vaccination.

Key words: Microparticles, Polymers, Vaccines

INTRODUCCIÓN

Los sistemas particulados como liposomas, micro y nano partículas han tenido un enorme impacto en un amplio rango de aplicaciones biomédicas. Además de ser utilizados en biosensores, como matriz para separación por afinidad, marcaje celular y cell sorting (Suri et al., 2013), se usan especialmente para la liberación controlada y focalizada de moléculas como hormonas, agentes anti-inflamatorios, péptidos y antígenos. En este último caso, se han realizado esfuerzos significativos para el mejoramiento de los sistemas existentes y el desarrollo de nuevos sistemas que sean seguros para su incorporación en formulaciones vacunales para uso humano (Zhao et al., 2014).

Debido a sus ventajas únicas como tamaño en el rango de micrones y extensa área para su funcionalización y cargado de moléculas, las micropartículas han sido utilizadas ampliamente como sistemas de transporte y liberación de proteínas, tanto para el desarrollo de fármacos como de vacunas (Tan et al., 2010). Su tamaño, forma y material dependen del uso que tendrá la micropartícula y son parámetros cruciales que pueden modular significativamente su función, pues pueden impactar en el reconocimiento y captura por parte de las células blanco del sistema inmune (Suri et al., 2013). Se sabe que las micropartículas en el rango de 1 a 10 µm promueven la presentación de antígenos al sistema inmune, facilitando su fagocitosis y presentación por parte de células especializadas conocidas como células presentadoras de antígeno (CPAs) con la consecuente activación de la respuesta inmune (Reddy et al., 2006). Así mismo se sabe que las micropartículas fabricadas con materiales naturales y sintéticos como los poli láctido-co-glicólidos (PLGAs por sus siglas en inglés) son bien toleradas debido a que los productos de su metabolismo, el ácido láctico y el ácido glicólico, pueden ser bien tolerados y eliminados por el organismo. Gracias a sus características, estos materiales se han clasificado como biodegradables y biocompatibles y han sido los principales candidatos para la fabricación de micro o nano partículas para uso en humanos (O'Hagan et al., 2006; Kumari et al., 2010).

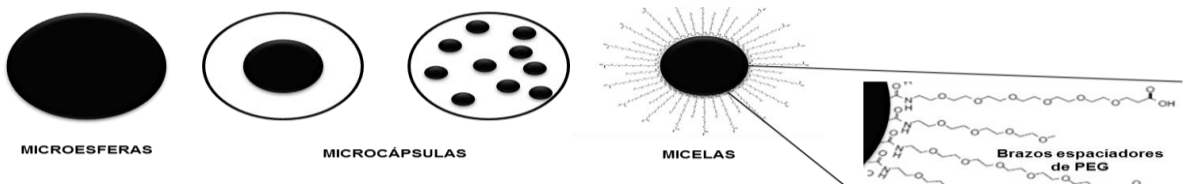
En esta revisión se resume el estado actual del uso de micropartículas preparadas a base de polímeros para la administración de antígenos. Se revisan y discuten los materiales, la fabricación, el mecanismo de captura, así como las ventajas del uso de polímeros naturales ya que gracias a su composición y fácil funcionalización, resulta una alternativa más segura para el desarrollo de vacunas de nueva generación que puedan administrarse tanto en humanos como en animales. Finalmente se

presentan algunas consideraciones y perspectivas sobre esta tecnología en el campo de la vacunación.

MATERIALES Y MÉTODOS DE FABRICACIÓN E INMOVILIZACIÓN

La selección del polímero para la preparación de la partícula, depende de la aplicación biomédica que ésta tendrá y de la vía de administración utilizada. En general las partículas de polímeros se preparan a partir de monómeros, bien sean naturales o sintéticos, o a partir de copolímeros (tabla 1), mediante técnicas que crean microcápsulas, microesferas o micelas (figura 1) listas para el cargado de moléculas o ya preparadas con la molécula que se va a administrar. En función de su tamaño pueden clasificarse como micropartículas si se encuentran en el rango de los micrones (1–1000 µm) o sub-micrones (100–1000 nm), o como nanopartículas, si se encuentran en un rango de 1–100 nm (Suri et al., 2013). En función de su forma las partículas pueden ser esféricas, amorfas, agregados o tener formas geométricas específicas (Hermanson, 2013).

Los métodos más comunes para su preparación son la evaporación del disolvente, el secado por aspersión o secado en spray y la polimerización. Una descripción general de estos métodos y sus ventajas y desventajas se resumen en la tabla 2. Por otro lado, los métodos para la inmovilización de las proteínas sobre las micropartículas pueden agruparse como métodos de inmovilización no covalente (adsorción) y métodos de inmovilización covalente (Datta et al., 2013). En el primer caso, micropartículas de naturaleza hidrofóbica permiten la adsorción directa de proteínas mediante interacciones con aminoácidos aromáticos (Karshikoff, 2006). En el caso de la inmovilización covalente, para la funcionalización de las partículas y cargado de moléculas se requieren reacciones de activación y acoplamiento que necesitan compuestos y solventes orgánicos. Básicamente se busca que las micropartículas tengan los grupos reactivos o funcionales desplegados en la superficie para permitir la unión covalente de las proteínas. La cantidad y tipo de estos grupos varía en función de los monómeros utilizados en el proceso de fabricación de la micropartícula. Los más comunes son de tipo carboxilato, aldehído, amina, amida, hidroxilo, epóxido, entre otros (Hemarson, 2013). Las partículas carboxiladas por ejemplo, se pueden obtener por copolimerización con monómeros del ácido acrílico o metacrílico y pueden unir moléculas con grupos amina formando uniones amida (Wikingsson & Sjöholm, 2002). Las partículas con grupos amina se pueden obtener por entrecruzamiento con compuestos como el glutaraldehído y poliglutaraldehído permitiendo la unión de proteínas mediante puentes disulfuro (Fundueanu et al., 2007), mientras



que partículas con grupos hidroxilo pueden obtenerse con copolímeros de poli hidroxietil metacrilato (pHEMA por sus siglas en inglés) (Devy et al., 2006) y/o poliestireno las cuales pueden activarse con compuestos como el carbonil diimidazol o el disuccinil carbonato (CDI y DSC por sus siglas en inglés) formando un grupo carbonilo reactivo a los grupos amina (Tauer et al., 2005). Partículas con grupos epóxido, introducidos mediante copolimerización con monómeros de vinilo (alil glicidil éter o glicidil metacrilato) pueden unir ligandos con grupos tiol, amino o hidroxilo mediante reacciones facilitadas bajo condiciones alcalinas. Este grupo reactivo por lo tanto puede utilizarse para unir no solo proteínas sino ácido nucleicos, azúcares y carbohidratos más complejos (Traina et al., 2012).

No obstante todos los avances en el área, todavía son muchos los desafíos para que los métodos de formación y funcionalización de las partículas no afecten adversamente la estabilidad y estructura de las proteínas y en consecuencia su papel biológico (Amidi et al., 2010). Subrayando que sigue siendo un reto controlar el tamaño de la partícula y lograr el escalamiento a nivel industrial

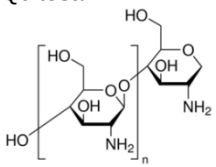
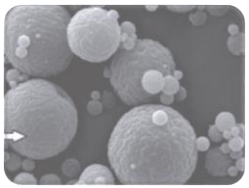
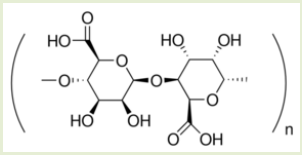
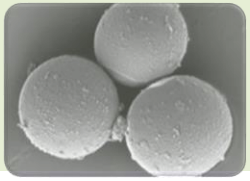
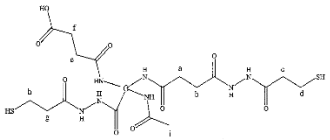
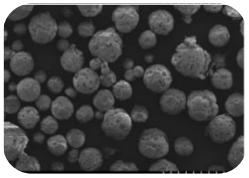
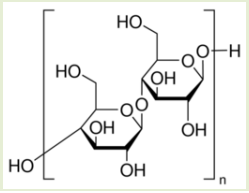
CARACTERIZACIÓN

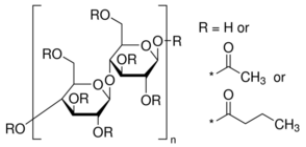
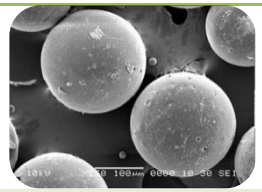
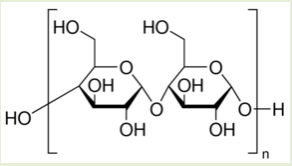
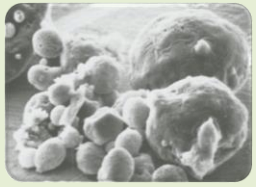
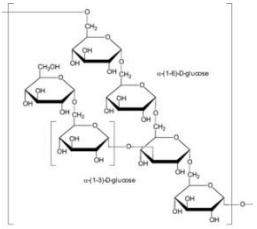
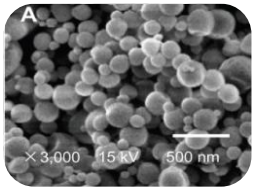
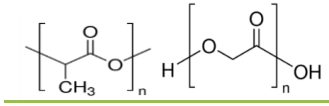
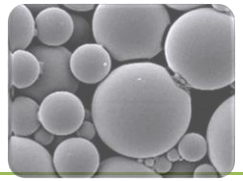
Una vez preparadas las micropartículas y dependiendo de la técnica utilizada para su preparación, se debe realizar una evaluación y caracterización cuidadosa de las mismas, no sólo para determinar el impacto de los procesos de fabricación sobre su estabilidad y la del ligando sino para establecer su idoneidad como sistema de transporte y liberación de antígenos o fármacos. Tanto para microcápsulas como para microesferas es importante la morfología y el tamaño (µm), la capacidad de carga (%), la eficiencia de encapsulación (%), la concentración de polímero (mg/mL) y el perfil de liberación, en especial cuando se trata de fármacos (Ye et al., 2010; Wieber et al., 2011). Los estudios de morfología y tamaño se realizan mediante técnicas de microscopía de las cuales la microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) es la más empleada seguida de la microscopía confocal y de fluorescencia. Estos estudios revelan información importante sobre la forma, regularidad de la superficie (presencia, distribución y tamaño de poros), presencia de defectos y agregación (Saez-Martínez, 2011).

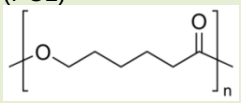
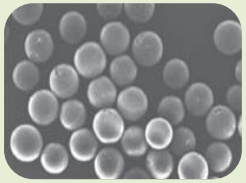
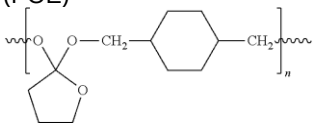
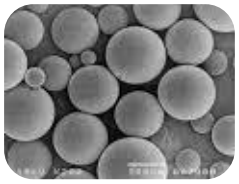
La eficiencia de encapsulación o atrapamiento, expresada como el porcentaje de proteína que quedó en la micropartícula con respecto a la cantidad total utilizada para el procedimiento, puede determinarse después de la hidrólisis o extracción de las micropartículas, mediante la cuantificación de las proteínas totales por cualquiera de los métodos convencionales (absorbancia a 280 nm, Lowry, Bradford y micro BCA). Por su parte, la carga hace referencia a la cantidad de proteína encapsulada o atrapada por unidad de masa de micropartículas y también se expresa en porcentaje (Mathew et al., 2014).

Finalmente, los perfiles de liberación también se analizan dependiendo si la micropartícula es una microesfera o una microcápsula y si el material con el que se preparó es biodegradable o hidrolizable ya que la liberación del compuesto

Tabla 1. Polímeros frecuentemente utilizados para la fabricación de micropartículas.

MATERIALES NATURALES		DESCRIPCIÓN	VENTAJAS	USOS
Quitosán 		Polisacárido catiónico formado de unidades de glucosamina con enlaces β (1→4). Obtenido por la deacetilación de la quitina, polímero presente en el exoesqueleto de insectos y crustáceos marinos.	●Biocompatibilidad y biodegradabilidad ●Abundancia de aminas primarias que lo hacen soluble en soluciones ácidas, lo que elimina el uso de químicos orgánicos durante su síntesis. ●Mayor tiempo de residencia en mucosa.	●Liberación oral de antígenos y fármacos como la insulina. ●Liberación de toxoides diftérico y tetánico. ●Liberación de DNA y RNA.
Alginato 		Copolímero no ramificado de ácido D-manurónico y L-gulurónico con enlaces β (1→4) derivado de las algas marinas.	●Biocompatibilidad ●Baja inmunogenicidad ●Condiciones suaves de preparación sin el uso de solventes orgánicos. ●Se pueden entrecruzar con cloruro de calcio y quitosán para mejorar el perfil de liberación.	●Microencapsulación de proteínas, drogas y células. ●Liberación oral y nasal de antígenos.
Gelatina 		Forma desnaturalizada del colágeno.	●Excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad. ●No es inmunogénica. ●Alta solubilidad.	●Liberación prolongada de citotóxicos, corticoides y antibióticos
Celulosa 		Homopolímero de unidades de glucosa con uniones β (1→4).	●Biocompatibilidad. ●Biodegradabilidad. ●Sus derivados también conservan estas propiedades	●Liberación de antiinflamatorios, analgésicos, corticoides
Celulosa-Acetato-Butirato (CAB)		Homopolímero de unidades de glucosa con uniones β (1→4) derivado de la celulosa.	●Biodegradabilidad ●Ofrece amplia capacidad para modificaciones	●Liberación de citotóxicos.

				●Aplicaciones en farmacéutica, agricultura y cosmética.
Almidón modificado 		Polisacárido de unidades de glucosa con puentes glucosídicos α (1→4) en la amilosa y α (1→6) en la amilopectina.	●Puede permitir el atrapamiento o unión covalente de la molécula de interés. ●Biodegradabilidad. ●Ninguna inmunogenicidad.	●Liberación de antígenos vía mucosas.
Dextrano 		Homopolisacárido ramificado de glucosa sintetizado por bacterias ácido lácticas a partir de la sacarosa con enlaces α (1→6) entre glucosas y α (1→2, 1→3 o 1→4) en las ramificaciones.	●Biocompatibilidad. ●Biodegradabilidad. ●Disponible en diferentes pesos moleculares. ●Puede funcionalizarse fácilmente.	●Liberación de fármacos. ●Liberación de antígenos vía mucosas.
MATERIALES SINTÉTICOS		**DESCRIPCIÓN**	**VENTAJAS**	**USOS**
Ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímeros (PLGA) 		Poliésteres alifáticos del ácido láctico y glicólico.	●Resorbible. ●Rápida cinética de degradación. ●Biocompatibilidad. ●Degradabilidad manejable en función de su composición.	●Liberación de ácidos nucleicos, proteínas y péptidos. ●Liberación de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos.

Poli (ε-caprolactona) (PCL) 		Polímero semicristalino de ε-caprolactona.	●Biodegradabilidad. ●Biocompatibilidad. ●Alta permeabilidad. ●No tóxico. ●Cinética lenta de degradación.	●Encapsulación y liberación de antibióticos. ●Liberación de antígenos y adyuvantes por vía oral. ●Co-encapsulación de drogas lipofílicas e hidrofílicas.
Poli (ortho-ester) (POE) 		Polímero de ortoésteres producto de la alquilación de los ácidos ortocarboxílicos.	●Biocompatibilidad. ●Biodegradabilidad.	●Liberación de proteínas y ácidos nucleicos.

Adaptada de Campos *et al*., 2010; Coelho *et al*., 2010; Kumari *et al*., 2010; Suri *et al*., 2013.

de interés, puede darse por diferentes mecanismos dependientes de estos factores (Coelho et al., 2010; Sáez-Martínez, 2011). En el caso de las microesferas en las que la proteína está distribuida en la matriz polimérica, la liberación puede darse por difusión o por la erosión de la partícula, mientras que en el caso de las microcápsulas, la liberación ocurre principalmente por difusión, por lo tanto, los perfiles de liberación pueden ser variados (Ye et al., 2010). Si bien los análisis de liberación que se hacen in vitro pueden no correlacionar con lo que ocurre in vivo, son una herramienta importante para predecir la utilidad de las micropartículas como sistemas de liberación.Otros análisis más rigurosos pueden incluir además, la determinación de humedad y solvente residual, índice de hinchamiento, y estabilidad en diferentes condiciones de temperatura y pH con respecto al tiempo. Para estos análisis y en general para verificar la estructura y función de la proteína, la presencia de agregados y otros productos, se utilizan técnicas analíticas como cromatografía, espectrometría de masas, electroforesis, dicroísmo circular y ensayos de bioactividad (Teekamp et al., 2015). También resultan importantes los ensayos de degradación enzimática tanto in vitro como in vivo y los de citotoxicidad pues proveen información sobre su inocuidad (Devy et al., 2006; Liu et al., 2014).

PROPIEDADES Y CONDICIONES

De forma general, las propiedades de las micropartículas pueden modularse variando su composición, estructura y tamaño, dependiendo del uso y la vía de administración seleccionada, pues las vías de administración parenteral (subcutánea, intramuscular, etc.) representan retos diferentes que las vías de administración por mucosas (oral, nasal, pulmonar, vaginal, etc.). Las propiedades físicas y químicas como el tamaño, la forma, la hidrofobicidad, la carga, la presencia de grupos funcionales para el acoplamiento o inmovilización de las moléculas, la solubilidad, la biocompatibilidad y biodegradabilidad, son además criterios fundamentales ya que determinan la estabilidad tanto in vitro como in vivo, la funcionalidad e inocuidad de las micropartículas y en particular su capacidad para modular la respuesta inmune (Liu et al., 2014). Por ejemplo, se ha observado que el tamaño es fundamental para obtener un tipo de respuesta deseado. Se ha reportado que micropartículas con tamaños inferiores a 10 µm pueden ser fagocitadas por las células presentadoras de antígeno y además pueden prolongar la presentación in vitro de la proteína o péptido asociado (Audran et al., 2003). Cuando son administradas por vía mucosa, aquellas con tamaños de hasta 5 µm pueden ser transportadas rápidamente por los vasos linfáticos eferentes hasta los órganos linfoides periféricos como el bazo e inducir respuesta inmune sistémica, o si son mayores de 5 µm pueden permanecer en las placas de Peyer ubicadas en el tejido linfoide asociado a mucosa (MALT por sus siglas en inglés) e inducir respuesta inmune local (Gutierro et al., 2002). La forma que tengan las micropartículas también es un factor que se ha reportado afecta la respuesta inmune ya que juega un papel determinante en la activación del citoesqueleto

Tabla 2. Métodos más comunes de fabricación de Micropartículas.

MÉTODOS	DESCRIPCIÓN	VENTAJAS Y DESVENTAJAS	EJEMPLOS
I. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS **Coacervación simple y compleja (o separación de fases)**	Proceso de tres pasos en los que se forma una emulsión agua/aceite (W/O) con el polímero disuelto en la fase orgánica y la proteína o compuesto en la fase acuosa. La adición de un segundo polímero causa la precipitación del primero en forma de gotas líquidas o partículas sólidas que se estabilizan en otro disolvente orgánico. Las partículas obtenidas se lavan exhaustivamente, centrifugan y secan por congelación.	**V:** Muy estudiados a nivel de laboratorio, elevada eficiencia de encapsulación. **D:** Difícil obtención de partículas pequeñas, dificultad para su escalamiento y aplicación a nivel industrial, persistencia en la presencia de residuos de solvente en el producto final.	Toxoide diftérico en micropartículas de quitosano cubiertas de alginato (Shukla *et al*., 2015)
II. MÉTODOS FÍSICO-MECÁNICOS **a. Emulsificación-Evaporación del disolvente** **b. Secado por aspersión**	Se forman emulsiones con la molécula contenida en la fase acuosa interna, el polímero en un disolvente orgánico en la fase oleosa, y una fase acuosa externa. El disolvente es eliminado a baja presión y temperatura para aumentar la viscosidad de la fase interna, seguida del aislamiento de las microesferas. En el secado por aspersión, la molécula en disolución acuosa o en	**V:** Amplio uso en el laboratorio, alta eficiencia de encapsulación, fácil escalamiento. El secado por aspersión además es más rápido y permite la obtención de micropartículas porosas entre 1 y 100 µm. **D:** Dificultad para controlar el tamaño de partícula, poca estabilidad y afectación de las proteínas por exposición a solventes y elevadas	a. Antimicrobiano (ácido usnico) en micropartículas de ácido poliláctico (Martinelli *et al*., 2014) b. Inmunomoduladores como oligos CpG en micropartículas de PGLA (Malyala *et al*., 2009)

	forma de partículas se dispersa en una disolución de polímero disuelto en un solvente orgánico volátil. La mezcla se bombea hacia el atomizador de aire caliente del secador y las partículas secas se llevan a un separador.	temperaturas, pérdida de producto final.	
III. MÉTODOS QUÍMICOS **Polimerización Interfacial y heterogénea**	Una fase no acuosa con surfactantes y una fase acuosa conteniendo el ligando se mezclan para formar una emulsión w/o en hielo. Se agrega otra fase no acuosa para que ocurra la polimerización en la interfase entre la solución acuosa que contiene el ligando y la solución orgánica que contiene los monómeros.	**V:** Puede llevarse a cabo bajo condiciones suaves que conservan toda o parte de la actividad biológica de la proteína encapsulada. **D:** Presencia de residuos del monómero en el producto final. Dificultad para su escalamiento y aplicación a nivel industrial.	Albúmina Sérica Bovina en microcápsulas de hidrietil almidón (Devy *et al*., 2006).

Adaptada de Yeo *et al*., 2001

de las CPAs y macrófagos y el proceso de fagocitosis (Champion & Mitragotri, 2006; Sharma et al., 2010). Este parámetro está estrechamente ligado con la carga, pues también promueve la fagocitosis por parte de los macrófagos, la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), la expresión de moléculas coestimuladoras como el CD80 y la secreción de interleucinas, lo que le confiere propiedades adyuvantes a las micropartículas (Audran et al., 2003; Liu et al., 2014).

Con los métodos de fabricación e inmovilización seleccionados, se puede conseguir modular estas propiedades y contribuir a la estabilidad simultáneamente. Por ejemplo, la adición de carboxilatos puede resultar en la estabilización de las partículas en solución previniendo fenómenos de agregación por carga ya que es frecuente que muchas partículas, en especial las de menor tamaño se agreguen por interacciones de van der Waals o hidrofóbicas. Por el contrario, las partículas hidrofílicas (con grupos polares como los hidroxilos) pueden ser más estables por los efectos repulsivos que le confiere la capa de agua que se forma a su alrededor estando en solución acuosa (Hermanson, 2013). Sin embargo, en el caso de polímeros hidrofílicos como el almidón soluble, el método más común para preparar estas micropartículas para que sean resistentes a disolución en un ambiente fisiológico, es el entrecruzamiento de las cadenas de polisacárido, introduciendo grupos vinilo o diacrilato (Campos et al., 2013). También es común que para inhibir o reducir la degradación enzimática ocurrida en ambientes fisiológicos como el tracto gastrointestinal y garantizar la cantidad adecuada del agente terapéutico, las micropartículas de polímeros solubles se combinen con otros polímeros como la poli-ε-caprolactona (Balmayor et al., 2009), o que la modificación química de los oligosacáridos, por acilación o acrilación, que se hace para permitir la unión covalente de los antígenos, también contribuya a su estabilidad en estos ambientes, lo cual además es esencial para la inducción de la respuesta inmune (Stertman et al., 2006).

Por otra parte, es muy importante que las micropartículas utilizadas como vehículo de antígenos sean biocompatibles y biodegradables, es decir que no provoquen ninguna respuesta fisiológica adversa que dañe el material después de interaccionar con tejidos y fluidos corporales, y que los productos de su degradación no sean tóxicos y se procesen por las vías metabólicas usuales. Como estrategias para promover estas propiedades y limitar interacciones inespecíficas con otras proteínas o biomoléculas, es común agregar coberturas hidrofílicas a núcleos hidrofóbicos (micelas poliméricas). Los polímeros más utilizados con este propósito incluyen el polietilenglicol (PEG), el polivinil alcohol (PVA), el ácido poliacrílico (PAA) y cualquier polímero que tenga grupos éster, ortoéster o amida (Coelho et al., 2010; Jokerst et al., 2011). También se usa como estrategia la unión de brazos espaciadores hidrofílicos, que generalmente son moléculas orgánicas como el PEG con grupos polares en la cadena que pueden interactuar con el medio y que tienen en un extremo un línker hidrofóbico para unirse a la partícula y en el otro extremo un

grupo funcional como el carboxilato para la unión del ligando. Esta estrategia llamada pegilación, no solo mejora la biocompatibilidad de la micropartícula sino que además contribuye con su estabilización (Jokerst et al., 2011; Teekamp et al., 2015).

Finalmente, y cumplidas todas estas condiciones, también se espera que un sistema de transporte y liberación basado en micropartículas permita: 1. Aumentar la solubilidad y estabilidad de la molécula asociada, 2. La liberación o entrega controlada, dirigida y en algunos casos sostenida de la molécula evitando efectos secundarios adversos, 3. El uso de menores concentraciones del fármaco o el antígeno y 4. Mejorar su distribución y biodisponibilidad (Tan et al., 2010; Campos et al., 2013). Estos objetivos se pueden alcanzar utilizando tanto la vía de administración parenteral como mucosa, sin embargo los resultados más promisorios se han obtenido utilizando esta última vía. Si bien se deben penetrar las barreras del epitelio para alcanzar las células competentes ubicadas en mucosa y superar condiciones drásticas de pH y presencia de proteasas (Stertman et al., 2006), las propiedades mucoadhesivas de las micropartículas de polímeros pueden resultar ventajosas ya que pueden favorecer el suministro constante de los antígenos.

MECANISMOS DE CAPTURA Y DESTINO

Los mecanismos de captura y destino de las micropartículas dependen estrechamente de su tamaño, material y vía de administración. Cuando son administradas por vía parenteral, las micropartículas pueden activar los mecanismos de opsonización, haciéndose más reconocibles para el sistema fagocítico en periferia y en consecuencia pueden ser removidas de circulación antes de llegar al blanco deseado. Al contrario de lo ocurrido con las nanopartículas que pueden escapar de la fagocitosis y circular en el torrente sanguíneo por más tiempo, las partículas mayores de 200 nm circulan poco tiempo y finalmente pueden ser aclaradas por el hígado, el bazo o los pulmones, o dependiendo de la carga pueden favorecer una fagocitosis no específica por células diferentes a las células blanco (Yu et al., 2015).

Por su parte, cuando las micropartículas son administradas vía mucosas, el moco es la principal barrera física que deben atravesar, una vez que atravesaron barreras como el pH y las proteasas. Básicamente el moco es un hidrogel complejo, compuesto de fibras de mucina entrecruzadas y unidas mediante interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro, que forman poros de tamaños diferentes y que pueden además retener sales, anticuerpos, bacterias y detritos celulares. Las mucinas, pueden ser secretadas o pueden estar unidas a las células, representando entre un 2-5% del moco en peso seco. Estas proteínas contienen grandes cantidades de residuos de serina, treonina y prolina con N- (2-3%) y O-glicosilaciones (40-80%) que varían en tamaño y nivel de ramificación dependiendo su ubicación (Ensign et al., 2012).

La carga negativa del moco y la variabilidad en su composición y grosor (relación entre sus capas ligera y firmemente adherente) a lo largo

del tracto gastrointestinal y en otras cavidades cubiertas de moco, son factores determinantes también para el destino de las partículas. Éstas pueden atravesarlo, adherirse o incluso ser excluidas, según sea su composición, carga y tamaño (ver figura 2). Como sistemas de liberación de antígenos o fármacos se buscan partículas penetrantes o mucoadhesivas, por lo que se puede recurrir a estrategias para variar estas características. Para la obtención de partículas penetrantes se pueden utilizar las coberturas con PEG y copolímeros de bajo peso molecular o incluir agentes mucolíticos en la partícula (Liu et al., 2015). Para la obtención de partículas mucoadhesivas se utilizan polímeros hidrofílicos, o se pueden adicionar grupos tiol en el esqueleto del polímero para promover la formación de puentes disulfuro con los dominios ricos en cisteína de las mucinas.

El proceso de mucoadhesión resulta favorable ya que prolonga el tiempo de residencia y mejora la biodisponibilidad en el sitio de aplicación facilitando el contacto del fármaco o el antígeno con la superficie del tejido blanco. Este proceso incluye dos etapas: el contacto, en el que ocurre la hidratación e hinchamiento del polímero para permitir su penetración y la consolidación, en la que ocurre el entrecruzamiento con las fibras de mucina y la formación de interacciones débiles (van der

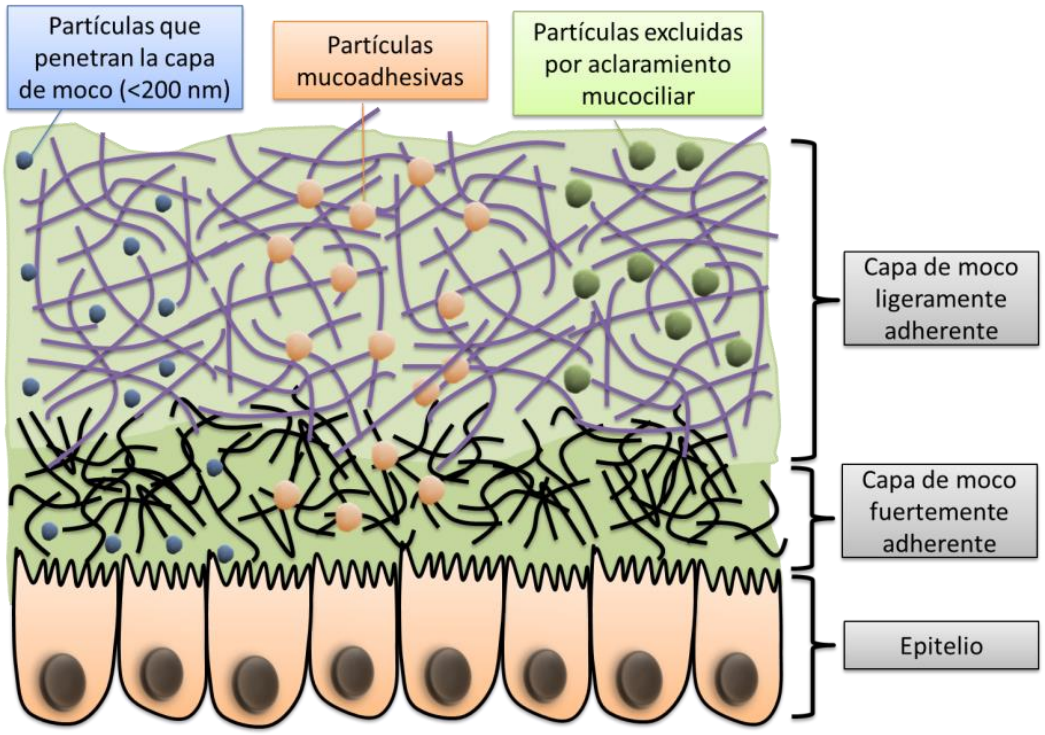


Fig. 2. Destino de las partículas de polímeros en la barrera de moco. Partículas aniónicas pequeñas pueden atravesar la malla de moco entrando en contacto directo con las células del epitelio. Micropartículas catiónicas con propiedades mucoadhesivas interaccionan con las fibras de mucina aumentando el tiempo de residencia y la biodisponibilidad del antígeno o fármaco. Partículas de otros materiales pueden ser aclaradas en la capa ligeramente adherente del moco y por acción de los cilios. Adaptada de Liu *et al*., 2015.

Waals y puentes de hidrógeno). Para esto, y sin importar la estrategia utilizada para la fabricación, la partícula polimérica debe tener suficientes grupos OH^- disponibles para los puentes, debe tener una carga aniónica superficial, alto peso molecular, flexibilidad de las cadenas y tensión superficial que permita su distribución en la capa de moco (Boddupalli et al., 2010).

Las propiedades físico químicas que determinan si las partículas serán penetrantes o mucoadhesivas (carga y tamaño) también son determinantes para los procesos de transporte en mucosa. Las partículas mucoadhesivas pueden ir liberando el antígeno o fármaco antes de entrar en contacto con las células del epitelio o bien, como pasa con las partículas penetrantes, pueden quedar en la superficie del epitelio y ser transportadas si tienen el tamaño adecuado. Una vez en el nivel de contacto con las células del epitelio, las partículas pueden ser transportadas al lumen por cuatro posibles mecanismos, que también están descritos para las micropartículas de origen endógeno y que son: la endocitosis mediada por receptores, el transporte paracelular, la persorción y la trancitosis (ver figura 3) (Powell et al., 2010; Plapied et al., 2011).

La endocitosis mediada por receptores es la vía de entrada por las células epiteliales regulares, mientras que el transporte paracelular ocurre entre las uniones celulares. Estas dos vías dan paso preferencial a nanopartículas de hasta 50 nm. Para las micropartículas el principal mecanismo de entrada es la trancitosis, que es el paso a través de las células M presentes en el tejido linfoide asociado tanto a intestino como a nasofaringe (GALT y MALT respectivamente y por sus siglas en inglés). Durante la trancitosis, las proteínas o péptidos cargados en las micropartículas pueden sufrir degradación parcial en los lisosomas y ser

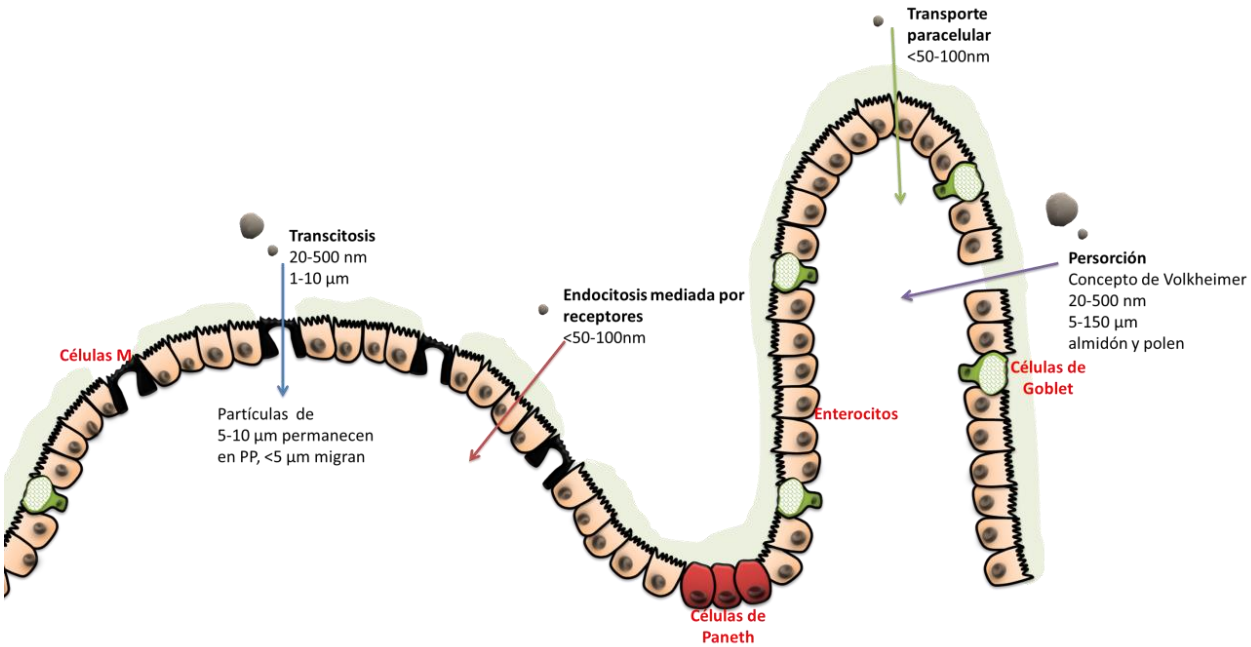


Fig. 3. Transporte de las micropartículas a través de mucosa intestinal.

liberados listos para su cargado en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de las CPAs y para su procesamiento y presentación a los linfocitos T (Ménard et al, 2010). Con mucha menor frecuencia, las micropartículas también pueden pasar a través de los gaps del epitelio (ocurridos por pérdida celular) en un fenómeno conocido como persorción o concepto de Volkheimer (O'Hagan, 1998).

VENTAJAS DEL USO DE POLÍMEROS NATURALES PARA LA FABRICACIÓN DE MICROPARTÍCULAS: EL ALMIDÓN COMO ALTERNATIVA

Entre los polímeros naturales utilizados para la fabricación de micropartículas para administración de antígenos, el quitosán ha sido tal vez, el más utilizado. No sólo es biodegradable, biocompatible y mucoadhesivo sino que se sabe es un modificador natural de la respuesta inmune, una propiedad reportada para la mayoría de los beta glucanos. Entre sus propiedades están la activación de macrófagos y la inducción de citocinas proinflamatorias (INF-γ, TNF-α, IL-12 e IL-18) y anticuerpos. Estos efectos están mediados por la interacción de las partículas con receptores de patrones de reconocimiento (PRRs por sus siglas en inglés) presentes en macrófagos y células dendríticas, y que reconocen carbohidratos tales como receptores de manosa, Dectina-1 y TLR-2 (Petrovsky & Cooper, 2011). En consecuencia, y para explotar todas estas propiedades son muchos los protocolos reportados para la fabricación de estas micropartículas, bien como componente único en las formulaciones o en combinación con otros polímeros.

Por otra parte, el uso del almidón, también se ha reportado para el diseño y fabricación de micropartículas con propiedades adyuvantes (Rydell et al., 2005). Estas micropartículas, preparadas a base de almidón soluble (malto-oligosacáridos) y modificadas químicamente para el atrapamiento o conjugación de los antígenos se han administrado por diferentes vías como la oral, parenteral y nasal (Stertman et al., 2004; Rodrigues & Emeje, 2012), comprobándose el aumento de su estabilidad en condiciones como las del tracto gastrointestinal y su eficiencia para inducir respuesta sistémica y local de anticuerpos así como respuesta de tipo celular (Rydell & Sjöholm, 2004). Sin embargo, no existen antecedentes del uso de micropartículas, tanto de almidón como de otros polímeros naturales, que no hayan sido modificadas químicamente para permitir la unión de antígenos para su posterior administración. La tabla 1 resume las principales aplicaciones exploradas para los principales biopolímeros.

Una alternativa desarrollada recientemente, aprovecha un sistema para la inmovilización no covalente de antígenos sobre micropartículas de almidón crudo. La adsorción, mediada por un Dominio de Fijación al Almidón (DFAtag), que interactúa con el almidón a través de uniones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, permite estabilizar a los antígenos en su trayecto por el tracto gastrointestinal cuando son administrados vía oral. La administración de diferentes antígenos inmovilizados en micropartículas de almidón a través de este domino favorece la inducción de una respuesta inmune antígeno-

específica que puede ser de tipo humoral o celular, tanto por la vía oral como por la vía nasal (Guillén et al, 2014; Moreno-Mendieta et al., 2014). Esta alternativa resulta muy ventajosa ya que no requiere la funcionalización de la partícula con la consecuente disminución en costos y riesgos derivados del uso de solventes orgánicos. Además se aprovechan las propiedades intrínsecas del almidón, tales como biodegradabilidad, biocompatibilidad e inocuidad.

PERSPECTIVAS SOBRE EL USO DE MICROPARTÍCULAS DE POLÍMEROS EN EL CAMPO DE LA VACUNACIÓN

En las últimas décadas, ha sido notorio y acelerado el progreso en el área de desarrollo de sistemas microparticulados de administración y liberación de proteínas o péptidos. No solo como herramienta para la administración de fármacos, la cual es ampliamente utilizada en la industria de medicamentos desde hace mucho tiempo, sino como alternativa para la administración de antígenos o inmunoestimulantes, con la consecuente aplicación en el área de la vacunación. La persistencia de enfermedades como el cáncer y las enfermedades infecciosas o degenerativas, demanda la búsqueda de nuevas vacunas y/o tratamientos, por lo que el uso de micropartículas de polímeros en estos modelos también se ha evaluado.

Por ejemplo, desde hace algunos años se ha explorado el uso de microcápsulas de hidroxietil almidón para proteger antígenos utilizados en el tratamiento del melanoma (Devy et al., 2006), o en modelos celulares de adenocarcinoma colorectal, se han utilizado exitosamente partículas de β-glucanos para la activación de citocinas proinflamatorias y receptores tipo Toll y tipo lectina. Administradas por vía oral se ha demostrado que estas micropartículas tienen la capacidad de inducir una respuesta específica de anticuerpos (De Smet et al., 2013). También se han utilizado microesferas de PLGA y quitosán para la administración del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), comprobándose su idoneidad como vacunas de aplicación única con la capacidad para estimular respuesta inmune específica y de memoria gracias a su perfil de liberación controlada y sostenida (revisado en McHug et al., 2015). Incluso se ha evaluado el uso de micropartículas para la administración subcutánea y nasal del péptido beta amiloide, como estrategia para evitar respuestas adversas de tipo celular y lograr el diseño de una vacuna contra el Alzheimer (Puras et al., 2011).

Como se describió en los apartados anteriores, los sistemas microparticulados para la administración de antígenos ofrecen múltiples ventajas en el área ya que, pueden contribuir a la estabilidad de las proteínas, facilitar y dirigir su liberación en tejidos y células especializadas y además pueden conferir propiedades adyuvantes necesarias en una vacuna. Sin embargo, los retos continúan. Con los sistemas de administración vía mucosas, la inestabilidad de los antígenos en condiciones drásticas como las del tracto gastrointestinal o la fuerte respuesta que puede inducirse en algunas zonas como la nasofaringe, siguen limitando su uso. Con los sistemas de administración

parenteral el rápido aclaramiento después de la inyección y el consecuente aumento en la frecuencia de las aplicaciones, impactan en el apego de los individuos a los esquemas de inmunización o tratamiento. Por otra parte se sabe que los protocolos de preparación y funcionalización de las micropartículas pueden afectar la estructura y funcionalidad de las proteínas así como la inocuidad de las preparaciones debido al uso de compuestos orgánicos no deseados, con repercusiones en los procesos de escalamiento a nivel industrial.

Con este panorama, el diseño de micropartículas para la administración de antígenos, debe orientarse más al uso de polímeros naturales y a la búsqueda de métodos más limpios y fáciles de preparación que permitan además estabilizar a las formulaciones para su almacenamiento (prescindiendo de cadenas frías para su conservación) y una disminución importante en los costos para su comercialización. Así mismo resulta importante optimizar este tipo de sistemas para su uso vía mucosas dadas la ventajas que tiene esta ruta con respecto a la vía de administración parenteral y al hecho que, sin existir adyuvantes mucosales aprobados para su uso en humanos, se puede tomar partido de las propiedades adyuvantes que tienen estos polímeros.

REFERENCIAS

Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W & Hennink WE (2010) Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. Adv. Drug. Deliv. Rev. 60: 59-82.

Audran R, Petter K, Dannull J, Men Y, Scandelle E, Groettrup M, Gander B & Corradin G (2003) Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages in vitro. Vaccine. 21: 1250–1255.

Balmayor ER, Tuzlakoglu K, Azevedo HS & Reis RL (2009) Preparation and characterization of starch-poly-[epsilon]-caprolactone microparticles incorporating bioactive agents for drug delivery and tissue engineering applications. Acta Biomaterialia. 5: 1035-1045.

Boddupalli BM, Mohammed ZNK, Nath RA & Banji D (2010) Mucoadhesive drug delivery system: An overview. J. Adv. Pharm. Technol. Res. 1: 381-387.

Campos E, Branquinho J, Carreira AS, Carvalho A, Coimbra P, Ferreira P & Gil MH (2013) Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. Eur. Polym. J. 49: 2005-2021.

Champion JA & Mitragotri S (2006) Role of target geometry in phagocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 4930–4934.

Coelho JF, Ferreira PC, Alves P, Cordeiro R, Fonseca AC, Góis JR & Gil MH (2010) Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. EPMA J. 1: 164-209.

Datta S, Christena LR & Rajaram YRS (2013) Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. Biotech. 3: 1-9.

Devy J, Balasse E, Kaplan H, Madoulet C & Andry MC (2006) Hydroxyethylstarch microcapsules: a preliminary study for tumor

immunotherapy application. Int. J. Pharm. 307: 194-200.

De Smet R, Demoor T, Verschuere S, Dullaers M, Ostroff GR, Leclercq G, Allais L, Pilette C & Dierendonck M (2013) β-Glucan microparticles are good candidates for mucosal antigen delivery in oral vaccination. J. Control. Release. 172: 671-678.

Ensign LM, Cone R & Hanes J (2012) Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. Adv. Drug Del. Rev. 64: 557–570.

Fundueanu G, Constantin M, Bortolotti F, Cortesi R, Ascenzi P & Menegatti E (2007) Cellulose acetate butyrate–pH/thermosensitive polymer microcapsules containing aminated poly(vinyl alcohol) microspheres for oral administration of DNA. Eur. J. Pharm. Biopharm. 66: 11-20.

Guillén D, Moreno-Mendieta S, Pérez R, Espitia C, Sánchez S & Rodríguez-Sanoja R (2014) Starch granules as a vehicle for the oral administration of immobilized antigens. Carbohydr. Polym. 112: 210–215.

Gutierro I, Hernández RM, Igartua M, Gascón AR & Pedraz JL (2002) Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. Vaccine. 21: 67-77

Hermanson GT (2013) Chapter 14. Microparticles and Nanoparticles. In: Bioconjugate Techniques. Third Edition. Academic Press, Elsevier. pp. 549-587.

Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN & Gambhir SS (2011) Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. Nanomedicine. 6: 715-728.

Karshikoff A (2006) Non-covalent interactions in proteins. Imperial College Press. London. 333p.

Kumari A, Yadav SK & Yadav SC (2010) Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids Surf. B: Biointerfaces. 75: 1-18.

Liu Y, Chen X, Wang L, Yang T, Yuan Q & Ma G (2014) Surface charge of PLA microparticles in regulation of antigen loading, macrophage phagocytosis and activation, and immune effects in vitro. Particuology, http://dx.doi.org/10.1016/j.partic.2014.02.006

Liu M, Zhang J, Shan W & Huang Y (2015) Developments of mucus penetrating nanoparticles. Asian J. Pharm. Sci. 10: 275-282.

McHugh KJ, Guarecuco R, Langer R & Jaklenec A (2015) Single-injection vaccines: Progress, challenges, and opportunities. J. Control. Release. 219: 596-609.

Malyala P, O'Hagan DT & Singh M (2009) Enhancing the therapeutic efficacy of CpG oligonucleotides using biodegrad¬able microparticles. Adv. Drug Deliv. Rev. 61: 218–225.

Mathew S, Lendlein A & Wischke C (2014) Characterization of protein-adjuvant coencapsulation in microparticles for vaccine delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm. 87: 403-407.

Ménard S, Cerf-Bensussan N & Heyman M (2010) Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of

dietary antigens. Mucosal Immunol. 3: 247-259.

Moreno-Mendieta SA, Guillén D, Espitia C, Hernández-Pando R, Sanchez S & Rodríguez-Sanoja R (2014) A novel Antigen-carrier system: The Mycobacterium tuberculosis Acr protein carried by raw starch microparticles. Int. J. Pharm. 474: 241–248.

O'Hagan DT (1998) Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. Adv. Drug. Del. Rev. 34: 305-320.

O'Hagan DT, Singh M & Ulmer JV (2006) Microparticle-based technologies for vaccines. Methods. 40: 10–19.

Plapied L, Duhem N, des Rieux A & Préat V (2011) Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. Curr. Opin. Colloid In. Sci. 16: 228-237.

Petrovsky N & Cooper PD (2011) Carbohydrate-based immune adjuvants. Expert. Rev. Vaccine. 10: 523-537.

Powell JJ, Faria N, Thomas-McKay E & Pele LC (2010) Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. J. Autoimmun. 34: J226-33.

Puras G, Salvador A, Igartua M, Hernández RM & Pedraz JL (2011) Encapsulation of Aβ1–15 in PLGA microparticles enhances serum antibody response in mice immunized by subcutaneous and intranasal routes. Eur. J. Pharm. Sci. 44: 200-206.

Reddy ST, Swartz MA & Hubbell JA (2006) Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. TRENDS Immunol. 27: 573-579.

Rodrigues A & Emeje M (2012) Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. Carbohydr. Polym. 87: 987–994.

Rydell N & Sjöholm I (2004) Oral vaccination against diphtheria using polyacryl starch microparticles as adjuvant. Vaccine. 22: 1265–1274.

Rydell N, Stertman L & Sjöholm I (2005) Starch microparticles as vaccine adjuvant. Expert Opin. Drug. Deliv. 2: 807-828.

Saez-Martínez VM (2011) Microesferas de copolímeros de ácido láctico y glicólico cargadas con interferón alfa 2b y factor de crecimiento epidérmico: Obtención, caracterización y estudios de liberación. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Universidad de la Habana. Habana, Cuba. pp. 1-134.

Sharma G, Valenta DT, Altman Y, Harvey S, Xie H, Mitragotri S., et al. (2010). Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. J. Control. Release. 147: 408–412.

Shukla A, Mishra V, Singh Bhoop B & Katare OP (2015) Alginate coated chitosan microparticles mediated oral delivery of diphtheria toxoid. Part A: Systematic optimization, development and characterization. Int. J. Pharm. 495: 220-233.

Suri S, Ruan G, Winter J & Schmidt CE (2013) Chapter I.2.19. Microparticles and Nanoparticles. In: Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, Elsevier. pp. 360-388.

Stertman L, Strindelius L & Sjöholm I (2004) Starch microparticles as an adjuvant in immunisation: effect of route of administration on the immune response in mice. Vaccine. 22: 2863–2872.

Stertman L, Lundgren E & Sjöholm I (2006) Starch microparticles as a vaccine adjuvant: Only uptake in Peyer's patches decides the profile of the immune response. Vaccine. 24: 3661-3668.

Tan ML, Choong PEM & Dass CR (2010) Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. Peptides. 31: 184-193.

Tauer K, Imroz Ali AM, Sedlak M (2005) On the preparation of stable poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles. Colloid Polym. Sci. 283: 351–358.

Teekamp N, Duque LF, Frijlink HW, Hinrichs WLJ & Olinga P (2015) Production methods and stabilization strategies for polymer-based nanoparticles and microparticles for parenteral delivery of peptides and proteins. Expert. Opin. Drug. Deliv. 12: 1311-1331.

Traina M, Galy J, Gérard JF, Dikic T & Verbrugge T (2012) Synthesis of cross-linked epoxy microparticles: Effect of the synthesis parameters. J. Colloid Interface. Sci. 368: 158-164.

Wieber A, Selzer T & Kreuter J (2011) Characterisation and stability studies of a hydrophilic decapeptide in different adjuvant drug delivery systems: a comparative study of PLGA nanoparticles versus chitosan-dextran sulphate microparticles versus DOTAP-liposomes. Int. J. Pharm. 12: 151-159.

Wikingsson L & Sjöholm I (2002) Polyacryl starch microparticles as adjuvant in oral immunisation, inducing mucosal and systemic immune responses in mice. Vaccine. 20: 3355–63.

Ye M, Kim S & Park K (2010) Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. J. Control. Release. 146: 241-260.

Yeo Y, Baek N & Park K (2001) Microencapsulation Methods for Delivery of Protein Drugs. Biotechnol. Bioprocess Eng. 6: 213-230.

Yu M, Wu J, Shi J & Farokhzad OC (2015) Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives, J. Control. Release, http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.012

Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao C, Milter N, Yu C. & Middelberg APJ (2014) Nanoparticle vaccines. Vaccine. 32: 327-337.

En Memoria a un Amigo y Colega Excepcional, El Dr. Federico Sánchez Rodríguez



Dr. Federico Sánchez Rodríguez

Escribir del **Dr. Federico Sánchez Rodríguez** en estos momentos y pretender distinguir su trayectoria profesional, me significa sentimientos encontrados, por un lado, el dolor por el gran amigo que se ha ido y por el otro, el honor de referir la obra de un gran hombre; generoso sin límites, entusiasta, emprendedor, maestro excepcional, hijo, esposo y padre sin igual, y un investigador de excelencia.

Conocí a **Federico** en el año de 1976 cuando cursaba sus estudios de maestría en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en el programa de maestría y doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). En 1978 obtuvo su grado de Doctor, siendo el primer graduado de doctorado en este programa. Posteriormente, realizó una estancia posdoctoral (1979-1981) en el Departamento de Bioquímica y Biofísica, de la Universidad de California en San Francisco, bajo la asesoría del Profesor Brian McCarthy.

En 1981, se integró al entonces Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM, hoy Centro de Ciencias Genómicas, en donde inicia el desarrollo de la Unidad de Biología Molecular de Plantas, primera en su tipo en la UNAM y en México. A partir de entonces, su trabajo científico y su actividad docente, fueron un factor determinante en la consolidación de la Biología Molecular de Plantas en este País.

Sus líneas de investigación fueron el metabolismo nitrogenado en hongos (*Neurospora crassa*) y de manera preponderante, el estudio de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre leguminosas y *Rhizobium*. Es en este campo en donde consolida su producción científica en revista internacionales de alto impacto (más de 100 publicaciones), el cual se refleja en las casi 1900 citas a sus trabajos.

Su actividad docente inicia en el año de 1973 en la Facultad de Química y se continúa ininterrumpidamente a partir de 1982 en los programas de maestría y doctorado en donde imparte cursos básicos y tópicos selectos. Cabe destacar su entusiasta participación por más de 10 años como profesor de la licenciatura en Ciencias Genómicas. De manera significativa y de gran valor académico es la clara vinculación entre su trabajo científico y la formación de

recursos humanos. Es en base a este binomio, en donde dirige 11 tesis de licenciatura, 13 de maestría y 10 de doctorado.

Uno de los aspectos de mayor singularidad en la carrera del **Dr. Federico Sánchez**, fue su alta capacidad para desarrollar colaboraciones con grupos tanto nacionales así como internacionales. No se requiere explorar mucho para entender este aspecto de su vida académica, todo está fundamentado en su gran generosidad, la alta calidad científica de sus trabajos y en su clara valoración del compartir. Lo anterior se refleja en su participación como organizador de congresos y reuniones tanto nacionales como internacionales, el otorgamiento del Premio Nacional en Alimentos, Especialidad en Biotecnología Vegetal Moderna (1987), su designación como presidente de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, su designación como Presidente Electo de la "International Society of Plant-Microbe Interaction, miembro de la American Society of Plant Biologist, Editor de la Revista Molecular Plant-Microbe Interactions, Miembro del Internacional Board de la Internacional Society of Molecular Plant-Microbe Interactions, solo por mencionar algunas distinciones.

En el aspecto institucional, las actividades del **Dr. Sánchez** son innumerables, basta señalar que en 1981 fue secretario académico del recién creado Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM y a partir de 1982, participó en múltiples Comisiones Dictaminadoras, Comités y Comisiones Evaluadoras, Consejos Internos, Comités Académicos. Fue nombrada por el rector **Dr. Juan Ramón de la Fuente** como miembro de la Comisión *ad hoc* para la formación de la Licenciatura en Ciencias Genómicas, igualmente fungió como evaluador del CONACyT y de otras muchas instituciones académicas y de investigación del país.

Recopilar todos y cada uno de los logros del **Dr. Federico Sánchez** es materia de un trabajo extenso y no es la pretensión de esta semblanza.

Permítaseme concluir diciendo que muy pocas personas en el mundo académico de este México, han sido tan admiradas, seguidas, respetadas y queridas como lo fue el Dr. Federico Sánchez, es sin duda un referente a seguir para las nuevas generaciones. Todos los que fuimos honrados con su amistad y tuvimos la distinción de convivir con él, sin lugar a duda lo recordaremos por el resto de nuestros días.

Dr. Miguel Lara Flores
Coordinador de Vinculación Institucional.
Secretaria de Desarrollo Institucional de la
Universidad Nacional Autónoma de México.
E-mail: mlara@unam.mx



www.smbb.com.mx