

MECANISMOS DE INHIBICIÓN DE LA METANOGÉNESIS CON LOVASTATINA Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Inhibition mechanisms of methanogenesis with lovastatin and analysis of gene expression

Naxhie LÓPEZ-REYES^{1,2}, Amaury ÁBREGO-GARCÍA¹ y Héctor Mario POGGI-VARALDO^{1*}

¹ Grupo de Biotecnología Ambiental y de Energías Renovables, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, Apdo. Postal 14-740, 07000, Ciudad de México, México.

² División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1a. Sección, 09340 Ciudad de México, México.

*Autor para correspondencia: lazarillodetormes1001@gmail.com

(Recibido: junio 2021; aceptado: enero 2022)

Palabras clave: coenzima F₄₂₀, estatinas, genes, metanógenos

RESUMEN

Las arqueas metanogénicas (AM) coexisten con la microbiota ruminal y utilizan H₂ como donador de electrones para convertir CO₂ en CH₄. Este último es un potente gas atmosférico causante del efecto invernadero que tiene un impacto importante en el calentamiento global y el cambio climático. La lovastatina (Lv) es un medicamento para el tratamiento de hipercolesterolemia en humanos que también reduce la producción de CH₄ en rumiantes. Esta revisión demuestra que existen diversos mecanismos sinérgicos que en conjunto afectan directamente la metanogénesis. El ácido mevalónico es el precursor clave de la síntesis de isoprenoides, los cuales constituyen la membrana de las AM. La Lv β-hidroxiácida, que es la forma activa de la molécula, es un inhibidor competitivo de la enzima reductasa 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMGCR), que es clave para la producción de los precursores de isoprenoides que forman la membrana de AM. Este es el mecanismo al cual se atribuye principalmente la inhibición de la metanogénesis con Lv. Se han reportado mecanismos alternos que inciden en la inhibición de la metanogénesis, tales como la supresión de las enzimas de la metanogénesis que dependen del cofactor F₄₂₀ y el aumento de la concentración de la acetil-coenzima A sintetizada a partir de metil-tetrahidrometanopterin (metil-H₄MPT). Se ha estudiado la expresión de algunos genes clave en la ruta metabólica de la metanogénesis en *Methanobrevibacter smithii* en condiciones de inhibición con Lv. Se ha demostrado que se incrementó la expresión del gen de la HMGCR y se redujo la del gen de la NADP-oxidoreductasa dependiente de la coenzima F₄₂₀ (NFOR).

Key words: coenzyme F₄₂₀, genes, methanogens, statins

ABSTRACT

Methanogenic archaea coexist within the rumen microbiota, converting CO₂ into CH₄ and using H₂ as an electron donor. Methane is a potent greenhouse gas that impacts climate change and global warming. Lovastatin (Lv) is a drug used to decrease hypercholesterolemia in human beings and can be used to reduce CH₄ production from ruminants. This review shows that there are several synergistic mechanisms that can directly disrupt methanogenesis. Mevalonic acid is a crucial precursor for the synthesis of methanogen's isoprenoids. It is also a metabolite found in microorganisms of the Eukarya and Archaea domains. The β-hydroxy acid form of Lv is a competitive inhibitor of the reductase 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMGCR), a crucial enzyme for the synthesis of isoprenoid precursors. In most reports, this is the mechanism for the inhibition of methanogenesis associated with Lv. However, alternate mechanisms for inhibition of methanogenesis have been reported, such as inhibition of cofactor F₄₂₀-dependent enzymes and the increase in the concentration of acetyl-CoA synthesized from methyl-H₄MPT. The expression of some essential genes in the metabolic pathway of *Methanobrevibacter smithii* methanogenesis has been studied under conditions of inhibition with Lv treatment. Results indicated an increased expression of the HMGCR gene, whereas the expression of NADP-oxidoreductase dependent on coenzyme F₄₂₀ gene (*fno*) was significantly reduced.

INTRODUCCIÓN

El CH₄ es un gas de efecto invernadero (GEI) que tiene un impacto importante en el cambio climático. Su potencial de calentamiento global es 25 veces más potente que el CO₂ (Mora et al. 2013) y se estima que la mayor fuente antrópica de CH₄ atmosférico es generada por la ganadería (Scheehle y Kruger 2006, Altermann et al. 2018, Saunio et al. 2020).

En general, las comunidades microbianas del rumen se asocian para degradar los componentes de la dieta, generando ácidos grasos volátiles (AGV), H₂ y CO₂ como principales productos de fermentación (Leahy et al. 2010). Las arqueas metanogénicas (AM) que habitan en el rumen emplean estos últimos dos compuestos y algunos otros, para producir energía, lo que a su vez genera CH₄ como producto final. Este fenómeno, también conocido como “emisión entérica de CH₄”, representa aproximadamente el 30 % de las emisiones globales de CH₄ (Leahy et al. 2010). Las principales arqueas productoras de CH₄ en el rumen pertenecen al género *Methanobrevibacter* (Tapio et al. 2017). Éstas usan el H₂ producido por eubacterias fermentativas, protozoariosciliados y hongos anaerobios, como donador de electrones para reducir el CO₂ a CH₄ (Cammack et al. 2018). Además de su contribución en el calentamiento global, la producción de CH₄ entérico representa una pérdida del 2 al 12 % de la energía bruta de los alimentos (Jonhson y Jonhson 1995). En este contexto, la reducción de

CH₄ entérico también podría significar un incremento en la eficiencia del metabolismo energético para el animal hospedero (Tapio et al. 2017).

Por lo anterior, en los últimos años se ha publicado varias propuestas para inhibir la producción de CH₄ entérico, siendo una opción la suplementación con lovastatina (Lv), un fármaco de la familia de las estatinas que ha mostrado potencial para reducir las emisiones de CH₄ entérico en rumiantes (Candyrine et al. 2018, Mohd-Azlan et al. 2018). Esto se debe a su capacidad para alterar la fisiología de las AM a diferentes niveles: interrumpe la síntesis de la membrana celular, impide la cadena respiratoria de la metanogénesis unida a la membrana y afecta negativamente el crecimiento de metanógenos (Miller y Wolin 2001, Gottlieb et al. 2016). Además, se ha propuesto que puede inhibir la actividad de las enzimas dependientes del cofactor F₄₂₀ (Sharma et al. 2011).

El objetivo de este trabajo fue efectuar una revisión de los mecanismos por los cuales la Lv afecta la metanogénesis en AM, y el efecto de este compuesto sobre la expresión de los genes implicados. El alcance de esta revisión incluye los siguientes temas: (i) síntesis de la membrana celular de AM; (ii) la Lv como inhibidor de la metanogénesis; (iii) inhibición de producción de CH₄ en microorganismos del género *Methanobrevibacter* y (iv) efecto de la Lv sobre la expresión de genes relacionados con la metanogénesis.

ARQUEAS METANOGÉNICAS

Woese y Fox (1977) descubrieron que las secuencias de ARN y otras características fisiológicas de un grupo de procariotas eran diferentes a las de las bacterias y clasificaron a este grupo en un nuevo dominio: Archaeabacteria (ahora Archaea). El dominio Archaea se divide en diferentes filos: Aigarchaeota, Bathyarchaeota, Crenarchaeota, Crenarchaeota *de aguas termales* Euryarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota, Thaumarchaeota, y el más reciente Verstraetearchaeota (Baptiste et al. 2005, Guy et al. 2014, Vanwonterghem et al. 2016, Berghuis et al. 2019). Con base en las primeras secuencias completas de genes de arqueas y análisis bioinformáticos, se sugirió que si bien las arqueas contienen cromosomas circulares como las bacterias, las proteínas implicadas en la replicación del ADN están más estrechamente relacionadas con las de eucariotas que con las de bacterias. Desde entonces, los estudios filogenéticos, bioquímicos y genéticos han demostrado la relación entre los sistemas de replicación de ADN de las arqueas y los eucariotas (Gilmore et al. 2017).

En el rumen las AM producen un 1 mol de metano y consumen 4 moles de hidrógeno, $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ (Demirel y Schere 2008, Cammack et al. 2018). Estos microorganismos realizan un tipo de respiración anaerobia conocida como metanogénesis, la cual ocurre a potenciales de oxidación-reducción muy bajos en comparación con otras formas de respiración anaerobia (Liu y Whitman 2008). De acuerdo con su fuente de energía, las AM se clasifican en tres grupos: 1) hidrogenotróficas, que usan H_2 o formiato, 2) metilotróficas, que usan compuestos de metilo y 3) las acetoclásticas, que usan acetato (Liu y Whitman 2008). Recientemente, la secuenciación de nuevos genomas y metagenomas ha dado lugar a la identificación de nuevos clados de metanógenos, por ejemplo, el clado Methanomassiliicoccales (Borrel et al. 2014) o el clado Methanonatronarchaeia (Sorokin et al. 2017). Debido a que las AM ruminales constituyen la fuente más importante de emisiones de CH_4 , se ha incrementado el interés para desarrollar estrategias de mitigación de metano ruminal (Beauchemin et al. 2020).

Síntesis de la membrana celular en arqueas metanogénicas

La membrana celular de las arqueas es una de sus características más notables y las distingue de los dominios Bacteria o Eukarya (Guy et al. 2014). En las arqueas, las cadenas hidrocarbonadas están formadas por grupos de isoprenoides unidos por

enlaces éster de glicerol enantiomérico formando glicerol-1-fosfato (G1P). Por el contrario, en bacterias y eucariotas el glicerol-3-fosfato (G3P) está unido por enlaces éster a dos ácidos grasos. Por otro lado, los grupos de cabeza polar (serina, etanolamina, glicerol y mioinositol) se encuentran en los fosfolípidos de los tres dominios (Jain et al. 2014).

Existe una amplia gama de lípidos relacionados con las arqueas. Los más comunes son lípidos de diéter (o arqueol) y tetraéteres (o caldarqueol), los cuales forman una monocapa (Gottlieb et al. 2016). Los lípidos unidos a éter no son exclusivos de las arqueas, también se encuentran en Bacteria y Eukarya, aunque no están distribuidos de forma ubicua y, por lo general, son un componente menor de la membrana lipídica (Koga y Morii 2007, Jain et al. 2014). Se ha formulado la hipótesis de que la estéreo-especificidad de los lípidos en la membrana celular de las arqueas y su estructura única es químicamente más estable, con lo cual las arqueas tienen la capacidad de resistir y prosperar en condiciones ambientales extremas (Koga 2012). Sin embargo, los lípidos de las arqueas también se encuentran en entornos mesófilos de los que todavía no se ha postulado su función estructural (Jain et al. 2014).

Los isoprenoides se encuentran en los tres dominios y son estructuralmente diversos, formando más de 30 mil compuestos diferentes en la naturaleza que van desde esteroides y quinonas a carotenoides y lípidos de membrana. Los componentes básicos de los isoprenoides son subunidades universales de cinco carbonos llamadas pirofosfato de isopentenilo (IPP) y pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), que son isómeros. La vía biosintética que conduce a la síntesis de IPP y DMAPP varía en diferentes organismos. Hasta ahora, se han informado tres vías: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato/1 deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (MEP/DOXP) y dos vías de mevalonato (MVA), una clásica y una alterna. Los genes de la vía MEP/DOXP no comparten homología con los genes de la vía MVA, donde las moléculas de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato se condensan en una sola para formar 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) que posteriormente se convierte en IPP y DMAPP por cinco enzimas. La vía MEP/DOXP es la más común entre las bacterias (Jain et al. 2014).

La vía del MVA consta de siete reacciones enzimáticas en las que se condensan dos moléculas de acetyl-CoA formando acetoacetyl-CoA. Ésta, a su vez, también se condensa para producir 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) y se somete a una fosforilación y descarboxilación mediada

por la enzima HMGCR para formar IPP por la ruta MVA. La vía clásica de MVA es común en los eucariotas, mientras que algunas plantas y eucariotas fotosintéticos poseen además la vía MEP/DOXP. La vía alternativa de MVA difiere de la vía clásica de MVA en los últimos tres pasos. En la vía alternativa de MVA, el fosfomevalonato se descarboxila a fosfato de isopentenilo mediante una descarboxilasa, que posteriormente se fosforila a IPP por la enzima isopentenil quinasa (Jain et al. 2014).

En general, IPP y DMAPP se sintetizan por la vía MEP/DOXP en la mayoría de las bacterias y por dos vías de MVA en Eukarya y Arqueas. La presencia de unidades de isoprenoides sensibles a estatinas en la membrana celular de las arqueas permite que las estatinas interfieran selectivamente con el crecimiento de las arqueas sin afectar la membrana celular de las bacterias (Miller y Wolin 2001). Si bien las bacterias no usan unidades de isoprenoides en su membrana celular, requieren a los isoprenoides en otros lugares y en conformaciones diferentes. Sin embargo, estas unidades bacterianas de isoprenoides son sintetizadas por la vía MEP/DOXP que no es inhibida por las estatinas. La vía clásica de MVA en Eucariotas y la vía alternativa de MVA en las Arqueas comparten cuatro de sus siete pasos (Gottlieb et al. 2016).

Las unidades de isoprenoides IPP y DMAPP que componen las membranas en las arqueas experimentan reacciones de condensación en serie donde DMAPP actúa como el primer aceptor alílico de IPP que conduce a la formación de un compuesto de 10 carbonos (C10) denominado geranil difosfato (GPP). Otras reacciones de condensación proceden con la adición de moléculas de IPP, donde la longitud de la cadena aumenta cada vez por una unidad de C5 formando farnesilo (C15), geranilgeranilo difosfato (C20), farnesilgeranil difosfato (C25) y así sucesivamente. Esta reacción de alargamiento de la cadena es catalizada por enzimas que pertenecen a la familia de las preniltransferasas que son comunes en los tres dominios. Dependiendo de la longitud y la geometría de la molécula final conformada, las preniltransferasas pueden tener varios miembros en su familia. La geometría de las enzimas puede ser cis o trans, y la longitud de la cadena de isoprenoides de la forma trans generalmente varía de C10 (como en los monoterpenos) a C50 (como en la coenzima Q10). La longitud de la cadena que se encuentra en los lípidos de la membrana de AM es siempre de la forma trans y está compuesta principalmente por C20 geranilgeranilo difosfato o C25 farnesilgeranil difosfato (Jain et al. 2014).

Lovastatina y su efecto inhibitorio sobre la meta-nogénesis

La Lv ($C_{24}H_{36}O_5$, PM 404.54 g/mol) fue la primera estatina aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EUA (FDA por su sigla en inglés) en 1987 (Endo 2010). Es un metabolito secundario en hongos y es sintetizada por *Aspergillus terreus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Monascus ruber*, *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus* y *Penicillium citrinum*. Estos hongos están implicados en procesos fermentativos en modalidades de fermentación en sustrato sólido y de cultivo sumergido. La biosíntesis de estatina por estos microorganismos depende tanto de la cepa de hongo como de su estado metabólico, entre otros factores (Chegwin 2012, Morgavi et al. 2014).

Uno de los aspectos más relevantes de la química de las estatinas es su estructura, tanto de anillo abierto (lactona [Lv-L]) como de anillo cerrado (β -hidroxiácido [Lv-H]). La Lv-L es tres a cuatro veces más lipofílica en comparación con su forma ácida, lo cual quiere decir que, en la estructura de lactona, la Lv está mejor dotada para cruzar las membranas lipídicas (Fong 2014).

La Lv puede inhibir la generación de CH_4 a través de los siguientes mecanismos: 1) reduciendo el crecimiento y reproducción de las AM mediante la alteración de la síntesis de la membrana celular, y 2) inhibiendo la actividad de enzimas que participan en la reducción del CO_2 (e.g., NADP-oxidoreductasa dependiente de la coenzima F_{420} [NFOR]). La alteración de la síntesis de la membrana celular de las AM ocurre debido a que la Lv tiene la capacidad de inhibir la actividad enzimática de HMGCR, enzima que cataliza la reducción de HMG-CoA a MVA, el cual es un precursor de la síntesis de los isoprenoides que conforman la membrana celular (Seenivasan et al. 2008). La enzima HMGCR se puede encontrar en dos formas diferentes: en eucariotas y arqueas como HMGCR clase I (unida a la membrana) y en algunas bacterias como HMGCR clase II (citósolica) (Pérez y Rodríguez 2013).

Además de inhibir las enzimas HMGCR clase I en las AM, la Lv también puede inhibir esta enzima en los hongos ruminales, lo que podría reducir las poblaciones de estos microorganismos (Chamilos et al. 2006). La degradación de la celulosa por hongos ruminales genera una gran cantidad de H_2 (aproximadamente el 44 % del gas total del rumen). Además, se ha reportado que los hongos ruminales *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces communis* y *Caecomyces communis*, producen de siete a 10 veces más formiato que las bacterias celulolíticas (Bernalier et al. 1992). Dado que el H_2 y el formiato son los principales sustratos para la

producción de CH₄ en AM (Demirel y Schere, 2008; Tapio et al. 2017), la reducción de las poblaciones de hongos por efecto de la Lv también puede disminuir la producción de CH₄ entérico (Jahromi et al. 2013a).

Otro mecanismo mediante el cual la Lv puede inhibir la producción de CH₄, es a través de la inhibición de la actividad de enzimas que participan en la reducción del CO₂ durante la metanogénesis, específicamente aquellas que requieren de la coenzima F₄₂₀ (Sharma et al. 2011). Ésta es un transportador de dos electrones que se encuentra en arqueas y algunas bacterias, y está implicada en pasos tempranos de la metanogénesis, además de tener funciones cruciales en la biosíntesis de antibióticos y en la reparación del ADN. Su nombre proviene de la intensa absorbancia/fluorescencia que presenta a 420 nm (emisión a 480 nm), que depende de la reacción redox y se pierde con la reducción del cofactor F₄₂₀; además, es responsable de la fluorescencia que caracteriza a las AM y fundamenta la metodología utilizada para su identificación (Bashiri et al. 2010).

Experimentos de acoplamiento de proteína-ligando in silico sugieren que la Lv puede tener una mayor afinidad por el sitio de unión a F₄₂₀ en este tipo de enzimas que la misma coenzima F₄₂₀. En los modelos in silico, la coenzima F₄₂₀ se une como grupo prostético al sitio activo de la enzima, como normalmente ocurre en la naturaleza. Sin embargo, el estudio de predicción de inhibidores reveló que la Lv tiene una afinidad de reacción de -22.07 kcal/mol y la mevastatina una afinidad de reacción de -21.91 kcal/mol. Esto indica que existe una mayor afinidad por la estructura modelo de la enzima NFOR con la Lv en comparación con la de la coenzima F₄₂₀, la cual tan solo mostró una afinidad de reacción de -14.40 kcal/mol. A su vez, esto sugiere que la Lv y la mevastatina pueden actuar como inhibidores potenciales de la enzima NFOR, alterando los pasos de la ruta metanogénica en los que se encuentre implicada la coenzima F₄₂₀ (Sharma et al. 2011). Otra proteína dependiente de F₄₂₀, que también se utilizó como modelo para comprobar en experimentos in silico la afinidad por el sitio activo de la Lv, fue la enzima metileno-tetrahidrometanopterina deshidrogenasa (M-H₄MPTD) dependiente de F₄₂₀ en *Mbb. smithii*, donde se observó nuevamente mayor afinidad de la Lv en comparación con la coenzima nativa F₄₂₀ (Muskal et al. 2016).

Inhibición de la generación de metano en el género *Methanobrevibacter*

Se considera que los microorganismos pertenecientes al género *Methanobrevibacter* son los metanógenos dominantes del rumen. Las secuencias típicas se

dividen en dos clados principales, *Mbb. gottschalkii* (33.6 %) (que incluye a *Mbb. gottschalkii*, *Mbb. millerae* y *Mbb. thaueri*) y *Mbb. ruminantium* (27.3 %) (que incluye a *Mbb. ruminantium* y *Mbb. olleyae*), que pueden representar en promedio el 62 % o más de las arqueas del rumen (Miller y Lin 2002, Leahy et al. 2013, Ábrego-García et al. 2021).

En los clados de *Methanobrevibacter* las especies mencionadas tienen diferencias en la secuencia del gen 16S rRNA menores al 3 %, y la decisión de describir múltiples especies se basó en gran medida en las diferencias entre los genomas según lo determinado por la hibridación de ADN-ADN, así como en limitadas diferencias fenotípicas (Janssen y Kirs 2008). Por esta razón, los microorganismos pertenecientes al género *Methanobrevibacter* en general se han utilizado como cepas modelo para estudiar la inhibición de metano, como se describe a continuación.

El trabajo pionero de Miller y Wolin (2001) con cepas puras del género *Methanobrevibacter* en cocultivo con bacterias fibrolíticas y celulolíticas demostró que la Lv pura en una concentración de 4 mg/l inhibió por completo la producción de metano. Este resultado fue confirmado por Demonfort et al. (2017) en condiciones similares, con administración de Lv pura en concentraciones de 1, 2 y 4 mg/L con las cepas *Mbb. smithii*, *Mbb. oralis*, *Mbb. masiliense*, *Mbb. Arboriphilus* y *Methanomassiliococcus luminyensis*, en cocultivo con bacterias anaerobias del sistema digestivo de seres humanos.

A diferencia de los dos trabajos anteriormente mencionados, Jahromi et al. (2013a) reportaron que la tasa de crecimiento y metanogénesis de *Mbb. smithii* fue inhibida significativamente con Lv comercial (la cual contenía 98 % en forma de Lv-L) y con un extracto metanólico de arroz fermentado (EMAF), el cual contenía 75 % en forma activa de Lv-H. Con base en esto, las concentraciones “aparentes” en la forma Lv-H fueron de 0.02, 0.20 y 1 mg/L, y de 0.73, 7.3 y 36.5 mg/L para los tratamientos con Lv comercial y EMAF, respectivamente. Se observa que ambos tratamientos inhibieron significativamente el crecimiento y producción de CH₄ en *Mbb. smithii*. Esto probablemente se deba a que si bien la forma inactiva Lv-L no posee la estructura conformacional para ser el inhibidor enzimático de la HMGCR, pudo hidrolizarse a Lv-H en las condiciones del medio de cultivo y tiempo de incubación de 72 h (Beltrán et al. 2019). Esto resultaría en un efecto antimetanogénico similar al de los EMAF, los cuales tenían una proporción mayor de Lv-H activa.

Como se mencionó anteriormente, se ha postulado que los efectos de los inhibidores de HMGCR están relacionados con la alteración de la membrana celular al interferir con la biosíntesis de isoprenoides (Gottlieb et al. 2016). Sin embargo, existen evidencias de un mecanismo adicional antimetanogénico asociado a la Lv (Muskal et al. 2016) y esto podría ser relevante para explicar algunos de los resultados observados con diferentes tipos de estatinas.

La ruta metanogénica a partir de la reducción de CO₂ a CH₄ requiere de cofactores únicos (ferredoxina, metanofurano, tetrahidrometanopterin y coenzima F₄₂₀), que no se encuentran en la ruta acetoclástica (Ferry 2011). Si bien la metanogénesis en *Mbb. smithii* puede proceder sólo con H₂ y CO₂, hay evidencia de que *Mbb. smithii* puede utilizar otros productos de fermentación bacteriana como alcohol y metanol para la metanogénesis utilizando la enzima NFOR en conjunto con el grupo prostético de la coenzima F₄₂₀ (Samuel et al. 2007).

Por otra parte, Hubert et al. (2018) reportaron en estudios in vitro que la Lv-L inhibió la producción de CH₄ en muestras de heces de seres humanos donde se identificó *Mbb. smithii*. Sin embargo, la forma Lv-H activa encargada de disminuir los niveles de colesterol fue ineficaz para reducir la generación de CH₄ en el sistema de estudio.

EFFECTO DE LA LOVASTATINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA METANOGENESIS

Jahromi et al. (2013b) evaluaron la expresión de algunos genes clave en la ruta metanogénica de *Mbb. smithii* en condiciones de inhibición con dos tratamientos: Lv comercial y EMAF. En general, los resultados demostraron que ambos tratamientos incrementan ($P < 0.05$) la expresión del gen *mhg* que codifica para la enzima HMGCR.

El tratamiento con EMAF tuvo un efecto significativo sobre la expresión del gen *hmd* que codifica para la enzima M-H₄MPTD, la cual lleva a cabo la conversión del metinil-H₄MPT a metileno-H₄MPT en pasos intermedios de la ruta metabólica de la metanogénesis en AM. El gen *mrc* que codifica para la metil coenzima M reductasa, enzima final de la ruta metanogénica, se incrementó con el EMAF.

Los tratamientos de Lv comercial y EMAF redujeron ($P < 0.05$) la expresión del gen *fno*, que codifica para la enzima NFOR. Esto coincide con lo reportado por Sharma et al. (2011), quienes demostraron que la Lv puede actuar como un inhibidor de la enzima NFOR en el género *Methanobrevibacter*.

En el tratamiento con EMAF como conductor de Lv hubo un incremento significativo sobre la expresión del gen *mtr* que codifica para la enzima metil-H₄MPT:coenzima M metil-transferasa, que traslada el grupo metilo de metil-H₄MPT al metabolito HS-coenzima M formando metil-coenzima M (Jahromi et al. 2013b), así como del gen *mta* que codifica para la enzima metanol:cobalamina metiltransferasa, la cual cataliza la conversión de metanol a COR-CH₃ y la producción de CH₄ durante la metanogénesis (Ferry 2011).

Samuel et al. (2007) observaron que la Lv disminuyó la expresión del gen *fno* que codifica para la enzima NFOR en el género *Methanobrevibacter*. La alteración del gen *fno* sugiere que la Lv interfiere con la síntesis del precursor de CH₄, metil-H₄MPT en pasos alternos de la metanogénesis debido a la inhibición de la coenzima F₄₂₀.

La coenzima F₄₂₀ actúa en tres diferentes pasos: dos pasos metabólicos intermedios contiguos y uno alterno e independiente en la metanogénesis. La coenzima F₄₂₀ es cofactor para la enzima M-H₄MPTD dependiente de F₄₂₀ codificada en el gen *mtd*, la enzima NFOR codificada en el gen *fno*, la cual está involucrada en una ruta metabólica alternativa de la metanogénesis que utiliza metanol y etanol como sustrato que actúa cuando el sustrato H₂ no está disponible, y la enzima metileno-tetrahidrometanopterin reductasa codificada en el gen *mer* (Ferry 2011).

Todas estas enzimas y genes están implicados en pasos cruciales para la formación de CH₄ (Reeve et al. 1997), ya que repercuten en la síntesis del compuesto metil-H₄MPT. Éste, a su vez, influye en la acumulación de acetyl-CoA, ya que *Mbb. smithii* es capaz de utilizar el metil-H₄MPT para llevar a cabo reacciones en la biosíntesis de acetyl-CoA, el cual se encuentra como un compuesto intermedio de la metanogénesis. Esto resulta en la represión por retroalimentación de las enzimas y por consecuencia de los genes que contribuyen a la síntesis de acetyl-CoA, un elemento indispensable en procesos celulares y metabólicos (Hendrickson et al. 2007). Así, parecería que hay un mecanismo de acción alternativo con amplia afinidad de Lv por la coenzima F₄₂₀, debido a que la inhibición de la ruta metabólica de biosíntesis de isoprenoides requiere mayor biosíntesis de acetyl-CoA, el cual está disponible a partir de metil-H₄MPT. Este metabolito no llega a concretarse como CH₄, razón por la cual los genes de enzimas implicados en la metanogénesis en pasos posteriores a la formación de metil-H₄MPT están sobreexpresados (Sharma et al. 2011).

Estudios in vitro han confirmado que la Lv-H tiene mayor efecto sobre la disminución de CH₄ y el

crecimiento de *Methanobrevibacter* en comparación con la Lv comercial Lv-L. Se demostró que hubo un efecto significativo en el gen *hmd* con EMAF pero no con Lv comercial. Se observó que con Lv comercial y EMAF se redujo la expresión del gen *adh*, que codifica la enzima alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP, la cual cataliza la reducción de F₄₂₀ con NADPH (Berk y Tahuer 1997); sin embargo, esta subexpresión del gen no se consideró significativa ($P < 0.05$) (Jahromi et al. 2013b).

Las transcripciones de los genes *hmd*, *adh* y *fno* fueron disminuidas en *Mbb. smithii* después de la exposición a Lv. La interferencia de ésta en la síntesis de los precursores de isoprenoides puede provocar un aumento de la acumulación de acetil-CoA en el grupo metabólico, lo que resulta en supresión de los genes que contribuyen a la síntesis de metil-H₄MPT. Se observó un decremento de CH₄ a pesar de la sobreexpresión de los genes *mcrA* y *mta* implicados en los últimos pasos de la metanogénesis. Esta observación corrobora que en presencia de Lv, aunque exista una sobreexpresión de estos genes, éstos no influyen en la producción final de CH₄ debido a que el consumo del metabolito intermedio Metil-H₄MPT se destina a la síntesis de acetil-CoA. La Lv comercial no tiene efecto en la expresión del gen *mcr*, pero EMAF aumentó la expresión de este gen en *Mbb. smithii*. En los metanógenos los genes *mtr*, *mcr* y *mta* en presencia de Lv funcionan en cohorte para disipar los depósitos intracelulares de metil-H₄MPT ocasionados por la alta afinidad de la Lv en suplir al cofactor F₄₂₀ en los pasos metabólicos anteriores inmediatos (Jahromi et al. 2013b). El gen *mcrA* cataliza el último paso de la metanogénesis y reduce el grupo metilo unido a la Co-M, liberando CH₄ con la enzima metil coenzima-M reductasa subunidad alfa, la cual es la subunidad funcionalmente activa (Ferry 2011).

La presencia de los genes *mcr* define a un microorganismo como metanógeno, e históricamente las enzimas de *mcr* han sido las más estudiadas en relacionadas con la metanogénesis. Además, se considera un marcador molecular para detectar o clasificar metanógenos en un consorcio (Evans et al. 2019).

Todos los genes *mcr* se han caracterizado a partir de diversos metanógenos, que contienen subunidades a, b y g codificadas por los genes *mcrA*, *mcrB* y *mcrG*, respectivamente, ubicados dentro del operón *mcrBDCGA* (Reeve et al. 1997).

En otro resultado de investigación en expresión génica, Demonfort et al. (2017) reportaron que la inhibición del crecimiento de los metanógenos se correlacionó con una mayor expresión del gen *hmg*,

que inhibe la síntesis del ácido mevalónico durante la síntesis de la membrana celular. Además, la baja concentración de ácido mevalónico producida por HMG-CoA no catalizado por HMGCR es el factor de control para la expresión ascendente del gen *hmg*. Estas observaciones corroboran que una sobreexpresión del gen *hmg* está asociada con una baja producción de ácido mevalónico y una deficiente síntesis de las membranas celulares de las AM. En conjunto, estos resultados sugieren que una reducción en la generación de CH₄ y el crecimiento deficiente de las AM se debió a la inhibición de la síntesis de ácido acetil-CoA y ácido mevalónico por disminución de la expresión del gen *fno* y mayor expresión del gen *hmg*, respectivamente.

CONCLUSIÓN

Esta revisión demuestra que la inhibición directa de ciertos puntos clave en la metanogénesis por diversos mecanismos que actúan de manera sinérgica, da como resultado una producción disminuida de CH₄ utilizando Lv. El ácido mevalónico, un metabolito intermedio común de los dominios Eukarya y Archaea, es el precursor clave para la síntesis de isoprenoides en metanógenos. La Lv-H es un inhibidor competitivo de la HMGCR, enzima clave para la producción de los precursores de isoprenoides. Éste es el mecanismo indirecto al cual se atribuye la inhibición de la metanogénesis en la mayor parte de los casos. Sin embargo, se han reportado mecanismos alternos que producen la inhibición por Lv de la metanogénesis, tales como inhibición de las enzimas dependientes del cofactor F₄₂₀ y el aumento de la concentración del metabolito acetil-CoA sintetizado a partir de metil-H₄MPT, entre otros.

La evidencia sugiere que la Lv actúa a varios niveles sinérgicos inhibiendo la metanogénesis y, por lo tanto, puede ser considerada como una posible estrategia para mitigar las emisiones de metano ruminal. Se ha estudiado la expresión de algunos genes clave en la ruta metabólica de la metanogénesis de *Mbb. smithii* en condiciones de inhibición con Lv. En general, los resultados han demostrado que la Lv incrementa ($P < 0.05$) la expresión del gen de la enzima HMGCR. También hay evidencia de que estos tratamientos con Lv reducen la expresión del gen *fno*, el cual codifica para la enzima NFOR ($P < 0.05$).

La manera en que podría administrarse Lv a los rumiantes para que actúe en sitios estratégicos aún no está resuelta y plantea un reto a futuro para desarrollar tecnologías que coadyuven a disminuir la emisión

de CH₄ entérico ruminal y contrarrestar sus efectos sobre el calentamiento global y el cambio climático.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento del CONACYT a través del proyecto “Estudios sobre mitigación de producción de metano ruminal de bovinos utilizando lovastatina”, SEP-CONACYT, CB 2018-1, No. A1-S-26901, concedido a uno de los autores (HMP-V). Se agradece también a la Dra. Jazmín Méndez Hernández (Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa) la revisión crítica del manuscrito, que fue enviado originalmente a la *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, así como otros apoyos y contribuciones.

La primera autora agradece al CONACYT la beca de pregrado de estancia de investigación en el Grupo de Biotecnología Ambiental y de Energías Renovables, L-33 y L-34, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Zacatenco, y al Dr. Oscar Armando Monroy Hermosillo, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

NOTACIÓN

AGV	ácidos grasos volátiles ó de bajo peso molecular
AM	arqueas metanogénicas
DMAPP	pirofosfato de dimetil-alilo
DXP	1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato
EMAF	extracto metanólico de arroz fermentado
F ₄₂₀	coenzima F ₄₂₀
GEI	gas de efecto invernadero
G1P	glicerol-1-fosfato
G3P	glicerol-3-fosfato
GPP	geranil difosfato
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HMGCR	reductasa 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A
IPP	pirofosfato de isopentenilo
Lv	lovastatina
Lv-H	lovastatina p-hidroxiácida
Lv-L	lovastatina lactona
Mbb	<i>Methanobrevibacter</i>
Metil-H ₄ MP	metil-tetrahidrometanopterin
MEP/DOXP	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato/1 deoxi-D-xilulosa 5-fosfato

M-H ₄ MPTD	metileno-tetrahidrometanopterin deshidrogenasa
MVA	mevalonato
NFOR	NADP-oxidoreductasa dependiente de la coenzima F ₄₂₀

REFERENCIAS

- Ábrego-García A., Poggi-Varaldo H.M., Mendoza-Vargas A., Mercado-Valle F.G., Ríos-Leal E., Ponce-Noyola T. y Calva-Calva G. (2021). Effects of fermented oat straw as lovastatin-carrier on in vitro methane production and rumen microbiota. *Front. Energy Res.* 9. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.630701>
- Altermann E., Schofield L.R., Ronimus R.S., Beatty A.K. y Reilly K. (2018). Inhibition of rumen methanogens by a novel archaeal lytic enzyme displayed on tailored bionanoparticles. *Front. Microbiol.* 9, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02378>
- Bapteste E., Brochier C. y Boucher Y. (2005). Higher-level classification of the Archaea: Evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1, 353-63. <https://doi.org/10.1155/2005/859728>
- Bashiri G., Rehan A.M., Greenwood D.R., Dickson J.M.J. y Baker E.N. (2010). Metabolic engineering of cofactor F₄₂₀ production in *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS ONE* 5 (12), e15803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015803>
- Beauchemin K.A., Ungerfeld E.M., Eckard R.J. y Wang M. (2020). Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal* 14 (S1), S2-S16. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003100>
- Beltrán D., Frutos-Lisón M.D., Espin J.C., García-Villalba R. (2019). Re-examining the role of the gut microbiota in the conversion of the lipid-lowering statin monacolin K (lovastatin) into its active P-hydroxy acid metabolite. *Food Funct.* 10, 1787-1791. <https://doi.org/10.1039/C8FO02594K>
- Berghuis B.A., Yu F.B., Schulz F., Blainey P.C., Woyke T. y Quake S.R. (2019). Hydrogenotrophic methanogenesis in archaeal phylum Verstraetearchaeota reveals the shared ancestry of all methanogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116 (11), 5037-5044. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815631116>
- Berk H. y Thauer R.K. (1997). Function of coenzyme F₄₂₀-dependent NADP reductase in methanogenic Archaea containing an NADP-dependent alcohol dehydrogenase. *Arch. Microbiol.* 168 (5), 396-402. <https://doi.org/10.1007/s002030050514>
- Bernalier A., Fonty G., Bonnemoy F. y Gouet P. (1992). Degradation and fermentation of cellulose by the rumen

- anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria. *Curr. Microbiol.* 25 (3), 143-148. <https://doi.org/10.1007/BF01571022>
- Borrel G., Parisot N., Harris H.M., Peyretailade E., Gaci N., Tottey W., Bardot O., Raymann K., Gribaldo S. y Peyret P. (2014). Comparative genomics highlights the unique biology of *Methanomassiliicoccales*, a *Thermoplasmatales* related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics* 13 (15), 679. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-679>
- Cammack K.M., Austin K.J., Lamberson W.R., Conant G.C. y Cunningham H.C. (2018). Ruminant Nutrition Symposium: Tiny but mighty: the role of the rumen microbes in livestock production. *J. Anim. Sci.* 96 (2), 752-770. <https://doi.org/10.1093/jas/skx053>. Erratum in: *J. Anim. Sci.* 96 (10), 4481. <https://doi.org/10.1093/jas/sky331>
- Candyrine S.C.L., Mahadzir M.F., Garba S., Jahromi M.F., Ebrahimi M. y Goh Y.M. (2018). Effects of naturally-produced lovastatin on feed digestibility, rumen fermentation, microbiota and methane emissions in goats over a 12-week treatment period. *PLoS ONE* 13 (7), e0199840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199840>
- Chamilos G., Lewis R.E. y Kontoyiannis D.P. (2006). Lovastatin has significant activity against zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (1), 96-103. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.96-103.2006>
- Chegwin A., Nieto-Ramírez I.J., Atehortua L., Sepúlveda A. y Liuda J. (2012). Statins: Biological activity and biotechnological production. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 14 (2), 157-178.
- Demirel B. y Schere P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: A review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 173-90. <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9131-1>
- Demonfort V, Armstrong N. y Drancourt M. (2017). In vitro susceptibility of cultured human methanogens to lovastatin. *Int. J. Antimicrob. Agents* 49 (2), 176-182. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.026>
- Endo A. (2010). A historical perspective on the discovery of statins. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 11, 86 (5), 484-493. <https://doi.org/10.2183/pjab.86.484>
- Evans P.N., Boyd J.A. y Leu A.O. (2019). An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 219-232. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0136-7>
- Ferry J.G. (2011). Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22 (3), 351-357. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.011>
- Fong C.W. (2014). Statins in therapy: Understanding their hydrophilicity, lipophilicity, binding to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, ability to cross the blood brain barrier and metabolic stability based on electrostatic molecular orbital studies. *Eur. J. Med. Chem.* 85, 661-674. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.037>
- Gilmore S.P., Henske J.K. y Sexton J.A. (2017). Genomic analysis of methanogenic archaea reveals a shift towards energy conservation. *BMC Genomics* 18 (1), 639. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4036-4>
- Gottlieb K., Wachter V., Sliman J. y Pimentel M. (2016). Review article: Inhibition of methanogenic archaea by statins as a targeted management strategy for constipation and related disorders. *Aliment. Pharm. Ther.* 43 (2), 197-212. <https://doi.org/10.1111/apt.13469>
- Guy L., Saw J.H. y Ettema T.J.G. (2014). The archaeal legacy of eukaryotes: A phylogenomic perspective. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 6 (10), a016022. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016022>
- Hendrickson E.L., Haydock B.C., Moore W.B., Whitman J.A. y Leigh J.A. (2007). Functionally distinct genes regulated by hydrogen limitation and growth rate in methanogenic Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (21), 8930-8934. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701157104>
- Hubert S., Chadwick A., Wachter V., Coughlin O., Kokai-Kun J. y Bristol A. (2018). Development of a modified-release formulation of lovastatin targeted to intestinal methanogens implicated in irritable bowel syndrome with constipation. *J. Pharm. Sci.* 107 (2), 662-671. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.09.028>
- Jahromi M.F., Liang J.B., Mohamad R., Goh Y.M., Shokryazdan P. y Ho Y.W. (2013a). Lovastatin-enriched rice straw enhances biomass quality and suppresses ruminal methanogenesis. *BioMed. Res. Int.* 2013, 397934. <https://doi.org/10.1155/2013/397934>
- Jahromi M.F., Liang J.B., Ho Y.W., Mohamad R., Goh Y.M., Shokryazdan P. y Chin J. (2013b). Lovastatin in *Aspergillus terreus*: Fermented rice straw extracts interferes with methane production and gene expression in *Methanobrevibacter smithii*. *BioMed Res. Int.* 2013, 604721. <https://doi.org/10.1155/2013/604721>
- Jain S., Caforio A. y Driessen A. J. (2014). Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. *Front. Microbiol.* 5, 641. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00641>
- Janssen P.H. y Kirs M. (2008). Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (12), 3619-3625. <https://doi.org/10.1128/AEM.02812-07>
- Johnson K.A. y Johnson D.E. (1995). Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73 (8), 2483-9292. <https://doi.org/10.2527/1995.7382483x>
- Koga Y. (2012). Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes. *Archaea* 2012, 789652. <https://doi.org/10.1155/2012/789652>
- Koga Y. y Morii H. (2007). Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations.

- Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71 (1), 97-120. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00033-06>
- Leahy S.C., Kelly W.J., Altermann E., Ronimus R.S., Yeoman C.J., Pacheco D.M., Li D., Kong Z., McTavish S. y Sang C. (2010). The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. PLoS One 5 (1), e8926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008926>
- Leahy S.C., Kelly W.J., Li D., Li Y., Altermann E., Lambie S.C., Cox F. y Attwood G.T. (2013). The complete genome sequence of *Methanobrevibacter* sp. AbM4. Standards in Genomic Science 8 (2), 215-227. <https://doi.org/10.4056/signs.3977691>
- Liu Y. y Whitman W.B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. Ann. New York Acad. Sci. 1125, 171-189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- Miller T.L. y Wolin M. J. (2001). Inhibition of growth of methane-producing bacteria of the ruminant forestomach by hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors J. Dairy Sci. 84, 1445-1448. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70177-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70177-4)
- Miller T.L. y Lin C. (2002). Description of *Methanobrevibacter gottschalkii* sp. nov., *Methanobrevibacter thaueri* sp. nov., *Methanobrevibacter woesei* sp. nov. and *Methanobrevibacter wolinii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 (Pt 3), 819-822. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-819>
- Mohd-Azlan P., Jahromi M.F., Ariff M.O., Ebrahimi M., Candyrine S.C.L. y Liang J.B. (2018). *Aspergillus terreus* treated rice straw suppresses methane production and enhances feed digestibility in goats. Trop. Anim. Health Prod. 50 (3), 565-567. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1470-x>
- Mora C., Frazier A.G., Longman R.J., Dacks R.S., Walton M.M., Tong E.J., Sánchez J., Kaiser L.R., Stender Y.O. y Anderson J.M. (2013). The projected timing of climate departure from recent variability. Nature 502 (7470), 183-187. <https://doi.org/10.1038/nature12540>
- Morgavi D.P., Martin C. y Boudra H. (2014). Fungal secondary metabolites from *Monascus* spp. reduce rumen methane production in vitro and in vivo. J. Anim. Sci. 91 (2), 848-860. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5665>
- Muskal S. M., Sliman J., Kokai-Kun J., Pimentel M., Wacher V. y Gottlieb K. (2016). Lovastatin lactone may improve irritable bowel syndrome with constipation (IBS-C) by inhibiting enzymes in the archaeal methanogenesis pathway. F1000 Res. 2016 (5), 606. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8406.3>
- Ney B., Ahmed F. H., Carere C.R., Biswas A., Warden A.C., Morales S.E., Pandey G., Watt S.J, Oakeshott J.G., Taylor M.C., Stott M.B., Jackson C.J. y Greening C. (2016). The methanogenic redox cofactor F₄₂₀ is widely synthesized by aerobic soil bacteria. Int. Soc. Microb. Ecol. 11, 125-137. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.100>
- Pérez J. y Rodríguez M. (2013). Metabolic plasticity for isoprenoid biosynthesis in bacteria. Biochem. J. 452 (1), 19-25. <https://doi.org/10.1042/BJ20121899>
- Reeve J.N., Nolling J., Morgan R.M. y Smith D.R. (1997). Methanogenesis: Genes, genomes, and who's on first? J. Bacteriol. 179 (19), 5975-5986. <https://doi.org/10.1128/jb.179.19.5975-5986.1997>
- Samuel B.S., Hansen E.E. y Manchester J.K. (2007). Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (25), 10643-10648. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704189104>
- Saunois M., Stavert A.R., Poulter B., Bousquet P. et al. (2020). The global methane budget 2000-2017. Earth Syst. Sci. Data 12, 1561-1623. <https://doi.org/10.5194/essd-12-1561-2020>
- Scheehle E.A. y Kruger D. (2006). Global anthropogenic methane and nitrous oxide emissions. The Energy Journal 27, 33-44. <https://doi.org/10.5547/ISSN0195-6574-EJ-VolSI2006-NoSI3-2>
- Seenivasan A., Subhagar S., Aravindan R. y Viruthagiri T. (2008). Microbial production and biomedical applications of lovastatin. Indian J. Pharm. Sci. 70(6), 701-709. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.49087>
- Sharma A., Chaudhary P.P., Sirohi S.K. y Saxena J. (2011). Structure modeling and inhibitor prediction of NADP oxidoreductase enzyme from *Methanobrevibacter smithii*. Bioinformation 6 (1), 15-19. <https://doi.org/10.6026/97320630006015>
- Sorokin D.Y., Makarova K.S., Abbas B., Ferrer M., Golyshin P.N., Galinski E.A., Ciordia S., Mena M.C., Merkel A.Y. y Wolf Y.I. (2017). Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis. Nat. Microbiol. 2, 17081. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.81>
- Tapio I., Snelling T. J., Strozzi F. y Wallace R.J. (2017). The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. J. Anim. Sci. Biotechnol. 8 (7), 34-45. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0141-0>
- Vanwonterghem I., Evans P. y Parks D. (2016). Methylotrophic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. Nat. Microbiol. 1, 16170. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.170>
- Woese C.R. y Fox G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (11), 5088-5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>