



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DIFERENCIAL DE
CATALASAS EN DISTINTAS COINDICIONES DE
CULTIVO DE *Debaryomyces hansenii***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MÓNICA RAMÍREZ HERNÁNDEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL
KISCHINEVZKY**

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DATOS DEL JURADO.

1. Datos del alumno

Ramírez
Hernández
Mónica
044 55 34 91 13 29
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302005945

2. Datos del tutor

Dra.
Claudia Andrea
Segal
Kischinevzky

3. Datos del sinodal 1

M en C.
Alfonso José
Vilchis
Peluyera

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Pablo
Rangel
Silva

5. Datos del sinodal 3

Q. F. B.
María Cristina
Aranda
Fraustro

6. Datos del sinodal 4

M en C.
Luis
Robledo
Arratia

7. Datos del trabajo escrito

Análisis de la actividad diferencial de catalasas en distintas condiciones de cultivo de
Dabaryomyces hansenii
96 p.
2012

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias. Parte de este trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Rehabilitación, en el Laboratorio de Líquido Sinovial y en la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa; agradezco al M en C. Alberto Gabriel López Reyes por el equipo y reactivos prestados y el apoyo teórico y técnico durante mi estancia en su laboratorio. Este trabajo se llevó a cabo bajo la tutoría de la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky.

Parte de esta investigación fue financiada por el proyecto PAPIIT, proyecto IN218611, "Estrés oxidativo en *Debaryomyces hansenii*".

DEDICATORIAS.

Este trabajo está dedicado a mi familia; papá, mamá y hermano por todo lo que me han enseñado; Sebastián, gracias por elegirme como tu mamita...me has enseñado mucho más de lo que yo lo he hecho contigo!

A todos mis tíos y abuelos de la familia Hernández Romero y Ramírez Palma por todo su apoyo y los buenos momentos en esta vida, los amigos que he hecho a lo largo de toda mi vida y que me han acompañado hasta este importantísimo momento y mis profesores que me han enseñado todo lo que sé.

AGRADECIMIENTOS.

Finalizar esta etapa es un momento que esperé por mucho tiempo, al fin llegó y... lo estoy disfrutando muchísimo, sin embargo nunca lo hubiera logrado sin la ayuda y guía de la Doctora Claudia Andrea Segal Kischinevzky a quien agradezco enormemente ya que fue quien me dio la primera oportunidad para trabajar en un laboratorio y aprender a desenvolverme; sus enseñanzas son fundamentales en mi desarrollo profesional y personal.

En segundo lugar quiero agradecerle a los investigadores del Instituto Nacional de Rehabilitación que me apoyaron, en especial al M en C Alberto Gabriel López Reyes por no tener ningún reparo en enseñarme la técnica de qPCR y prestarme el equipo necesario para la realización de los experimentos correspondientes, a la bióloga Mónica Santamaría Olmedo que forma parte de su equipo de trabajo por las facilidades que me brindó durante mi estancia en el laboratorio de Líquido Sinovial. Asimismo, al M en C Carlos Landa Solis de la Unidad de ingeniería de tejidos, terapia celular y medicina regenerativa, por su ayuda teórica y experimental en el diseño y análisis de los ensayos de citometría de flujo, toda su ayuda fue fundamental en el desarrollo de este trabajo.

Dentro de las personas que trabajan en la UNAM merecen mención especial la Doctora Luisa Alba Lois y el Doctor Víctor Valdés López, quienes dirigen el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias, ya que su amplia experiencia y observaciones me fueron de mucha utilidad para mejorar mi desarrollo profesional. Y al M en C Alfonso José Vilchis Peluyera y al M en C Aristides III Sampieri Hernández, por el apoyo técnico recibido.

Quiero agradecer a quienes forman parte del comité que evaluó mi trabajo de tesis por tomarse el tiempo necesario para revisar y realizar aportaciones que enriquecieron esta presentación, el Doctor Pablo Rangel Silva, el M en C Luis Robledo Arratia y la Química Cristina Aranda Fraustro además del M en C Alfonso José Vilchis Peluyera y mi tutora, la Doctora Claudia Andrea Segal Kischinevzky.

También quiero agradecerle a PAPIIT, proyecto IN218611, “Estrés oxidativo en *Debaryomyces hansenii*” quien se encargó de financiar los gastos para realizar este proyecto de tesis y otorgarme una beca.

En el tiempo en el que realicé este trabajo también consolidé grandes amistades dentro del laboratorio, como la de Román Alfonso Castillo Díaz que en un sinnúmero de veces me ayudó y se lo agradezco de todo corazón, también Daniel Ochoa que es muy divertido, al igual que Diego Noriega Samaniego y finalmente César Lobato, todos son unos grandes amigos y he aprendido mucho de ustedes, gracias por darme su amistad!

Nunca me olvido de los amigos que hice cuando estudiaba y que aun siguen siendo personas con las que paso momentos muy especiales, muchas gracias por su apoyo a todos los del cuadro (Chucita, Abril Chan, Pillo, Ave, Itzel, Diego, Arturo Martínez, Arturo Roldán, Horacio, Ximena y Aneth), a quienes no lo eran (Roberto Artaban, Chelo) y a una gran persona que me ayudó a encontrar mi vocación dentro de un laboratorio, al Maestro en C Gustavo Ortega Lule.

Quise dejar al final uno de los agradecimientos más importantes, y este es para mi familia, a mi papá Francisco Ramírez Palma por ser quien me enseñó a tener fortaleza todos los días de mi vida y a no rendirme por más dura que sea una situación, a mi mamá Luz Hernández Romero por ser quien me enseñó a tener sensibilidad y aprecio por cada una de las cosas que se tienen, a mi hermanito Miguel Ángel Ramírez Hernández por ser quien me enseñó a tener esperanza cuando todo parecía perdido y a mi hermoso hijo Sebastian Bautista Ramírez que me ha enseñado lo hermosa que es la vida con un compañerito en las buenas y en las malas.

¡Muchas gracias a todos!

**“Hecho lo que debía hacerse”
Shakyamuni**

ÍNDICE

I.	RESUMEN	10
II.	INTRODUCCIÓN	12
II. 1	Aerobiosis	12
II. 2	Producción de ERO'S	
II. 2.1	Mitocondria	13
II. 2.2	Peroxisomas	18
II. 3	Combate de ERO'S con sistemas antioxidantes no enzimáticos	
II. 3.1	Glutati3n	18
II. 3.2	MUCs (canales no-específicos mitocondriales)	19
II. 3.3	Proteínas desacoplantes	19
II. 3.4	Enzimas REDOX que no bombean protones	20
II. 4	Combate de ERO's con mecanismos enzimáticos	
II. 4.1	Super3xido dismutasa (SOD)	21
II. 4.2	Citocromo C peroxidasa	21
II. 4.3	Monotiol-glutarredoxinas	21
II. 4.4	Peroxidoxinas	22
II. 4.5	Catalasas	22
II. 4.5.1	Mecanismos de acci3n de la catalasa	24
II. 4.5.2	Catalasas de levaduras	26
II. 5	La levadura <i>Debaryomyces hansenii</i>	27
II. 6	Técnicas de análisis	
II. 6.1	Cuantificaci3n en tiempo real mediante la reacci3n en cadena de la polimerasa (qRT-PCR)	
II. 6.1.1	Generalidades de la qPCR	30
II. 6.1.2	Retrotranscripci3n	31
II. 6.1.3	Fluor3foros	33
II. 6.1.4.	Curvas de disociaci3n	36
II. 6.1.5	Conocimientos b3sicos del análisis de la expresi3n	38
II. 6.1.6	Optimizaci3n de la reacci3n	39
II. 6.1.7	Cuantificaci3n	39
II. 6.1.7.1	Cuantificaci3n absoluta	39
II. 6.1.7.2	Cuantificaci3n relativa	40
II. 6.1.8	Genes de referencia	42
II. 6.1.9	Aplicaciones	42
II. 6.2	Citometría de flujo	

	II. 6.2.1	Generalidades	42
	II. 6.2.2	Marcadores fluorescentes	44
	II. 6.2.3	Detección del daño oxidativo	44
III.		ANTECEDENTES	46
IV.		OBJETIVOS	49
V.		HIPÓTESIS	50
VI.		MATERIAL Y MÉTODOS	51
VII.		RESULTADOS	60
VIII.		DISCUSIÓN	80
IX.		CONCLUSIONES	86
X.		BIBLIOGRAFÍA	88

I. RESUMEN

Debaryomyces hansenii es una levadura perteneciente a los hongos hemiascomicetos de la familia Saccharomycetaceae; es llamada “no convencional” ya que presenta características metabólicas, estructurales, proteicas, no comunes, que resultan de interés biotecnológico, como el ser eurihalina, halo y criotolerante. Estas características le confieren la capacidad de crecer en medios con poca agua, alto contenido de azúcar, así como en medios altamente salinos y soportar bajas temperaturas, es así como la podemos encontrar en helados, jamones, quesos, maderas en descomposición, suelo, frutos, embutidos, mermeladas y en el mar; en pocas palabras, es un organismo extremófilo capaz de adaptarse a una gran variedad de nichos ecológicos.

Es capaz de metabolizar gran cantidad de azúcares para realizar fermentación anaerobia y también puede usar algunos alcoholes. Posee dos tipos diferentes de actividad antioxidante: un sistema enzimático y otro no enzimático; dentro del primer tipo se encuentra la superóxido dismutasa (SOD) que dismuta el anión superóxido para producir peróxido de hidrógeno y las catalasas, encargadas de disociar al peróxido de hidrógeno en una molécula de oxígeno y otra de agua. *Debaryomyces hansenii* presenta dos enzimas con actividad de catalasa codificadas por los genes *Dhcta1* (Catalasa A de Atípica) y *Dhctt1* (Catalasa T de Típica), la primera proteína se encuentra localizada en el peroxisoma, la segunda se encuentra en el citoplasma. Datos de nuestro laboratorio sugieren que ambas enzimas se regulan de manera diferencial tanto por la fuente de carbono como por la presencia de sal.

Mediante ensayos de qPCR, realicé la cuantificación relativa de los transcritos codificantes para ambas proteínas (*Dhcta1* y *Dhctt1*) cuando la levadura fue crecida en cuatro medios distintos, usando fuente de carbono glucosa ó etanol, con y sin NaCl. El gen *Dh26S* fue utilizado como referencia, como resultado se observa que el gen *Dhctt1* está regulado por la presencia de la sal y que el gen *Dhcta1* no presenta variaciones en medio rico YPD comparado con medio YPD+NaCl; sin embargo, los dos genes mostraron variación en sus niveles de expresión cuando la levadura fue crecida en etanol con y sin sal.

Adicionalmente, realicé la cuantificación de peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, mediante una técnica fluorescente de marcaje específico en células de *D. hansenii* y de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) para comparar la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO's) e indirectamente analizar el tipo de actividad enzimática llevado a cabo por cada organismo.

Asimismo, determine el tamaño y la complejidad celular de las dos especies de levaduras, que permitió correlacionar los datos del marcaje fluorescente con la respuesta estructural que presentaron las dos especies de levaduras a las diferentes condiciones de cultivo; obtuve una media de los dos parámetros y realicé una prueba estadística para comparar cada uno de los datos obtenidos y determinar si existían diferencias significativas.

II. INTRODUCCIÓN.

La célula es la unidad fundamental que constituye a los organismos y con base en las características morfológicas y requerimientos nutricionales, ambientales, relaciones filogenéticas, evolución, etc. Se clasificaron en tres dominios Archea, Eubacterya y Eucarya.

Con base en teorías sobre la evolución suponemos que la aparición de microorganismos de mayor complejidad se dio por una serie de eventos, en donde las células “simples” fueron estableciendo con otros organismos relaciones endosimbióticas hasta adquirir nuevas características que les permitieron evolucionar de manera independiente y diferente de sus ancestros; así pues, se propone la teoría del origen de la mitocondria y el cloroplasto, en donde se establece que una célula primitiva capturó a una bacteria que le proveyó funciones para desarrollar los organelos mencionados (Lewin, 2007). Los análisis de secuencias homólogas sugieren que ambos organelos se desarrollaron separadamente a las células de las cuales surgieron pero teniendo un ancestro común en una Eubacteria, así la mitocondria podría tener su origen en una α -bacteria púrpura y el cloroplasto en una cianobacteria (Lewin, 2007).

I. AEROBIOSIS.

La aparición de organismos fotosintéticos como las algas verde-azules (cianoprocariontes) y plantas inferiores y superiores dio origen a la acumulación de oxígeno en la atmósfera terrestre y en los océanos ancestrales, provocando grandes cambios que modificaron extraordinariamente las condiciones de vida en la Tierra.

De tener un ambiente reductor, el planeta pasó a tener un ambiente oxidante, gracias a que la fotosíntesis provocó cambios en el agua, pues fue usada como fuente de poder reductor liberando oxígeno a la atmósfera terrestre.

Los organismos evolucionaron utilizando la reactividad del oxígeno esta nueva condición de vida trajo como consecuencia la generación de formas de oxígeno reactivas como resultado de su metabolismo. Estas especies reactivas pueden dañar componentes celulares como aminoácidos, lípidos, ácidos grasos, proteínas y ácidos nucleicos (Scandarios, 2002).

Al estar bajo riesgo oxidante, solo sobrevivieron aquellos organismos que presentaron mecanismos para detoxificar a la célula de las formas reactivas de oxígeno y minimizar los efectos nocivos provocados.

El proceso de reducción de O_2 a H_2O requiere de la transferencia de cuatro electrones; si esto ocurriera por transferencia de los pares de electrones, el producto sería peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Sin embargo, el oxígeno tiene afinidad para unirse a rutas reductoras, dando como productos intermedios especies reactivas de oxígeno (ERO's), como el anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($OH\cdot$), también formando peróxido (H_2O_2) a través de la interacción con iones metálicos. Siendo el O_2^- y $OH\cdot$ extremadamente oxidantes, la célula actúa mediante la transducción de una serie de señales moleculares capaces de activar y transcribir genes para la detoxificación de ERO's (Scandarios, 2002).

La respuesta celular antioxidante puede ser no enzimática, como en el caso de las moléculas de glutatión, ascorbato (vitamina C), vitamina A, α -tocoferol (vitamina E), flavonoides, tioles, urato, alcaloides, carotenoides y tioredoxinas; por otro lado, puede encontrarse una respuesta enzimática como la formada por la familia de proteínas NOX, superóxido dismutasas (SOD) (MnSOD) localizadas en matriz mitocondrial, superóxidos dismutasas (CuSOD) intermembranales de mitocondria, citocromo C peroxidasa (intermembranales mitocondriales), monotiolo-glutarredoxinas y peroxidoxinas, entre las cuales se agrupa a las catalasas (Nappi y Ottaviani, 2000; Apel y Hirt, 2004).

2. PRODUCCIÓN DE ERO'S

2.1 Mitocondria

La mitocondria es un organelo encargado de la respiración y generación de energía, posee formas y volúmenes variados dependiendo de los requerimientos energéticos celulares; está conformada por una membrana externa y una interna con diferentes funciones y actividades enzimáticas, que separan tres espacios: citosol, espacio intermembranal y matriz mitocondrial.

La membrana externa es una bicapa de fosfolípidos relativamente simple, contiene proteínas porinas o VDAC (canales aniónicos dependientes de voltaje, por sus siglas en inglés) que le dan permeabilidad a moléculas de 10 kilodaltones o menos y un diámetro aproximado de 20Å. Los iones,

moléculas nutritivas, ATP, ADP, etc. pueden pasar por la membrana externa con facilidad; aquí se realizan pocas funciones enzimáticas o de transporte; cabe destacar que contiene entre 60 y 70% de proteínas.

La membrana interna contiene más proteínas que la externa, no tiene poros y es más selectiva; es permeable sólo al oxígeno, al dióxido de carbono y al agua. Su estructura es sumamente compleja, incluye todos los complejos enzimáticos del sistema de transporte de electrones, el complejo ATP sintasa, y las proteínas de transporte. Los pliegues forman invaginaciones llamadas crestas mitocondriales, que aumentan la superficie para el asentamiento de enzimas.

En la figura 1 se muestra la imagen de uno de los modelos de mitocondria que mejor la representa, en ella se pueden observar las partes principales que la conforman y la localización de sus complejos enzimáticos.

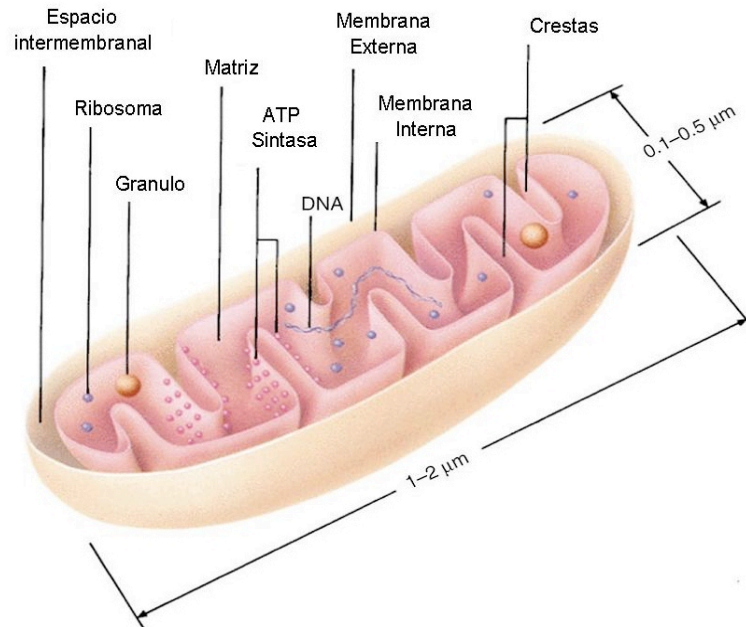


Fig. 1. Modelo de baffle, estructura interna de la mitocondria basado en los resultados de Palade. Esquema de Frey et al. modificado por Ramírez-Hernández.

La membrana interna de la mitocondria es considerada el sitio primario para la producción de ERO's (Barja, 2007), ahí se encuentran:

a) La cadena de transporte de electrones que produce la mayor cantidad de energía vía fosforilación oxidativa (OXPHOS) en cinco complejos enzimáticos (Blier, et al, 2001).

Los complejos I al IV están implicados en el transporte de electrones a través de una serie de proteínas vía reacciones REDOX (Dowling y Simmons, 2009).

El complejo I, denominado como NADH deshidrogenasa o NADH (flujo de electrones): en este complejo el NADH es oxidado a NAD^+ , reduciendo al FMN a FMNH_2 en un único paso que involucra a dos electrones. El siguiente transportador de electrones es un centro Fe-S que sólo puede aceptar un electrón y transferirlo a la ubiquinona, generando una forma reducida denominada semiquinona. Esta semiquinona vuelve a ser reducida con el otro electrón que quedaba, generando el ubiquinol, QH_2 . Durante este proceso, cuatro protones son translocados a través de la membrana interna mitocondrial, desde la matriz hacia el espacio intermembranal.

Complejo II o succinato deshidrogenasa: es la única enzima del ciclo de Krebs asociada a la membrana. Este complejo dona electrones a la ubiquinona desde el succinato y los transfiere vía FAD a la ubiquinona.

El complejo III o complejo citocromo bc_1 oxida la forma reducida de la coenzima y reduce a su vez al citocromo C que es un transportador de electrones hidrosoluble proteico localizado en el espacio intermembranal, que puede desplazarse por el interior de la membrana interna. Al mismo tiempo, transloca dos protones a través de la membrana por los dos electrones transportados desde el ubiquinol.

Por último, el complejo IV o citocromo C oxidasa, capta cuatro electrones de las cuatro moléculas de citocromo c que se transfieren al oxígeno (O_2), para producir dos moléculas de agua (H_2O). Al mismo tiempo se translocan cuatro protones al espacio intermembranal, por los cuatro electrones y "desaparecen" de la matriz cuatro protones que forman parte del H_2O .

Al ser una reacción exergónica, la energía liberada crea un gradiente de protones hacia el espacio intermembranal. Los protones luego vuelven a entrar en la membrana a través de un canal específico en el complejo V. La energía liberada impulsa la síntesis endergónica de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Mathews C y van Holde K, 1998).

Bajo condiciones estándares, el oxígeno es convertido en agua en el complejo IV y la energía generada por el gradiente de protones es usada para conducir a la producción de ATP en el complejo V; durante este proceso, puede haber fuga de un porcentaje del oxígeno consumido por la mitocondria en el complejo IV y este es convertido en una de las varias especies reactivas de oxígeno (ERO's) en lugar de agua.

b) Complejo enzimático, la F_1F_0 – ATP sintasa se encarga de proveer energía a la célula mediante la síntesis de ATP, también puede llevar a cabo la hidrólisis de éste, por lo que se le da el nombre de F_1F_0 – ATPasa. Sus subunidades pueden separarse en dos dominios estructurales, llamados F_1 (compuesto por subunidades solubles y es el dominio catalítico de la enzima) y F_0 (dominio membranal). La síntesis de ATP está acoplada a un gradiente de potencial electroquímico de protones generado por la cadena respiratoria durante la oxidación de sustratos; la síntesis de ATP se inicia con la unión de ADP y P_i para su posterior condensación y formación de un enlace fosfodiéster, dando origen al ATP para finalmente dejar libre el producto.

c) Proteínas transportadoras para el paso de iones y moléculas a través de ellas, como ácidos grasos, ácido pirúvico, ADP, ATP, O_2 y agua. Pueden destacarse la translocasa de adenín nucleótido y la de fosfato; su función se describe a continuación:

1. Translocasa de adenín nucleótido. Esta proteína se encarga de transportar a la matriz mitocondrial el ADP que se encuentra en el citoplasma de la célula, formado durante las reacciones que consumen energía; posteriormente esta misma proteína devuelve al citoplasma el ATP recién sintetizado durante la fosforilación oxidativa.

2. Translocasa de fosfato. Esta proteína está implicada directamente en la introducción de fosfato citosólico junto con un catión H^+ , a la matriz mitocondrial; en este momento el fosfato es esencial para fosforilar el ADP durante la fosforilación oxidativa, para dar origen al ATP.

Entre ambas membranas queda delimitado el espacio intermembranal compuesto de un líquido similar al hialoplasma; tiene una alta concentración de protones como resultado del bombeo por los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. Ahí se localizan diversas enzimas que intervienen en la transferencia del enlace de alta energía del ATP, como la adenilato cinasa o la

creatina cinasa. También se localiza la carnitina, molécula implicada en el transporte de ácidos grasos desde el citosol hasta la matriz mitocondrial.

La matriz contiene a las enzimas responsables de las reacciones del ciclo del ácido cítrico, oxígeno disuelto, agua, dióxido de carbono, intermediarios reciclables que sirven como lanzaderas de energía y la maquinaria independiente para la síntesis de proteínas, incluyendo el DNA, RNA mensajero, RNA de transferencia y ribosomas. Gracias a los pliegues, ningún componente de la matriz está alejado de la membrana interior, por lo tanto los componentes de la matriz pueden difundirse a complejos interiores de la membrana y transportar proteínas dentro de un proceso relativamente lento.

En la figura 2 se muestra un esquema de la localización de algunos complejos (I y II) implicados en la cadena transportadora de electrones y la localización de la ATP sintasa, que se encarga de la producción de energía en forma de ATP necesaria para el funcionamiento de cualquier célula.

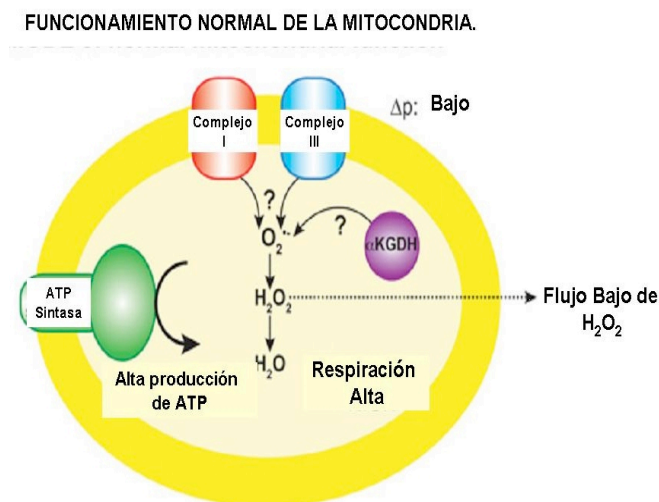


Figura 2. Transporte de electrones en la mitocondria. Se muestran los complejos y formación de ERO's.

Cabe mencionar que la mitocondria no es el único organelo en el que se generan ERO's, también en otros, como el cloroplasto en plantas y el peroxisoma son fuentes importantes de producción.

2.2 Peroxisomas

Los peroxisomas son organelos citoplásmicos en forma de vesículas con membrana semipermeable y se forman por gemación al desprenderse del retículo endoplásmico liso. Por sí mismos pueden abultar cierta porción de su membrana produciendo nuevos peroxisomas, sin derramar su contenido en el citoplasma. La membrana que poseen protege a la célula de los efectos dañinos de lo que puedan contener en su interior.

Tienen una matriz relativamente fina, granulada, en la que se encuentra una masa densa denominada nucleoide; este tiene una estructura muy regular semejante a un cristal; su análisis bioquímico muestra la presencia de enzimas, como peroxidasas, catalasas, urato-oxidasas, aminoácido-oxidasas y enzimas del metabolismo de metanol en el caso de los organismos metilótrofos.

La β -oxidación en plantas y levaduras ocurre en los peroxisomas, a diferencia de los mamíferos, que este proceso ocurre en la mitocondria, con contraste crucial en la deshidrogenación inicial: una deshidrogenasa de flavoproteína transfiere electrones del oxígeno molecular, produciendo peróxido de hidrógeno en lugar de transferirlos de $FADH_2$, como ocurre en la mitocondria.

El sistema de β -oxidación peroxisómico de los ácidos grasos utiliza reacciones enzimáticas completamente distintas de las de la mitocondria y no está ligado a la producción de energía. Este se usa exclusivamente para la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, con 24 o más carbonos y ácidos grasos de cadena ramificada; también contienen una vía paralela para la biosíntesis del colesterol.

3. COMBATE DE ERO's CON SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

3.1 Glutati6n

Es un tripéptido que no se sintetiza a partir de ribosomas, mantiene el balance REDOX en todos los compartimentos de la célula, además de que algunas enzimas dependen de su presencia,

como la formaldehído deshidrogenasa; tiene una contribución importante para el sistema inmune, la síntesis y reparación del DNA.

3.2 MUCs (canales no-específicos mitocondriales)

Cuando la velocidad de consumo de oxígeno está disminuida, como en el estado de reposo (estado IV), se estimula la producción de ERO's; para evitar la sobreproducción se han desarrollado mecanismos para mantener elevada la velocidad a la que funciona la cadena respiratoria, aún en ausencia de síntesis de ATP (estado III). Uno de estos mecanismos es la utilización de MUCs. Se trata de canales que al abrirse generan una transición en la permeabilidad de la mitocondria, permitiendo la disipación del gradiente de electrones, esto es, la apertura de las MUCs conduce al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, es decir, a la pérdida del gradiente electroquímico y disminución de la síntesis de ATP (Uribe-Carvajal, et al, 2011); este mecanismo depende de la comunicación estrecha entre la mitocondria y la célula, quizá a través de asociaciones proteicas y de mensajeros metabólicos (Díaz-Ruiz, et al, 2008).

En levaduras, cada especie utiliza su propio mecanismo para mantener una velocidad elevada de consumo de oxígeno en su cadena respiratoria y evitar la producción de ERO's: el poro de transición de la membrana (PTP) de *S. cerevisiae* es similar al de mamíferos: se abre con la presencia de nucleótidos trifosfatados (ATP) y se cierra con ADP y con fósforo inorgánico; en *D. hansenii* sucede algo similar, se cierran con Na^+ y K^+ y se necesita 10 veces más de fósforo inorgánico para cerrarse, se abren con Ca^{++} y Mg^{++} , sucesos relacionados estrechamente con el estado energético de las células. Sin embargo, en *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*) parecen no existir (Uribe-Carvajal, et al, 2011).

El disipar el gradiente de electrones previene la reducción de la velocidad de la cadena transportadora, sin reducir el consumo de oxígeno, evitando la formación de superóxido (Guerrero-Castillo, et al, 2011).

3.3 Proteínas desacoplates

Es un sistema muy parecido a los MUCs, pero sólo disipan el gradiente de protones; posibilitan la aceleración del consumo de oxígeno en presencia de ácidos grasos que aceleran la

actividad protonofórica de la proteína desacoplante. Se han identificado dos posibles candidatos de esta proteína en el genoma de *Y. lipolytica* y ambos se han expresado heterológamente en *S. Cerevisiae* (Luevano, 2012).

3.4 Enzimas REDOX que no bombean protones

Son enzimas monoméricas, que no bombean protones pero conducen electrones, estas proteínas evitan la formación del gradiente de H⁺ y aceleran el consumo de oxígeno sin disiparlo. Las proteínas más comunes de este tipo se encuentran en la mitocondria y son dos diferentes:

1. Oxidasas alternativas o AOX (por sus siglas en inglés): estas proteínas regeneran la ubiquinona y transfieren los electrones al oxígeno para formar agua, sin sacar protones al espacio intermembranal.
2. NADH deshidrogenasa tipo II (NDH2): estas proteínas se localizan en la membrana de la matriz mitocondrial; la que se encuentra en la parte interna oxidan al NADH de la matriz mitocondrial; la que se localiza en la parte externa oxida al NADH del citosol. Ninguna de las dos bombean protones al realizar el transporte de electrones (Guerrero-Castillo, Araiza-Olivera et al. 2011).

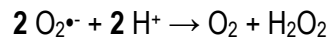
Probablemente aparecieron en bacterias antes de que existiera la fosforilación oxidativa, para proteger sus delicadas enzimas que reducen al nitrógeno. En levaduras existen isoformas de AOX constitutivas, otras se inducen bajo condiciones de estrés. Estas proteínas no contribuyen al gradiente de protones y dependen de su cantidad y del tipo de complejo que sustituyen (Guerrero-Castillo, Araiza-Olivera et al. 2011).

4. COMBATE DE ERO'S CON MECANISMOS ENZIMÁTICOS.

4.1 Superóxido dismutasa (SOD).

La enzima superóxido dismutasa (SOD) ha sido obtenida y caracterizada en una gran variedad de organismos; un tipo contiene Cu(II) más Zn (II) en el sitio activo (Cu/Zn SOD), otros Mn (III) (MnSOD), un tercer tipo funciona con Fe (III) (FeSOD) y el cuarto con Ni (II/III) (NiSOD) (Scandalios, 1997; Fridovich, 1995; Gralla, 1997).

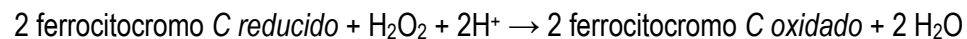
Algunos organismos pueden tener más de un tipo de SOD en varios compartimentos celulares.



4.2 Citocromo C peroxidasa

Los principales citocromos respiratorios se clasifican como *b*, *c* ó *a*, según las longitudes de onda de los máximos de absorción espectral. En general, los citocromos catalizan la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno, cabe mencionar que usan como cofactor al grupo hemo.

La citocromo *c* peroxidasa elimina el peróxido a cambio de electrones de la cadena transportadora de electrones en el espacio intermembranal de la mitocondria.



4.3 Monotiol-glutarredoxinas

Las glutarredoxinas (Grt), son esenciales en el mantenimiento redox tiol/disulfuro, en mamíferos, desempeñan una respuesta frente al estrés a nivel intra y extracelular.

Las glutarredoxinas son oxidadas por las ERO's y reducen de manera no enzimática al glutatión. La levadura *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pompe*) por ejemplo, posee 2-ditio-glutarredoxinas (*grx1*, *grx2*) y 3-monotiol-glutarredoxinas (*grx3*, 4, y 5).

Grx3 se encuentra en el retículo endoplasmático y en la envoltura nuclear, *Grx4* se ubica principalmente en el núcleo y *Grx5* en las mitocondrias. Una mutación *nula grx3* no ocasiona cambios en el crecimiento, mientras que una mutación en *grx5* provoca un decremento en la velocidad de crecimiento y afecta la resistencia a oxidantes como el peróxido. Las mutantes en *Grx4* no son viables, lo cual sugiere que tienen un papel importante en *S. pombe* (Chung, Kim et al, 2005).

4.4 Peroxidoxinas

Son una familia de proteínas que se encargan de reducir al peróxido e hidroperóxidos, con un residuo de cisteína en el sitio activo; son reguladas dependiendo del estado redox y la presencia de proteínas cinasas.

4.5 Catalasas

La primera vez que se conoció la actividad de catalasa fue alrededor del año 1818, cuando Thernard observó que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) era degradado en tejidos de plantas y animales. Posteriormente, Oscar Loew en el año de 1900 postuló que se trataba de una enzima quien se encargaba de esta actividad y la nombró "catalasa". Estudiando el comportamiento de la enzima, Chance demostró que el H_2O_2 era un producto reducido de la respiración mitocondrial (Chance, et al., 1979); Warburg en 1923 mostró que la enzima podía inhibirse con cianuro y que probablemente contenía un ión metálico en su sitio activo. Finalmente, Zeile y Hellstrom en 1930 proporcionaron las últimas pruebas para demostrar que se trataba de un grupo prostético hemo y Summer y Dounce, lograron purificar y cristalizar la catalasa de hígado de ternera (Scandarios et al, 1997).

Las catalasas se encuentran localizadas en peroxisomas mayoritariamente, pero no son exclusivas de este organelo. Son enzimas que dismutan el H_2O_2 en O_2 y H_2O ; están formadas por cuatro subunidades casi idénticas (homotetrámeros), tienen un origen común y están presentes en los tres dominios de los seres vivos: Archea, Eubacteria y Eucaria (Diaz, et al, 2005; Klotz y Loewen, 2003, Vega-García, 2007).

Existen tres tipos de catalasas: uno consiste en las catalasas monofuncionales, que contienen un grupo hemo en su sitio activo y se encuentran en todos los organismos; el segundo tipo son Mn-catalasas, son hexaméricas y no tienen grupo hemo en su sitio activo, en su lugar hay un átomo de Mn, sólo se encuentran en procariontes anaerobios; el tercer tipo, son las catalasas peroxidadas, presentan actividad de catalasa y peroxidasa, son hemoproteínas y se encuentran tanto en hongos como en bacterias.

Entre las catalasas monofuncionales existen las de subunidades pequeñas, que tienen una masa molecular de alrededor de 60KDa y las de subunidades grandes, de masa molecular mayor a

80KDa; las del primer tipo tienen la característica de unir NADPH y se inhiben por sustrato, la característica de unir NADPH es para prevenir la acumulación de los compuestos II y III; se encuentran presentes en mamíferos, plantas, hongos y la mayoría de las bacterias. Las catalasas de subunidades grandes solo se encuentran en hongos y bacterias, no unen NADPH, presentan un dominio en C-terminal semejante a la flavodoxina y son resistentes a H_2O_2 (Díaz, 2005).

En el caso de la levadura *D. hansenii* sus catalasas son monofuncionales y pesan alrededor de 55 y 63 KDa.

Las catalasas monofuncionales están formadas por cuatro dominios:

1. Amino terminal: esta región está formada desde el aminoácido 1 hasta el residuo de histidina -esencial para la catálisis,- que aproximadamente son 60 aminoácidos. En este extremo no suele haber mucha similitud entre las diferentes catalasas y se observa un brazo torcido que se encierra entre las subunidades vecinas, contiene a la hélice α_2 que es el primer elemento de estructura secundaria común en las catalasas (Díaz, 2005).
2. Un barril β con ocho hebras antiparalelas: este es el dominio más conservado entre las catalasas, se clasifica como estructura $\alpha+\beta$ y abarca aproximadamente 260 aminoácidos. Las primeras cuatro hebras (β_1-4) son consecutivas y están separadas por tres hélices (α_3-5) del segundo grupo de cuatro hebras (β_5-8). La primera mitad del barril β contiene la histidina y la asparagina que son esenciales del sitio activo. La continuidad de los puentes de hidrógeno entre las hebras del barril β se pierde entre las hebras β_4 y β_5 , donde hay sólo dos puentes de hidrógeno con la asparagina esencial. La hebra β_5 es irregular porque tiene tres aminoácidos (Ser196, His197 y Thr198) que no participan en la hoja β . Lo anterior permite que el amino terminal de la hebra β_5 se una a las hebras β_4 y β_6 para cerrar el barril β . Entre las hebras β_6 y β_7 hay dos hélices (α_6 y α_7). La segunda mitad del barril funciona para unir el NADPH en las catalasas. La última hélice (α_8) es una hélice tipo π presente posiblemente en todas las otras estructuras de catalasa (Díaz, 2005).
3. Un asa envolvente: esta estructura está constituida de 110 aminoácidos que unen al barril β con el dominio de las hélices. Tiene poco contenido de estructura

secundaria repetitiva, contiene una hélice ($\alpha 9$) con la tirosina esencial que coordina al Fe (Díaz, 2005).

4. Un dominio de hélices: el dominio de las hélices, con 60 aminoácidos, está formado por cuatro hélices contiguas ($\alpha 10-13$), bien definidas, que son parecidas a las encontradas en las globinas. La principal diferencia estructural entre las catalasas pequeñas y las grandes es la presencia, en estas últimas, de un dominio extra en el carboxilo terminal de aproximadamente 150 aminoácidos. Éste es un dominio del tipo α/β formado por cuatro hélices alfa ($\alpha 15-18$) y ocho hebras β ($\beta 9-16$) cuya topología es semejante a la de la flavodoxina (Díaz, 2005).

4.5.1 Mecanismo de acción de la catalasa

La dismutación del O_2^- catalizada por la superóxido dismutasa (SOD), resulta en la generación de H_2O_2 , que podría reaccionar con iones metálicos para generar OH^\cdot , que es muy oxidante; así, la catalasa puede tomar al H_2O_2 y degradarlo antes de que esto ocurra.

El primer paso del mecanismo catalítico de la reacción consiste en la oxidación del hierro (Fe) del grupo hemo y del anillo porfirínico. Se rompe el enlace oxígeno-oxígeno del peróxido con los dos electrones, uno de los oxígenos se protona y se libera una molécula de agua y el otro átomo de oxígeno se coordina con el fierro del grupo hemo. Para el rompimiento del enlace O-O, se transfieren dos electrones de la enzima, uno del fierro y otro de la porfirina o de un aminoácido de la proteína. Se genera una forma de la enzima llamada compuesto I, que está formada por Fe^VO ferroxilo y un radical catiónico, que puede ser porfirínico, de un aminoácido vecino o una mezcla de ambos (reacción I) (Long y Salin, 2000).

El segundo paso consiste en recuperar la forma intermediaria de la catalasa (reducción del compuesto I), mediante la transferencia de dos electrones a partir de una segunda molécula de H_2O_2 (Carpena, et al, 2006; Hillar, et al, 2000; Zamocky, et al, 2001) u otras moléculas diferentes como alcoholes alifáticos (MatÈ, Zamocky, et al, 1999), también se produce agua y dioxígeno (reacción II) (figura 3).

En condiciones específicas, el compuesto I puede captar un electrón, originando el compuesto II. El compuesto II tiene un estado de oxidación intermedio a los observados en el

compuesto I y la catalasa en reposo. Al reaccionar con una molécula de H_2O_2 forma el compuesto III, que tiene un estado de oxidación Fe^{VI} . El compuesto II y el compuesto III son inactivos catalíticamente.

En la figura 3 se muestra la reacción general de la catalasa, esta reacción se realiza en dos sentidos (oxidación-reducción), un paso para formar agua y otro para retomar la forma original de la proteína.

ACTIVIDAD DE CATALASA.

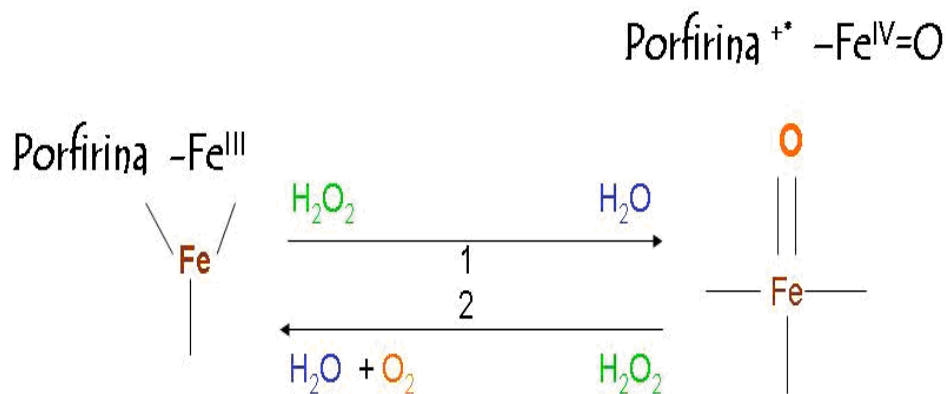


Figura 3. Esquema de la reacción de la catalasa. En el estado inicial ocurre la oxidación del grupo hemo de la catalasa, una segunda molécula de peróxido de hidrógeno reduce al compuesto formado en la reacción anterior. Esquema modificado de Zamocky *et al*, 2001.

La catalasa es una de las enzimas más rápidas, limitada *in vivo* únicamente por la velocidad de difusión del peróxido de hidrogeno (MatÈ, Zamocky et al, 1999). En el peroxisoma, aparte del glutatión, la enzima más importante para neutralizar las ERO's es la catalasa A.

Actualmente se cuenta con estructuras cristalográficas de catalasas como la KatG de *Haloarcula marismortui* (arquea) (HTK) (Yamada, et al, 2002); la de *Burkholderia pseudomallei* (bacteria) (IMWV),(Carpena, et al, 2003); *Mycobacterium tuberculosis* (bacteria) (1SJ2) (Bertrand, et al, 2004); y *Synechococcus* PCC7942 (cianobacteria) (1UB2) (Wada, et al, 2002); la comparación de estas cuatro estructuras muestran que se trata de hemoproteínas diméricas, los aminoácidos esenciales para su actividad y la secuencia consenso de unión al grupo hemo se conservan en el

dominio N-terminal, razón por lo cual se considera que solo este es el dominio catalítico (Vega-García, 2007).

4.5.2 Catalasas de levaduras

En 1963 quedó demostrada la existencia de múltiples formas de catalasa en un solo organismo (Scandalios, 2002). Asimismo, se han identificado varios genes que codifican para catalasas en hongos; en *Candida albicans* (*C. albicans*) se identificó uno cuya expresión parece ser vital para la patogenicidad (Wysong, et al, 1998). *Aspergillus nidulans* tiene cuatro, expresándose de manera diferencial dependiendo de la etapa del desarrollo (Kawasaki y Aguirre, 2001, Kawasaki, et al, 1997). *D. hansenii* (Segal, et al, 2011), al igual que *S. cerevisiae*, cuenta con dos: la catalasa A que es peroxisómica, codificada por el gen *DhCTA1* (homóloga de *CTA1* de *S. cerevisiae*, Cohen, et al, 1988) con un tamaño de 1458 pares de bases y 486 codones; se sitúa en la cadena complementaria del Cromosoma F. Su ortólogo en *S. cerevisiae* contiene contra las ERO's durante la β -oxidación de los ácidos grasos (Feron, et al, 2005).

Por el contrario, la catalasa T es citoplasmática, codificada por el gen *DhCTT1* (homólogo de *CTT1*, Hartig y Ruis, 1986), con un tamaño de 1674 pares de bases, 558 codones. Está en la cadena complementaria del Cromosoma B; Su ortólogo en *S. cerevisiae* se expresa diferencialmente inducida por diferentes tipos de estrés. Al ser citosólica se esperaría que este más regulada que *DhCTA* debido a que contiene con fuentes exógenas de ERO's o filtraciones de ERO's endógenas (en caso de la deficiencia en los mecanismos de cada organelo).

Cabe destacar que algunos estudios de relaciones filogenéticas usando las secuencias de catalasas de varias levaduras muestran que la catalasa peroxisómica es común a todos los hemiascomicetos y que la catalasa citosólica es resultado de una duplicación y posterior divergencia; este hecho debe haber ocurrido en una etapa anterior a la duplicación masiva del genoma de *S. cerevisiae* (Turunen, et al, 2009; Segal-Kischinevzky, et al, 2011). Cabe destacar que Segal, en 2010, realizó una comparación entre las dos secuencias de genes de catalasas (*CTA1* y *CTT1*) de *S. cerevisiae*, revelando que mantienen un 39% de identidad entre éstas; en cambio las dos catalasas de *D. hansenii* tienen una identidad del 51% entre ellas. Más aún, al comparar las secuencias entre ortólogos (*ScCTA1* vs *DhCTA1*) su identidad se eleva al 68%, lo que indica que

hay una presión selectiva para conservar la secuencia entre ambos organismos; en el caso de *DhCTT1* las secuencias ortólogas tienen una identidad del 52%.

5. La levadura *Debaryomyces hansenii*

En la década de los 60's del siglo pasado, un equipo de científicos de la Universidad de Göteborg (Suecia), inició estudios sobre un grupo de levaduras marinas, entre las cuales se encontraba *D. hansenii*; esta fue clasificada por Nakase *et al.* como un hongo hemiascomiceto de la familia Saccharomycetaceae en cuyo género *Debaryomyces*, originalmente se conocieron 15 especies. Actualmente, gracias a la sistemática molecular usando el análisis de secuencias de RNA ribosomal, se han transferido varias especies de otros géneros en particular *Schwanniomyces occidentalis*, al género *Debaryomyces* (Kurtzman y Robnett, 1991). *D. hansenii* se divide en dos subespecies (Kurtzman y Fell, 1998; Barnett, et al, 2000), de acuerdo a la diferente movilidad electroforética de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasas y por la temperatura máxima de crecimiento tolerada: 31 - 35 °C para la subespecie *Debaryomyces hansenii var hansenii* y 36 - 39 °C para la subespecie *Debaryomyces hansenii var fabryii* (Kurtzman y Fell, 1998; Barnett, et al, 2000).

El género *Debaryomyces* se encuentra en diversos hábitats (incluso en condiciones extremas con poco agua), desde la carne, cerveza, frutas secas, mermeladas, yogurt, helados, embutidos, quesos, maderas en descomposición, suelos y productos con gran cantidad de azúcar hasta los ambientes con poco agua, sin dejar de lado los ambientes marinos de donde se aisló por primera vez (Navarrete, et al, 2009; Norkrans et al, 1966; Marth, 1978)

En 1987 Jeremi y colaboradores, aislaron diferentes levaduras de medios con alto contenido en azúcar, entre ellas *Debaryomyces*; asimismo se halló en aguas hipersalinas de la costa del Sur del Atlántico, Namibia y el Gran Lago de Sal en Utah; igualmente se le encontró predominante en procesos de manufacturación de comida salada junto con los géneros *Pichia*, *Zygosaccharomyces* y *Candida* (Butinar, *et al*, 2005). Se considera que es una levadura anaerobia facultativa y criotolerante, ya que resiste bajas temperaturas. La temperatura óptima de crecimiento está comprendida en el rango de 20 – 25 °C, aunque se sabe que *D. hansenii* puede crecer entre los 5 – 10 °C, o aún en temperaturas bajo cero es posible el crecimiento (Davenport, 1980); a 10 °C crece en pH 5 - 6 con actividad de agua mayor a 0.99, lo que explica el encontrarla en salchichas, helados, u otros alimentos procesados.

Se demostró que el Na⁺ no es un elemento tóxico para esta levadura, ya que presenta crece aún en altas concentraciones intracelulares de este catión (Prista et al, 1997). Incluso si *D. hansenii* es cultivada en medios con altas concentraciones de sales, incrementa su capacidad para contender contra agresiones de agentes abióticos (Gori et al, 2007; Papouškova and Sychrova 2007; Sánchez, et al, 2008). Para evitar la alta producción de radicales libres y mantener la velocidad a la que funciona la cadena respiratoria aún en ausencia de síntesis de ATP (estado III), el incremento de cationes monovalentes como Na⁺ y K⁺ provocan que el canal MUC mitocondrial se cierre, impidiendo la permeabilidad transicional y evitando de esta manera el libre flujo de iones dentro y fuera de la matriz mitocondrial (Cabrera-Orefice et al, 2010), siendo este un reflejo de la alta concentración de sodio encontrada en el citoplasma de la levadura; la apertura de este poro debe ser exquisitamente controlada ya que de no ser así dispara la muerte celular por apoptosis o necrosis (Madeo et al, 1999).

Con base en la gran plasticidad del metabolismo de las especies del género *Debaryomyces* para adaptarse a condiciones ambientales extremas, se le ha llamado “levadura no convencional” (Spencer, et al, 2001). Es catalogada como eurihalina y osmotolerante pues crece en medios con un rango amplio de salinidades, siendo capaz de tolerar hasta un 24% de NaCl (4.106 M); asimismo, se le considera halotolerante (Tokuoka, 1993), puede cultivarse en medios con 18% de glicerol y posee la capacidad de metabolizar diferentes azúcares, incluyendo D-glucosa, que utiliza para efectuar fermentación anaerobia. *S. cerevisiae* crece de manera restringida en concentraciones que van de 1.5 a 1.7M de NaCl (Onishi, 1963); cuando *D. hansenii* es crecida en altas concentraciones de sal, los niveles intracelulares no son suficientes para balancear la presión del medio (Norkrans, 1969, Thomé-Ortiz et al., 1998); bajo este hecho se ha identificado la producción de solutos compatibles: glicerol y arabinitol, como balance en respuesta al incremento en la concentración extracelular de sal (Nobre y da Costa, 1985; Thomé-Ortiz, 1998); el sistema de transporte para conservar la homeostasis del glicerol (Lucas, et al, 1990) y la participación del metabolismo del carbono de igual forma se asocian a esta producción (Blomberg y Adler, 1993). Se ha demostrado la presencia de plásmidos lineares en *Debaryomyces hansenii* denominados PDHL1, PDHL2 y PDHL3, cuya estabilidad se relacionó con la alta presión osmótica; en medio con sal ya sea NaCl o KCl se mantienen presentes, mientras que sin sal no se han encontrado (Gunge, et al, 1993), este grupo ha ligado estos plásmidos también a la temperatura, siendo estables a 25 °C sin presión osmótica. Es importante hacer notar que muchos otros autores no han encontrado estos plásmidos en ninguna

condición, por lo que se duda de su existencia.

Una cualidad más de *D. hansenii* es ser oleaginosa; puede sintetizar, acumular y almacenar lípidos con un máximo de 70% de su peso seco; degrada lípidos, aunque a pH ácido esta capacidad se ve limitada (proteolítica-lipolítica) (Sorensen y Samuelson, 1996; Sorensen, 1997), estas características son de gran utilidad para la industria en procesos de curado de embutidos (Ratledge y Tan K-H, 1990; González-Hernández, et al, 2002). De manera normal sintetiza y exhibe tolerancia a toxinas que aniquilan a diferentes organismos, sean levaduras o bacterias. Esta actividad *killer* se presenta sólo cuando es crecida en medios que contienen NaCl y KCl y poca o nula oxigenación como en la manufactura de quesos y vinos, o en medios ácidos (con citratos) y temperatura relativamente baja (18 °C) (trabajo de nuestro laboratorio); cabe destacar que esta actividad no está asociada a ningún plásmido linear (Gungue, et al, 1993). Conjuntamente posee alta tolerancia a ClO₂, un poderoso biocida (Ramírez, et al, 2001).

En cuanto al uso de fuentes de carbono para realizar actividades metabólicas, *D. hansenii*, en contraste con otras levaduras del género *Candida* y *Pichia*, está preparada para usar N-alcanos como melibiosa, rafinosa, almidón soluble, inositol, D-glucosa, galactosa, sacarosa, trehalosa, D-xilosa, etanol, glucitol, salicil y gluconato (Yadav y Loper, 1999; Nakase, et al, 1998). Se ha observado que la fermentación de glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, rafinosa y trehalosa es poca, y es notable que no se observa fermentación con lactosa, hecho que se corrobora con el crecimiento pobre de *D. hansenii* en condiciones anaerobias (Nakase, et al, 1998); asimila gran variedad de polioles, como etanol, metanol, glicerol, arabinol y xilitol (González-Hernández, et al, 2002), sustratos en los que no se observa fermentación (Uta, y Hauke, 2006; Sampaio, et al, 2008; Converti y Dominguez, 2001). También puede utilizar una variedad de fuentes de nitrógeno tales como sulfato amónico, urea, nitrito, bases púricas y aminoácidos (Kurtzman y Robnett, 1998; Barnett, et al, 2000). Asimismo, es capaz de utilizar metales pesados como el cadmio (Seda-Miró et al., 2007), en cuya presencia se observa incremento en la producción de riboflavina a niveles útiles para la industria médica (Voronoski, et al, 2004).

Es considerada normalmente como no patógena (Swiss Agency of the Environment, Forest and Landscape SAEFL, 2004), sin embargo en estudios clínicos la han aislado en infecciones de hueso y pulmón (Wong, et al, 1982).

Este organismo tiene un codón que varía del uso del código genético universal, CUG que codifica normalmente para leucina, en *Debaryomyces hansenii* lo hace para serina, que es leído por un tRNA de serina único y especial (Sugita y Nakase, 1999); utiliza 43 RNAs de transferencia, a diferencia de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata* y *Kleuyromyces lactis* que usan 42; del 100% de su genoma, se sabe que el 79.2% es codificante, hecho que le confiere ser una levadura con una de las mayores capacidades codificantes, además de poseer la mayor cantidad de DNA redundante, con el 49.2% (Llorente, et al, 2000).

En cuanto a su ciclo de vida, todas las especies del género *Debaryomyces* son hongos ascomicetos, esto es, levaduras con capacidad de reproducción sexual por ascosporas y asexual por gemación multipolar. Cuando se encuentran en forma haploide, ocasionalmente se agrupa formando pseudomicelios primitivos que rara vez se desarrollan bien.

La reproducción sexual ocurre por conjugación heterogámica con dos células sexualmente diferentes, tamaño o forma. *Y. lipolytica* y *D. hansenii* carecen de un locus de tipo de apareamiento, a diferencia de otras levaduras como *S. cerevisiae* que posee dos, a y α (Mahiney y Broach, 1989); tiene una diplofase corta con la formación de ascosporas rugosas, esféricas, ovoides o lisas gracias a la meiosis; esporádicamente se observa isogamia (van der Walt, et al, 1977); cabe destacar que *Candida famata* es la forma imperfecta de *D. hansenii* ya que carece de reproducción sexual.

6. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

6.1 Cuantificación en tiempo real mediante la reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR)

6.1.1 Generalidades de la qPCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica empleada para sintetizar de manera artificial un fragmento de DNA utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de una bacteria llamada *Thermus aquaticus* también conocida como *Thermophilus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79 a 85 °C), de ahí su nombre comercial: *taq* DNA polimerasa.

Cuando se hace una reacción de PCR, se sintetiza DNA complementario a partir de un templado de RNA o DNA; cuando el templado es RNA, de manera artificial se añaden cada uno de los componentes implicados en la retrotranscripción: la enzima transcriptasa reversa, DNA polimerasa, ácidos nucleicos que contengan el o los fragmentos de los genes deseados para sintetizar, oligonucleótidos (*primers*), desoxirribonucleótidos-3P (dNTPs), cofactores de la enzima (MgCl₂, KCl), pH y temperatura adecuada para que la reacción se pueda llevar a cabo.

La técnica de PCR posee muchas aplicaciones, sin embargo, el surgimiento de la qRT-PCR permite amplificar y al mismo tiempo cuantificar, moléculas de RNA o DNA complementario (cDNA) específicas y así acceder a datos fiables y precisos sobre la expresión genética de las células en estudio (Vinueza-Burgos, 2009).

La PCR en tiempo real puede generar amplicones muy pequeños, desde 60 pares de bases, lo que la hace ideal para la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares patológicas o experimentales, así como para la cuantificación de niveles de mRNA en muestras de tejidos con RNA parcialmente degradado (Bustin, 2002).

En esta prueba, el producto de la PCR se mide al final de cada ciclo y permite monitorear en cada ciclo la aparición de DNA producto de la reacción; mediante el uso de fluoróforos, cada vez que se realiza una copia del DNA molde libera fluoresce, por lo que esta es proporcional a la cantidad de DNA generado. Además, esta técnica brinda sensibilidad y robustez, con la posibilidad de cuantificar la cantidad inicial de DNA blanco presente en la muestra. Los datos pueden ser analizados mediante un software y puede calcularse el número de copias de mRNA o la expresión génica relativa entre varias muestras (Heid, et al, 1996).

6.1.2 Retrotranscripción

Anteriormente, debido a que se usaban DNA polimerasas, era necesario utilizar DNA como secuencia blanco ya que estas enzimas no son capaces de amplificar RNA; actualmente se ha hecho uso de enzimas de retrotranscripción para generar cDNA a partir de un templado de RNA en una sola reacción (figura 4) (Valasek y Repa, 2005; Vinueza-Burgos, 2009).



Figura 4. Esquema general de retrotranscripción.

Se utilizan enzimas de retrotranscripción como la del virus aviar de mioblastosis y la del virus de leucemia murina, siendo la primera la más robusta; otra opción es usar mezclas de enzimas para mejorar la eficiencia de transcripción (Bustin, 2005b).

En el primer paso inicia la retrotranscripción, de RNA a DNA; una vez que finaliza este paso se eleva la temperatura del termociclador a 95 °C para desnaturalizar el cDNA, en este paso las dobles cadenas se abren quedando dos hebras, en este momento el termociclador baja la temperatura entre 50 y 65 °C para alinear los *primers* con las hebras de DNA, ya que a esta temperatura se forman y rompen constantemente los puentes de hidrógeno, las uniones más estables (complementarias) perduran alineadas formando una pequeña región de doble cadena dando lugar a que la DNA polimerasa se una para iniciar la amplificación en sentido 5' → 3'; de esta manera se estabiliza la unión pues se genera un amplicón de mayor tamaño con mayor cantidad de puentes de hidrógeno; durante la extensión se eleva la temperatura a 72 °C ya que la DNA polimerasa alcanza su máxima actividad, y continuando la síntesis de los fragmentos de DNA a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado, este ciclo se repite unas 40 veces (Eguiarte, et al, 2007).

Es importante mencionar que dado que la PCR en tiempo real y la transcripción reversa se utilizan en combinación en una misma reacción, la señal final obtenida en RT-PCR dependerá de la eficiencia de la reacción de la transcriptasa inversa (Bustin, et al, 2005).

En una reacción la eficiencia es la relación entre la cantidad de producto obtenida experimentalmente (en ensayos reales) y la cantidad de producto calculado de manera teórica (en situaciones ideales), expresado como un porcentaje.

$$\% \text{ Rendimiento} = (\text{Cantidad real} / \text{cantidad teórica}) \times 100$$

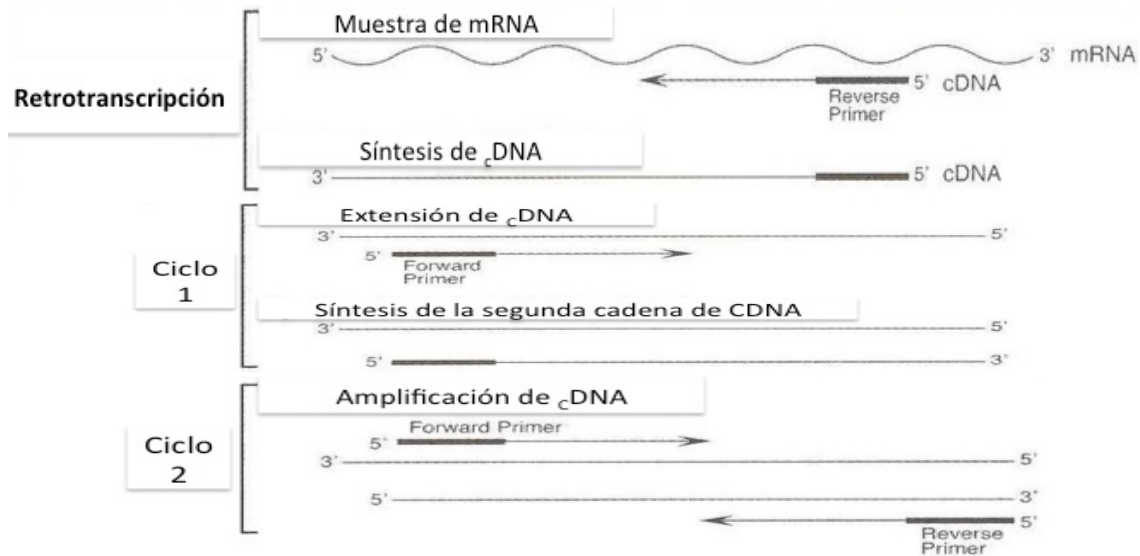


Figura 5. La retrotranscripción en PCR se inicia a partir de un templado de mRNA, el siguiente paso es sintetizar una gran cantidad de copias de cDNA y finalmente se lleva a cabo la cuantificación del transcrito, cuántas copias se han sintetizado.

6.1.3 FLUORÓFOROS.

Los fluoróforos son moléculas químicas que se unen a ciertos grupos o moléculas con características específicas que les permite fluorescer, para la técnica de qPCR existen varias opciones dependiendo del equipo y muestra a estudiar; pueden ser fluorocromos no específicos o sondas moleculares dependientes de la secuencia (Lee, et al, 2004; Valasek y Repa, 2005).

Con el uso de fluorocromos no específicos se detecta la generación exponencial de cDNA de doble cadena, ya que el fluorocromo se une inespecíficamente a éstas. El bromuro de etidio es un ejemplo de fluorocromo inespecífico que antiguamente era utilizado en experimentos de PCR pero dada su baja fluorescencia e inespecificidad dejó de usarse. El SYBR GREEN es otro ejemplo de fluoróforo inespecífico, actualmente se utiliza con mucha frecuencia, es excitado por luz azul a $\lambda_{\max} = 488\text{nm}$ y emite luz verde a $\lambda_{\max} = 522\text{nm}$, la ventaja de usarlo es que sólo utiliza un par de cebadores para llevar a cabo la amplificación, lo que baja su costo, pero sólo puede amplificar un producto en cada reacción.

Las sondas específicas utilizan por lo menos un oligonucleótido marcado fluorescentemente, por lo general esta sonda está unida a dos fluorocromos e hibrida en la zona intermedia entre el

cebador directo (forward) y el inverso (reverse), esto es, en el amplicón. Así, cuando la sonda está intacta, presenta transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Esta FRET no se produce cuando los dos fluorocromos están distantes debido a la degradación de la sonda por la actividad 5' - 3' exonucleasa de la DNA polimerasa, o bien, por la separación física de los fluorocromos debido a un cambio en la conformación de la sonda, esto permite monitorear el cambio de patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen (Lee, et al, 2004).

En la figura 6 se muestra un esquema de cómo funciona la sonda FRET durante las reacciones de qPCR; también se encuentra otro esquema de la sonda SYBR GREEN que es un fluoróforo inespecífico.

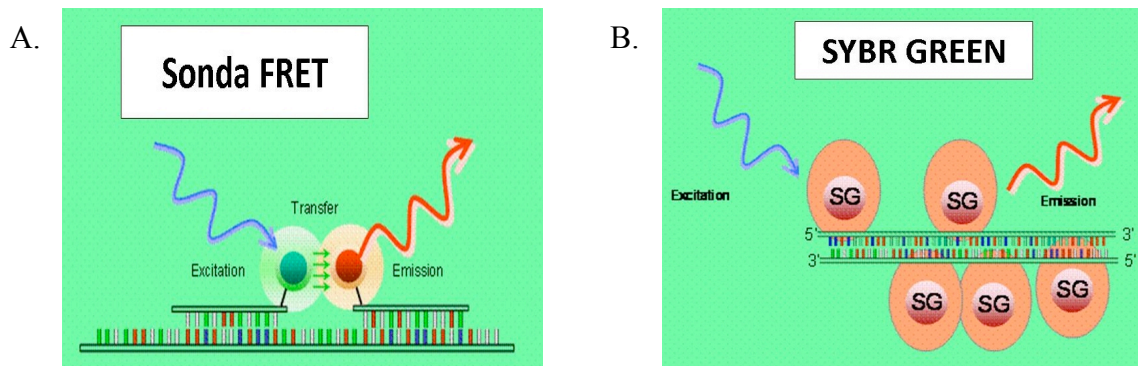


Figura 6. Esquema de emisión de fluorescencia y funcionamiento de fluoróforos no específicos. En el panel A se muestra el principio básico con la sonda FRET. En el panel B se muestra cómo funciona el SYBR GREEN, durante las reacciones de PCR en tiempo real. Esquemas tomados de www.diagnosticsgenome.com/real-time-pcr.htm, modificados por Ramírez-Hernández.

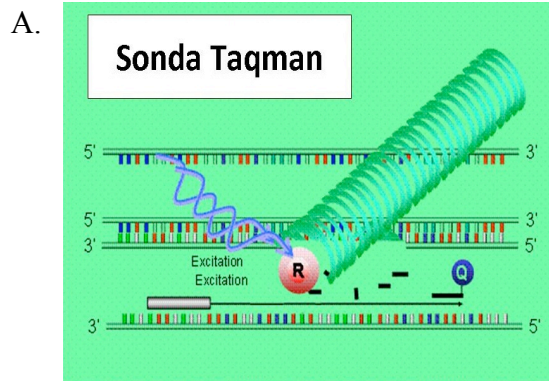
Ejemplos de sondas específicas:

Sondas TaqMan: Sondas marcadas con dos fluorocromos, posee un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (quencher); esta sonda marcada hibrida específicamente en la región central del producto de PCR a obtener, cuando se efectúa la reacción (sonda más el par de *primers* específicos), la sonda hibrida en el amplicón y por la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda, la hidroliza mediante su actividad de exonucleasa 5' - 3', lo que provoca la separación del quencher del fluoróforo y por lo tanto, la emisión de

fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de amplicón producido (Lee, *et al*, 2004).

- **Sondas tipo *molecular beacons***: son oligonucleótidos de cadena sencilla que por su estructura tienen una zona de apareamiento de bases interna y forman una horquilla, en presencia del amplicón, la sonda se abre y se une preferentemente a aquél, lo que produce la emisión de fluorescencia. Estructuralmente posee la zona complementaria al amplicón en el giro de la horquilla, la de complementariedad interna en el cuello y los fluoróforos en sus extremos: donador en el 5' y aceptor en el 3'. Cuando la sonda está cerrada en horquilla, el fluoróforo del 3' impide la emisión de fluorescencia por parte del propio 5', cosa que no sucede al unirse al amplicón (Lee, *et al*, 2004).
- **Sondas *scorpion***: son moléculas mixtas que contienen un *primer* específico para el amplicón unido covalentemente a una horquilla similar a las sondas del tipo *beacon* que, en su zona de giro, poseen un elemento complementario al amplicón. Los fluoróforos donador y aceptor se encuentran en la estructura de horquilla; de este modo, cuando ésta se encuentra cerrada no tiene emisión de fluorescencia, hecho que sí sucede cuando ambos se separan debido a la presencia del amplicón y la apertura de la zona en la horquilla (Lee, *et al*, 2004).

En la siguiente figura (figura 7) se muestra un esquema de los tres diferentes fluoróforos específicos que se mencionaron anteriormente, su principio fundamental es emitir luz, es decir, fluorescer; pero su mecanismo de acción durante las pruebas de qPCR es distinto.



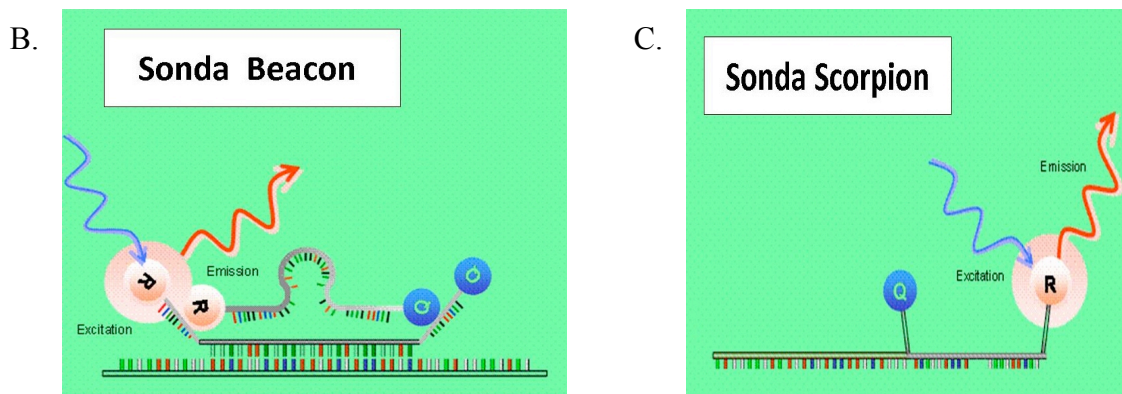


Figura 7. Esquema básico de funcionamiento de sondas específicas. En el p nel A se aprecia el funcionamiento de la sonda tipo Taqman, en el p nel B la sonda Beacon y el p nel C muestra la sonda Scorpion. Esquemas tomados de www.diagnosticsgenome.com/real-time-pcr.htm, modificados por Ramírez-Hernández.

Debe tenerse en cuenta que en los últimos ciclos de la reacción de PCR, la cantidad de producto no guarda relación con la cantidad inicial de DNA o cDNA en las muestras a analizarse (Lee, et al, 2004; Valasek y Repa, 2005). Una de las más importantes ventajas de la PCR en tiempo real es que el proceso completo se realiza en el termociclador, esto ayuda a disminuir el riesgo de contaminación en el laboratorio y permite aumentar el rendimiento de la prueba en tiempo real (Valasek y Repa, 2005).

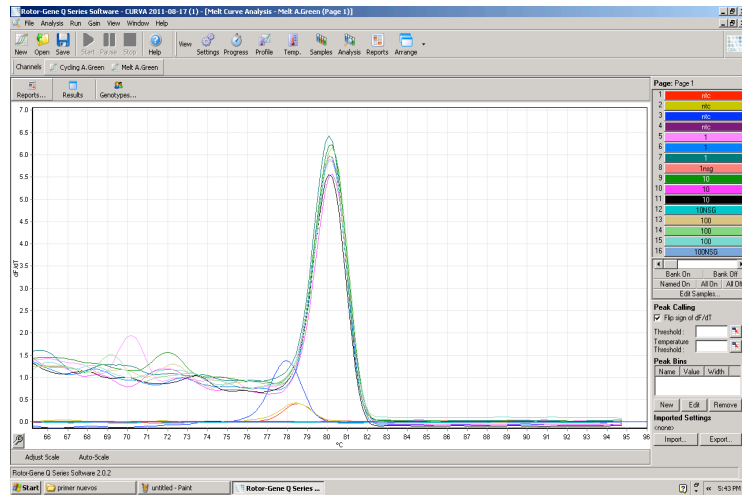
6.1.4 CURVA DE DISOCIACIÓN.

Con el propósito de distinguir la amplificación de productos inespecíficos con los amplicones de interés, se realiza una curva de disociación (melting temperature), en la cual se va elevando gradualmente la temperatura de la reacción hasta desnaturalizar completamente al cDNA, en este momento la fluorescencia disminuye porque el colorante (fluoróforo inespecífico) deja de estar unido al producto de la PCR; se obtiene una gráfica con tantos picos como fragmentos distintos de cDNA se produjeron en la reacción, así se analiza el tamaño del producto de PCR y se conoce si la señal obtenida corresponde al gen de interés o a dimerizaciones de los *primers*, para lo cual es necesario saber que éstos se disocian a una temperatura más alta que los amplicones de interés (Ririe, et al, 1997), lo anterior lo podemos observar en la figura 8.

Cabe mencionar que si existe un exceso de muestra inicial se puede desplazar la reacción, resultando en una ausencia de amplificación. Se considera que existe una inhibición de la reacción

cuando no se supera el umbral en la gráfica de amplificación o si se muestra un retraso aparente respecto al control blanco.

A.



B.

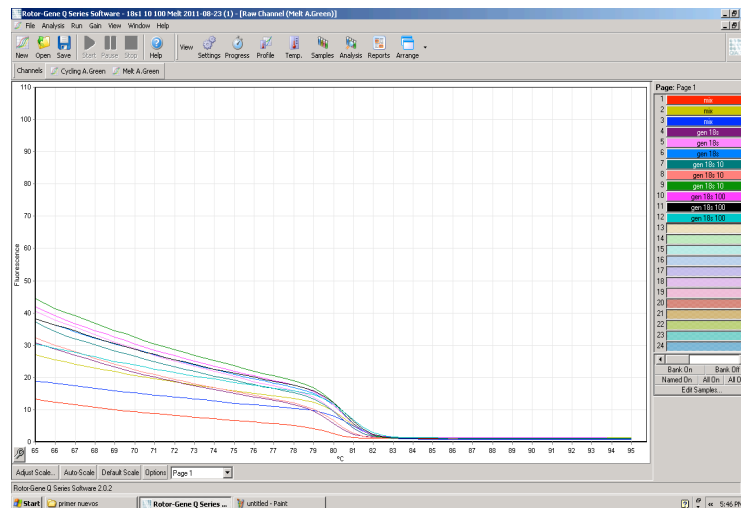


Figura 8. Curvas de disociación. En la figura A se muestra la temperatura de disociación de una amplificación específica y de un producto de dimerización. En la figura B se muestra otra forma de apreciar la pérdida de fluorescencia en cada una de la muestras, producto de elevar la temperatura progresivamente.

El análisis de las curvas de disociación permite prescindir de la electroforesis para observar los resultados, como se hace en la PCR de punto final.

6.1.5 CONOCIMIENTOS BÁSICOS DEL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN.

El resultado inmediato de la qPCR es una gráfica en la que se expresa la fluorescencia leída en el eje de las ordenadas y el número de ciclos en el eje de las abscisas; la curva consta de una fase inicial en donde la fluorescencia está por debajo del nivel de detección del termociclador; la segunda fase es en la que se da un incremento de la fluorescencia, que es exponencial en su inicio; y una tercera fase (*plateau*) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia. Es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que señala la zona de aumento exponencial, en la gráfica se señala con una línea horizontal (*threshold* o umbral) (figura 9) (Bustin, 2002).

El punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral se denomina Ct (*threshold cycle*), el cual indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral, cuanto más DNA tenga la muestra más rápido alcanzará este valor; si las eficiencias de reacción son óptimas, cada vez que se diluya una muestra 10 veces, el valor de Ct aumentará aproximadamente 3.3 ciclos (Bustin, 2005a) .

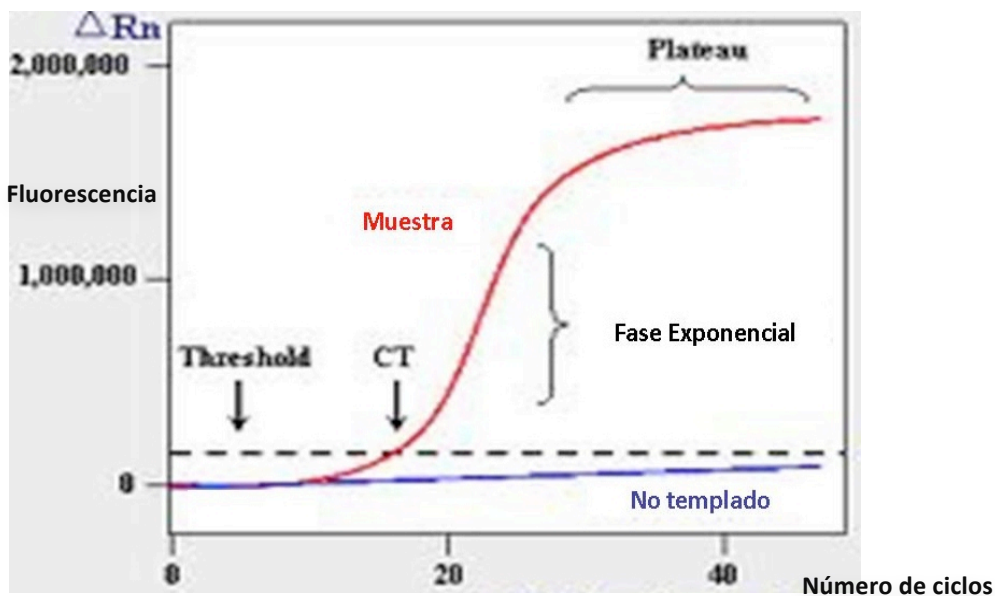


Figura 9. Esquema de amplificación en PCR tiempo real. Se muestran los principales componentes del gráfico obtenido a partir de ensayos de PCR tiempo real. Esquema tomado de www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml, modificado por Ramírez-Hernández.

6.1.6 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN.

La optimización de la reacción consiste en minimizar las variaciones en la amplificación que pueda tener la enzima polimerasa para que no haya efectos importantes en los valores de Ct, y que tengan un impacto mínimo en la cantidad de fluorescencia observada, es decir, la reacción tiene que ser específica, sensible, eficiente y reproducible en otras reacciones de PCR en tiempo real (Edwards, 2004).

Los factores que influyen en la eficiencia de la reacción son la concentración de los *primers*, concentración de la muestra, concentración de los marcadores fluorescentes, concentración de la enzima y desoxirribonucleótidos (dNTP's), así como las diferentes temperaturas a las que se llevan a cabo el proceso de retrotranscripción y la amplificación.

En pocas palabras, la eficiencia de la PCR en tiempo real es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de DNA o cDNA en cada ciclo (Bustin y Nolan, 2004a).

6.1.7 CUANTIFICACIÓN.

Existen dos maneras de llevar a cabo la cuantificación en qRT-PCR, una es la cuantificación absoluta, la otra es la cuantificación relativa.

6.1.7.1 CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA.

Con este método, se relaciona la señal de la amplificación obtenida con el número de copias fijo de una secuencia estándar (contenido de DNA empleado en la curva de calibración) utilizando una curva de calibración. Es importante que la PCR de la muestra y de los elementos de la recta de calibrado tengan la misma eficiencia de reacción.

Las curvas de calibración son altamente reproducibles y permiten la generación de datos específicos y sensibles, si se usa el modelo de curvas de calibración externas, tienen que ser rigurosamente validadas con absoluta exactitud, pues la cuantificación de la expresión genética en la PCR en tiempo real depende exclusivamente de la precisión de los estándares empleados (Pfaffl, 2008).

Para la realización de las curvas de calibración, los valores de fluorescencia, son expresados como logaritmos con el fin de estudiar fácilmente la fase exponencial de amplificación, en la gráfica aparecen como una línea recta, pues se presenta el logaritmo de la fluorescencia frente al número de ciclos, esto permite cuantificar la cantidad de DNA inicial.

Cada segmento cuantificable permite definir una ecuación de la recta de tipo $U=ax+b$, ya que modela la eficiencia de la amplificación (pendiente a) y, mediante la ordenada en el origen b , la cantidad de DNA en el ciclo 0 (todo esto teóricamente).

Como en todas las medidas experimentales, existe un margen de error. Esta cuantificación también conlleva un error estocástico; si las muestras estándares fueran amplificadas por más ciclos, se obtendrían cinéticas diferentes, si bien bastante próximas. Cada una de estas permite establecer una nueva ecuación. Las ordenadas en el origen diferentes también son evaluadas, así se puede evaluar el error o incertidumbre de la técnica comparando las diferencias entre las pendientes estándares (Vinueza-Burgos, 2009).

6.1.7.2 CUANTIFICACIÓN RELATIVA.

La cuantificación relativa expresa el cambio en los niveles de expresión de $mRNA$ interpretado como $cDNA$ del gen a estudiar contra el gen de referencia (housekeeping) (Pfaffl, 2004).

La expresión de los genes de referencia debe ser constante en todas las condiciones a estudiar, además se recomienda usar uno o varios para corregir la variación no específica, como las diferencias en la cantidad y calidad de la muestra (RNA) ya que puede afectar la eficiencia de la reacción (retrotranscripción) (Ambion, 2008).

El primer modelo para realizar la cuantificación relativa usa los valores de Ct y la eficiencia de la reacción para corregir el error, en este caso, generalmente se hace uso de software, como en el caso de los equipos de QIAGEN.

El segundo modelo no requiere la eficiencia de reacción para corregir el error ya que asume una eficiencia del 100% tanto para el gen de estudio como para el gen de referencia (Livak y Schmittgen, 2001), este modelo es el de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que es aplicable para una estimación rápida de la proporción relativa de la expresión genética en estudio (Pfaffl, 2001), expresa la proporción

obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{ratio} = 2^{-[\Delta\text{CP}_{\text{sample}} - \Delta\text{CP}_{\text{control}}]}$$

$$\text{ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$$

Un tercer método publicado por Pfaffl (2001) se basa en las diferentes eficiencias de la PCR tanto para los genes en estudio como para los genes de referencia como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

En esta ecuación la razón del gen en estudio se expresa en una muestra frente a un control en comparación con un gen de referencia. E_{target} representa la eficiencia de la PCR en tiempo real del amplicón en estudio; E_{ref} representa la eficiencia de la PCR en tiempo real del gen de referencia; $\Delta\text{CP}_{\text{target}}$ es la desviación en Ct del control menos la muestra del gen en estudio; y $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$ es la desviación en Ct del control menos la muestra del gen de referencia (Vinueza-Burgos, 2009). Como se mencionó, también es necesario conocer la eficiencia de PCR de cada gen estudiado. Las eficiencias de la PCR en tiempo real se calculan a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo real (Pfaffl, 2004) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E = 10^{[-1/\text{slope}] - 1}$$

Es importante mencionar que la cuantificación relativa de mRNA tiene algunas limitaciones, ya que se puede introducir un sesgo estadístico importante cuando hay grandes diferencias en los niveles de expresión del gen en estudio y del gen normalizador, lo que pueden conducir a una

interpretación biológica equivocada. En segundo lugar, es difícil encontrar genes de referencia adecuados (Bustin, et al, 2005). Por estas razones es recomendable la utilización de más de un gen de referencia con el fin de tener datos fiables en la investigación (Bustin y Nolan, 2004b; Vinueza-Burgos, 2009)

6.1.8 GENES DE REFERENCIA.

Con el fin de ayudar a una mejor elección de genes de referencia en la PCR de tiempo real, algunos investigadores se han dado a la tarea de analizar varios genes comúnmente usados, los que destacan por su estabilidad y reproducibilidad la b-actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hipoxantina guanina fosforribosil-transferasa y 18S del RNA ribosomal (Huggett, et al, 2005; Vinueza-Burgos, 2009).

Es importante mencionar que recientemente se creó un software con el fin de analizar la idoneidad de genes de referencia para cada experimento, software disponible gratuitamente en Internet (Vinueza-Burgos, 2009).

6.1.9 APLICACIONES.

Por ser una técnica con que arroja resultados muy veraces ha sido muy utilizada en las ciencias forenses y de bioseguridad, así como en el ámbito clínico, para identificar alteraciones presentes en algunas enfermedades o síndromes, analizando la sobreexpresión de genes en células o tejidos bajo el efecto de fármacos, agentes infecciosos, etc. Debe notarse el gran uso que se le ha dado a la PCR en tiempo real en la ciencia básica para analizar la expresión de genes en organismos de interés biológico.

6.2 CITOMETRÍA DE FLUJO

6.2.1 GENERALIDADES

El análisis por citometría de flujo (CMF) es una técnica multiparamétrica, que se basa en pasar una suspensión de células u otro tipo de partículas por delante de un haz de luz blanca láser focalizada. El choque de cada célula o partícula con el rayo de luz produce señales correspondientes

a diferentes parámetros de la muestra que son recogidos por distintos detectores y convierten las señales ópticas en señales electrónicas que son digitalizadas para medir simultáneamente varios parámetros de una misma célula o partícula.

Algunos parámetros se relacionan con características intrínsecas de la célula, como tamaño y complejidad del citoplasma; otros se relacionan con características antigénicas de cada célula (inmunofenotipo); por lo tanto, mediante esta metodología es posible identificar una célula por medio de sus características antigénicas y/o por sus características morfológicas.

Las señales que se producen por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos:

a) **Dispersión:** Resulta de la interacción de la luz con una partícula que produce un cambio de dirección (no de longitud de onda) en todos los sentidos del espacio. Las características morfológicas que determinan la dispersión de la luz son fundamentalmente tamaño celular, membrana, núcleo y material granular del interior de la célula, características que en conjunto se denominan complejidad.

En los citómetros de flujo se determinan dos fracciones de dispersión, una es la luz dispersada en ángulo cónico pequeño (0-10°) que casi coincide con la dirección de la luz incidente, llamada FSC (*forward scatter*). Es una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión. La segunda fracción es la luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (*side scatter*), proporcional a la complejidad de la estructura interna de la partícula.

b) **Fluorescencia:** Un fluorocromo es una molécula química que absorbe luz a una determinada longitud de onda (energía) y emite a una longitud superior (menor energía). El espectro de absorción o excitación es el rango sobre el que un fluorocromo absorbe luz y el espectro de emisión es el rango sobre el que un fluorocromo emite luz. Cuando un fluorocromo interacciona con la luz de excitación procedente del láser emite energía radiante. Debido a que parte de la energía se absorbe, la luz emitida es de menor energía que la luz de excitación, es decir la longitud de onda emitida es mayor. La diferencia entre la longitud de onda de absorción y emisión se denomina *stokes shift*. Los citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos antígeno/anticuerpo u otras especies de partículas marcadas con un fluorocromo situados en una

célula, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula.

6.2.2 MARCADORES FLUORESCENTES.

Actualmente existen fluorocromos que reaccionan de manera relativamente específica con los distintos tipos de radicales generados dentro de la célula. Generalmente se usan derivados dihidro de compuestos fluorescentes, como fluorosceína, rodamina o etidio. Una modificación química promueve que estas moléculas no fluorescentes o con distintas características espectrales, reviertan a los compuestos fluorescentes originales por la acción de las especies reactivas, permitiendo la detección de la actividad oxidativa en las células. Se ha descrito que el diacetato de diclorodihidrofluorosceína (H_2DCFDA) es un compuesto apolar que se incorpora en las células, en donde es convertido en diclorodihidrofluorosceína (H_2DCF) por acción de las esterasas intracelulares. La H_2DCF que no presenta fluorescencia se convierte rápidamente por la acción de los radicales libres a diclorofluorosceína, altamente fluorescente. La H_2DCF es oxidada por los radicales peróxido de hidrógeno en presencia de la peroxidasa, citocromo C o iones de Fe^{2+} como los de las catalasas, pero no por los superóxido ni hidroxilos, aunque puede reaccionar con otras especies reactivas del oxígeno como el óxido nítrico. La principal desventaja de la diclorofluorosceína es que, al ser producto de la oxidación, no se retiene adecuadamente en el interior de la célula, por lo que no es fácilmente detectada o cuantificada en procesos de oxidación lentos. El dihidroetidio o hidroetidina (DHE), a diferencia de los anteriores, es capaz de reaccionar directamente con los radicales superóxido, oxidándose a etidio. Este compuesto, que presenta una fluorescencia azul, pasa a tener la fluorescencia roja tras su oxidación. El etidio se acumula en el núcleo, en donde se intercala con el DNA y en lisosomas; también llega a depositarse en localizaciones intracelulares donde se está generando estrés oxidativo.

6.2.3 DETECCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO.

El estrés oxidativo produce en las células la acumulación de carbonilos, que tiene lugar en primer término por la acción directa de las especies reactivas de oxígeno sobre las proteínas, produciendo la oxidación de los residuos de aminoácidos; en segundo lugar por la peroxidación de lípidos, ya que aparecen carbonilos sobre los fosfolípidos de las membranas celulares, originándose al mismo tiempo fragmentos carbonilo reactivos, β -insaturados, capaces de unirse a los grupos tiol y

amino de las proteínas. La unión de tioles a estos aldehídos reactivos ocurre mediante una reacción de adición que deja libre el carbonilo para subsiguientes reacciones.

Adicionalmente, se podría determinar el contenido de glutatión en la célula con monoclorobimano (MCBL), que se une a las moléculas adquiriendo la capacidad de fluorescer.

III. ANTECEDENTES.

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio (Segal-Kischinevzky, et al, 2011), se encontró que cultivos con glucosa como fuente de carbono con o sin sal y extraídos en fase exponencial y estacionaria de crecimiento de *D.hansenii* muestran una actividad de catalasa más alta que la de *S. cerevisiae* en las mismas condiciones (tabla1).

Tabla 1. Actividad específica* de catalasa de <i>Debaryomyces hansenii</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> crecidas en medio rico, con y sin sal, en fase exponencial y estacionaria				
Fase de crecimiento del cultivo/cepa	Glucosa (YPD)			
	<i>D. hansenii</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
0.6 M NaCl	-	+	-	+
Exponencial	0.7 (±0.2)	1.2 (±0.2)	0.0026 (±0.012)	0.045 (±0.043)
Estacionaria	1.5 (±0.2)	0.4 (±0.2)	0.12 (±0.01)	0.152 (±0.03)

* (mmoles de H₂O₂ oxidado/min/mg de proteína)

Resultados similares se encontraron cuando ambas cepas eran cultivadas usando etanol como fuente de carbono. Se llevaron a cabo electroforesis nativas para analizar mediante zimogramas la actividad de catalasa de *D. hansenii*, en donde se observó una banda en todas las condiciones, que más tarde, mediante su secuenciación, se demostró que correspondía a la catalasa A; en la única condición en donde se observaba una segunda banda que correspondería a la catalasa T era en el medio rico YPD (Yeast extract/extracto de levadura, Peptona de caseína, Dextrosa), de fase de crecimiento estacionaria (figura 10).

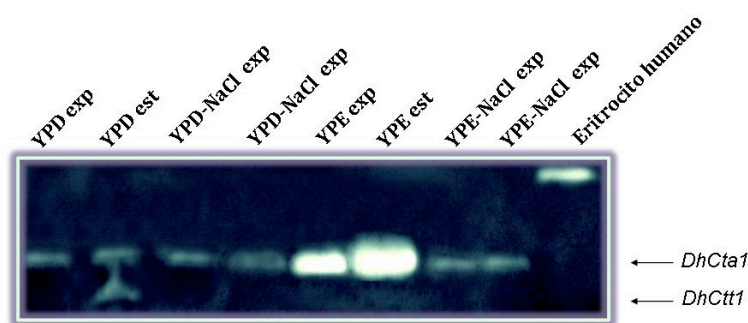


Figura 10. Zimograma de *Debaryomyces hansenii* cultivada en YP y diferentes fuentes de carbono, hasta fase exponencial (exp) o estacionaria (est) de crecimiento, con o sin sal. Carril 1. YPD exp; 2. YPD est; 3. YPD-NaCl exp; 4. YPD-NaCl est; 5. YPE exp; 6. YPE est; 7. YPE-NaCl exp; 8. YPE-NaCl est; 9. Catalasa de eritrocito humano.

Asimismo, para determinar si existía una regulación a nivel transcripcional de la expresión de los genes cuando la levadura es crecida en cuatro medios de cultivo diferentes, YPD, YPD+NaCl, YPOH y YPOH+NaCl, mediante análisis tipo northern blot de los transcritos de las dos catalasas, *Dhcta1* y *Dhctt1*, en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, se encontró que en los cultivos que contenían glucosa el transcrito más abundante era el de *Dhctt1* y presentaba poco del de *Dhcta1*; sin embargo, en los medios que contenían etanol el transcrito de mayor presencia era el de *Dhcta1* y en menor proporción el de *Dhctt1*, los resultados anteriores se muestran en la figura 11.

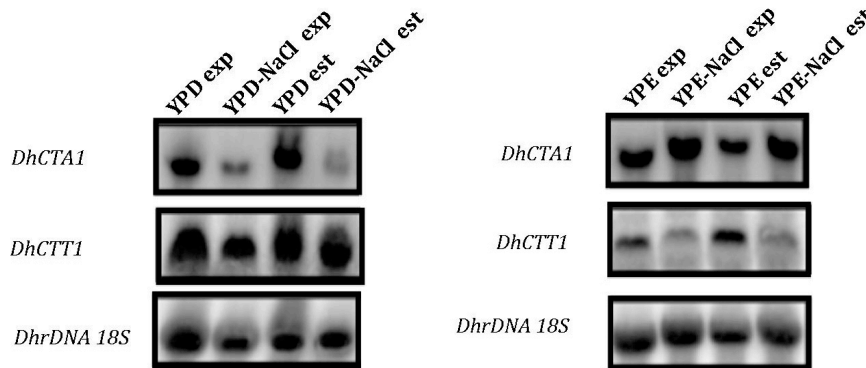


Figura11. Northern blot de RNA total obtenido de *Debaryomyces hansenii* cultivada hasta fase exponencial o estacionaria en medio YP glucosa o etanol como únicas fuentes de carbono y con o sin NaCl presente en el medio. En el panel A se muestran los transcritos de *Dhcta1*, su expresión es inhibida en presencia de NaCl; en el panel B los transcritos de *Dhctt1*, su expresión es inhibida en presencia de NaCl.

Con base en los datos que obtuvieron Segal-Kischinevzky y cols. del northern blot, se propuso que la mayor actividad de catalasa corresponde a un mayor nivel de RNA mensajero del gen que codifica para la catalasa A, sin embargo el efecto negativo que se observa en los zimogramas ejercido por el NaCl, no correlaciona con una reducción de *Dhcta1* en YPOH+NaCl, lo que sugiere que la sal podría estar ejerciendo una regulación a nivel postranscripcional.

Por su parte, la proteína *DhCTT1* es evidente en los zimogramas de cultivos crecidos en YPD hasta fase estacionaria, mientras que los análisis tipo northern blot mostraron que la expresión del gen codificado no está regulada por la fase de crecimiento, ya que es evidente la presencia del mRNA tanto en cultivos de fase exponencial como de fase estacionaria.

Así, se decidió realizar una cuantificación mediante la técnica de qPCR de los transcritos *Dhcta1* y *Dhctt1* de *Debaryomyces hansenii* en fase estacionaria de crecimiento cuando es cultivada en medio YPD y YPOH con y sin NaCl.

Por otro lado, ante la evidencia de que la actividad de catalasa presente en esta levadura era mucho más alta que la determinada en *S. cerevisiae* en las mismas condiciones, se decidió cuantificar las ERO's presentes en las diferentes muestras y compararla con las de la levadura de pan, así como comparar la complejidad y el tamaño de las células en los diferentes medios de cultivo.

IV. OBJETIVOS.

General.

- Analizar diversos aspectos de la respuesta a estrés oxidativo en la levadura eurihalina *Debaryomyces hansenii*.

Específicos.

- Cuantificar y analizar la diferencia de abundancia entre los mRNA's de los genes *Dhctt1* y *Dhcta1* que codifican para las catalasas de la levadura eurihalina *Debaryomyces hansenii* de que se expresan de manera diferencial en diferentes medios de cultivo.
- Determinar la cantidad y el tipo de especies reactivas de oxígeno presente en las células de *Debaryomyces hansenii* en fase estacionaria de crecimiento en cuatro medios diferentes cuantificando la presencia de peróxido de hidrógeno y radical superóxido mediante citometría de flujo.

V. HIPÓTESIS.

Si *Debaryomyces hansenii* es una levadura no convencional que puede adaptarse a condiciones osmóticas, salinas y oxidativas extremas, en medio rico con y sin sal debe existir una regulación diferencial en los transcritos *Dhcta1* y *Dhctt1*, codificantes para la proteína catalasa, al igual que en medio rico con etanol como fuente de carbono con y sin sal; también debe presentarse diferente contenido de radicales de oxígeno, tamaño celular y contenido de iones y organelos en las células dependiendo del medio en el que se crezca a la levadura.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

ALINEACIÓN DE SECUENCIAS Y DISEÑO DE *PRIMERS*

Se obtuvieron las secuencias de los dos genes que codifican para catalasas de *D. hansenii* *Dhctt1* y *Dhcta1* de la página electrónica www.genolevures.org/, que corresponden a *DEHA2B16214g* y *DEHA2F10582g*, nombres asignados por el consorcio de GÉNOLEVURES para los mismos, y del gen de la subunidad ribosomal *Dh26S* que se usó como gen de referencia durante los análisis de qPCR. Se alinearon ambas secuencias con el programa CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment, para obtener el porcentaje de similitud de ellas; de la región con mayor variabilidad entre los dos genes (*Dhcta1* y *Dhctt1*) se diseñó un par de *primers* para cada uno usando el programa primer-BLAST (*primer designing tool*), con BLAST/blastn (*suite/databases using a nucleotide query*). Se procedió a hacer lo mismo con el gen de la subunidad ribosomal *Dh26S*. Se analizaron los seis *primers* generados (sentido y antisentido de *Dhcta1*, *Dhctt1* y *Dh26S*) para corroborar que fuesen especie-específicos y no se alinearan en algún otro sitio del genoma de *Debaryomyces hansenii* (los tres programas; CLUSTAL 2.1, Primer-BLAST y BLAST/blastn se encuentran disponibles en línea). El alineamiento de la secuencia de los dos genes y de los dos pares de *primers* se muestra en la figura 12.



Figura 12. Alineamiento de los *primers* de *Dhcta1* y *Dhctt1* con las secuencias problema. En el extremo carboxilo terminal de ambas secuencias es en donde hay mayor diferencia en la secuencia de nucleótidos, a partir de esa referencia se diseñaron los dos pares de *primers* correspondientes a cada gen. En color morado se indica el sitio donde se alinean los primers para el gen *Dhcta1* (sentido y antisentido) con un amplicón de 151 pb y en azul para el gen *Dhctt1* (sentido y antisentido) con amplicón de 198 pb

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE *Debaryomyces hansenii*.

Se creció a *Debaryomyces hansenii* en medio rico YPD+0.6M NaCl a 28 °C en agitación constante por 24 horas, una vez que transcurrió el tiempo el cultivo se centrifugó a 3,000 rpm por 15 minutos, decantó y retiró el sobrenadante, la pastilla de células se lavó, centrifugó y decantó el sobrenadante resuspendiendo en el líquido residual.

Para obtener el material genético, se realizó el método de extracción orgánica, empezando por adicionar 200µl de solución de lisis que contiene Tritón X-100 al 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, TrisCl 10mM (pH 8.0) y Na₂EDTA 1mM, posteriormente se adicionó 200µl de fenol:cloroformo:isoamílico en proporción 25:24:1 (PCI), para separar lípidos y proteínas de los ácidos nucleicos, además de agregar 300µg de perlas para romper por disrupción mecánica; se agitó y posteriormente se le agregó agua, centrifugando y separando la fase acuosa, se agregó 1000µl de etanol al 100% mezclando por inversión, se centrifugó nuevamente y decantó el sobrenadante, la pastilla resultante se resuspendió y se adicionó 3µl de RNAsa a concentración 10µg/µl para eliminar contaminación por RNA y se incubó 5 minutos a 37 °C; transcurrido el tiempo se adicionó 8µl de NH₄Oac 4M pH 8.0 más 1,000µl de etanol al 100% mezclando suavemente por inmersión, se centrifugó, se lavó con etanol al 70% y resuspendió en agua; se lavó dos veces con PCI y una vez con CI (cloroformo-isoamílico 24:1), se precipitó con 1/10 del volumen total con NaOAc 3M, pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol al 100% dejando 24 horas a -80 °C. Para concluir se centrifugó, lavando con etanol al 70%, dejando secar a temperatura ambiente para resuspender en agua libre de nucleasas.

AMPLIFICACIÓN DE CATALASA CON *PRIMERS* Y DNA GENÓMICO DE *Debaryomyces hansenii* EN PCR DE PUNTO FINAL

De acuerdo con la temperatura media de disociación (T_m) de los *primers*, se realizó una prueba de amplificación por PCR de punto final para verificar que los *primers* amplificaran el segmento deseado: 198 pares de bases para *Dhctt1* y 151 para *Dhcta1*.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50µl adicionando los cuatro *primers* en un solo tubo de reacción para la detección de los dos genes con las siguientes concentraciones de los reactivos y volúmenes:

1. Primer forward *Dhctt1* 200µg (2µL)
2. Primer reverse *Dhctt1* 200µg (2µL)
3. Primer forward *Dhcta1* 200µg (2µL)
4. Primer reverse *Dhcta1* 200µg (2µL)
5. dNTP's 10 mM (2µL)
6. Buffer de reacción 10X (5µL)
7. Buffer MgCl 2.5mM (5µL)
8. DNA 3µl
9. Enzima 0.5µl
10. H₂O libre de nucleasas 29.5µl

El modelo del termociclador empleado fue Eppendorf AG 22331 (Hamburg thermal cycler de la marca Eppendorf, Hamburg, Germany), con la siguiente programación.

1. 5 minutos a 94 °C (desnaturalización inicial del DNA genómico)
 2. 1 minuto a 94 °C (desnaturalización)
 3. 1 minuto a 52 °C (alineación de *primers*)
 4. 1 minuto a 72 °C (extensión de cadena)
 5. 1 minuto a 94 °C
 6. 1 minuto a 52 °C
 7. 1 minuto a 72 °C
 8. 10 minutos a 72 °C (extensión final)
 9. 8 °C - ∞
- Por 5 ciclos.
- por 30 ciclos.

CONDICIONES DE CULTIVO Y CRECIMIENTO DE *Debaryomyces hansenii*

Se usó una cepa silvestre de *Debaryomyces hansenii* identificada como Y7426, crecida en medio rico YPD que contiene extracto de levadura (Y) 1%, peptona de caseína (P) 2% y dextrosa anhidra (D) 2%, ó YPEtOH con 1% de Y, 2% de P y 2% de etanol, con o sin 0.6M de NaCl.

El pre-inóculo se dejó crecer en medio rico YPD+0.6M NaCl a 28 °C con agitación constante, se inocularon los medios YPD, YPD+0.6 M NaCl, YPEtOH y YPEtOH + 0.6M NaCl a DO_{600nm} 0.05 y se dejaron crecer por 72 horas a 28 °C con agitación constante.

EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción del RNA total se llevó a cabo con el kit ZR Fungal/Bacterial RNA MicroPrep™ de ZYMO RESEARCH. Se centrifugó cada medio, se retiró el sobrenadante y colocó la pastilla en un tubo ZR Bashing Bead Lysis agregando buffer de lisis de RNA y perlas para romper las células, alternando ciclos de agitación y hielo, se centrifugó recuperando el sobrenadante para transferirlo a un tubo Zymo IIC, se centrifugó y recuperó el sobrenadante para mezclarlo con un volumen proporcional aproximado de $\frac{3}{4}$ de etanol 100% del líquido total obtenido para la recuperación del RNA. La mezcla se transfirió a un tubo Zymo IIC y se centrifugó, desechando el sobrenadante, la columna se lavó con Buffer PrepRNA y RNA Wash Buffer. Finalmente se agregó H₂O libre de nucleasas directamente a la matriz de la columna, se dejó reposar, se centrifugó y se recuperó el RNA.

ELECTROFORESIS

Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% para RNA con el fin de comprobar la integridad del material extraído; las muestras se incubaron con Loading Mix que contiene formamida 2.2ml, formaldehído 0.8ml, MAE 10X 0.5ml, glicerol al 80% 0.4ml y azul de bromofenol al 2% 0.1ml; las muestras se hirvieron con esta mezcla por 15 minutos y tiñeron con GelRed, una vez listas se cargó el gel y dejó corriendo con buffer MAE 10X que contiene MOPS 0.2M, NaOAC 50mM, ajustando estas dos soluciones a pH 7.0, posteriormente se agrega EDTA 10mM y H₂O-DEPC - agua tratada con DEPC (DEPC al 0.1%)- y formaldehído, a 112 Volts por 4 horas aproximadamente hasta observar las dos subunidades ribosomales *Dh18S* y *Dh26S* completamente separadas.

CUANTIFICACIÓN DE *m*RNA (ng/μl) DE *Debaryomyces hansenii*.

Para determinar la cantidad total de ácidos nucleicos contenidos en las muestras se leyó la absorbencia a 260nm y 280 nm, que corresponden a ácidos nucleicos y proteínas respectivamente, el cociente de dividir DO₂₆₀/DO₂₈₀ da un estimado de la pureza de la muestra, los valores cercanos a 1 indican que se tiene aproximadamente 20μg/μl de RNA en una cadena sencilla de nucleótidos; para este procedimiento se usó un NanoDrop Thermo Scientific 2000 que requiere 1.5 μl de muestra para realizar la cuantificación de cada una de las extracciones realizadas (Maniatis, et al. 1982).

DIGESTIÓN DE DNA GENÓMICO REZAGADO EN LA EXTRACCIÓN DE RNA.

Para evitar la amplificación de DNA genómico durante la reacción de qRT-PCR, este se eliminó digiriendo las muestras con DNasa.

Se tomó una alícuota de RNA; cada 1µg de muestra se digirió con 1U de RQ1 RNase-Free DNase de Promega Product y se adicionó la cantidad necesaria de RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer, se incubó a 37°C por 30 minutos; posteriormente se adicionó 2 µl de RQ1 DNase Stop Buffer para detener la reacción y se dejó a 65°C durante 10 minutos . Concluida la digestión las muestras se guardaron a -20 °C hasta su uso.

SÍNTESIS DE cDNA

Se realizó una prueba de amplificación con los *primers* en PCR de punto final usando cDNA sintetizado a partir del mRNA extraído. La síntesis de la primera cadena de cDNA, que produce un híbrido entre mRNA y cDNA se realizó con el kit RevertAid™H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit de la marca Fermentas. En un tubo estéril se agregó 1µg de RNA de cada una de las condiciones, 1µl de oligo (dT)₁₈ primer y 10µl de agua libre de nucleasas mezclando suavemente, se centrifugó e incubó 5 minutos a 65°C, se enfrió en hielo, se agregó 4µl de buffer de reacción 5X, 1µl de inhibidor RiboLock RNasa (20u/µl), 2µl de mezcla de dNTP's 10mM y 1 µl de Transcriptase Reverse RevertAid H Minus M-MuLV (200u/µl) en el orden indicado, llegando a un volumen final de 20 µl , la mezcla se centrifugó y se incubó por 60 minutos a 42 °C, transcurrido el tiempo la reacción se termina al incrementar la temperatura 5 minutos a 70 °C.

Al término de la síntesis del híbrido (cadenas sencillas de cDNA), estas se usaron como templado para la síntesis de las cadenas complementarias de cDNA.

Para la síntesis de la segunda cadena de cDNA se adicionó 8 µl de buffer de reacción 10X, buffer de Mg⁺, 1U de RNasa, 30U de DNA polimerasa I y se aforó a 100 µl con agua libre de nucleasas, se mezcló, centrifugó e incubó a 15 °C por dos horas, consecutivamente se agregaron 12.5U de T4 DNA Polimerase TEM Pase. Para terminar la reacción se añadió EDTA 0.5M pH 8.0 y se concluyó con la purificación del cDNA mediante extracción orgánica, se realizaron dos lavados

con 100 μ l de PCI y un lavado con 100 μ l de C:I, se precipitó con 1/10 de volumen de NaOAC 3M, pH 5.2 y dos volúmenes de etanol al 100% dejando 24 horas a -80 °C. Para concluir se centrifugó, lavando con etanol al 70%, dejando secar a temperatura ambiente para resuspender en agua libre de nucleasas.

AMPLIFICACIÓN DE cDNA DE *Debaryomyces hansenii* CON PRIMERS PARA *DhCTT1* y *DhCTA1* EN PCR DE PUNTO FINAL

Una vez que se verificó que se había sintetizado cDNA, se llevó a cabo una reacción de prueba en PCR de punto final en un volumen final de 50 μ l, adicionando los dos *primers* correspondientes a cada gen para su detección en cada tubo de cDNA sintetizado a partir de mRNA de condiciones diferentes en cada medio (YPD, YPD+0.6 M NaCl, YPEtOH y YPEtOH +0.6M NaCl) con las siguientes concentraciones de los reactivos y volúmenes:

1. *Primers* forward *Dhctt1* 200 μ g (2 μ l)
2. *Primers* reverse *Dhctt1* 200 μ g (2 μ l)
3. *Primers* forward *Dhcta1* 200 μ g (2 μ l)
4. *Primers* reverse *Dhcta1* 200 μ g (2 μ l)
5. dNTP's 10 mM (2 μ l) .
6. Buffer de reacción 10X (5 μ l).
7. Buffer MgCl 2.5mM (2 μ l).
8. cDNA 3 μ l.
9. Enzima 0.5 μ l.
10. H₂O libre de nucleasas 29.5 μ l.

Programando el termociclador de la siguiente manera:

- | | | |
|----|--|------------------|
| 1. | 5 minutos a 94 °C (desnaturalización inicial del cDNA) | |
| 2. | 1 minuto a 94 °C (desnaturalización) | } Por 5 ciclos. |
| 3. | 1 minuto a 52 °C (alineamiento) | |
| 4. | 1 minuto a 72 °C (extensión) | |
| 5. | 1 minuto a 94 °C | } Por 30 ciclos. |
| 6. | 1 minuto a 52 °C | |
| 7. | 1 minuto a 72 °C | |
| 8. | 10 minutos a 72 °C (extensión final) | |
| 9. | 8 °C - ∞ | |

qRT-PCR DE GENES *Dhctt1*, *Dhcta1* Y *Dh26S* A PARTIR DE RNA TOTAL DE *Debaryomyces hansenii*

El equipo usado para la cuantificación en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa de *Dhctt1*, *Dhcta1* y *Dh26S* fue ROTOR-Q qRT-PCR M 1 204174 de QIAGEN, con el kit acoplado de ONE STEP, el cual requiere RNA total para llevar a cabo la reacción y posterior cuantificación.

La reacción se llevó a cabo con muestras biológicas diferentes por triplicado en un volumen final de 10 μ l, por separado para cada gen (*Dhcta1*, *Dhctt1* y *Dh26S*) con las siguientes concentraciones y volúmenes:

Requerimientos para amplificar el gen *Dhcta1*:

1. 1 μ l de RNA total a 100 η g/ μ l de cada muestra de los medios YPD, YPD+0.6M NaCl, YPEtOH y YPEtOH +0.6M NaCl
2. 0.425 μ l de *primer forward* 2 μ M de *Dhcta1*
3. 0.33 μ l de *primer reverse* 2 μ M de *Dhcta1*
4. 3.04 μ l de H₂O libre de nucleasas
5. 5 μ l de master mix que contiene al fluoróforo SYBR GREEN, dNTP's y buffer de MgCl
6. 0.125 μ l de la enzima transcriptasa reversa (RT)

Para gen *Dhctt1*:

1. 1 μ l de RNA total a 100 η g/ μ l de cada muestra de los medios YPD, YPD+0.6M NaCl, YPEtOH y YPEtOH + 0.6M NaCl
2. 0.74 μ l de *primer forward* 2 μ M de *Dhctt1*
3. 0.59 μ l de *primer reverse* 2 μ M de *Dhctt1*
4. 2.46 μ l de H₂O libre de nucleasas
5. 5 μ l de master mix
6. 0.125 μ l de enzima RT

Para gen *Dh26S*:

1. 1 μ l de RNA total a 100 η g/ μ l de cada muestra de los medios YPD, YPD+0.6M NaCl, YPEtOH y YPEtOH + 0.6M NaCl

2. 0.85 μ l de *primer forward* 2 μ M de *Dh26S*
3. 0.6 μ l de *primer reverse* 2 μ M de *Dh26S*
4. 2 μ l de H₂O libre de nucleasas
5. 5 μ l de master mix
6. 0.125 μ l de enzima RT

El termociclador Rotor Q fue programado de la siguiente manera:

1. 10 minutos a 55 °C (retrotranscripción del mRNA).
2. 7 minutos a 95 °C (desnaturalización de la enzima y degradación del mRNA).
3. 10 segundos a 95 °C para desnaturalizar el cDNA. } 45 ciclos
4. 45 segundos a 60 °C alineamiento y extensión. }
5. Estimación de la T_M en un rango de 60 °C – 95 °C aumentando 0.5 °C cada segundo (temperatura media de disociación del amplicón).

CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS TRANSCRITOS *Dhcta1* Y *Dhctt1*.

La cuantificación relativa es un método para estimar la magnitud en los niveles de expresión de los genes en estudio comparando con uno o más genes de referencia.

El método usado es el de la $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO's) DE CÉLULAS DE *Debaryomyces hansenii* EN FASE ESTACIONARIA DE CRECIMIENTO CON MARCADORES FLUORESCENTES: DICLORODIHIROFLUORECEÍNA (DCFH-DA) PARA PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂) Y DIHIROETIDIO (DHE) PARA ANIÓN SUPERÓXIDO (O₂⁻).

Para analizar la cantidad de ERO's que contienen las células en la fase estacionaria, se tomó una alícuota de 1,000 μ l de cada medio por triplicado, se pusieron en tubos y etiquetaron de manera consecutiva (1, 2, y 3); se centrifugaron para obtener la pastilla de células y se retiró el sobrenadante, se lavó con buffer de fosfatos PBS; al tubo etiquetado con el número 1 se le agregó 150 μ l de PBS, al tubo 2 se le añadió 150 μ l de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), al tubo 3 le correspondieron 150 μ l de dihidroetidio (DHE); los tubos se cubrieron totalmente con papel aluminio y se incubaron dos horas a 30 °C en agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo se retiró el papel aluminio, centrifugaron los tubos y decantaron para retirar completamente el reactivo, las pastillas se disolvieron en 1,000 μ l de buffer PBS, se tomó una alícuota de 300 μ l que se transfirió a un tubo nuevo adicionando 700 μ l de PBS.

La determinación de ERO's en las células se llevó a cabo en un lector de fluorescencia (Citómetro) BD Beckman Coulter, usando longitud de onda de 488 y 530 nm para DCFH-DA que tiene fluorescencia verde y DHE que presenta fluorescencia inicial azul que al oxidarse a etidio la presenta en color rojo (Königsberg, 2008)

VII. RESULTADOS

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS GENES *Dhcta1* Y *Dhctt1*

Con el fin de diseñar los *primers* necesarios para los experimentos de RT-qPCR, se recuperaron las secuencias de los genes que codifican putativamente para las catalasas A y T de *Debaryomyces hansenii*, en la base de datos de *Genolevures* (<http://www.genolevures.org>).

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
DhCTT      ATGTTTTCGAATACATTCAAAATACGAGAAAGATCCAGCAGTCTACTCAACCTCCAA 60
DhCTA      ATGCTTCCTGTTTACATG-----AACCCGAAK 27
      * * * * *
DhCTT      GCGTTTCCATATGCCAATCATCCATATGGTCCCAACCGCAGCCCTCGCCGGCCACTA 120
DhCTA      GGR-TGTCCAATCCAG--AACATTGCTACTCAAGAGTTGGCCCAACATGGTCCATTA 84
      * * * * *
DhCTT      TTATTGCAAGATTTAAATTTGATGACGACATTTCCTCCTTCGATCATGAAAGAAATCCA 180
DhCTA      TTATTGCAAGATTTCAATCTTATGATTCCTTAGCACACTTCGACAGAGAAAGAAATCCA 144
      * * * * *
DhCTT      GAAAGAGTTGTTTCAAGGAAAGGTGGTGGTCTCAGCGATATTTGCAATTGACTGATTA 240
DhCTA      GAAAGAGTTGTCAGCCCAAGGGATCGTGGTTCAGGGTACTTTGAAAGTACTGAC-- 201
      * * * * *
DhCTT      TTGCTGATTTAACTTATGCCCCGC-CATTAACAATCCCCAG-GCTAT----AAATGTCC 288
DhCTA      ----GATTTAGTGAATTTGAGTCTGCATTTTGGATACTATGGTAAAGAAAGCC 258
      * * * * *
DhCTT      T--GTATCAGTTAGATTCTCTACAGTTGAGGCTGAAGCGGTACACCCGACACATAAGA 351
DhCTA      AAGTTTTAACCAGATTCTCCACCGTTGGTGGTGAATCGGTTCTGCTGACAGTGTAGA 315
      * * * * *
DhCTT      GATCCAAAGGGGTTCTCAATTAATTAAGAACTGACATTGGTAAATGATGGATTGGTTTTT 411
DhCTA      GATCCAAAGGATTTCTACTAAGTTGATACCGAGAGGTAAGTTGGATTTTACTGTAC 375
      * * * * *
DhCTT      AACATACACCAATCTTCTTTATTAGAGCCCGATTAAGTCTCCAAATTTATTCACACC 471
DhCTA      AACATACACCAATCTTCTTATTAGAGCCCGATTCACAGTTCCCTCAGTTTATCCATACC 435
      * * * * *
DhCTT      CAAGAGAGAGATCCATCAAACTTAATCAATTAAGTATCCATACCACTACT-TGGGA 530
DhCTA      CAAGAGAGAGCCAG--AAAC-----TCACTTGAAGZACCA-ACCATGTTTGGGA 485
      * * * * *
DhCTT      CTACTTTATCAGATCTCTGAATGCTTACATCAA--AACTACTCATGTTGGTAAAG 587
DhCTA      CTACTTGACTCTAATCAAGAAATCCATCCACCAAGTTAAGACTC--TTTTCTGGAGCC 542
      * * * * *
DhCTT      GGGTATTCCAAGAGTTGGCCGAAATGCAAGGATATTGGGCTCATACNTTAAACTAAT 647
DhCTA      TGGTACTCCACCTAGTTTACAGAGAAATGCAAGGTAAGTCTGGTCCACCTTACAGTGGTC 602
      * * * * *
DhCTT      TACGATAAAGATGAA-ATACTTATATTCAGATCCATTCTCTGCTGATGGAGGTTTTG 706
DhCTA      CACAGAGAGGGTGAATGTTACT-ACGTCCAGTCCACTTCACTCTCCGATCAAGTGTCA 661
      * * * * *
DhCTT      ACGGCTTAGTGACAAAGAGGGAAGGTTGGCTGGTTCATCAGCTGAATACACACTA 766
DhCTA      AAGCTTGCACACAGAAAGCCAGGATTTGGCAGGTC--CAATCCAGATTTTGGTCAA 720
      * * * * *
DhCTT      -AGGATTTATATGAAGAAATTCCTGCTGTAATTAATCCATATTCATTTAATGTTCAA 825
DhCTA      GAGACTTGTTCAAAGAAATTCGCAAGGTAATCGCCCATCTGACTGTTTACATCCAA 780
      * * * * *
DhCTT      ACGATGACACTTAAACAGGCTGAAGAAATTCGCTTATTCATCAATGATTTAACAAAGTA 885
DhCTA      ACCATGACTCAAGACAGGCTAAGAAAGCCACCATCTCCCTCTTGGACTTAAACCAAGGTC 840
      * * * * *
DhCTT      TGGCTCACAAGAAATCCATTAAGAAAGTTTGGCCCGATGGTTTTAGATAAGATCCG 945
DhCTA      TGGCCACATAGGATTATCCCAATGAGAGATTCGTTAAATAGTCTTGAACGAAACCCA 900
      * * * * *
DhCTT      GTAAATTACCAGATCAAAATTCACAAATTCGCTTTTCCACTGCTCATTTAGTTCGCGGA 1005
DhCTA      AAGAACTATTTTGGCAATTTGAGCAAGTTCATTTGGCACTGCTCAGCCGTTTCTCTAC 960
      * * * * *
DhCTT      ATGAGGCTCTGCTGATCCAGCTTTGCAATCAAGATTAATCTCTTACGCTGATACACAC 1065
DhCTA      ATGGAAGCTCTGCTGATCCAGCTTTGCAATCAAGATTAATCTCTTACGCTGATACACAC 1020
      * * * * *
DhCTT      CGTCATAGATTAGCGCCCAATTACCAACAGTTAAGCGTTAACAAACCAAGGACATTTGAT 1125
DhCTA      AGACACAGATTAGTACCAATTACCCCAAAATTCCTGTTACTCTCCAAACAC--TGGT 1077
      * * * * *
DhCTT      AGTAATTCGGATGTCCTATTTTAGCAGGTAATTTTCAAGAGAGGGGATGGCACTATT 1185
DhCTA      CGGTTTTCAA--TCCGATATGAGGATGGTCA--GGATGAGG--TTTAG 1122
      * * * * *
DhCTT      GATRAATCAGGATCTAGACCTAATTAATGAGTTCGTTATTAACCTATT-BAITCTGCTC 1244
DhCTA      GTRACTTAGGATCACAATCAACTATTTAGCCACTTCCAAACAGCTTGAATTC----- 1176
      * * * * *
DhCTT      GACGATCCAAAGTTCATCAAGAAATGGATTAACCACTGTTGAAGAAAAGTATTAG 1304
DhCTA      -AAGATTTTAG--CATCAAGAA--GACAGAA-- 1206
      * * * * *
DhCTT      TGTGTTCCGAACGATCTACTGATAAATGAATTTTACAGAAAGCOTAAATTTGAA 1364
DhCTA      --GTTGGGAGGGGCTGCTTCTCCAT-----TCCACTGGA--AGTACT----- 1248
      * * * * *
DhCTT      GGCATGACGAAAAAATTTGGCTCAAACTGATGACTATATTCTGGATTTAGTGGCT 1424
DhCTA      GACA-----AGGATTAATCCCAAG--TACTGCTTATACAAATGTTTTAG--CT 1293
      * * * * *
DhCTT      AAGGTTTACAGCCCAAGAGCCCTTTATAAAAATATTATTAGTAAAGATAAAGGGGA 1484
DhCTA      AAGTATCC--AAAG--TACGCTACAGC--TAGCTTACAG--AGGTTGGT-- 1336
      * * * * *
DhCTT      TTTCATAGAGCTATTCTTGGACATGCAATCGAAATAAGGTTTCTCAAAATAAAGAAAG 1544
DhCTA      -TTCATG-----TTTCTG-----GGCTGAAA-----CTCATATCCAAAGACA 1373
      * * * * *
DhCTT      AGTACCTCAGTTATGGGGTTTGTATAGAGGGGATTTAGGAGTGAAGTTCGCTAAAGGTT 1604
DhCTA      GGT--CTTGTATAG--TTGGAAAGGTTCCACCCAG--AATT--ATCCGCCAACA-TTA 1423
      * * * * *
DhCTT      AAGAGTAACTTACAGCACTTACTGTTACAGAAATATCCAGACTCTTGAATAGCTCT 1684
DhCTA      AAGAGGAGCT-----TTACAACTTTCTCCAGA----- 1482
      * * * * *
DhCTT      TGCTAACTAA 1674
DhCTA      ----AAGTAA 1458
  
```

Figura 13. Alineamiento de las secuencias de los genes *Dhcta1* y *Dhctt1* que codifican para las catalasas de *Debaryomyces hansenii*.

Para el alineamiento de las secuencias de los genes se usó el programa ClustalW 2.1. Este programa alinea dos o más secuencias para identificar su tamaño, las regiones que se encuentran conservadas, sitios con deleciones o sustituciones, espacios y similitud entre las secuencias para deducir relaciones evolutivas o usar la información con otros propósitos. En este caso, al alimentar al programa con la secuencia de los genes y alinearlos se corroboró su tamaño, 1,458 pares de bases para *Dhcta1* y 1,674 pares de bases para *Dhctt1*, y se obtuvo que la mayor variabilidad entre los dos genes se encontraba en el extremo carboxilo terminal, como se muestra en la figura 13.

DISEÑO DE PRIMERS

Sobre la región con mayor variabilidad entre los genes *Dhcta1* y *Dhctt1* (región carboxilo terminal), se diseñó una pareja de *primers* (sentido “F”, forward y antisentido “R”, reverse), tomando en cuenta el tamaño recomendado (entre 20 y 25 pares de bases), contenido de citosina y guanina (C-G rango 20 - 80%) y que la temperatura de alineamiento (mayor a 55°C) fuera muy parecida entre cada par de *primers*, el tamaño de los amplicones no debían superar los 200 pares de bases para evitar la formación de estructuras secundarias en las muestra de mRNA, ya que el equipo es muy sensible.

Para la amplificación del gen de referencia *Dh26S* ya se contaba con los *primers*, sólo se analizaron para determinar temperatura de alineamiento y tamaño del amplicón, terminando con una prueba de alineamiento específico (Blast“n”, en la página del NCBI) para la especie y gen. En análisis de los tres pares de *primers* se muestran en la figura 14.

AMPLIFICACIÓN CON LOS PRIMERS EN DNA GENÓMICO

Los *primers* diseñados para la amplificación de cada gen *Dhcta1* y *Dhctt1*, fueron probados en DNA genómico para validar si alineaban y amplificaban específicamente el segmento deseado. Para obtener el DNA genómico de *D. hansenii*, se dejó crecer a esta levadura en medio rico YPD a 28°C con agitación constante para realizar posteriormente la extracción del material genético. La prueba de amplificación de los genes se llevó a cabo en PCR de punto final considerando la T_M óptima para alineamiento y amplificación; finalmente se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% (figura 15).

Especificaciones de los primers para Dhctt1.

1. Dhctt1 Primer pair 2

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	TATGGTGCCCAAACGGCAGGC	Plus	21	85	105	59.98	61.90%
Reverse primer	GCCTGGGGATTGTAATGGACGGG	Minus	23	282	260	59.31	60.87%
Product length	198						

>XM_457656.1 Debaryomyces hansenii CBS767 DEHA2B16214p (DEHA2B16214g) mRNA, complete cds
product length = 198
Forward primer 1 TATGGTGCCCAAACGGCAGGC 21
Template 85 105
Reverse primer 1 GCCTGGGGATTGTAATGGACGGG 23
Template 282 260

Especificaciones de los primers para Dhcta1.

2. DhCTA1 Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	CCAACGGATGTCCAATCCCAGAACC	Plus	25	23	47	59.55	56.00%
Reverse primer	CCAGATCCCTTGGCGTGCACA	Minus	21	173	153	59.38	61.90%
Product length	151						

>XM_460824.1 Debaryomyces hansenii CBS767 DEHA2F10582p (DEHA2F10582g) mRNA, complete cds
product length = 151
Forward primer 1 CCAACGGATGTCCAATCCCAGAACC 25
Template 23 47
Reverse primer 1 CCAGATCCCTTGGCGTGCACA 21
Template 173 153

Especificaciones del primer Dh26S RNA.

3. Dh26S Primer

Sequence (5'->3')
Forward primer CGTCCCTGCCCTTGTACAC
Reverse primer GCCTCACTSSGCCSTTCAATCG

Figura 14. Diseño de los tres pares de primers. Se muestran características de cada uno de los primers, tanto de los genes *Dhcta1* y *Dhctt1*, como del gen de referencia *Dh26S*. Los primers cumplen con los requerimientos necesarios para su uso en qPCR.

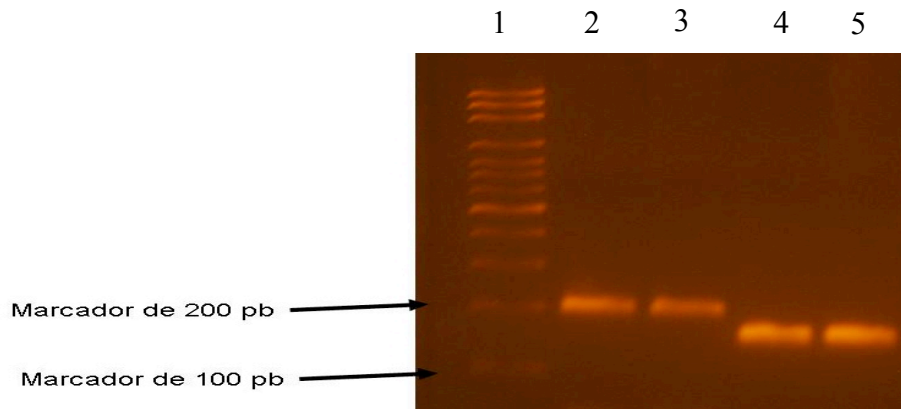


Figura 15. Prueba de amplificación de primers con DNA genómico de *Debaryomyces hansenii*. En el carril 1, marcador de peso molecular, 100 pb es la marca más baja y la banda inmediata corresponde a 200 pb. En los carriles 2 y 3 se aprecia el amplicón de *Dhctt1* de 198 pb, en los carriles 4 y 5, el amplicón correspondiente a *Dhcta1* de 151 pb.

OBTENCIÓN DEL RNA TOTAL

Una vez probado que los *primers* eran específicos, se prosiguió con el crecimiento de *D. hansenii* en los cuatro medios para realizar la extracción de RNA total mediante el método descrito en la metodología cuando la levadura se encontraba en fase estacionaria. Para verificar la integridad y calidad del RNA, se realizó una electroforesis, que se muestra en la figura 16.

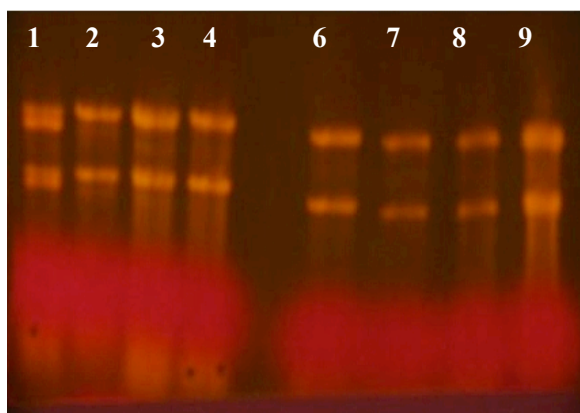


Figura 16. Electroforesis de RNA total de *D. hansenii* crecida en glucosa o etanol y presencia o ausencia de NaCl. Se observan las dos principales subunidades ribosomales, *Dh26S* y *Dh18S*; en los carriles 1 y 6, RNA de *D. hansenii* crecida en YPD; carriles 2 y 7, YPD+NaCl; carriles 3 y 8, YPEtOH; carriles 4 y 9, YPEtOH+NaCl.

SÍNTESIS DE cDNA.

Con el fin de realizar una prueba de amplificación con los *primers*, se sintetizó DNA complementario (cDNA) a partir de los RNAs extraídos de los cuatro cultivos. La síntesis de cDNA es una reacción en donde se usa un templado de mRNA maduro para sintetizar una cadena sencilla de DNA y a partir de ella una segunda complementaria utilizando una transcriptasa reversa bajo condiciones controladas, ya que es una metodología “in vivo”.

Una vez que terminó la reacción de retrotranscripción las muestras se limpiaron de impurezas proteicas y restos de RNA con lavados de fenol-cloroformo-isoamílico (PCI, 25:24:1) y se llevó a cabo la reacción de PCR punto final con las concentraciones de reactivos y muestras, así como las temperaturas antes estandarizadas. A cada tubo se le añadieron los cuatro *primers* correspondientes a los dos genes, para su detección en una reacción múltiple (figura 17).

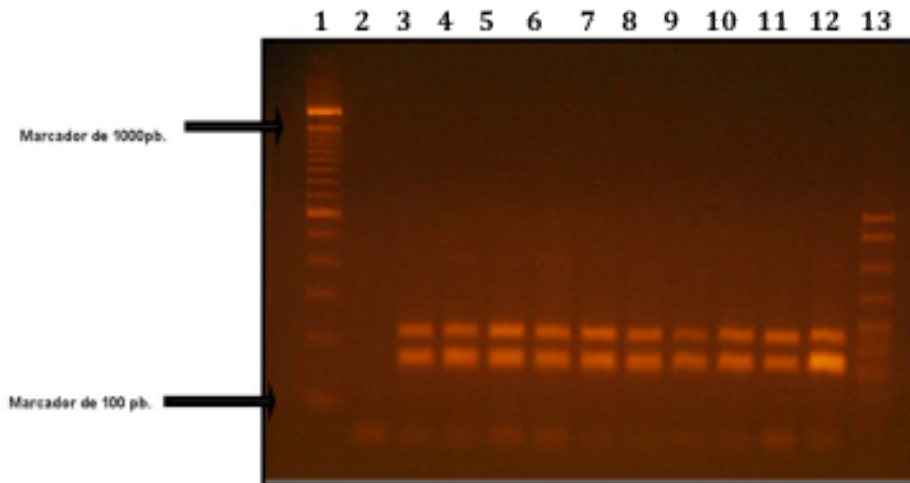


Figura 17. Amplificación de cDNAs por PCR de punto final. En los carriles 3 al 12 se pueden observar dos bandas, la más baja de 151 pb corresponde a *Dhcta1* y la banda de arriba de 198 pb corresponde al gen *Dhctt1*. En los carriles 1 y 13 los marcadores de peso molecular, la banda más baja es de 100 pb, la banda inmediata superior es de 200 pb. El carril 2 tiene el control negativo, sin haber agregado cDNA. Los carriles 3 al 8 corresponden al cDNA de doble cadena, los carriles 9 al 12 son cDNA de cadena sencilla. La diferencia entre cada uno de los carriles es el medio en el que fueron crecidas las células: en los carriles 5 y 9 se encuentran las muestras de cDNA en YPD; los carriles 2, 6 y 10 corresponden a YPD+NaCl; en 3, 7 y 11 al medio YPEtOH; los carriles 4, 8 y 12 corresponden a YPEtOH+NaCl.

RETROTRANSCRIPCIÓN Y AMPLIFICACIÓN EN RT-qPCR.

El equipo usado para la reacción de PCR en tiempo real requiere $mRNA$ como sustrato, ya que trabaja con una enzima de retrotranscripción que realiza la reacción de síntesis de cDNA y después amplifica en un solo paso, para ello, se necesitó tratar a las muestras de RNA con DNAsa para eliminar cualquier contaminación por DNA presente. Hubo que realizar pruebas de estandarización, ya que esta técnica y el equipo son muy sensibles y los datos obtenidos podían no ser muy precisos; cabe destacar que la mezcla de reacción ya contiene el fluoróforo, dNTP's, enzima y buffer con Mg necesarios para que se lleve a cabo la reacción. El fluoróforo SYBR GREEN funciona al ser excitado por luz azul ($\lambda_{max} = 488nm$) emitiendo como respuesta luz verde ($\lambda_{max} = 522nm$); este es conocido como fluoróforo inespecífico, ya que se une sin distinción a segmentos de DNA de doble cadena, pero tiene la ventaja de usar *primers* para efectuar la amplificación de segmentos específicos, debido a ello es detectable la generación exponencial del amplicón de interés. El uso de genes de referencia o *housekeeping* para realizar la cuantificación de la expresión del $mRNA$ sirve para corregir la variación no específica entre la cantidad y calidad del RNA empleado, ya que estos parámetros pueden afectar las eficiencias de la retrotranscripción. Se busca

que el gen de referencia sea lo más estable posible ya que a partir de él se calculará el nivel de producto obtenido en cualquier momento de la amplificación mediante la señal de fluorescencia basada en un umbral determinado.

Las reacciones fueron hechas individualmente, un juego de *primers* (sentido y antisentido) a la vez.

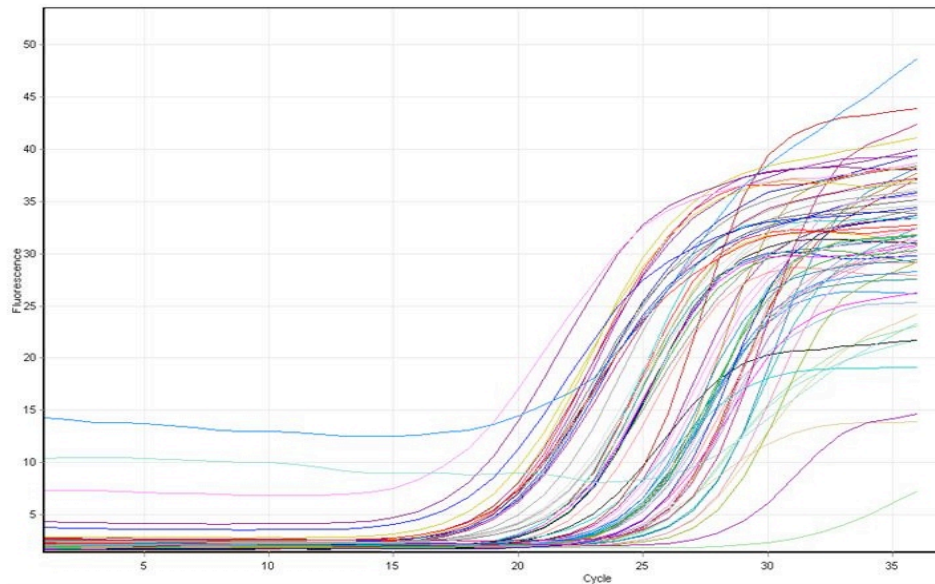


Figura 18. Amplificación de los genes *Dhcta1* y *Dhctt1* y el gen de referencia *Dh26S*.

Debido a que se realizó una estandarización de los tres genes, incluyendo concentraciones de *primers*, temperatura de alineamiento y número de ciclos, fue posible usar un mismo programa de corrida para los tres genes, la imagen se muestra en la figura 18. En la gráfica se pueden apreciar tres grupos de amplificaciones. El primero, entre los ciclos 16 al 20, corresponden a *Dh26S*, entre los ciclos 20 al 24 se amplificó el transcrito de *Dhcta1* y *Dhctt1* se amplificó a partir del ciclo 25.

Las amplificaciones muy tempranas se relacionan directamente con una mayor cantidad del transcrito del gen *Dhcta1* (debido a que la PCR es una reacción exponencial se aumenta de manera significativa la cantidad de moléculas de cDNA recién sintetizadas, es por ello que en los ensayos de qPCR en donde hay más concentración de estas moléculas se rebasa primero el umbral basal de fluorescencia), así a diferencia del gen *Dhctt1* que amplifica ciclos más tarde, implicando que existe

menor número de estos transcritos, esto es consistente no importando las diferentes condiciones de cultivo.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE REFERENCIA, *Dh26S*.

Generalmente, los genes de referencia son amplificados antes que los genes problema y son muy estables, por ello los ensayos se realizaron en el mismo momento y bajo las mismas condiciones ambientales.

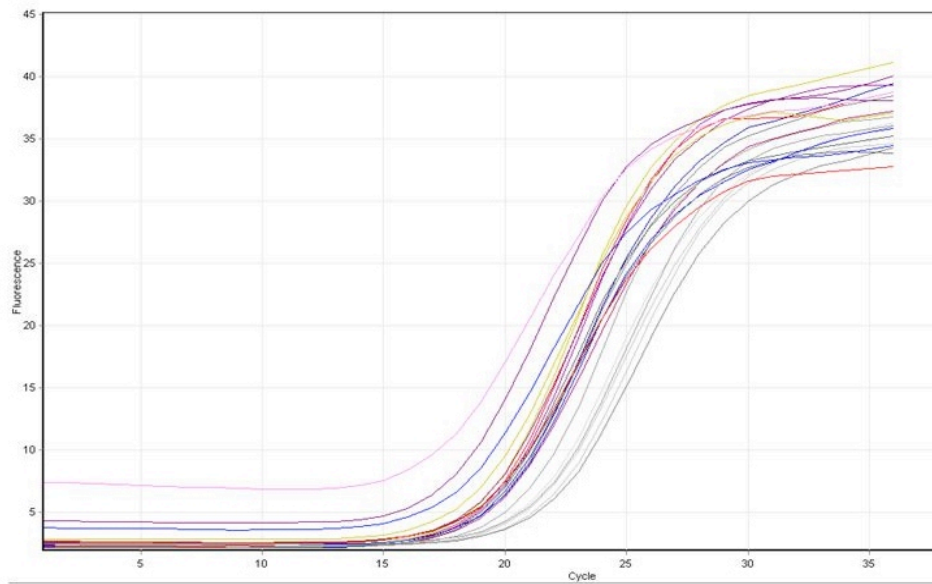


Figura 19. Amplificación del gen de referencia (housekeeping) *Dh26S*.

Como se indicó anteriormente, el gen *Dh26S* se usó como referencia ya que por tratarse de un gen ribosomal la probabilidad de que los niveles de este transcrito se vieran afectados por las diferentes condiciones en que se creció a la levadura *D. hansenii* eran muy pocas en comparación con otros genes de citoesqueleto o algunos otros implicados en el metabolismo. El *Dh26S* inició la amplificación en el ciclo 16 aproximadamente (antes que cualquiera de los otros dos genes), variando según la muestra que se estaba amplificando, es decir, YPD o YPEtOH con y sin sal (figura 19). De manera consistente, se amplificaba primero el transcrito proveniente del cultivo en YPD,

después el de YPEtOH, luego el de YPD+0.06M de NaCl y finalmente el de YPEtOH+0.6M de NaCl. Como se discute más adelante, por tratarse de un gen cuya expresión suponíamos constitutiva, creemos que la integridad del RNA está comprometida en el medio de cultivo que contiene EtOH como fuente de carbono.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN *Dhcta1*.

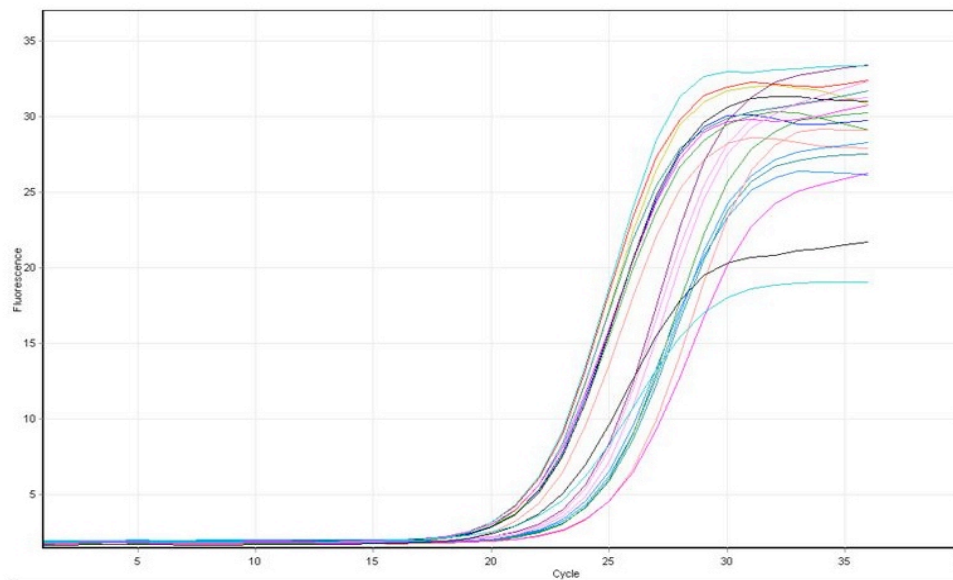


Figura 20. Amplificación del gen *Dhcta1*.

En el caso de *Dhcta1*, la amplificación inició en el ciclo 20; en la escala de fluorescencia presenta un umbral máximo de 35. Estos datos son importantes para llevar a cabo la cuantificación comparativa de los transcritos (figura 20). La amplificación fue más temprana para el transcrito que provenía del medio YPD, después la del medio YPEtOH, luego la de YPD+0.6M de NaCl y la más tardía, sugiriendo una cantidad menor de transcrito, la que provenía de YPEtOH+0.6M de NaCl.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN *Dhctt1*.

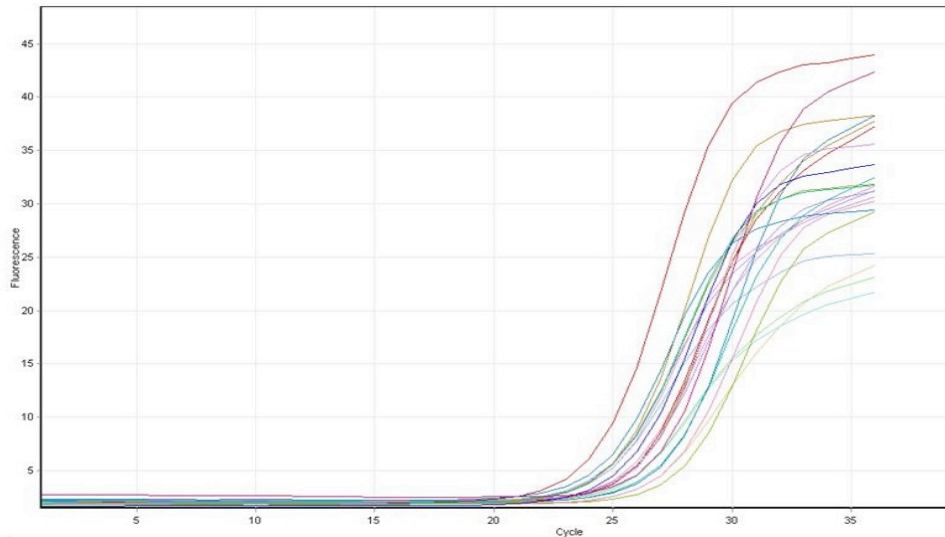


Figura 21. Amplificación del gen *Dhctt1*.

En este caso la amplificación se muestra a partir del ciclo 24, con umbral de fluorescencia que va desde 20 hasta más de 40 dependiendo de la muestra que se está amplificando (figura 21). El primer transcrito en amplificar fue el de YPD+0.6M de NaCl, luego el de YPD, después el de YPEtOH y al final YPEtOH+0.6M de NaCl.

Las pendientes de la amplificación de los tres genes son muy distintas, así como el ciclo en el que cada uno empezó a amplificar y el máximo de fluorescencia alcanzado por gen y por muestra, lo que se puede interpretar como un parámetro de la expresión diferencial entre los dos transcritos en los distintos medios.

CURVAS DE DISOCIACIÓN (T_m) PARA *Dh26S*, *Dhcta1* Y *Dhctt1*.

La T_m (melting temperature) o curva de disociación de los amplicones, permite calcular la temperatura de disociación del fragmento deseado. Debido a su especificidad, permite discernir entre productos inespecíficos y dimerizaciones y el amplicón de interés.

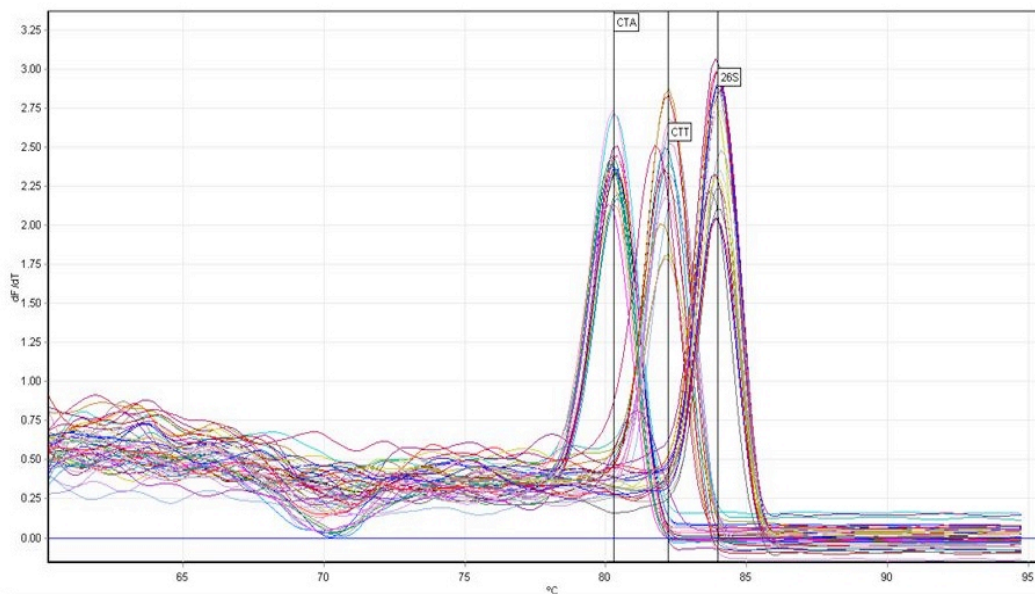


Figura 22. Curva de disociación de los diferentes amplicones generados en la reacción. Esta imagen muestra las temperaturas de disociación de los amplicones generados siendo consistentes con los datos previos del tamaño esperado para la amplificación de cada gen. En el eje de la X se encuentra la T_m , de los tres amplicones y en el eje de las Y una escala a la cual se pierde la fluorescencia por la desnaturalización de las ebras de cDNA.

El tamaño promedio de los amplicones de cada gen es consistente con la temperatura de disociación, ya que el fragmento más pequeño corresponde a *Dhcta1* con 151 pares de bases y una T_M de 80.35 °C, *Dhctt1* tiene 198 pares de bases y una T_M de 82.27 °C, y *Dh26S* una T_M de 83.8 °C por tratarse de un fragmento más grande (figura 22). Esto demuestra que los datos obtenidos son realmente los fragmentos deseados y no se trata de la formación de dímeros por el exceso de *primers*, formación de estructuras secundarias en las muestras de RNA, amplificaciones por contaminación de DNA ni amplificaciones inespecíficas cuando se llevó a cabo la reacción.

El análisis individual de los datos de T_M de cada amplicón en cada uno de los medios mostró que para *Dhcta1* en medio YPD aparentemente tiene un amplicón de mayor tamaño; su T_M promedio es de 80.5°C. En orden descendente le sigue el medio correspondiente a YPEtOH con 80.40°C, el amplicón de los medios YPD+NaCl y YPEtOH+NaCl con 80.35 °C. En el caso de *Dhctt1* se necesitó mayor temperatura en el medio YPD con 82.50 °C, posteriormente el medio YPEtOH con 82.40 °C, finalmente los medios YPD+NaCl y YPEtOH+ NaCl con 82.35 °C.

El gen de referencia *Dh26S* mostró un amplicón mayor comparado con los otros dos genes, asimismo se observó que el más grande de sus amplicones fue el del medio YPD con 84.4 °C, le siguieron YPD+NaCl y YPEtOH con 84.35 °C y finalmente YPOH+NaCl con 83.5 °C.

CUANTIFICACIÓN RELATIVA

El análisis de cuantificación relativa se realizó por el método de la $2^{-\Delta\Delta Ct}$, esta técnica se utiliza para obtener la magnitud en los cambios de los niveles de expresión de uno o más genes en estudio comparándolos con uno o más genes de referencia (Pfaffl, 2004). El cálculo de la expresión relativa se basa en la comparación de los valores de Ct y se aplica para una estimación rápida de la proporción relativa de la expresión genética en estudio (Pfaffl, 2001).

Para realizar la cuantificación relativa, se llevó a cabo una normalización con el gen de referencia y posteriormente se consideró como medio estándar de crecimiento al medio rico YPD; así pues, la cantidad de transcrito encontrada de los dos genes en estudio, *Dhcta1* y *Dhctt1* en esta condición fueron considerados como la cantidad normal para realizar la comparación con las otras tres condiciones de cultivo.

Los datos mostrados en la siguiente figura (figura 23) se obtuvieron al promediar las dobles deltas ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de los transcritos en cada condición de crecimiento, estas deltas se obtuvieron de tres eventos independientes de amplificación con tres triplicados de cada evento.

	Dhcta1	Dhctt1
YPD/YPD	1	1
YPD/YPD+NaCl	0.397	3.176
YPD/YPEtOH	0.371	0.876
YPD/YPEtOH+NaCl	0.124	0.222

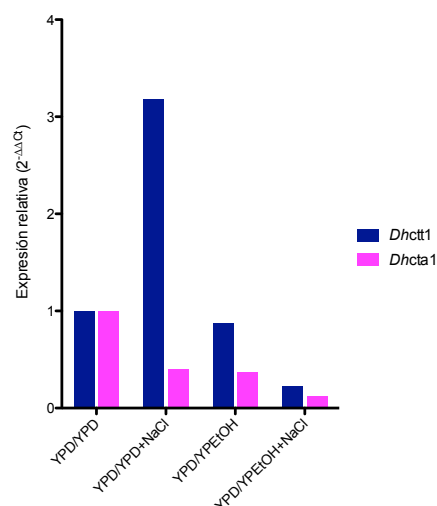


Figura 23. Cuantificación relativa de los transcritos *Dhcta1* y *Dhctt1*. (Tabla 2)

La tabla anterior muestra que el transcrito codificante para la enzima catalasa A tiene mayor presencia solo en el medio YPD, esta se ve disminuida en los demás medios especialmente en el que contiene etanol y sal (YPEtOH+NaCl); en los medios YPD+NaCl y YPEtOH se mantiene un nivel de transcrito similar. Con respecto al transcrito de *Dhctt1* solo se ve aumento de este en el medio YPD+NaCl, de manera que los niveles más altos de este transcrito se presentan en los medios que contienen glucosa como fuente de carbono; en el medio que contiene etanol el transcrito es similar al del medio considerado estándar YPD y en YPEtOH+NaCl la disminución fue considerable; cabe mencionar que ambos transcritos sufrieron una disminución equiparable y considerable de sus niveles cuando la levadura fue crecida en medio de etanol con sal (YPEtOH+NaCl).

CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LOS CULTIVOS DE *Debaryomyces hansenii*

Se determinó la cantidad de peróxido de hidrógeno y anión superóxido en la fase estacionaria de crecimiento de *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces cerevisiae* para comparar entre estas dos especies de levaduras la cantidad de radicales que se generan cuando son sometidas a diferentes condiciones de estrés durante su crecimiento; al mismo tiempo sirve para correlacionar los datos obtenidos en la cuantificación de tiempo real, proporcionando información sobre la actividad enzimática llevada a cabo por las dos levaduras bajo diferentes condiciones.

Para ello se usaron dos tipos de marcaje fluorescentes específicos, la DCFH-DA (dihidrodiclorofluoresceína), que presenta fluorescencia verde que reacciona a longitud de onda de 488 nm y el DHE (dihidroetidio), que absorbe a 530 nm, mostrando fluorescencia inicial azul que al oxidarse a etidio la presenta en color rojo.

La DCFH-DA no es capaz de reaccionar directamente con el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), pero reacciona con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia de peroxidasa, citocromo C o iones de Fe^{2+} como los que poseen las catalasas en sus grupos hemo. En cambio el DHE, a diferencia de la DCFH-DA, es capaz de reaccionar directamente con los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A continuación se presentan una serie de gráficas de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* que muestran los datos obtenidos de los ensayos para detectar la cantidad de radicales libres de oxígeno, peróxido de hidrógeno y anión superóxido intracelular (figura 24, 25 y 26):

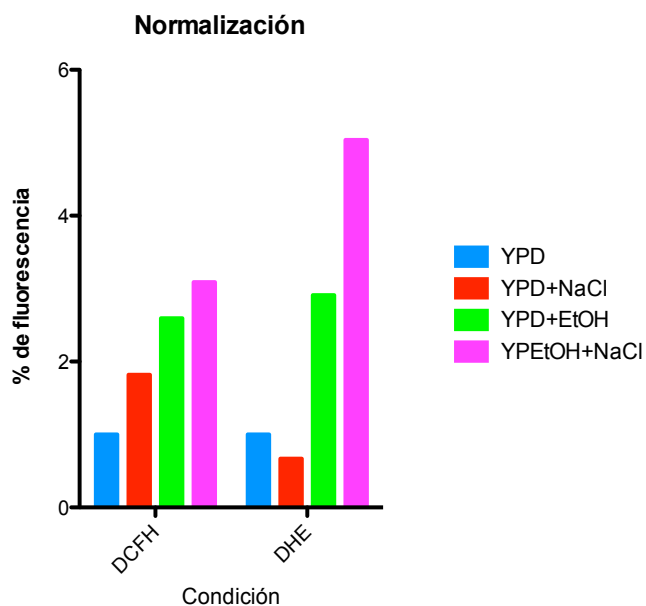


Figura 24. Normalización de los datos obtenidos por citometría para *D. hansenii* en fase estacionaria en cuatro medios diferentes. La DCFH-DA es un marcador que reacciona ante el radical peróxido de hidrógeno; el DHE se oxida al estar en contacto con anión superóxido.

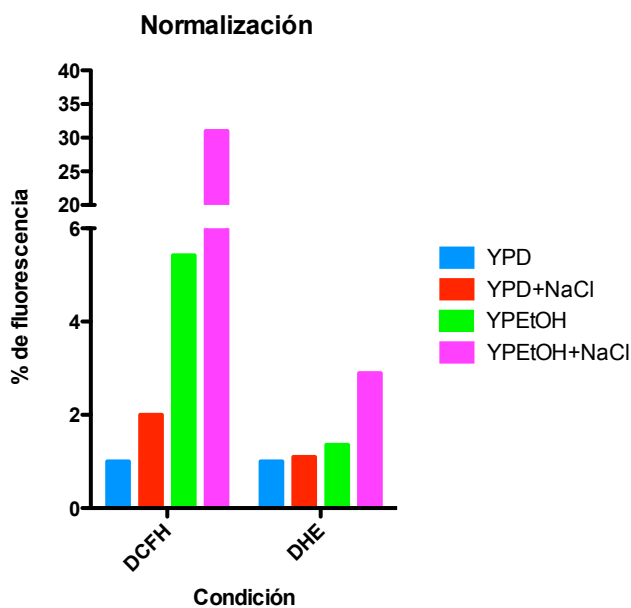
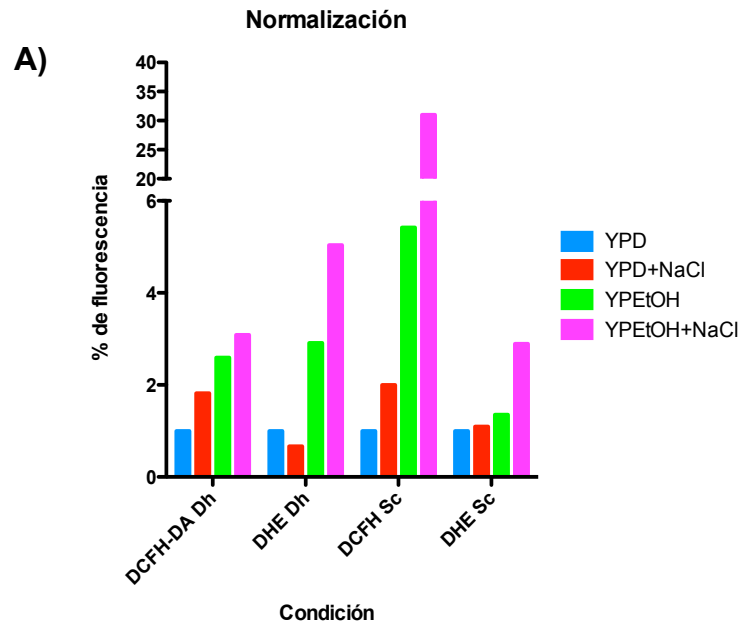


Figura 25. Normalización de datos obtenidos por citometría para *S. cerevisiae* en fase estacionaria en cuatro medios de cultivo. La DCFH-DA es un marcador que reacciona ante el radical peróxido de hidrógeno; el DHE se oxida al estar en contacto con anión superóxido.



B)

Cepa	MEDIO							
	YPD		YPD+NaCl		YPEtOH		YPEtOH+NaCl	
Fluoróforo	DHE	DCFH	DHE	DCFH	DHE	DCFH	DHE	DCFH
<i>D. hansenii</i>	1	1	0.667	1.820	2.910	2.594	5.037	3.088
<i>S. cerevisiae</i>	1	1	1.096	2	1.355	5.42	2.892	31

Figura 26. Gráfica de la comparación de los datos normalizados de *D. hansenii* y *S. cerevisiae*; en la tabla de abajo se muestran los datos de fluorescencia obtenidos para peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Tabla 3.

ANÁLISIS DE COMPLEJIDAD Y TAMAÑO CELULAR

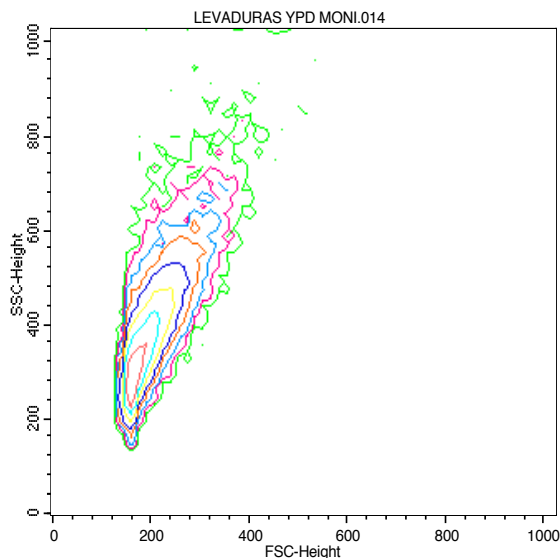
El parámetro “complejidad celular” se mide en función de la dispersión de la luz; pues al interaccionar el haz de luz con partículas de tamaño significativo, produce un cambio de dirección (desviación del haz de luz). Las características morfológicas de la célula que determinan la dispersión son el tamaño celular, membrana, núcleo, organelos, proteínas y material granular.

Se realizaron varios ensayos midiendo tamaño y complejidad celular de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* cultivadas en los medios YPD, YPD+NaCl, YPEtOH y YPEtOH+NaCl; con los datos registrados para estos dos parámetros se calculó la media y analizaron por separado; es importante mencionar que los valores de las escalas mostradas en las gráficas de tamaño y complejidad celular son unidades relativas utilizadas por el equipo a partir del cual se realiza una comparación con los grupos experimentales.

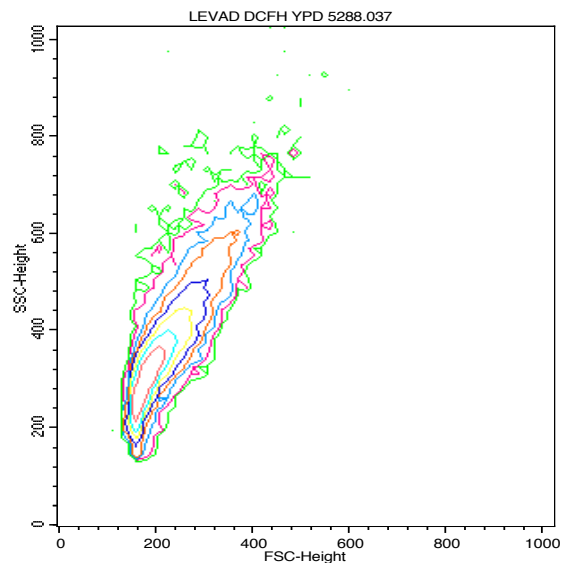
En la figura 27 se observa la respuesta que tuvieron las células de las dos especies de levadura ante las diferentes condiciones osmóticas (con y sin NaCl) y las fuentes de carbono: fermentable (glucosa) y no fermentable (etanol).

Con respecto a los datos de distribución de tamaño y complejidad celular, resulta importante mencionar que las células de *D. hansenii* crecidas en cualquiera de los cuatro medios son más pequeñas que las de *S. cerevisiae* en las mismas condiciones, sin embargo un fenómeno que se apreció en ambas levaduras fue que redujeron su tamaño considerablemente cuando se cultivaron en medio con etanol como fuente de carbono con y sin sal (YPEtOH y YPEtOH+NaCl).

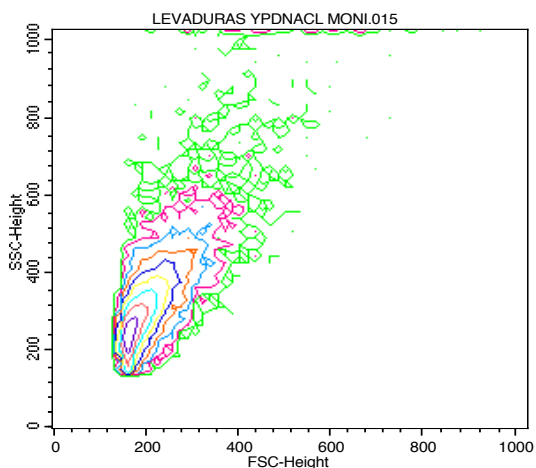
***Debaryomyces hansenii* en YPD**



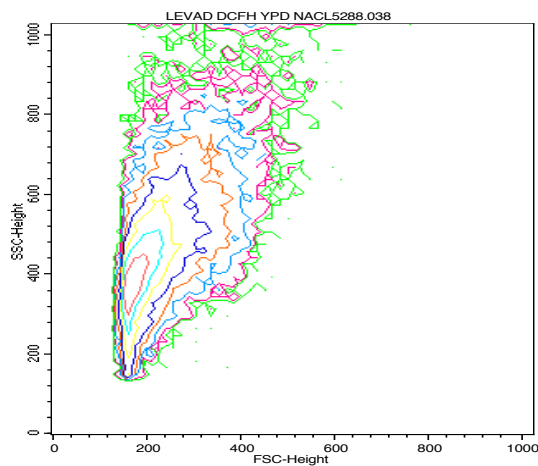
***Saccharomyces cerevisiae* en YPD**



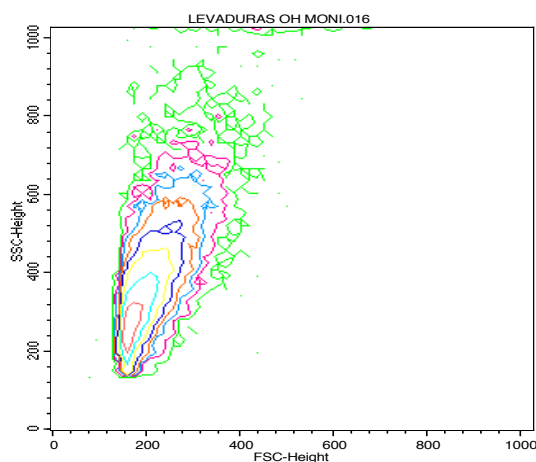
***Debaryomyces hansenii* en YPD+NaCl.**



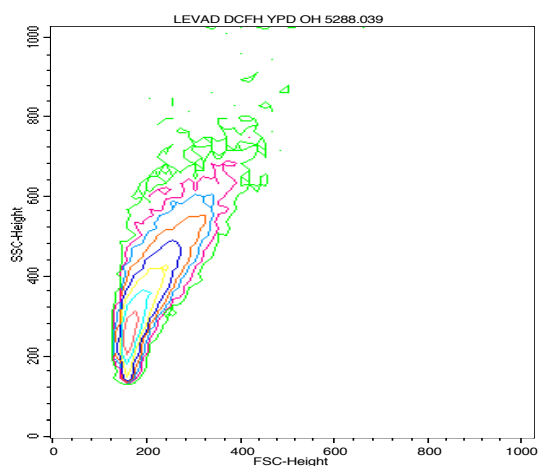
***Saccharomyces cerevisiae* en YPD+NaCl.**



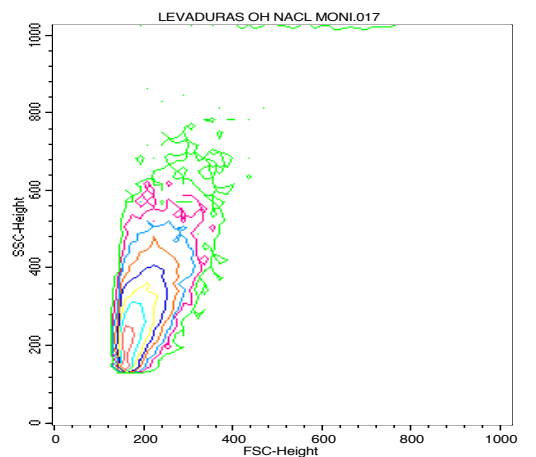
***Debaryomyces hansenii* en YPEtOH.**



***Saccharomyces cerevisiae* en YPEtOH.**



***Debaryomyces hansenii* en YPEtOH+NaCl.**



***Saccharomyces cerevisiae* en YPEtOH+NaCl.**

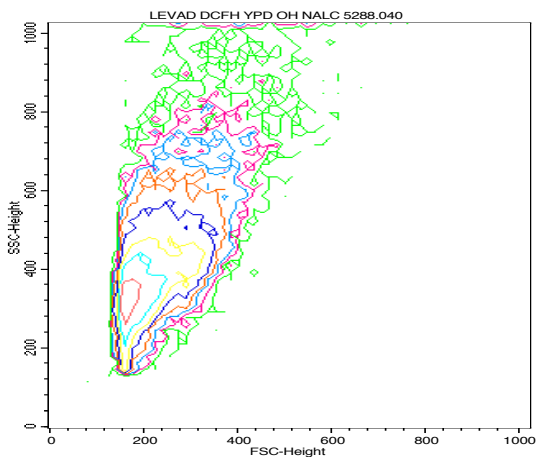


Figura 27. Gráficos de tamaño y complejidad celular de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* crecidas en cuatro medios diferentes (YPD, YPD+NaCl, YPEtOH y YPEtOH+NaCl). En la columna de la izquierda se encuentran las gráficas correspondientes a *D. hansenii*, en la derecha a *S. cerevisiae*. En el eje de las X se encuentra una escala de tamaño celular y en el eje de las Y otra escala de complejidad celular.

En la tabla 4 se muestran los valores numéricos promediados de los parámetros de tamaño y complejidad celular de las dos especies de levaduras, *D. hansenii* y *S. cerevisiae*:

TABLA 4.

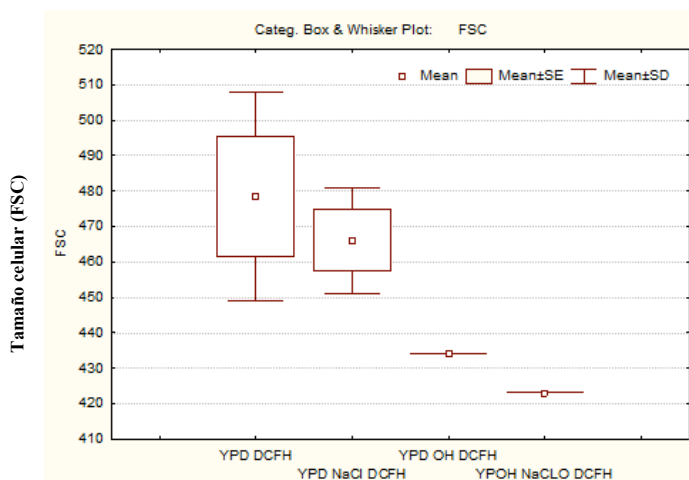
	<i>Debaryomyces hansenii</i>				<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
	YPD	YPD+NaCl	YPEtOH	YPEtOH+NaCl	YPD	YPD+NaCl	YPEtOH	YPEtOH+NaCl
Tamaño	478.5	466	434	423	503.5	523.5	466	511.47
Complejidad	845.4	697	836.5	808.5	834	933.5	764	901.5

Tabla 4. Valores de complejidad y tamaño celular para *D. hansenii* y *S. cerevisiae*.

Para el resultado anterior se calculó la media de los datos obtenidos de los tres ensayos elaborados por triplicado en cada uno de los medios en que fueron crecidas las dos especies de levaduras, *D. hansenii* y *S. cerevisiae*. Los gráficos muestran la relación tamaño-complejidad celular. Asimismo, se realizó una prueba de Tukey a los datos de cada especie de levadura para determinar si existe una diferencia significativa entre las células de los cuatro medios, utilizando todos los pares de medias posibles y comparándolas entre sí. Esta prueba se basa en un rango de distribución “q” studentizada para identificar cuándo la diferencia entre dos medias es mayor que el error estándar y por lo tanto existen diferencias entre un grupo de células y otro.

En la figura 28 se muestra la gráfica de caja y bigotes del tamaño celular obtenida mediante la prueba de Tukey para *D. hansenii* y *S. cerevisiae* respectivamente, en donde se cotejó el tamaño de las células cultivadas en YPD en contraste con los otros tres medios, YPD+NaCl, YPEtOH y YPEtOH+NaCl.

Debaryomyces hansenii



<i>D. hansenii</i>				
Tukey HSD test; Variable: FSC (por separado)				
Marked differences are significant at p < .05000				
	{1}	{2}	{3}	{4}
M 25 al 28	M=478.50	M=466.00	M=434.00	M=423.00
YPD DCFH {1}		0.792823	0.044089	0.014546
YPD NaCl DCFH {2}	0.792823		0.161344	0.051506
YPD OH DCFH {3}	0.044089	0.161344		0.846338
YPOH NaClO DCFH {4}	0.014546	0.051506	0.846338	

Saccharomyces cerevisiae

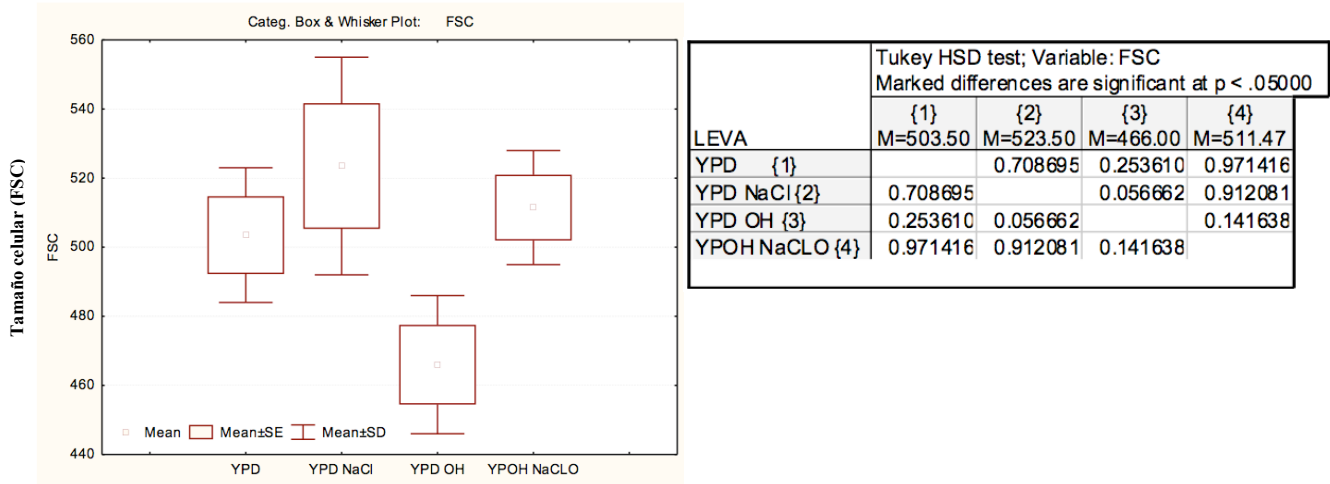
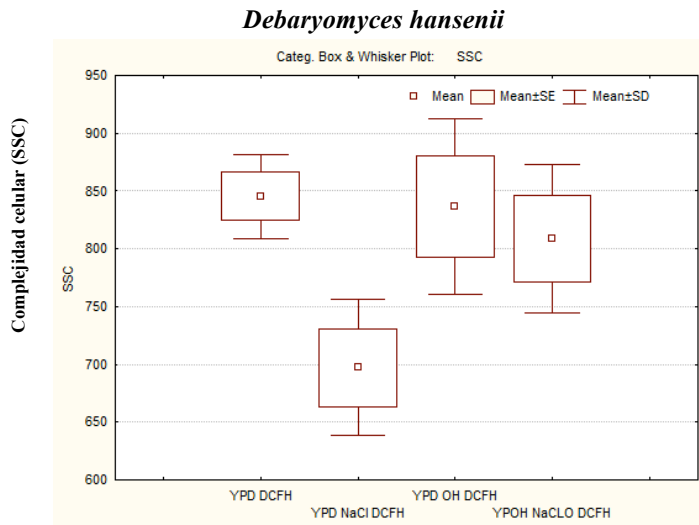


Figura 28. Gráficas comparativas del tamaño celular, cuando las dos especies de levaduras fueron cultivadas en las cuatro condiciones diferentes (YPD, YPD+NaCl, YPEtOH y YPEtOH+NaCl). Al lado de las gráficas se muestran los resultados de la prueba de Tukey; en color rojo se encuentran los valores cuando el cambio de tamaño tiene significancia estadística.

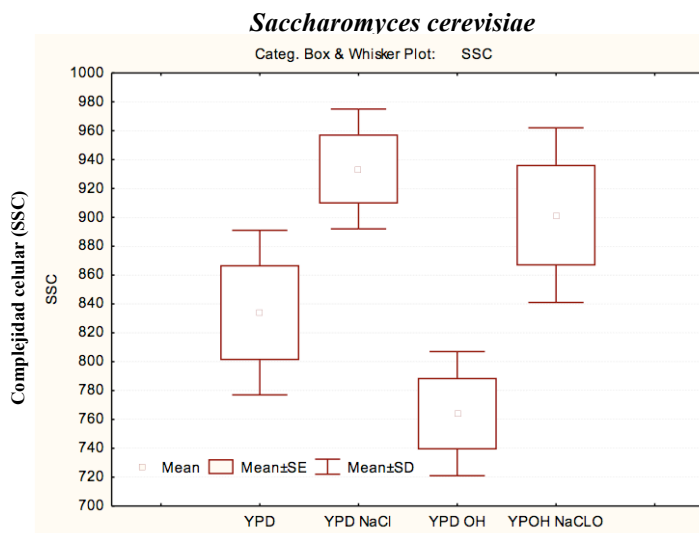
Mediante las gráficas de la figura 28 se muestra que las células de *D. hansenii*, cuando son crecidas en medio YPD, son células de gran tamaño. El crecerlas en medio YPD+NaCl ocasionó que su tamaño se redujera aproximadamente un 3% y al comparar el tamaño de las células crecidas en YPEtOH y YPEtOH+NaCl se obtuvo que entre estas dos condiciones no hay diferencia de tamaño; sin embargo, comparadas con el medio ideal (YPD) se obtuvo que redujeron su tamaño en más del 26%. Cabe destacar que estos cambios en el tamaño de las células tienen significancia estadística.

Para el caso de *S. cerevisiae* se observó que las células de mayor tamaño son las crecidas en medio YPD+NaCl, siguiendo las crecidas en YPEtOH+NaCl con una diferencia en tamaño del 2.3%, después el medio YPD con una diferencia de 3.8% y las células que fueron más pequeñas fueron las cultivadas en etanol, ya que redujeron su tamaño aproximadamente 11%; sin embargo estos cambios no tienen significancia estadística.

En la figura 29 se presentan las gráficas de complejidad celular para las dos levaduras, también se realizó una prueba de Tukey para determinar si existían diferencias significativas.



<i>D. hansenii</i>		Tukey HSD test; Variable: SSC (por separado) Marked differences are significant at $p < .05000$			
		{1}	{2}	{3}	{4}
LEVA 1		M=845.50	M=697.00	M=836.50	M=808.50
YPD DCFH {1}			0.067795	0.997778	0.876657
YPD NaCl DCFH {2}		0.067795		0.087522	0.191427
YPD OH DCFH {3}		0.997778	0.087522		0.940289
YPOH NaClO DCFH {4}		0.876657	0.191427	0.940289	



<i>S. cerevisiae</i>		Tukey HSD test; Variable: SSC Marked differences are significant at $p < .05000$			
		{1}	{2}	{3}	{4}
LEVA		M=834.00	M=933.50	M=764.00	M=901.50
YPD {1}			0.158654	0.394582	0.422738
YPD NaCl {2}		0.158654		0.015582	0.867709
YPD OH {3}		0.394582	0.015582		0.044319
YPOH NaClO {4}		0.422738	0.867709	0.044319	

Figura 29. Gráficas comparativas de la complejidad celular cuando las dos especies de levaduras fueron cultivadas en las cuatro condiciones diferentes (YPD, YPD+NaCl, YPEtOH y YPEtOH+NaCl).

La cantidad de organelos y partículas que forman parte del parámetro complejidad celular en *D. hansenii* son más abundantes cuando crece en medio YPD, seguido por las células que crecieron en medio con YPEtOH, luego YPEtOH+NaCl y finalmente YPD+NaCl; esto es importante, ya que sugiere que las células crecidas en los medios que contenían sal no son más complejas que las crecidas en el medio que no la tiene; sin embargo, en muchos organismos el despliegue de la maquinaria “anti-estrés” encargada de contender con cambios en la osmolaridad o partículas

resultantes de cambios en la osmolaridad, se elevan cuando la salinidad del medio aumenta en comparación con el medio ideal y en esta levadura no se observa este fenómeno.

En el caso de *S. cerevisiae*, la mayor complejidad se presenta en las células crecidas en medio YPD+NaCl, siguiendo las crecidas en YPEtOH+NaCl, en tercer lugar las de los medios YPD y por último las células crecidas en YPEtOH; este comportamiento es diferente al que presenta *D. hansenii* ya que parece ser que *S. cerevisiae* tiene una mejor adaptación al etanol que a la sal, en cambio *D. hansenii* se adapta mejor a la sal que al etanol.

VIII. DISCUSIÓN

La secuencia de *Debaryomyces hansenii* CBS 767 está disponible en la página WEB del Consorcio de Genolevures (Sherman, et al, 2009). Las secuencias de DNA que codificarían a las catalasas de *D. hansenii* fueron recuperadas por su similitud con las de *Saccharomyces cerevisiae*. Las dos secuencias obtenidas fueron alineadas; así al alineamiento fue posible determinar qué región en las secuencias de estos dos genes presentaba mayor variabilidad, encontrando que esto ocurría en la región carboxilo terminal, la cual se utilizó para el diseño de los *primers*; en la figura 13 se muestran las secuencias alineadas y en la figura 14 se muestran los *primers* diseñados, tomando en cuenta que fueran los adecuados para su utilización en RT-qPCR; para el gen *Dhcta1* el *primer forward* se alineó en la base número 23 y el *reverse* en la base 173, para *Dhctt1* el *primer forward* alineaba en la base 85 y el *reverse* en 282, generando amplicones de 151 y 198 bases respectivamente.

La prueba de PCR de punto final se realizó para probar si en todo el genoma de *D. hansenii* podrían alinearse los *primers* o solo en los genes que codifican a las proteínas catalasas, figura 15; de esta manera obtuve que sólo amplificaron en estas secuencias, demostrando su especificidad.

La cuantificación de los transcritos se hizo a partir de RNA total de las células; debido a ello, este material debe ser de buena calidad, por lo que realicé dos pruebas, una electroforesis para visualizar su integridad (figura 16) y la síntesis de cDNA de cadena sencilla y doble, para después amplificar los dos genes de manera correcta (figura 17).

La retrotranscripción de los genes es uno de los pasos más importantes, ya que se deben estandarizar todas las condiciones que puedan variar los resultados, las cuestiones a considerar son: la cantidad de muestra (RNA), la contaminación con DNA y proteínas, las concentraciones de los *primers* y reactivos.

En general, en los resultados crudos se observa que los transcritos de *Dhcta1* son más abundantes que los de *Dhctt1*; específicamente, en la cuantificación relativa de los transcritos, se obtuvo que *Dhcta1* está presente en los cuatro medios, siendo más abundante en YPD, mientras que la transcripción de este gen en YPEtOH+NaCl disminuye una décima parte en comparación con la cantidad de transcrito en el primer medio. Por otro lado, la transcripción de *Dhctt1* parece estar regulada no solo por la fuente de carbono, sino también por la sal, porque en los medios que

contenían glucosa se observó la mayor cantidad de transcrito y en el medio YPD+NaCl se presentó un incremento de 3.176 veces con respecto al normalizado (YPD). En los medios que contenían etanol como fuente de carbono, disminuyó la presencia del transcrito, en especial en YPEtOH+NaCl; en los dos medios se observó un fenómeno parecido, la transcripción del gen tiende a disminuir su nivel de expresión cuando la fuente de carbono es etanol y esta disminución es mayor si se adiciona NaCl.

Cabe mencionar que cuando se usa glucosa como fuente de carbono, las reacciones de qPCR fueron consistentes y reproducibles; por el contrario, algo le ocurre a la transcripción de los genes en los medios que contienen etanol; de alguna manera este compuesto está alterando a la célula, ya que los transcritos de ambos genes se mostraron inestables, las eficiencias de reacción variaron en un mismo evento y entre los demás triplicados y el tamaño teórico de los amplicones (*Dhcta1* y *Dhctt1*) varió en algunos pares de bases.

Debido a que el etanol es una fuente precursora de radicales de oxígeno, la sal en los medios con etanol adiciona una segunda agresión de tipo osmótica que podría explicar este efecto sobre los transcritos; sin embargo, a diferencia de otras levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, la maquinaria metabólica y antioxidante de *Debaryomyces hansenii* responde de manera más eficaz ante los cambios nutricionales, pero sobre todo osmóticos, a los que es sometida durante su crecimiento.

En pocas palabras, los niveles de expresión de los dos transcritos varían dependiendo del medio en el que creció la levadura. La mayor presencia de *Dhctt1* se encuentra en YPD+NaCl, después YPD, luego etanol y finalmente etanol con sal. El transcrito de *Dhcta1* tiene mayor presencia en YPD, siguiendo YPD+NaCl, luego YPEtOH y finalmente YPEtOH+NaCl. Esto permite suponer que la transcripción de *Dhctt1* esta influenciada no solo de la fuente de carbono, sino también de la presencia de sal.

Dhcta1 codifica para una catalasa peroxisómica y se encargaría de mitigar el peróxido producido por la beta oxidación. La mayor transcripción se presentó en medio YPD disminuyendo en las otras tres condiciones (YPD+NaCl→YPEtOH→YPEtOH+NaCl) (figura 23).

Se determinó la cantidad de dos clases de ERO's en la fase estacionaria de crecimiento mediante citometría. Los resultados muestran que el radical más abundante en *Debaryomyces hansenii* es el anión superóxido, marcado con dihidroetidio; los datos normalizados muestran una magnitud de 1 para YPD, 0.66 en presencia de sal, 2.91 con etanol como fuente de carbono y 5.03 para YPEtOH+NaCl (figura 24).

En el caso del marcaje con DCFH-DA (H_2O_2), hay una disminución bastante notable en la cantidad de peróxido de hidrógeno presente en las células en comparación con anión superóxido; de igual manera, se observa aumento progresivo de este radical de acuerdo al medio del que se trate, estos aumentos tienen la misma tendencia que los vistos con DHE, a excepción del medio YPD+NaCl, que en este caso sigue el mismo patrón de aumento (figura 24).

En el caso de *S. cerevisiae* se obtuvo mayor concentración de peróxido de hidrógeno que del anión superóxido (figura 25). Con respecto al peróxido, en orden ascendente está el medio YPD con una basal estándar, YPD+NaCl contiene el doble de radical, en etanol el contenido se elevó 4.5 veces más que en YPD y finalmente en YPEtOH+NaCl es muy notorio el daño a su maquinaria enzimática pues el contenido de peróxido en las células se elevó 30 veces. La cantidad basal del anión superóxido en YPD se eleva ligeramente en YPD+NaCl y YPOH y se va al doble en YPOH+NaCl.

Es interesante notar las diferencias entre las dos especies de levaduras, ya que este fenómeno proporciona indicios del nivel de adaptación, eficiencia y funcionalidad enzimática para contender contra las ERO's, también hace notoria la plasticidad metabólica para usar los nutrientes como la fuente de carbono, nitrógeno y sales disponibles.

Al comparar los datos normalizados de *S. cerevisiae* con respecto a los de *D. hansenii*, se puede apreciar mejor la diferencia en orden de magnitud de abundancia entre los dos distintos radicales de oxígeno medidos en cada medio de cultivo en la misma fase de crecimiento (figura 26). Mientras que para *D. hansenii* el más abundante es el anión superóxido, para *S. cerevisiae* es el peróxido de hidrógeno, este experimento refleja indirectamente el tipo de actividad enzimática llevado a cabo en cada levadura. La catalasa de cualquier organismo lleva a cabo la disociación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en una molécula de agua (H_2O) y otra de oxígeno (O_2), a ello se debe la baja presencia del radical en las células; las dos catalasas (A y T) con que cuenta *D. hansenii*

muestran ser más eficientes que las de la levadura *S. cerevisiae*, o también podría estar indicando que su presencia es menor, ya que su expresión y/o actividad puede estar más regulada.

En el caso del anión superóxido sucede lo contrario, es más abundante en *D. hansenii* que en *S. cerevisiae* no habiendo diferencia significativa entre el nivel basal y el más elevado; las enzimas superóxido dismutasas de *S. cerevisiae* podrían ser más eficientes, o bien más abundantes.

Relacionar la abundancia y tipo de radical de oxígeno presente en las células con la cantidad, estabilidad y tipo de transcrito de catalasas de *D. hansenii*, permite postular que el bajo contenido de peróxido en el citoplasma estaría asociado a la presencia del transcrito *Dhctt1*; al ser la sal una agresión (en un medio rico con glucosa) induce mayor síntesis de este transcrito. Por otro lado, el etanol disminuye la expresión del gen *Dhctt1*, de modo que la señalización puede estarse viendo afectada para iniciar la síntesis del gen *Dhctt1*, con mayor generación de ERO's en el citoplasma, causando además la inestabilidad del transcrito. Asimismo, los transcritos en el medio EtOH+NaCl parecen estar dañados, pero quizá la proteína no, ya que en esta condición hay una alta cantidad de anión superóxido pero no de peróxido, es decir, la sal lo estabiliza, lo que no ocurre a nivel de la transcripción porque el transcrito se ve afectado en etanol con o sin sal.

En el caso del crecimiento con glucosa, la expresión del gen *Dhcta1* disminuyó con presencia de sal en el medio; en etanol con o sin sal, el transcrito parece estar dañado al igual que el de *Dhctt1*. Cabe destacar que la presencia del transcrito de *Dhcta1* es mucho más abundante en cualquier condición que la de *Dhctt1*.

Al referirme a transcritos inestables o dañados, pretendo describir que el transcrito en cuestión se amplifica con una menor eficiencia y genera fragmentos dos ó tres bases más pequeños de lo que se esperaba, y esto ocurrió también para la amplificación de *Dh26S*, por lo que tardíamente descubrimos que éste no era un buen gen de referencia. Por otro lado, los datos de complejidad y tamaño celular sugieren que otro conocido gen de referencia, como la actina, también se movería, por lo que será necesario encontrar genes que realmente no cambien su expresión al cultivar las levaduras en una fuente de carbono como etanol.

Para hacer el análisis citométrico, cultivé *S. cerevisiae* y *D. hansenii* en los cuatro medios hasta fase estacionaria de crecimiento. Las células se cosecharon y resuspendieron en PBS y 1 ml fue colocado en el tubo de ensaye.

Se analizaron los datos obtenidos de los ensayos para tamaño y complejidad celular con la prueba de Tukey para las dos levaduras. El tamaño de las células y complejidad dependió directamente del medio en el que se cultivó a la levadura; para *Debaryomyces hansenii* crecer en medio que contenía glucosa la hizo tener un citoplasma notablemente más grande que cuando creció en medios con etanol. Contener sal en los medios, ya sea en YPD o en YPEtOH también está influyendo en el volumen y la complejidad celular.

Las células de *D. hansenii* más complejas fueron aquellas que crecieron en medio YPD, en seguida las cultivadas en YPEtOH, y al último las crecidas con NaCl y las menos complejas fueron las de YPD con sal, lo que sugiere que para *D. hansenii* la sal favorece su ciclo de vida. Por el contrario, en *S. cerevisiae* la mayor complejidad se presentó en las células que habían sido crecidas en un medio que contenía sal, en este caso es consistente el mayor tamaño y la complejidad celular que se presentan en el medio YPD+NaCl; las células menos complejas fueron las crecidas en el medio YPEtOH, lo que confirma que el etanol no es un factor de estrés para estas células facultativas.

El factor que induce a las células a ser menos complejas esta íntimamente ligado con la versatilidad del metabolismo para utilizar los nutrientes del medio. Para *D. hansenii*, cambiar la fuente de carbono (glucosa por etanol) del medio provoca una mayor complejidad, que se asocia a una condición de estrés que pensamos que es oxidativo. En el caso de *S. cerevisiae* usar sal en el medio tiene repercusiones directas, aumentando la complejidad y evidenciando así el estrés osmótico. Para *D. hansenii* este parámetro está determinado por la fuente de carbono y contenido de sal, el medio más complejo es YPD, prosiguiendo el medio YPEtOH; los medios que contenían sal disminuyeron este contenido, entonces *D. hansenii* crece mejor en medios que contienen glucosa que en los de etanol y el contenido de sal (0.6M de NaCl) favorece este crecimiento, ya que la granulosidad disminuye considerablemente en las células que fueron crecidas en estas condiciones.

Comparando los resultados de complejidad y tamaño celular entre las dos levaduras, *D. hansenii* y *S. cerevisiae* presentan desarrollos y respuestas estructurales diferentes ante las mismas condiciones de crecimiento como los nutrientes, salinidad, fuente de carbono y temperatura.

Para *D. hansenii* la fuente de carbono fue determinante en el tamaño celular; adicionar sal al medio rico que contiene glucosa no provocó ningún cambio de este parámetro, pero cambiar la fuente de carbono redujo significativamente su tamaño, independientemente de la presencia de NaCl. En cambio, la sal sí influyó en el tamaño de las células de la levadura de panadero; las células de mayor tamaño fueron las que crecieron con sal, tanto en glucosa como en etanol (figura 28).

Mediante el marcaje específico de EROs se obtuvo el contenido del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el contenido del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo cual indirectamente refleja la actividad de las catalasas. Los resultados del ensayo arrojaron que *S. cerevisiae* tiene más peróxido de hidrógeno que *D. hansenii* en todas las condiciones y el anión superóxido es más abundante en cambio, en *D. hansenii*; esto sugiere que el sistema de detoxificación de ERO's aquí analizado es más eficiente en *D. hansenii* que en *S. cerevisiae*.

Crece en un medio distinto al ideal desencadena una respuesta celular para tratar de adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento. Este despliegue incluye encender, apagar y regular la expresión de genes necesarios para sobrevivir; otra consecuencia es aumentar la cantidad de organelos y sus respectivas actividades dentro de la célula, lo que provoca también un aumento en el contenido proteico, de iones, vacuolas, gránulos, metabolitos, u otros, disueltos en el citoplasma; al aumento o disminución de este contenido se le conoce como complejidad celular y se mide por la dispersión de un haz de luz que pasa a través de cada una de las células.

IX. CONCLUSIONES

Con los estudios de cuantificación en tiempo real de las muestras de mRNA se demostró que existen variaciones para el gen *Dhcta1*, al comparar los tres medios contra YPD se observa sólo disminución en el transcrito, pudiéndose explicar de alguna manera por su localización y función; la catalasa A (*Dhcta1*), al ser peroxisomal, está únicamente ligada directamente al funcionamiento de este organelo y no al funcionamiento de las otras rutas metabólicas.

Se observan cambios en la expresión de *Dhcta1* cuando es crecida en medio YPD o YPEtOH, sugiriendo que el promotor o factores de transcripción que inducen o reprimen la transcripción del gen, son afectados por estas distintas fuentes de carbono (etanol o glucosa), posiblemente por la forma en que se metabolizan; y la generación de ERO's concomitante resultado de esta acción, será mitigada mayormente por *Dhctt1*, que es citoplásmica. La cantidad de transcritos también se ve afectada por la concentración de sal, sin embargo, se puede postular que *D. hansenii* crece mejor en medios ricos en sal ya que es eurihalina y debe tener un sin número de adaptaciones que le permiten crecer en altos niveles de NaCl.

En el caso de *Dhctt1* sí se encuentran variaciones que aumentan el transcrito considerablemente, dependiendo de la presencia o ausencia de sal. Considerando la transcripción del gen *Dhctt1* como nivel basal en medio YPD, hay un incremento de 3.17 veces (en el momento de rebasar el umbral Ct) cuando se añade sal (NaCl), sugiriendo que la sal de alguna manera esta provocando la formación de ERO's y posteriormente la transcripción o activación del gen *Dhctt1*. Es curioso y vale la pena mencionar, que cuando la levadura es crecida en YPEtOH+NaCl, el transcrito de *Dhctt1* disminuye, lo que podría hacer pensar que la sal es un factor de estrés; sin embargo, el verdadero aumento de ERO's se observa con etanol y la adición de sal evidencia este daño.

El ensayo para medir ERO's concuerda bien con los resultados obtenidos por Segal y cols. (2011), porque *Dhctt1* responde a la presencia de peróxido extracelular, ya que es una proteína citoplasmática y contiene con el estrés salino, mientras que *Dhcta1* se encuentra confinada al peroxisoma y su respuesta es menor.

Finalmente, es importante resaltar la diferente capacidad que presentaron las dos levaduras para metabolizar el peróxido de hidrógeno; notablemente *D. hansenii* contiene mejor con este radical que *S. cerevisiae* bajo cualquier fuente de carbono, con y sin sal; sin embargo, *S. cerevisiae* presenta una mayor actividad por parte de la SOD comparada con *D. hansenii*, lo cual sienta las bases para realizar un estudio más detallado acerca de su maquinaria anti-estrés. Además, la complejidad celular en las dos especies de levaduras es diferente, ya que el estrés es mitigado de forma distinta en las dos levaduras, hecho que se ve reflejado en el desarrollo de las células. Para concluir, puedo postular que *Dhcta1* de *D. hansenii* no está regulada por la presencia de peróxido de hidrógeno en el citoplasma, ya que su expresión en YPEtOH y YPEtOH+NaCl, que son las condiciones en donde hay mayor cantidad de peróxido, bajó considerablemente; en cambio, *Dhctt1* está regulada por la presencia de sal en el medio: la alta presencia de este transcrito se encuentra asociada a una mediana cantidad de peróxido y a la baja complejidad celular, ya que podría ser que en esta condición no hay tantos organelos, proteínas, vesículas, etc., por que la proteína catalasa tiene una alta actividad en esta condición, además el tamaño de las células también depende directamente de la fuente de carbono.

X. BIBLIOGRAFÍA.

Almbro MK, Dowling DK, Simmons LW (2011) Effects of vitamin E and beta-carotene on sperm competitiveness. *ECOLOGY LETTERS*, **14**: 891-895

Ambion Biosystems (2008) Use of Internal and External Standards or Reference RNAs for Accurate Quantitation of RNA Levels. http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_151.html

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373–399.

Barja G (2007) Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation Res.* **10**: 215–223

Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (2000) *In Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd edn, Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (eds). *Cambridge University Press: Cambridge*.

Bertrand T, Eady N, Jones J, Jesmin, Nagy J, Jamart B, Raven E, Brown K (2004) Crystal structure of Mycobacterium Tuberculosis Catalase-Peroxidase. *Journal of Biochemistry* **279**: 38991-38999

Blier PU, Dufresne F, Burton RS (2001) Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends in Genetics*, **17**: 400–406.

Blomberg A y Adler L (1993) Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **33**: 145-212.

Boveris A, Oshino N, Britton Chance (1972) **The Cellular Production of Hydrogen Peroxide.** *Biochemical Journal* **128**: 617-630

Bustin, SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* **29**: 23-39.

Bustin, SA & Nolan, T (2004a) Analysis of mRNA Expression by RealTime PCR. In: Real-Time PCR; an Essential Guide. KJ Edwards et al. editors. *Horizon Bioscience. Wymondham*, p. 125-184.

Bustin SA & Nolan T (2004b) Pitfalls of quantitative real-time reversetranscription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* **15**: 155-166.

Bustin, SA, Benes V, Nolan T & Pfaffl MW (2005) Quantitative realtime RT-PCR a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* **34**: 597-601.

Bustin SA (2005a) Real-Time PCR. In: Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics M.Podda & J.Fuchs, editors. Marcel Dekker.New York, p. 1131-1135.

Bustin SA (2005b). Real-Time Reverse Transcription PCR. In: Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics. M. Podda & J. Fuchs, editors. Marcel Dekker. New York, p. 1131-1135.

Butinar L, Santos S, Spencer I, Oren A, Gunde N (2005) Yeast Diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett* **244**: 29-234

Cabrera-Orefice A, Guerrero-Castillo S, Luevano-Martínez LA, Pena A, Uribe-Carvala S (2010) Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?) *J Bioenerg Biomembr* **42**: 11-19

Callaghan R, O'Connor JE, Barrientos A, Herrera G, Martínez A (2005) La citómica como estrategia alternativa en farmacología y toxicología *in Vitro* II. In: Las Omicas Genómicas, Proteómicas, Citómicas y Metabólicas: Modernas tecnologías para el desarrollo de fármacos (M. Cascales, M.J. Gómez-Lechón y J.E. O'Connor, eds. Instituto de España-Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid. Pp. 123-182

Cano-Estrada Araceli y González-Halphen Diego (2011) ATPsintasa y sus diferencias estructurales. *REB* 30(3): 98-108.

Carpaena X, Loprasert S, Mongkolsuk S, Switala J, Loewen PC, Fita I (2003) Catalase-peroxidase *KatG* of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7^Å resolution. *J Mol Biol* **327**: 475-489

Carpaena X, Wiseman B, Deemaganr T, Herguedas B, Ivancich A, Singh R, Loewen PC, Fita I (2006) Roles of Arg426 and Trp111 in the modulation of NADH oxidase activity of the catalase-peroxidase *KatG* from *Burkholderia pseudomallei* inferred from pH-induced structural changes. *Biochemistry* **45**: 5171-5179

Chance B, Sies, H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolismo in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**: 527-605.

Chung WH, Kyoung-Dong K, Jung-Hye R (2005) Localization and function of three monothiol glutaredoxins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Comm* **330**, **2**: 604-610

Cohen S (1988). Psychosocial models of social support in the etiology of physical disease. *Health Psychology* **7**: 269–297

Converti A, Dominguez JM (2001) Influence of Temperature and pH on Xylitol Production from Xylose by *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnol. Bioeng.* **75**: 39-45

Davenport RR, (1980) In Biology and activities of yeast, Skinner FA, Passmore SM, Davenport RR (eds). *Academic Press: London*: 215-230

Díaz A, Muñoz-Clares R, Rangel P, Valdés VJ, Hansberg W (2005) Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen. *Biochimie* **87**: 205–214

Díaz R, Avéret N, Araiza D, Pinson B, Uribe S, Devin A, Rigoulet M (2008) Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. A possible role in Crabtree effect induction? *J. Biol. Chem* **283**: 26948–26955.

Dowling DK, Simmons LW (2009) Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc. R. Soc. B* doi:10.1098/rspb.2008.1791 Published online

Edwards KJ, Logan J, Saunders N (2004) Real-Time PCR; An Essential Guide. *Horizon Bioscience Wymondham*.

Eguiarte L, Souza V, Aguirre X (2007) Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: *Ecología molecular*. 1 eds. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. pp 1112

Feron G, Waché Y (2005) Microbial biotechnology of food flavor production. In: Dominick T (ed) *Food biotechnology*, 2nd edn. Dekker, New York, pp 407–441

Fridovich I, (1995) Superoxide Anion Radical (O_2^-), Superoxide Dismutases, and Related Matters. *J BIO CHEMISTRY* **272**: 18515–18517

González-Hernández JC, Peña A (2002) Estrategias de adaptación de organismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología* **44**, 3-4: 137-156

Gori K, Hébraud M, Chambon C, Mortensen HD, Arneborg N, Jespersen L (2007) Proteomic changes in *Debaryomyces hansenii* upon exposure to NaCl stress. *FEMS Yeast Res.* **7(2)**: 293-303.

Gralla EB, Valentine JS (1997) Delivering Copper Inside Yeast and Human Cells. *Science* **278**: 817-818

Guerrero-Castillo S, Araiza-Olivera D, Cabrera-Orefice A, Espinasa-Jaramillo J, Gutiérrez-Aguilar M, Luévano-Martínez LA, Zepeda-Bastida A, Uribe-Carvajal S (2011) Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species. *J Bioenerg Biomembr.* **43(3)**: 32

Gunge N, Fukuda K, Morikawa S, Murakami K, Takeda M, Miwa A (1993) Osmophilic linear plasmids from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet* **23**: 443-449

Hartig A, Ruis H (1986) Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T. *Eur J Biochem.* 1986 Nov 3; **160(3)**: 487–490.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**: 986-994.

Hillar A, Peters B, Pauls R, Loboda A, Zhang A, Mauk AG, Loewen PC (2000) Modulation of activities of catalase-peroxidase HPI of *Escherichia coli* by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **39**: 5868-5875

Huggett J, Dheda K, Bustin S A y Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and Immunity* **6**: 279-284.

Izawa S, Inoue Y, Kimura A (1996) Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **320**:61-67

Kawasaki L, Aguirre J (2001) Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **183**: 1434-1440

Kawasaki L, Wynsong D, Diamond R, Aguirre J (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J Bacteriol* **179**: 3284-3292

Klotz MG, Loewen PC (2003) The molecular evolution of catalytic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Mol Biol Evol* **20**: 1098- 1112

Königsberg M F (2008) Manual Moderno; Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas/Mina Königsberg Fainstein. México: Manual Moderno. pp: 636

Kurtzman CP, Fell J W (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 331-371

Kurtzman CP, Robnett CJ (1991) Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* **35**(5): 1216–1223.

Lee MA, Squirrell DJ, Leslie DL, Brown T (2004) Homogeneous Fluorescent Chemistries. In: *Real-Time PCR; An Essential Guide*.

Lepingle A, Casaregola S, Neuveglise C, Bon E, Nguyen H, Artiquenave F, Wincker P, Gaillardin C (2000) Genomic exploration of the ascomycetous yeast: 14. *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*. *FEBS Lett* **487**: 82-86

Lewin B (2007) The Content of the Genome. Genes IX. Jones and Bartlett Publishers Sudbury Massachusetts pp72

Liochev SI, Fridovich I (1999) Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life* **48**: 157–161

Littlechikd J (1999) Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. *Curr Opin Chem Biol* **3**: 28-34

Livak KJ y Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.

Llorente B, Durrens P, Malpertuy A, Aigle M, Artiquenave F, Blandín G, Bolotin-Fukuhara M, Bon E, Brottier P, Casareogola S, et al. (2000) Genomic exploration of the ascomycetous yeast: 20. Evolution of the gene redundancy compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **487**: 122-133

Long S, Salin ML (2001) Molecular cloning, sequencing analysis and expression of the catalase-peroxidase gene from *Halobacterium salinarum*. *DNA SEQ*, **12(1)**: 39-51

Lucas C, da Costa M, van Uden N (1990) Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **6**: 187-191

Luévano LA (2012) Uncoupling proteins (UCP) in unicellular eukaryotes: true UCPs or UCP1-like acting proteins? *FEBS Lett.* 2012 Apr 5;**586(7)**:1073-8. Epub 2012 Mar 13.

Mahoney DJ, Broach JR (1989) The HML matyng-type cassette of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by two separate but functionally equivalent silencer. *Mol Cell Biol* **9**: 4621-4630

Maniatis T, Fritsch E F y Sambrook J (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 202-203 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982) pp: E.5

Marth EH (1978) Dairy products. In Food and Beverages Mycology, Beuchat LR(ed.) **AVI**: Westport : CT; 145-172

MatÈ MJ, Zamocky M, Nykyri LM, Herzog C, Alzari PM, Betzel C, Killel F, Fita I (1999) Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Bio* **286**: 135-149

Mathews C, van Holde K (1998) Oxidaciones biológicas, transporte electrónico y fosforilación oxidativa. En Bioquímica (2 edición) Mc Graw-Hill/Interamericana de España, S. A. U., Aravaca, Madrid. Pp 574-610.

Navarrete C, Siles A, Martínez JL, Calero F, Ramos J (2009) Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* **9**: 582-590

Nakase T, Susuli M, Phaff HJ, Kurtzman CP (1998) 26. *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij Nom, Cons. In The Yeast- A Taxonomy study, Kurtzman CP, Fell JW (eds). **Elsevier**: Amsterdam; 157-173

Nappi A.J, Ottaviani E (2000) Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* **22**, 469–480.

Nobre M F, da Costa M S (1985) The accumulation of polyols by the yeast *Debaryomyces hansenii* in response to water stress. *Canadian Journal of Microbiology* **31(11)**: 1061-1064

Norkrans B (1966) Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Arch Microbiol* **54**: 374 – 392

Norkrans B, Kylin A (1969) Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *J Bacteriol* **100**: 836-845.

Onishi H (1963) Osmophilic yeasts. *AdvFoodRes* **12**:53 – 94.

Papouskova K, Sychrova H (2007) The eco-action of osmotic and high temperatura stresses results in a growth improvement of *Debaryomyces hansenii* cells. *Int J Food Microbiol* **118**: 1-7

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**: e45.

Pfaffl M W (2004) Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: *A-Z of Quantitative PCR* S.A.Bustin, editor. International University Line. *La Jolla* p. 87-120.

Pfaffl M W (2008) Gene-Quantification. <http://www.genequantification.de/>

Prista C, Almagro A, Loureiro-Diaz MC, Ramos J (1997) Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Enviromen Microbiol* **63**: 4005-4009

Ramírez M, Hernández NY, Ochoa JL (2001) *Debaryomyces hansenii* grown in nonsterile seawater ClO₂-peptone-containing medium. *Can J Microbiol* **47**: 676-679

Ratledge C, Tan K-H (1990) In *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, Verachter HJ. De Mot R (eds). **Marcel Dekker**: New York; 223-253

Ririe K M, Rasmussen R P y Wittwer C T (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**: 154-160.

Sampaio F, Mantovani H, Vieira F, Alencar C, Converti A & Lopes F (2005) Bioconversion of D-xylose to xylitol by *Debaryomyces hansenii* UFV-170: Product formation versus growth. *Proc. Biochemistry*. **40**: 3600-3606.

Sánchez NS, Arreguín R, Calahorra M, Peña A (2008) Effects of salt on aerobics metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* **8**:1303-1312

Scandalios, J.G. (2002) The rise of ROS. *TRENDS in Biochemical Sciences* **27**:483-486

Scandalios JG, Guan L, Polidoros A (1997) Catalase in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In JG Scandalios, ed, *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 343-406
Skriver K, Mundy J (1990) Gene expression

Seda-Miro J, Arroyo-González N, Perez-Matos A E, y Govind NS (2007) Impairment of cobalt-induced riboflavin biosynthesis in a *Debaryomyces hansenii* mutant. *Can J Microbiol* **53(11)**: 1272-1277.

Segal-Kischinevzky CA (2011) Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*: Análisis de su expresión. Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México.

Segal C, Rodarte B, Valdés V, Mendoza G, González A, Alba L (2010) The euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii* has two catalase genes encoding enzymes with differential activity profiles. *Curr Microbiol* **62(3)**: 933-43

Sherman DJ, Martin T, Nikolski M, Cayla C, Souciet JL, Durrens P; Génolevures Consortium (2009). Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 37 (Database issue), pp. D550-4.

Sorensen J, (1997) The Rhizosphere as a Habitat for Soil Microorganisms. In: Modern Soil Microbiology, Van Elsas, J.D., J.T. Trevors and E.M.H. Wellington (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, USA., pp: 21-45.

Sørensen BB y Samuelson H (1996) The combined effects of environmental conditions on lipolysis of pork fat by lipases of the meat starter culture organisms *Staphylococcus xylosus* and *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* **32**: 59-71.

Spencer J F T (2001) Food Microbiology Protocols (Methods in Biotechnology) Food Microbiology Protocols (Methods in Biotechnology) [John FT Spencer, Alicia L. Ragout de Spencer] Publisher: Humana Press; Softcover reprint of hardcover 1st ed. 2001 edition. ISBN-13: 978-1617372308

Sugita T, Nakase T (1999) Non-universal usage of the leucine CUG codon and the molecular phylogeny of the genus *Candida*. *Syst Appl Microbiol* **22**:79-86

Swiss Agency of the Environment, Forest and Landscape (SAEFL) (2004) Guideline classifications of Organisms: Fungi. **SAEFL**: Berne, Switzerland

Thomé-Órtiz PE, Peña A, Ramírez J (1998) Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentration of KCl and NaCl. *Yeast* 14. 1355-1377

Tokuoka, K (1993) Sugar-and salt-tolerant yeast. *J. Appl. Bacteriol.* **74**:101-110

Turunen O, Seelke R, Macosko J (2009) *In silico* evidence for functional specialization after genome duplication in yeast. *FEMS Yeast Res* **9**:16-31

Uribe-Carvajal S, Luévano-Martínez LA, Guerrero-Castillo S, Cabrera-Orefice A, Corona-de-la-Peña NA, Gutiérrez-Aguilar M (2011) Mitochondrial unselective channels throughout the eukaryotic domain. *Mitochondrion* **11(3)**: 382-390

Uta B, Hauke (2006) *Debaryomyces hansenii*- an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Wiley InterScience* DOI: 10.1002/yea.1374

van der Walt JP, Taylos MB, Liebenberg NVDW (1977) Ploidy, ascus formation and recombination in *Torulasporea (Debaryomyces) hansenii*. *Antonie van Leeuwenhoek* **43**: 205-218

Valasek MA, Repa JJ (2005) The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* **29**: 151-159

Vega-García V (2007) Sobre-expresión de la catalasa-peroxidasa de *Neurospora crassa*: Introducción. Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México.

Vinueza-Burgos C (2009) PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular (Real Time PCR: the new age of cellular genetic information). *Ref. def. 020910_RED VET Publicado:* 14.02.09

Voronovsky AY, Abbas CA, Dmytruk KV, Ishchuk OP, Kshanovska BV, Sybirna KA, Gaillardin C, Sibirny AA (2004) *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) DNA sequences containing genes involved in riboflavin synthesis. *Yeast*. 21(15):1307-16.

Wada K, Tada T, Nakamura Y, Kinoshita T, Tamoi M, Shigeoka S, Nichimura K (2002) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of catalase-peroxidase from *Synechococcus* PCC 7942. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 157-159

Welinder KG (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* **2**: 2516-2518

Wong B, Kiehn TE, Edwards F, Bernard EM, Marcove RC, de Harven E, Armstrong (1982) Bone infection caused by *Debaryomyces hansenii* in a normal host: a case report. *J Clin Microbiol* **16**: 545-548

Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamond RD (1998) Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immunol* **66**:1953-1961

Yadav JS, Loper JC (1999) Multiple P450 alk (cytochrome P450 alkane hydroxylase) genes from the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Gene* **226**: 139-146

Yamada Y, Fujiwara T, Sato T, Igarashi N, Tanaka N (2002) The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Holoarcula marismortui*. *Nat Struct Biol* **9**: 691-695

Zamocky M, Regelsberger G, Jakopitsch C, Obinger C (2001) The molecular peculiarities of catalase-peroxidase. *FEBS Lett* **492**: 177-182

Zimniak P, Hartter E, Woloszuc W, Ruis H (1976) Catalase biosynthesis in yeast: Formation of catalase A and catalase T during oxygen adaptation of *Saccharomyces*. *Eur J Biochem* **71**: 393-398

PÁGINAS CONSULTADAS.

<http://www.diagnosticsgenome.com/real-time-pcr.htm>

<http://www.citometriadeflujo.com/HTML/fundamentos%20contenido.htm#>

<http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=2656>

<http://www.mastesis.com/tesis/tiorredoxinas+de+escherichia+coli+y+saccharomyces+cerevisiae:93922>

<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/mitochondria/mitets.html>

<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/mitochondria/mitets.html>

http://es.wikipedia.org/wiki/Cadena_de_transporte_de_electrones

<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/peroxisomas.html>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml>

<https://www.genolevures.org/>

Latin american journal of aquatic research *versión* ISSN 0718-560X.

Lat. Am. J. Aquat. Res. vol.39 no.3 Valparaíso nov. 2011

Lat. Am. J. Aquat. Res., 39(3): 544-552, 2011 DOI: 10.3856/vol39-issue3-fulltext-14