



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD Y LA DETOXIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS
DEL OXÍGENO EN *DEBARYOMYCES HANSENII***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA: MÓNICA RAMÍREZ HERNÁNDEZ

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky
Facultad de Ciencias, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: Dra. María Soledad Funes Argüello
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Antonio Peña Díaz
Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO DE 2018



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.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/838/2017
ASUNTO: Oficio de Jurado


Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de agosto de 2017 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno(a) **RAMÍREZ HERNÁNDEZ MÓNICA** con número de cuenta **302005945** con la tesis titulada "Análisis de la toxicidad y la detoxificación de especies reactivas del oxígeno en *Debaryomyces hansenii*", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY**:

Presidente: DRA. ADELAIDA DÍAZ VILCHIS
Vocal: DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
Secretario: DRA. MARÍA SOLEDAD FINES ARGÜELLO
Supiente: DR. JOSÉ EDUARDO RODRIGUEZ BUSTAMANTE
Supiente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de noviembre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/MJFM/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por permitirme ser parte de sus estudiantes y darme los conocimientos y experiencias necesarios para desenvolverme profesionalmente.
- ❖ Al CONACYT por el apoyo (con número de CVU 545489) que me otorgó durante mis estudios de maestría, ya que sin él no había sido posible concluir este proyecto.
- ❖ Al proyecto PAPIT IN218611 por financiar gran parte de este proyecto
- ❖ A la Fundación Canales de Ayuda A. C. por financiar parte de la investigación desarrollada en mi proyecto de maestría y otorgarme una beca; sin su apoyo no hubiera sido posible finalizar la última etapa de experimentos.
- ❖ A la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky por ser mi tutora, así como por sus conocimientos y apoyo.
- ❖ A mi Comité tutorial integrado por Dra. María Soledad Funes Argëllo y Dr. Antonio Peña Díaz por tomarse el tiempo y la paciencia necesarios para escucharme, corregir y reconstruir pacientemente cada una de las ideas que fui planteando, sus aportaciones me hicieron una estudiante más crítica y vinculada con mis objetivos iniciales.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- ❖ A todos los miembros académicos y estudiantes del laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias que con sus críticas y aportes que fueron fortaleciendo mi investigación.
- ❖ A la Q Viviana Escobar Sánchez por el apoyo técnico recibido.

- ❖ A la Maestra Marilyn Paz de la Universidad de Valparaíso en Chile, por su ayuda en la estandarización de la técnica de TBARS.

- ❖ Al M. en C. Omar Noel Medica Campos por su ayuda en la estandarización y medición enzimática.

- ❖ A los Doctores miembros del jurado, por corregir y mejorar esta tesis.

ÍNDICE

	Página
1.- Introducción.....	1
1.1.- Proteínas antioxidantes: superóxido dismutasa	2
1.2.- Actividad catalítica de la superóxido dismutasa	3
1.3.- Proteínas antioxidantes: catalasa	4
1.4.- Estructura de las catalasas monofuncionales... ..	5
1.5.- Actividad catalítica de la catalasa	6
1.6.- Proteínas antioxidantes: peroxidasas	7
1.7.- Consecuencias del estrés oxidante	8
1.8.- Peroxidación lipídica	8
1.9.- Daño a biomoléculas: ácido desoxirribonucleico	10
1.10.- Daño a biomoléculas: proteínas	11
1.11.- Modelo de estudio.....	14
2.- Antecedentes.....	17
3.- Hipótesis.....	23
4.- Objetivo.....	24
2.1.- Objetivos particulares.....	24
5.- Material y método.....	25
5.1.- Cepa, medios de cultivo y pre-cultivos.....	25
5.2.- Curvas de crecimiento y conteo celular.....	25
5.3.- Obtención de extractos crudos.....	25
5.4.- Cuantificación de proteínas.....	26
5.5.- Actividad de catalasa.....	26
5.6.- Actividad de superóxido dismutasa.....	26
5.7.- Electroforesis de proteínas (PAGE).....	27
5.7.1.- Geles desnaturalizantes.....	27

5.7.2.- Tinción de geles desnaturalizantes.....	28
5.7.3.- Geles nativos.....	28
5.7.4.- Tinción para observar actividad de catalasa.....	29
5.7.5.- Tinción para observar actividad de superóxido dismutasa.....	29
5.8.- Carbonilación de proteínas.....	29
5.9.- Obtención de esferoplastos.....	30
5.10.- TBARS (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico).....	30
5.10.1.- Curva estándar de MDA.....	30
5.11.- Selección de genes constitutivos a evaluar mediante RT-qPCR.....	31
5.11.1.- Diseño de desoxioligonucleótidos.....	32
5.12.- Extracción de DNA genómico de <i>D. hansenii</i>	32
5.12.1.- Amplificación con desoxioligonucleótidos en DNA genómico de <i>D. hansenii</i>	33
5.13.- Extracción de RNA total.....	33
5.14.- Cuantificación de RNA total.....	34
5.15.- Digestión de DNA genómico.....	34
5.16.- Electroforesis de RNA.....	35
5.17.- Ensayos de RT-qPCR.....	35
5.17.1.- Análisis de la expresión y validación de genes de referencia.....	36
5.17.2.- Cuantificación.....	36
6.- Resultados.....	37
6.1.- Curvas de crecimiento y conteo celular.....	37
6.2.- Actividad de superóxido dismutasa.....	39
6.3.- Actividad de catalasa.....	41
6.4.- Zimogramas de actividad enzimática.....	43
6.4.1.- Zimograma de superóxido dismutasa.....	43
6.4.2.- Zimograma de catalasa.....	44
6.5.- Contenido de grupos carbonilo.....	44

6.6.- Lipoperoxidación de ácidos grasos de membrana plasmática: contenido de malondialdehído (MDA).....	46
6.7.- Cuantificación del RNA retrotranscrito mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	49
6.8.- Diseño de desoxioligonucleótidos.....	50
6.9.- Prueba de amplificación de los desoxioligonucleótidos con DNA genómico.....	51
6.10.- Extracción y purificación de RNA total.....	52
6.11.- Validación de la expresión de los genes constitutivos.....	52
6.12.- Cuantificación de transcritos de catalasa A, T y superóxido dismutasa Cu-Zn.....	54
7.- Discusión.....	57
8.- Conclusiones.....	67
9.- Perspectivas.....	68
10.- Bibliografía.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Actividad específica de catalasa.....	18
Tabla 2. Tabla de valores relativos de tamaño y complejidad de las células de <i>D. hansenii</i>	19
Tabla 3. Tiempo de duplicación de <i>Debaryomyces hansenii</i>	39
Tabla 4. Actividad total de superóxido dismutasa.....	40
Tabla 5. Actividad total de catalasa.....	42
Tabla 6. Contenido de grupos carbonilo.....	45
Tabla 7. Contenido total de MDA.....	48
Tabla 8. Estabilidad de genes constitutivos.....	53
Tabla 9. Niveles de expresión relativa de mRNA de los genes <i>Dhcta</i> , <i>Dhctt</i> y <i>Dhsod</i>	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Especies reactivas del oxígeno (ROS).....	1
Figura 2. Estructura cuaternaria de superóxido dismutasa Cu-Zn 1(SOD 1).....	2
Figura 3. Estructura cristalográfica de la catalasa A monofuncional de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	6
Figura 4. Catálisis realizada por la catalasa monofuncional	7
Figura 5. Peroxidación lipídica.....	10
Figura 6. Ejemplos de daños a moléculas y proteínas generados durante el estado de estrés oxidante.....	14
Figura 7. Micrografías de <i>Debaryomyces hansenii</i>	16
Figura 8. Northern blot de RNA total obtenido de <i>Debaryomyces hansenii</i>	17
Figura 9. Zimograma de actividad de catalasa de <i>Debaryomyces hansenii</i>	18
Figura 10. Gráficas comparativas del tamaño celular.....	19
Figura 11. Gráficas comparativas de la complejidad celular.....	20
Figura 12. Gráfica de contenido relativo de peróxido de hidrógeno y anión superóxido en <i>D. hansenii</i>	20
Figura 13. Niveles de expresión relativa de mRNA de genes <i>Dhcta</i> y <i>Dhctt</i>	21
Figura 14. Cámara de Neubauer.....	37
Figura 15. Curvas de crecimiento.....	38
Figura 16. Muestras estándar de oxidación de NBT en el sistema de xantina-xantina oxidasa.....	40
Figura 17. Actividad total de superóxido dismutasa.....	41
Figura 18. Actividad total de catalasa.....	42
Figura 19. Zimograma de actividad de superóxido dismutasa	43
Figura 20. Zimograma de actividad de catalasa	44
Figura 21. Contenido de grupos carbonilo	46
Figura 22. Cromógenos de curva estándar de MDA con TMPO	47
Figura 23. Curva estándar de TMPO para determinación de TBARS	47
Figura 24. Fotografía de células y esferoplastos de <i>D. hansenii</i>	48

Figura 25. Contenido de MDA en 10 ⁸ esferoplastos de <i>D. hansenii</i>	49
Figura 26. PCR en punto final con DNA genómico de <i>D. hansenii</i>	51
Figura 27. Gel de agarosa de RNA de <i>D. hansenii</i>	52
Figura 28. Validación de genes de referencia para qPCR	54
Figura 29. Nivel de expresión de <i>Dhcta</i> , <i>Dhctt</i> y <i>Dhsod</i> en medios de cultivo con glucosa como fuente de carbono.....	55
Figura 30. Nivel de expresión de <i>Dhcta</i> , <i>Dhctt</i> y <i>Dhsod</i> en medios de cultivo con etanol como fuente de carbono	56

RESUMEN

Desde tiempos ancestrales las levaduras han tenido un papel muy importante en la industria alimenticia, médica, agrícola y científica. Actualmente son utilizadas como modelo para la investigación de procesos biológicos fundamentales en los organismos eucariontes y especialmente en humanos. La secuenciación del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* y de otras levaduras ha fomentado que se estudien sus cualidades con potencial industrial relevante.

Debaryomyces hansenii es una levadura que tiene la capacidad de tolerar condiciones extremas que son altamente perjudiciales en otros organismos, esto representa una ventaja en la aplicación de procesos biotecnológicos. Un tema de interés actual es el estrés oxidante ya que esta condición está relacionada con un gran número de desórdenes en humanos. El llegar a esta condición involucra inequívocamente daños en moléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos; altera la actividad enzimática basal de enzimas, así como su nivel de transcripción (a nivel del mRNA) y también afecta procesos celulares como el transporte vesicular, ciclo celular, envejecimiento y apoptosis.

Retomando las bases anteriores, en este trabajo se analizaron varios aspectos relacionados con el estrés oxidante, la señalización redox y en general las defensas involucradas en la respuesta antioxidante de *D. hansenii*. La metodología implementada proporcionará una aproximación global de lo que ocurre en la levadura cuando se crece bajo condiciones pro-oxidantes. El estudio consistió en cultivar a la levadura en medio rico con una de dos fuentes de carbono (glucosa 2% p/v o etanol 2% v/v) y tres concentraciones distintas de sal (NaCl 0 M, 0.6 M y 1.2 M) con el fin de 1) medir y comparar en extractos crudos la actividad enzimática total de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD), tipificar mediante electroforesis nativa (zimogramas) ambos tipos de enzimas; 2) llevar a cabo una cuantificación de grupos carbonilo (cetonas y aldehídos) mediante conjugación de las proteínas con 2,4-dinitrofenilhidrazina; 3) abordar el daño en lípidos de membrana plasmática determinando el contenido de malondialdehído (MDA), producto de la lipoperoxidación en 10^8 esferoplastos por medio de la técnica de TBARS (Sustancias Reactivas al ÁcidoTiobarbitúrico). Por último, 4) mediante qPCR, herramientas estadísticas y el uso de *software* se evaluó el nivel de expresión y estabilidad de cuatro genes para ser validados como genes de referencia. Cuando se determinó el mejor gen de referencia, éste se utilizó para normalizar y medir los cambios en los niveles de expresión de los transcritos *Dhcta* (catalasa A), *Dhctt* (catalasa T) y *Dhsod* (superóxido dismutasa).

Partiendo de que *D. hansenii* es un organismo halófilo, este no deberá presentar cambios ni daños significativos en los medios con sal en comparación con los medios sin sal; cuando la levadura disponga de etanol como fuente de carbono, sus actividades enzimáticas antioxidantes y daños deben ser mayores en comparación con los medios que contienen glucosa como fuente de carbono.

Las determinaciones realizadas revelaron que 1) la mayor actividad enzimática antioxidante no está determinada por el contenido de sal en el medio de cultivo sino por la fuente de carbono. El resultado anterior concuerda con los zimogramas; 2) respecto a la medición de grupos carbonilo en extractos crudos, se encontró que su contenido aumenta por dos razones, la primera es por el incremento en la concentración de NaCl en los medios de cultivo y la segunda razón del aumento es por el uso de etanol como fuente de carbono. 3) Con la técnica de TBARS, en donde se mide la oxidación de lípidos que genera aldehídos, se encontró que el mayor contenido de MDA se presentó en los medios con glucosa y disminuyen con la presencia de NaCl así como con etanol. 4) En cuanto a los niveles de expresión de los transcritos de catalasa (*Dhcta*, *Dhctt*) y superóxido dismutasa (*Dhsod*) se determinó que su regulación es dependiente de la concentración de sal y la fuente de carbono de la que se dispuso en el medio de cultivo.

Finalmente, se reafirmó que las fuentes de carbono no fermentables, etanol en este caso, producen mayor cantidad de especies reactivas (que la glucosa), esto se ve reflejado en el aumento en la actividad enzimática antioxidante así como en el nivel de daño a biomoléculas; la regulación de genes antioxidantes depende de diversos factores.

ABSTRACT

Since ancient times yeasts have played a very important role in the food, medical, agricultural and scientific industries. They are currently used as a model for the investigation of fundamental biological processes in eukaryotes and especially in human organisms. Sequencing of the genome of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts has encouraged the study of its qualities with relevant industrial potential.

Debaryomyces hansenii is a yeast that is able to tolerate extreme conditions that are highly detrimental in other organisms, this represents an advantage for its application in biotechnological processes. An issue of current interest is oxidative stress since this condition is related to a large number of disorders in humans. Reaching this condition unambiguously involves damage to molecules such as lipids, proteins, carbohydrates and nucleic acids; alters the basal enzyme activity of proteins as well as their level of transcription (at mRNA level) and affects cellular processes such as vesicular transport, cell cycle, aging and apoptosis.

Taking back the previous bases, this work analyzed several aspects related to oxidative stress, redox signaling and in general the defenses involved in the antioxidant response of *D. hansenii*. The methodology implemented will provide an overall approximation of what happens in yeast when grown under pro-oxidant conditions. The study consisted in cultivating the yeast in rich medium with two different carbon sources (glucose or ethanol) and three different concentrations of salt (NaCl 0M, 0.6M or 1.2M) in order to measure and compare the enzymatic activity in crude extracts. Total catalase and superoxide dismutase enzymes were analyzed by native electrophoresis (zymograms); also, we carry out a quantification of carbonyl groups (ketones and aldehydes) by conjugation of the proteins with 2,4-dinitrophenylhydrazine; to deal with the damage in plasma membrane lipids, the content of malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, was determined by means of the TBARS (Reactive to TioBarbituric Acid) technique in 10^8 spheroplasts. Finally, using RT-qPCR, statistical tools and software we evaluated the level of expression and stability of four genes to be validated as reference genes. When the best reference gene was determined, it was used to normalize and determine changes in expression levels of *Dhcta* (catalase A), *Dhctt* (catalase T) and *Dhsod* (superoxide dismutase) transcripts. Our results showed that the higher antioxidant enzymatic activity is not determined by the salt content in the culture medium but by the carbon source; the above result is consistent with zymograms. The expression levels of the catalase transcripts and SOD showed that

its regulation is dependent on the concentration of salt and the carbon source that was available in the culture. Paradoxically, the highest content of MDA was presented in the media with glucose and the carbonyl group content shows a direct relation of ascense first with the salt content and secondly by ethanol.

1.- INTRODUCCIÓN

El oxígeno es uno de los 6 elementos (C, H, O, N, P y S) fundamentales para la vida en la Tierra, compuestos como O_2 y H_2O son indispensables para cualquier organismo, además de que el oxígeno es parte esencial del metabolismo. Participa en el proceso de respiración y en la fosforilación oxidativa, a partir de la cual se generan moléculas altamente energéticas. Sin embargo, la disfunción de los procesos celulares, aunado a estímulos exteriores, pueden dar origen a especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), estas ROS son capaces de dañar a los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, etc. (Figura 1) Cuando los daños son irreparables conducen a la disfunción celular.

Existen moléculas y enzimas capaces de contrarrestar y/o eliminar la reactividad de las ROS, estas son llamadas antioxidantes. Los antioxidantes no enzimáticos pueden ser sintetizados por la propia célula como es el glutatión o pueden ser adquiridos por medio de la dieta como en el caso de los tococromanos, ácido ascórbico y flavonoides; estos son compuestos sintetizados mayormente por organismos fotosintéticos y/o levaduras y bacterias ya que son expresados mediante complementación heteróloga con intereses biotecnológicos.

En el caso de los antioxidantes enzimáticos, su principal función es dismutar a las ROS para obtener compuestos totalmente inocuos, actuando directamente sobre las ROS o bien, como reguladores redox de proteínas tioles que contribuyen a mantener un estado redox correcto en las células. La actividad antioxidante se lleva a cabo simultáneamente en diversos compartimentos celulares y órganos por sistemas enzimáticos distintos pero con idéntica actividad bioquímica, es decir son sistemas paralelos (Herrero, *et al.* 2008).

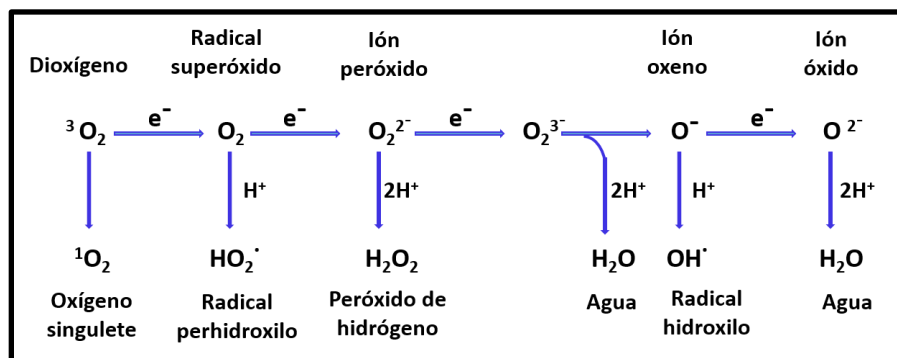


Figura 1. Especies reactivas del oxígeno (ROS). La reducción (e^-) o adición de protones (H^+), a una molécula de oxígeno genera distintas especies reactivas. Tomada de (Konigsberg, 2008).

1.1.- PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES: SUPERÓXIDO DISMUTASA

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que fue descubierta en 1969 por McCord y Fridovich, que dismuta el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Está presente a lo largo de la escala evolutiva, desde bacterias hasta eucariontes superiores. Existen principalmente cuatro tipos de superóxido dismutasas: la CuZnSOD (SOD1) que se localiza en el citoplasma de las células, la MnSOD (SOD2) que tiene su función principalmente en la mitocondria, la FeSOD que se localiza principalmente en cloroplastos y la NiSOD que sólo se ha encontrado en el género *Streptococcus*. Sin embargo, algunos experimentos han demostrado que SOD1 puede trasladarse a la mitocondria en condiciones de mucho estrés oxidante para mitigar a las especies reactivas (Butler y Kosman, 1992). Las enzimas con actividad de superóxido dismutasa no son homólogas, lo que muestra que han evolucionado independientemente en respuesta a una presión evolutiva (Céspedes, et al. 1996).

Las superóxido dismutasas pertenecen al grupo de las metaloproteínas, en su sitio activo tienen un grupo prostético que puede ser de cobre-zinc, manganeso o hierro; aunque existen otras menos frecuentes con níquel, hierro-manganeso y hierro-zinc; están conformadas por dos subunidades idénticas de aproximadamente 16 kD, de 151-153 residuos de aminoácidos (en *S. cerevisiae*) unidas por un puente disulfuro; el dímero tiene una masa molecular alrededor de 31.2-32 kD (Figura 2).

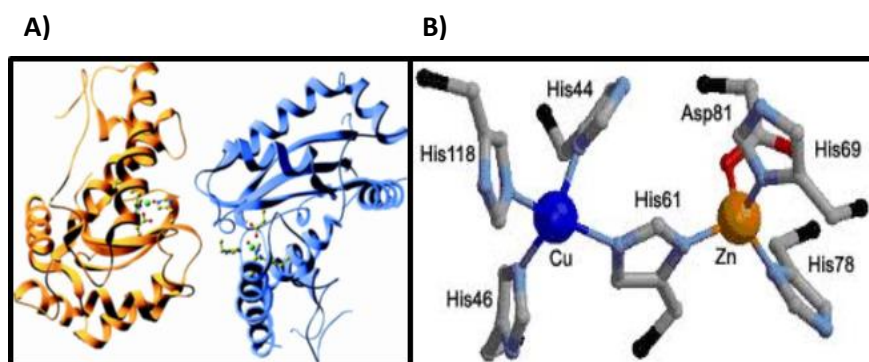


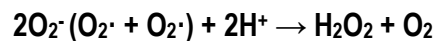
Figura 2. Estructura cuaternaria de superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD1). En A) se observan las dos subunidades de la SOD1 y en puntos de color su sitio activo. B) Acercamiento del sitio activo de SOD1 junto con los residuos de aminoácidos que lo rodean (Muñoz, et al.2005; Osredkar y Sustar, 2011).

Estudios de la cristalografía de la estructura de la superóxido dismutasa de *S. cerevisiae* revelaron que su estructura tridimensional tiene un barril- β antiparalelo de 8 hebras aplanadas además de tres asas externas derivadas del contenido de aminoácidos. 25 residuos de glicina por subunidad distribuidos en la secuencia hacen que la hoja β sobresalga, constituyendo 1/6 del total de aminoácidos distribuidos de manera uniforme a lo largo de la secuencia. Los aminoácidos aromáticos que presenta son 8 residuos de fenilalanina y 2 de tirosina.

1.2.- ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA

Cada subunidad presenta un átomo de Cu^{2+} y uno de Zn^{2+} en su sitio activo, la conformación y la catálisis dependen enormemente de la interacción del ion Cu^{2+} con cuatro nitrógenos provenientes de los anillos de imidazol de cuatro residuos de histidinas, en las posiciones 44, 46, 61 y 118 de la cadena polipeptídica, además de una molécula de agua. La comunicación entre el Cu^{2+} y el Zn^{2+} ocurre a través de la interacción del anillo de imidazol de la histidina 61, también interactúa con las histidinas 69 y 78 y el grupo carboxilo ($-\text{COO}^-$) del ácido aspártico 81. La histidina 61, que interactúa con ambos metales, puede estar encargada de suministrar los protones necesarios para la dismutación (Hernández-Saavedra y Romero-Geraldo, 2001), mientras que la arginina 143 es la encargada de guiar al radical superóxido al sitio activo. La dismutación ocurre cuando un electrón del anión superóxido es donado al centro catalítico, desencadenando la formación del oxígeno molecular. El Cu^{2+} dona un electrón a un segundo radical superóxido que junto con dos protones forman al peróxido de hidrógeno (Djinovic, et al. 1992; García, et al. 1995).

Para la dismutación del anión superóxido, la enzima utiliza dos moléculas de oxígeno, dos moléculas de anión superóxido y dos protones para generar una molécula de peróxido de hidrógeno y una molécula de oxígeno, como se muestran en la siguiente reacción:



Al comparar varias secuencias de SOD de eucariontes, se encontró que las secuencias de levaduras tienen poca divergencia con respecto a las superóxido dismutasa de bovinos, presentando 55% de identidad en secuencia de aminoácidos (Djinovic, et al. 1992). En el caso de la levadura *D. hansenii*, Hernández-Saavedra (2001) reportó que ésta presenta dos isoformas de la CuZnSOD. La

característica que diferencia una de otra es el contenido de residuos de histidina: la SODC1, o canónica, presenta 6 y tiene actividad catalítica elevada; en cambio, la SODC2 solamente tiene tres histidinas, las otras tres histidinas son reemplazadas por tirosinas y su actividad es limitada.

Por su parte, la MnSOD tiene en su sitio activo manganeso; generalmente se ha determinado su estructura cristalográfica como homotetrámero, sin embargo también se determinó como dímero en la levadura *Candida albicans*, debido a las condiciones en que fue crecida (Sheng, et al. 2011).

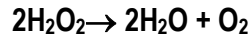
1.3.- PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES: CATALASA

La dismutación del peróxido de hidrógeno se conoció por primera vez hacia el año de 1818 cuando Thernard observó la degradación de este metabolito en tejidos de plantas y animales. Fue hasta 1900 que Oscar Loew acuñó el nombre de catalasa para describir a esta enzima y en 1930 Zeile y Hellstrom demostraron que se trataba de una hemo enzima, siendo purificada en 1937 por Summer y Dounce a partir de hígado de ternera.

Diversos estudios han demostrado que las catalasas tienen un origen común y que están presentes en los tres dominios de los seres vivos: Archaea, Bacteria y Eucaria (Díaz, et al. 2005; Klotz y Loewen, 2003). Es una hemo enzima globular formada por cuatro subunidades casi idénticas unidas mediante enlaces no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético hemo y tiene una masa molecular alrededor de 50-80 kD; el peso del tetrámero oscila entre 210 y 330 kD dependiendo del órgano, organismo y tipo de la catalasa del que se trate. Dentro de la célula pueden encontrarse en mitocondrias, peroxisomas en levaduras y citoplasma celular. En animales y plantas tiene una alta expresión durante el desarrollo del gametofito y/o embrionario, siendo parte primordial de los procesos de maduración. Además, su ausencia causa padecimientos severos como cataratas, en plantas fungen como mecanismos de defensa y en hongos están relacionadas con su virulencia.

Existen tres tipos de enzimas con función de catalasa (Figura 10): I) las catalasas monofuncionales, que contienen un grupo hemo en su sitio activo (presentes en todos los organismos), II) Mn-catalasas, que son enzimas con un átomo de manganeso en su sitio activo presentes en procariontes anaerobios, y III) las catalasas-peroxidasas, que poseen actividad de catalasa y también de peroxidasa, presentes en bacterias, arqueas y hongos (Díaz, et al. 2005).

Las catalasas son enzimas que dismutan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, esta catálisis se lleva a cabo degradando 2 moléculas de peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua y una de oxígeno, de acuerdo a la siguiente reacción general:



1.4.- ESTRUCTURA DE LAS CATALASAS MONOFUNCIONALES

Las catalasas monofuncionales se han clasificado en tres clados, esto basándose en dos eventos de duplicación de genes. Dentro del clado 1 se encuentran las catalasas con 500 residuos de aminoácidos por subunidad, son de origen vegetal y un subgrupo bacteriano. En el clado 2 se encuentran enzimas con subunidades de 750 residuos de aminoácidos, en este clado se encuentran enzimas de origen bacteriano y fúngico, así como de algunas arqueas también las presentan, posiblemente se deba a eventos de transferencia horizontal. El clado 3 agrupa enzimas con 500 residuos de aminoácidos por subunidad, las presentan bacterias, arqueas, hongos y eucariontes como los mamíferos (Díaz, et al. 2012).

A pesar de la clasificación en tres clados de las catalasas, estas enzimas guardan una alta similitud estructural atribuida a 460 residuos de aminoácidos que dan origen a una organización tridimensional conocida como “estructura de catalasa” (catalase fold) y es casi exclusiva de las hemo catalasas monofuncionales (Figura 3) (Díaz, et al. 2012).

Presentan cuatro regiones: 1) amino terminal: del residuo aminoácido 1 al 60 aproximadamente, en donde se encuentra una histidina esencial para la catálisis, esta región corresponde a una α hélice (α_2) siendo el primer componente de la estructura secundaria. 2) Barril β : compuesto por ocho hebras antiparalelas de alrededor de 250 residuos de aminoácidos, va de la histidina esencial al extremo carboxilo terminal, las hebras 1-4 son contiguas y están separadas de las hebras 5-8 por tres α hélices; ya que la hebra 5 es irregular porque hay tres residuos de aminoácidos: Ser 196, His 197 y Thr 198, que no participan en la hoja β , lo que genera que entre las hebras 4 y 5 sólo se formen dos enlaces de hidrógeno con la asparagina esencial, lo que provoca que la hebra 5 se una a la 4 y la 6 para cerrar el barril. 3) Asa envolvente: estructura dada por 110 residuos de aminoácidos que unen al barril β con el dominio de α -hélices; su arreglo en forma secundaria casi no se repite y contiene a la hélice α -9 con la tirosina esencial que coordina al Fe. 4) Dominio de α -hélices: compuesto por 60 residuos de

aminoácidos organizados en cuatro α -hélices (α 10-13) que se asocian con las α -hélices 3-5 y con la hebra 5 del barril β para estabilizar la estructura cuaternaria (Nicholls, *et al.* 2000).

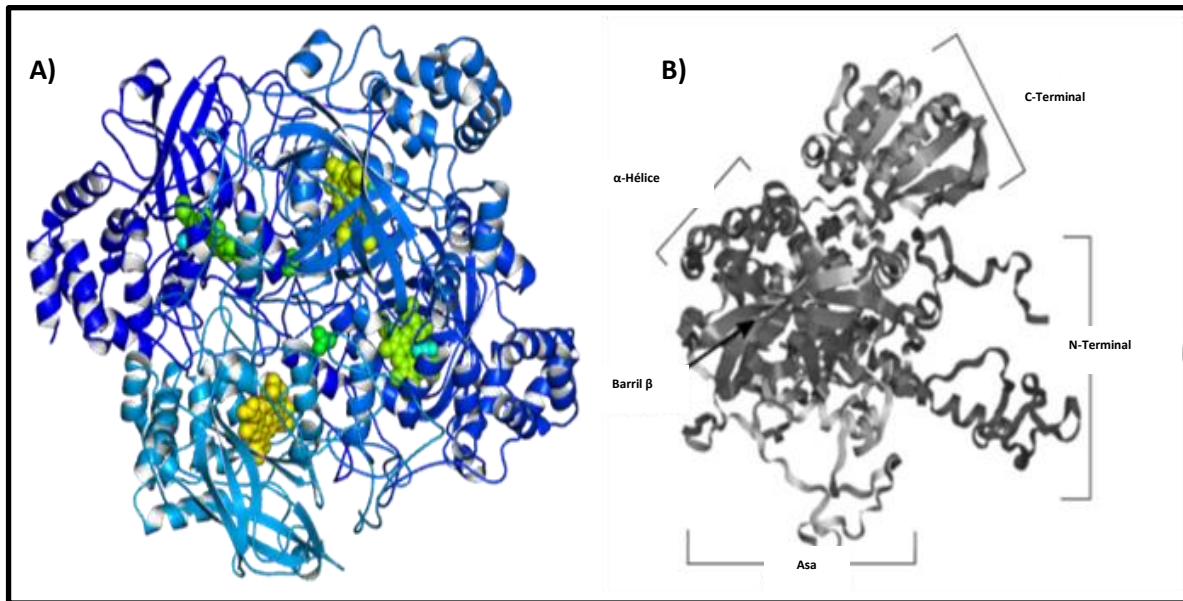


Figura 3. Estructura cristalográfica de la catalasa A monofuncional de *S. cerevisiae*. En A) se observan las cuatro subunidades en color azul (claro y marino) y los sitios hemo (verde y amarillo) que la conforman. En B) se muestra la representación de los cuatro dominios básicos de las catalasas de subunidades pequeñas. Estructura cristalográfica tomada de https://pdj.org/mine/structural_details/1a4e, abril 2017 y de (Nicholls, *et al.* 2000).

1.5.- ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA CATALASA

A grandes rasgos, la actividad catalítica de la catalasa se lleva a cabo con la transferencia de dos electrones entre dos moléculas de peróxido de hidrógeno, una donadora y otra aceptora. El inicio 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 dos electrones, uno de los oxígenos se protona liberando una molécula de agua y el otro átomo de oxígeno se coordina con el Fe del grupo hemo. Para romper el enlace O-O, se transfieren dos electrones de la enzima, uno del Fe y otro de la porfirina o de un aminoácido de la enzima. De esta manera se genera el llamado compuesto I, formado 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, 2001).

En la reacción consecutiva se recupera la forma intermedia de la catalasa, llevando a cabo la reducción del compuesto I, al transferir dos electrones a partir de una segunda molécula de H_2O_2 u otras moléculas como alcoholes alifáticos, produciendo agua y dióxigeno, constituyendo la reacción II (Maté, *et al.* 1999; Carpena, *et al.* 2006; Ramírez, 2012). En condiciones muy específicas, el compuesto I puede captar un electrón dando origen al compuesto II, que 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 se forma el compuesto III, con estado de oxidación Fe^{VI} ; este último y el compuesto II son catalíticamente inactivos (Figura 4) (Ramírez, 2012).

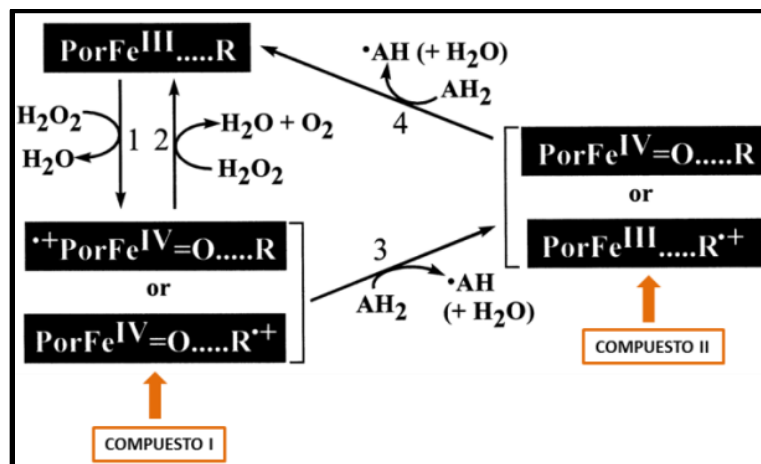


Figura 4. Catálisis realizada por la catalasa monofuncional. En el estado inicial ocurre la oxidación del grupo hemo de la catalasa, una segunda molécula de peróxido de hidrógeno reduce al compuesto I formado en la reacción anterior. Esquema modificado de (Zámocky, *et al.* 2001).

1.6.- PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES: PEROXIDASAS

Las peroxidasas son un grupo de enzimas que utilizan como sustrato peróxidos orgánicos e inorgánicos, así como sus respectivos alcoholes, utilizando tioles de cisteína en sus sitios activos, siendo los tioles los donadores de electrones. Las glutatión peroxidasas (GPX's), emplean glutatión mientras que las peroxidoxinas, usan tiorredoxina (TRX's) como reductor.

Las glutatión peroxidasas, clásicas de levadura, son multiméricas y actúan sobre hidroperóxidos orgánicos e inorgánicos. Las glutatión peroxidasas de hidroperóxidos de fosfolípidos (PHGPX's por sus siglas en inglés), son monoméricas y se asocian a membranas, son solubles en hidroperóxidos y

se encargan de reducirlos, por ejemplo, los lipoperóxidos generados en la membrana plasmática (Herrero, *et al.* 2008).

Las peroxidoxinas reducen peróxidos y peroxinitritos mediante tiorredoxina (TRX's) que dona electrones, tienen diversas localizaciones, pudiendo ser citoplasmáticas, mitocondriales o nuclear. En levadura, las peroxidoxinas citoplasmáticas actúan sobre especies reactivas nitrosantes y presentan actividad cooperativa con las otras tres peroxidoxinas.

En el año 2004, H. H. Jang observó que en condiciones oxidantes o de choque calórico se forman complejos proteicos de alto peso molecular con actividad de chaperona. Esa actividad es totalmente independiente a la de peroxidasa, al igual que ocurre con las glutatión peroxidasas (GPX's).

1.7.- CONSECUENCIAS DEL ESTRÉS OXIDANTE

Todas las células y sus organelos están delimitados por una membrana que se encarga de aislar los distintos ambientes; las membranas están constituidas por lípidos, carbohidratos (esteroles), además de proteínas integrales y periféricas. El tipo y proporción de estos elementos varía de organelo a organelo y de ello dependen sus propiedades dinámicas: fluidez, rotación, permeabilidad, excitabilidad, diferenciación, exocitosis; mecanoquímicas: densidad, viscosidad, energía libre superficial y de comunicación: señalización y transducción de señales.

La importancia de que las membranas biológicas conserven su integridad radica en mantener un ambiente osmótico correcto dentro de las células y llevar a cabo las interacciones pertinentes entre el ambiente externo e interno tanto de células como de organelos. Durante el estado de estrés oxidante, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno reaccionan con metales de transición de manera espontánea o por radiación, generando radical hidroxilo, siendo este la principal ROS que oxida a las biomoléculas; ácidos nucleicos y proteínas y a los ácidos grasos de membrana. Esta oxidación conduce a la formación de puentes disulfuro en las cadenas proteicas y provoca el desmoronamiento de la estructura de la membrana, conduciendo a la muerte celular (Steels, *et al.* 1994).

1.8.- PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

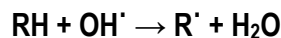
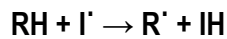
La peroxidación lipídica es la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados que los convierte en hidroperóxidos, provocando la ruptura de las membranas. A partir de la incorporación del radical

hidroxilo se origina un radical peroxilo (ROO^\cdot) que origina una reacción en cadena, los hidroperóxidos se descomponen en productos secundarios.

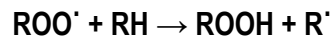
El proceso de peroxidación lipídica puede ocurrir de dos maneras. La primera es la vía enzimática, en la cual participa la ciclo oxigenasa (COX) y la lipo oxigenasa (LO), y se genera un hidroperóxido por la inserción de oxígeno molecular en el centro activo de la enzima. Producto de este tipo de oxidación son las prostanglandinas (vía COX) y eicosanoides (vía COX y LO); la característica de estos hidroperóxidos es que son estereo específicos y con función biológica significativa.

La segunda manera en la que ocurre la peroxidación es no enzimática y se da en tres fases (Figura 5):

1) Inicio: un iniciador (I^\cdot) extrae un átomo de hidrógeno de un enlace CH_2 (grupo radical metil) que se localiza adyacente a un doble enlace de una cadena alifática de un ácido graso poliinsaturado, dando origen a un radical orgánico (R^\cdot). Se ha postulado que el iniciador es el radical hidroxilo (OH^\cdot , $E^\circ=1,6$ V) generado por la reacción de Haber-Weiss, en la que participan el O_2^- y el Fe^{+3} (Gutteridge, 1995).



2) Propagación: el radical lipídico (R^\cdot) generado sufre combinación o adición con oxígeno hasta llegar a radical peroxilo (ROO^\cdot), que puede captar átomos de H desde un enlace alílico de una molécula lipídica vecina, formando hidroperóxidos (ROOH), especialmente si hay presencia de metales (Cu^+ o Fe^+), siendo una reacción autocatalítica en cadena.



3) Terminación: Los hidroperóxidos son el producto final de la lipoperoxidación, son moléculas estables pero las altas temperaturas y la presencia de metales (Fe^\cdot y Cu^\cdot) estimulan su descomposición en hidrocarburos gaseosos (etano, pentano) y aldehídos (malondialdehído, 4-hidroxinonenal). En esta fase ocurre la combinación de productos de la peroxidación lipídica para formar compuestos no radicales o por la reacción de éstos con antioxidantes (atrapadores) (Buettner, 1993).

Varios compuestos pueden ser generados a partir de un solo ácido graso, debido a que sus cadenas alifáticas poseen varios sitios susceptibles a que las ROS sustraigan átomos de hidrógeno (Halliwell y

Gutteridge, 1999). La formación de endoperóxidos lipídicos a partir de un ácido graso poliinsaturado que contiene por lo menos tres dobles enlaces interrumpidos con grupos metilo, puede conducir a la formación de malondialdehído (MDA) como producto de su descomposición (Marnett, 1998; Buege y Aust S. D., 1978).

El MDA es un dialdehído de tres carbonos altamente reactivo que puede combinarse con diversos grupos funcionales de las proteínas, lipoproteínas, RNA y DNA. Es usado como biomarcador de daño por ROS en membranas ya que es capaz de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (1mol de MDA→2 mol de TBA) a pH bajo y alta temperatura, dando lugar a que se origine un cromógeno rosado que puede ser determinado a una longitud de onda de 535nm.

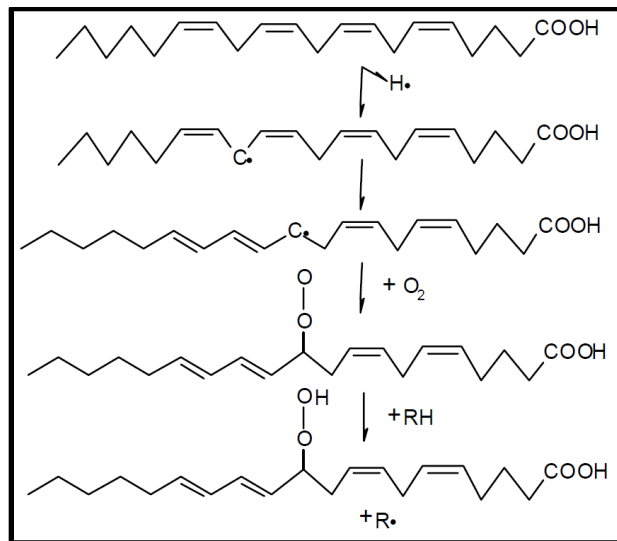


Figura 5. Peroxidación lipídica. Esquema simplificado de la peroxidación de un ácido graso poliinsaturado en donde una molécula de radical hidroxilo sustrae un átomo de H⁺ de un ácido graso, generando un radical peroxilo, y desencadenando la desestabilización de la membrana plasmática o la membrana de cualquier otro organelo (Hansberg, 2002).

1.9.- DAÑO A BIOMOLÉCULAS: ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO (DNA)

El DNA es quizá la molécula más importante que poseen los seres vivos; está constituida por dos hebras antiparalelas complementarias formadas por cuatro bases nitrogenadas, un azúcar y un grupo fosfato que son los que le dan carga y producen el super enrollamiento de la molécula.

Cuando las ROS llegan hasta el DNA, provocan modificaciones en las bases, aductos/rupturas en una o en las dos hebras y la formación de lesiones apurínicas/apirimidínicas con potencial mutagénico y/o tóxico (Salmon, et al. 2004).

Se ha estudiado el efecto del H₂O₂ sobre el DNA, encontrando que a bajas concentraciones (~10µM) su efecto es prácticamente nulo. En concentraciones cercanas a 150µM, se arresta el crecimiento y el DNA, protegido por las histonas, conserva la energía para la expresión de genes implicados en contender con estrés oxidante. Finalmente, a concentraciones mayores de H₂O₂, la célula cesa toda actividad e inicia la participación de complejos proteicos implicados en la reparación del DNA, tales como MRN (Mre11, Rad-50 y Nbs1) o p53, que a su vez funcionan como sensores y/o transductores de señales (Barzilai y Yamamoto, 2004).

Resulta primordial mencionar que el H₂O₂ es utilizado como sensor de estrés oxidante a la vez que es el precursor del radical hidroxilo (OH[·]), causante de modificaciones en las bases como la desaminación de la citosina en uracilo y de 5-metilcitosina en timina, en el azúcar conocida como desoxirribosa, pérdida de base y ruptura de la hebra y de las fracturas en la molécula de DNA (Hansberg, 2002; Barzilai y Yamamoto, 2004). Por su parte, el oxígeno singulete (¹O₂) solamente ataca a la guanina, formando aductos y 8-hidroxi-guanina, base que es capaz de formar enlaces de hidrógeno erróneos: A:T por C:G y G:C por T:A, dando origen a mutaciones (Hansberg, 2002).

Además de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), el MDA producto de la peroxidación lipídica ataca a proteínas y ácidos nucleicos, DNA y RNA. Marnett, (1998) estudió la formación de aductos monoméricos y oligoméricos en las bases nitrogenadas, en experimentos *in vitro* entre DNA y MDA y encontró que el pirimido (1,2α)purín-10(3H)-1 (M₁G) es el principal aducto producido, seguido por N⁶-(3-oxo-propenil) de oxiadenosina (M₁A) y pequeñas trazas de N⁴-(3-oxopropenil) deoxicidina (M₁C). La proporción de los primeros dos compuestos es 5:1 (Marnett, 1998; Buege y Aust S. D., 1978).

1.10.- DAÑO A BIOMOLÉCULAS: PROTEÍNAS

Las proteínas son cadenas formadas por residuos de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos entre un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (-NH₂) de residuos adyacentes. Son abundantes y poseen diversas funciones que dependen de una correcta homeostasis celular. La disfunción

proteica se puede dar por diversas causas; la edad celular es una de ellas, lo que provoca la disminución en la eficiencia para reciclarlas así como desarreglos causados por especies reactivas.

La oxidación de las proteínas se ha clasificado como reversible e irreversible. En el primer caso la oxidación se revierte debido a que esas proteínas tienen funciones redox; un ejemplo claro sucede cuando el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) originan la formación de puentes disulfuro entre grupos tioles de las cisteínas que se encuentran aledañas en la conformación tridimensional. De esta manera pueden activarse o desactivarse; adicional a este sistema, existe la glutationilación y la S-nitrosilación (Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006).

En el caso de la oxidación irreversible, las proteínas pierden sus propiedades y función porque ocurren eventos de carbonilación, rupturas de enlaces peptídicos, nitración y enlaces proteína-proteína. En cuanto al estrés oxidante, el principal radical causante de daño es el radical hidroxilo (HO^\cdot), seguido del oxígeno singulete (1O_2). Eventos como la radiación ionizante y la oxidación catalizada por metales son las otras dos causas de deterioro. En los procesos anteriores, el radical que se produce es el HO^\cdot que al reaccionar con los hidrógenos (del C- α) de la estructura central de las proteínas, genera radicales carbono estables que en presencia de oxígeno generan radical peroxilo. Subsecuentemente el radical hidroxilo y una imina que se hidroliza producen una ruptura en el enlace peptídico. En el caso de que el radical carbono obtuviera un hidrógeno generaría un hidroperóxido que se descompondría en radical alcoxilo, causando a su vez ruptura en la cadena polipeptídica (Mirzaei y Regnier, 2006).

Cabe mencionar que el HO^\cdot no difunde fuera del sitio en donde se genera, por lo tanto reacciona inmediatamente con estructuras y compuestos cercanos (Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006).

La carbonilación ocurre principalmente en cinco aminoácidos a través de cuatro rutas. La primera ruta es una oxidación directa:

1. prolina \rightarrow 2-pirrolidona
2. lisina \rightarrow semialdehído- α -aminoalifático
3. arginina y prolina \rightarrow semialdehído glutámico
4. treonina \rightarrow ácido 2- amino-3-cetobutírico

La segunda es provocada por la ruptura de la cadena polipeptídica por medio de la ruta de la α -amidación u oxidación del ácido glutámico, que conlleva a péptidos en donde el N-terminal se encuentra bloqueado por un derivado α -cetoacilo.

En las últimas dos rutas ocurren reacciones secundarias con moléculas que en su estructura poseen grupos carbonilos. Modelo de ello es el grupo imidazol de la histidina o sulfhidrilo de la cisteína con MDA o 4-hidroxi-2-nonenal o 2-propenal. También suelen darse por reacción con cetoaminas, cetoaldehídos y deoxinas, producto de la reacción con azúcares reductores o productos de oxidación como el amino de residuos de lisina (glicación y glicoxidación) (Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006; Reverter, et al. 2004).

Los productos que cuantitativamente son más abundantes durante eventos de carbonilación en orden descendente son: semialdehído glutámico y semialdehído aminoalifático.

Las proteínas que modulan el estado redox intracelular son de dos tipos: las que contienen tiorredoxina (TRX) y las de glutatión (GRX) (Herrero, et al. 2008). Ambos sistemas funcionan redundante y cooperativamente. En *S. cerevisiae* se encuentran tres Trx's: Trx1, Trx2 y Trx3, las dos primeras son citosólicas y la tercera mitocondrial; su importante función es actuar sobre hidroperóxidos (Herrero, et al. 2008).

En el caso de los sistemas de glutarredoxinas (GRX's) se ha detectado la expresión de cuatro en *S. cerevisiae*; algunas son citoplasmáticas y otras mitocondriales. Su papel protector contra especies reactivas es actuar sobre el anión superóxido e hidroperóxidos, lo que demuestra que sus actividades catalíticas se sobrelapan parcialmente. Las que se localizan en núcleo tienen funciones regulatorias redundantes sobre el factor de transcripción Aft1, involucrado en la expresión de genes de asimilación, regulación y homeostasis de hierro. La falta de Grx's causa hipersensibilidad a oxidantes (Herrero, et al. 2008). El sistema TRX y GRX tienen importancia vital al actuar sobre hidroperóxidos tanto internos como externos.

Actualmente existen diversas técnicas para estudiar y analizar la producción de residuos de grupos carbonilos (cetonas y aldehídos) en proteínas. Todas tienen en común el uso de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) que se une a los grupos carbonilo de los péptidos, originando un complejo proteína-2,4-dinitrofenil hidrazona (Mirzaei y Regnier, 2006; Vargas, et al. 2007).

En la figura 6 se muestran cinco ejemplos de oxidación.

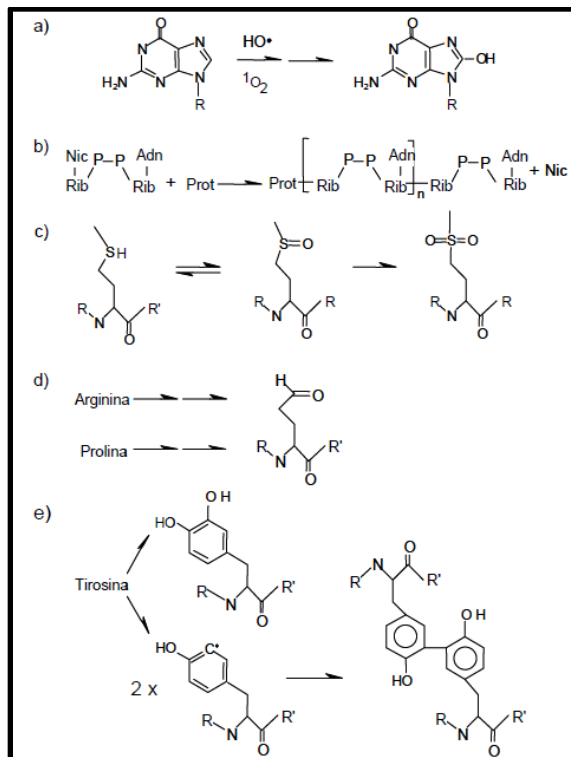


Figura 6. Ejemplos de daños a moléculas y proteínas generados durante el estado de estrés oxidante. En A) la oxidación de guanina (base nitrogenada) por radical hidroxilo y/u oxígeno singulete que genera 8-hidroxi guanina. En B) la polimerización de la enzima ADPribosa en el sitio de ruptura de la cadena del ácido nucleico. C) Oxidación (de una proteína) reversible de la sulfosida de metionina e irreversible en la sulfona de metionina. D) Oxidación irreversible de proteínas, en los residuos de aminoácidos metionina y arginina, dando origen al semialdehído glutámico. E) Oxidación irreversible de proteínas. Residuo de aminoácido tirosina y fenilalanina se hidroxilan originando dihidroxifenilalanina (DOPA) y dos radicales tirosilo que pueden formar ditirosina ([Hansberg, 2002](#)).

1.11.- MODELO DE ESTUDIO

Las levaduras son utilizadas como modelo de estudio debido a la relativa facilidad y economía con que se manipulan, así como la rapidez con que se logra obtener datos de relevancia científica y tecnológica. A grandes rasgos, son hongos unicelulares que tienen forma ovoidea, se reproducen por gemación o división y producen enzimas capaces de descomponer diversos compuestos orgánicos, principalmente azúcares mediante la fermentación alcohólica o polioles vía oxidación para la obtención de energía ([García-Campos, 2013](#)). En términos generales, *S. cerevisiae* ha sido utilizado como

organismo modelo, no obstante, presenta características y limitaciones que han hecho que los científicos fijen su interés en otras levaduras con potencial científico y biotecnológico, por ejemplo, *D. hansenii*.

Es un hongo hemiascomiceto de la familia Saccharomycetaceae del género *Debaryomyces* (Nakase, et al. 1996). Dicho género se encuentra en numerosos hábitats, desde condiciones con poca agua y oxígeno hasta productos con gran cantidad de azúcar y sales (eurihalina, osmotolerante y halotolerante) (Navarrete, et al. 2009; Norkrans, 1966; Marth, 1978; Tokuoka, 1993). Al contar con plasticidad metabólica para adaptarse a múltiples condiciones (extremas) es considerada como una “levadura no convencional” (Spencer, 2001).

Algunos investigadores iniciaron estudios sobre los cambios en la morfología de esporas, anamorfos y gemas de *D. hansenii*. Cuando era crecida a distintos valores de pHs, temperaturas, nutrientes y sobre todo salinidad, se registraron cambios estructurales como disminución en el número de mitocondrias, presencia de vesículas, cuerpos granulares, ornamentaciones y formación de pliegues en la membrana plasmática. Era muy claro que la inusual fisiología se debía correlacionar con su capacidad de supervivencia (Gezelius y Norkrans, 1970).

En el laboratorio se ha cultivado en medios con diversas fuentes de carbono (glucosa, galactosa, etanol, metanol, etc.) que utiliza para efectuar la fermentación aerobia y con rangos de salinidad que inducen la producción de solutos compatibles: glicerol y arabinitol, para balancear su concentración extracelular (Figura 7) (Nobre y Milton, 1985; Thomé-Órtiz, et al. 1998). Posee la cualidad de ser oleaginosa: sintetizar, acumular y degradar lípidos con un máximo de 70% de su peso seco; aunque a pH ácido esta capacidad proteolítica-lopólitica se ve limitada (Sorensen y Samuelson, 1996). Es tolerante a toxinas y presenta actividad *killer* contra bacterias y otros hongos cuando es crecida en medios que contienen NaCl y KCl y poca o nula oxigenación. Usa variedad de fuentes de nitrógeno (aminoácidos, nitritos, etc.) (Kurtzman y Robnett, 1998; Barnett, et al. 2000). De igual forma puede hacer uso de algunos metales pesados; muestra de ello es el incremento en la producción de riboflavina al ser sometida a cadmio (Voronovsky, et al. 2004).

En cuanto al estudio de su genoma, el 79% es codificante y posee el 49% de DNA redundante (Llorente, et al. 2000). Cuenta con la capacidad de reproducirse sexualmente por ascosporas; por conjugación heterogámica con dos células sexualmente diferentes en tamaño o forma. La

reproducción asexual sucede por gemación multipolar. En forma haploide, ocasionalmente se agrupa formando pseudomicelios primitivos que rara vez se desarrollan apropiadamente.

Se sabe que *D. hansenii* respira significativamente menos en presencia de NaCl (Gezeliu y Norkrans, 1970). El proceso de respiración es un intercambio de electrones que se lleva a cabo en la mitocondria, en donde se consume entre el 85-90% de oxígeno (Lushchak y Gospodaryov, 2005), hecho que la hace ser la principal fuente productora de ROS. No obstante, crecer en una condición aeróbica no es la única fuente de especies reactivas: variaciones en el pH, nutrientes, temperatura, iones o radiación contribuyen a que los radicales aumenten sus niveles basales.

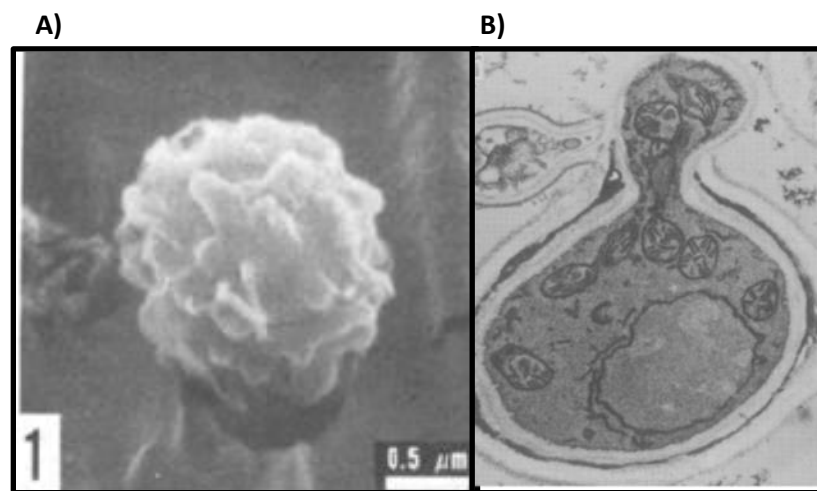


Figura 7. Micrografías de *D. hansenii*. En A) Ascospora de *D. hansenii* tomada por microscopía de barrido; se pueden observar ornamentaciones en respuesta al uso de diferentes fuentes de carbono (Kurtzman, et al., 1975). En B) una micrografía de microscopía de transmisión de *D. hansenii* cultivada en medio rico YPD+1.2M de NaCl, en ella se observan mitocondrias, organelos y una gema nueva (Kreger-Van y Veenhuis 1975).

En *D. hansenii* se están estudiando las condiciones que generan “estado oxidante”, pues al ser un organismo extremófilo (eurihalino, osmo-, xero-, halo-, quimio- y criotolerante) no se ha podido esclarecer cuáles son las condiciones perjudiciales. Algunos investigadores enfocaron su atención en estudiar la bioquímica, bioenergética y fisiología; es decir, sobre sus características y capacidades para contender y adaptarse a condiciones extremas sin perjudicar su metabolismo y fisiología. Por su parte Segal-Kischinevsky (2011) y Ochoa[†] (1995), independientemente, concentraron su investigación en el estudio del “estrés oxidante”. Lo anterior con el propósito de aprovechar su potencial biotecnológico.

2.- ANTECEDENTES

Se han hecho estudios pioneros en cuanto a la bioquímica y genómica de *D. hansenii*. En 2011 [Segal-Kischinevzky](#) y colaboradores reportaron que el uso de etanol como fuente de carbono y la presencia de 0.6 M de NaCl eran determinantes para observar la presencia de la catalasa A o T en experimentos tipo *Northern Blot* (Figura 8).

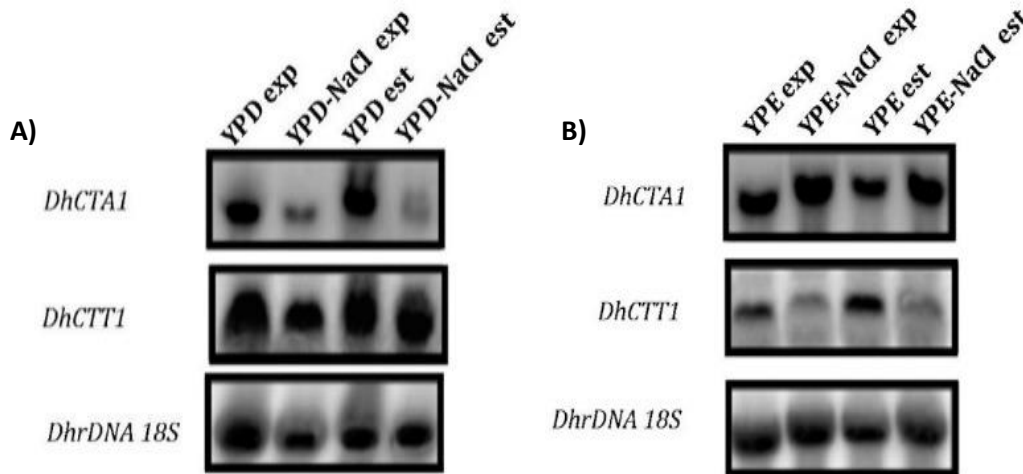


Figura 8. Northern blot de RNA total obtenido de *D. hansenii*. A la izquierda se muestra el Northern blot de RNA de levaduras cultivadas hasta fase exponencial o estacionaria en medios con glucosa (YPD y YPD+0.6M NaCl). En la derecha se muestra el Northern blot de RNA de levaduras cultivadas hasta fase exponencial o estacionaria en medios con etanol (YPEtOH y YPEtOH+0.6 M NaCl). Tomada de [Segal-Kischinevzky et al. 2011](#).

En la figura 8 se muestra un experimento en el que se detectó que *Dhcta* se encuentra presente en las cuatro condiciones de cultivo (YPD, YPD-NaCl, YPE y YPE-NaCl) y es más abundante en etanol, YPE y YPE-NaCl, ya sea en fase exponencial o estacionaria de crecimiento. Se observó que *Dhctt* está presente principalmente en los medios con glucosa con o sin NaCl. Con este resultado [Segal-Kischinevzky](#) propuso que la fuente de carbono podía ser determinante para la expresión de una u otra catalasa, es decir, *Dhcta* que codifica catalasa A para cuando se dispone de etanol (o alguna otra fuente de carbono no fermentable) y *Dhctt* codificante para catalasa T cuando la fuente de carbono es glucosa.

Los análisis de actividad de catalasa mostraron que en fase exponencial de crecimiento en el medio con etanol (YPE) esta actividad es 5 veces mayor en comparación con medios de glucosa (YPD), mientras que en la fase estacionaria se eleva 7 veces más. En los cultivos con 0.6 M de NaCl, tanto en etanol como en glucosa no hubo un aumento significativo de la actividad enzimática. Para dar

robustez a este estudio, se comparó la actividad de catalasa de *D. hansenii* con la de *S. cerevisiae*, obteniendo una menor actividad por parte de esta última levadura (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad específica de catalasa. Tomada de Segal-Kischinevzky et al. 2011.

La actividad de catalasa se midió en <i>D. hansenii</i> y <i>S. cerevisiae</i> crecidas en medio rico, con y sin sal, en fase exponencial y estacionaria. * (mmoles de H ₂ O ₂ oxidado/min/mg de proteína)						
Fase de crecimiento del cultivo/cepa	<i>D. hansenii</i>				<i>S. cerevisiae</i>	
	Exponencial		Estacionaria		Exponencial	
YPD	73	1X	150	1X	5	1X
YPD+0.6 M NaCl	124	1.7X	40	0.3X	75	15X
YPE	380	5X	1050	7X	17	1X
YPE+0.6 M NaCl	360	5X	200	1.3X	135	14X

Mediante electroforesis de proteínas y zimogramas, Segal-Kischinevzky detectó la actividad de ambas catalasas en medio YPD (Figura 9), por lo tanto, propuso que las catalasas (A y T) de *D. hansenii* están reguladas a nivel transcripcional por la fuente de carbono y a nivel postraduccional por la fuente de carbono y presencia de sal.

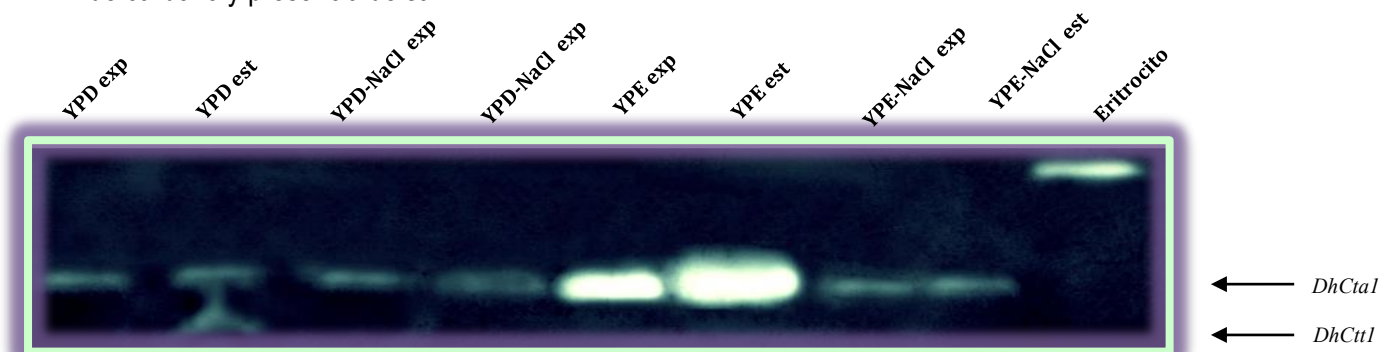


Figura 9. Zimograma de actividad de catalasa de *D. hansenii*. En el carril 1. Extracto crudo de medio YPD fase exponencial; carril 2. YPD estacionaria; 3. YPD-NaCl exp; 4. YPD-NaCl est; 5. YPE exp; 6. YPE est; 7. YPE-NaCl exp; 8. YPE-NaCl est, 9. Catalasa de eritrocito humano. En medio YPD est se detectó la actividad de catalasa T. Tomada de Segal-Kischinevzky et al. 2011

En el año 2012, con el fin de corroborar y analizar a detalle la transcripción de las catalasas de *D. hansenii*, Ramírez-Hernández (2012) realizó una serie de experimentos tomando como antecedentes el modelo experimental de Segal-Kischinevzky. El primer método empleado fue la citometría de flujo (CMF), una técnica multiparamétrica. Una suspensión de células pasan delante de un haz de luz blanca láser focalizada, la dispersión de dicho rayo se registra y es convertida de señales ópticas a electrónicas que son digitalizadas mostrando dos parámetros medidos en una misma célula: tamaño y complejidad. Para medir los parámetros antes mencionados, se cultivó a la levadura en medio YPD,

YPD+0.6 M NaCl, YPEtOH y YPEtOH+0.6 M NaCl hasta fase exponencial, además se marcó con fluorescencia, diacetato de diclorodihidrofluorosceína (H₂DCFDA) el contenido de peróxido de hidrógeno y con dihidroetidio (DHE) el contenido de anión superóxido.

La citometría de flujo reveló que las células de mayor tamaño son las que crecen con glucosa (Tabla 2). La concentración de NaCl no influye sobre este parámetro. Al aplicar la prueba de Tukey, se determinó que solo la fuente de carbono influye en este parámetro.

Tabla 2. Tabla de valores relativos de tamaño y complejidad de las células de *D. hansenii*.

<i>D. hansenii</i>				
	YPD	YPD+0.6 M NaCl	YPEtOH	YPEtOH+0.6 M NaCl
Tamaño	478.5	466	434	423
Complejidad	845.4	697	836.5	808.5

Con la complejidad celular, se encontró que las células crecidas en etanol muestran mayor cantidad de granulosidad (partículas, organelos, iones, proteínas, etc.), esta disminuye con la presencia de NaCl, sin embargo, no existen diferencia significativa entre los grupos de células (Figuras 10 y 11).

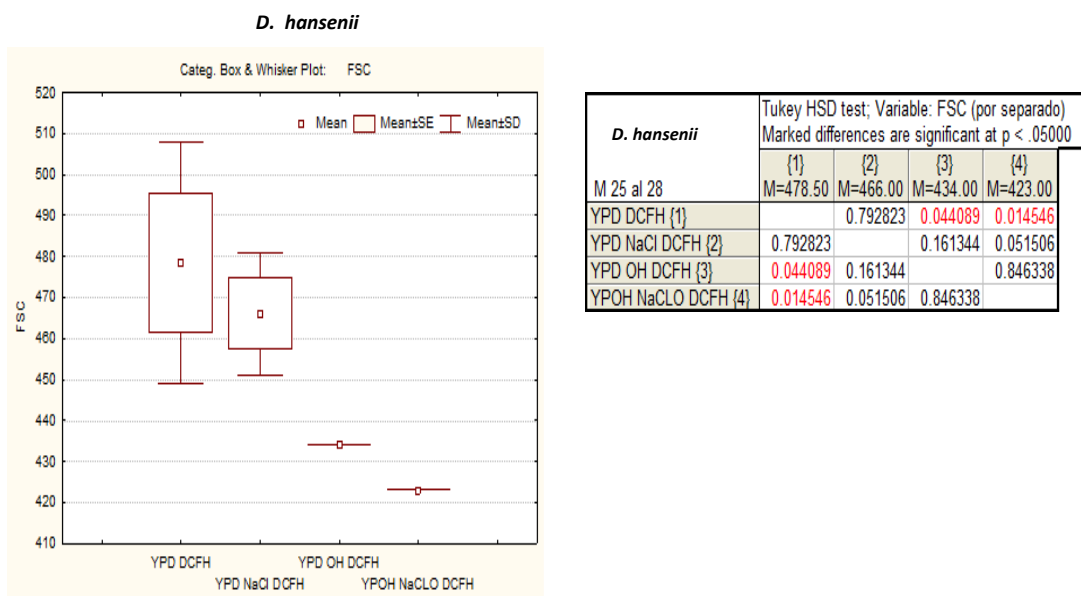


Figura 10. Gráficas comparativas del tamaño celular. A la izquierda se muestra la gráfica de tamaño celular y a la derecha un recuadro con los valores obtenidos mediante la prueba de Tukey, en rojo los que tienen significancia estadística.

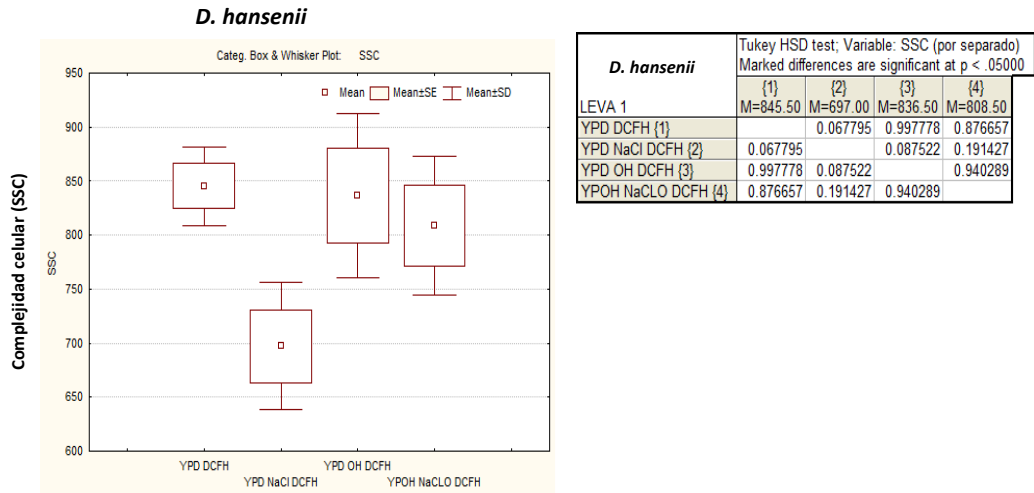


Figura 11. Gráficas comparativas de la complejidad celular. En el lado izquierdo se muestra la gráfica de complejidad celular y a la derecha los resultados de la prueba de Tukey; no hay diferencias entre las condiciones de cultivo.

Con respecto a los fluorocromos para H_2O_2 y O_2^- , Ramírez-Hernández (2012) obtuvo que en YPD y YPEtOH+0.6 M NaCl se tiene la mayor concentración de peróxido de hidrógeno y de anión superóxido, estos datos no concuerda con el tamaño y complejidad obtenidos (Figura 12).

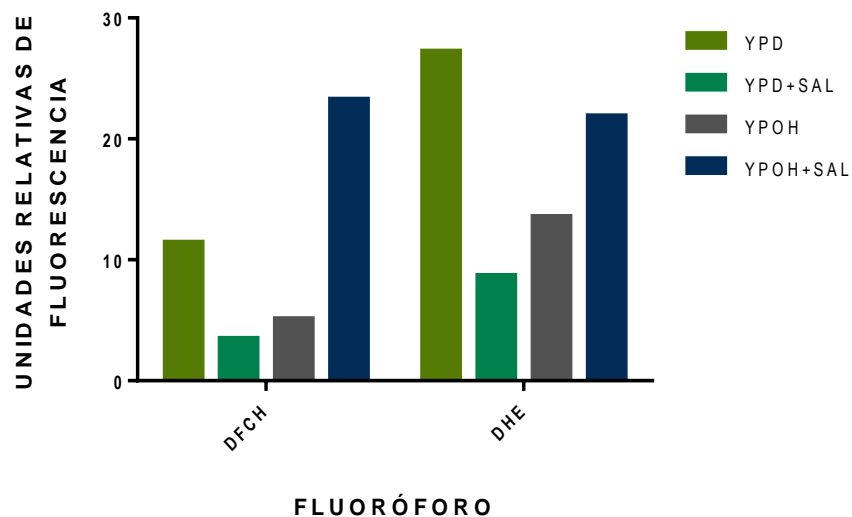


Figura 12. Gráfica de contenido relativo de peróxido de hidrógeno y anión superóxido en D. hansenii. El contenido de radicales de oxígeno fue medido mediante DCFH-DA (verde) para peróxido de hidrógeno y DHE (rojo) para anión superóxido en células provenientes de 4 condiciones de cultivo, YPD, YPD+0.6 M NaCl, YPEtOH y YPEtOH+0.6 M NaCl.

Con estos resultados se obtuvieron dos conclusiones. La primera es que el tamaño y complejidad indican que la condición de crecimiento ideal para *D. hansenii* es el medio rico YPD+0.6 M NaCl pues se presenta un balance entre tamaño y contenido granuloso. La segunda conclusión fue que, al no considerar a la pared celular como una barrera de permeabilidad, no se tomó en cuenta que ésta puede intervenir en la difusión de los fluorocromos y por ende en su reacción, por lo que estos resultados pueden no ser correctos.

La segunda parte de experimentos consistió en estandarizar y realizar RT-qPCR (retrotranscripción cuantitativa de la Reacción en cadena de la polimerasa) de los dos genes de catalasa de *D. hansenii*. RT-qPCR es una técnica en la que se sintetizan moléculas de DNA a partir de un templado de mRNA, permitiendo amplificar y cuantificar a las moléculas recién sintetizadas. El análisis de los datos arrojados se realizó de manera relativa con el método de la $2^{\Delta\Delta Ct}$. Se elige una condición de crecimiento y un gen que fungen como estandarizadores de la expresión, considerada como 1, a partir de este valor se sacan las diferencias (en proporción). Para este análisis los estándares fueron el medio YPD y el gen de rRNA26S (*DhrRNA26S*). El análisis de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sugirió que el gen *Dhcta* disminuía su expresión en todas las condiciones de cultivo con respecto a la condición estándar. El gen de *Dhctt*, mostró aumento de expresión en YPD+0.6 M NaCl (Figura 13). Ramírez (2012) concluyó que los resultados no eran certeros debido a que la expresión del gen de referencia *DhrRNA26S* variaba su expresión al igual que los genes experimentales. No fue posible apreciar los cambios de expresión.

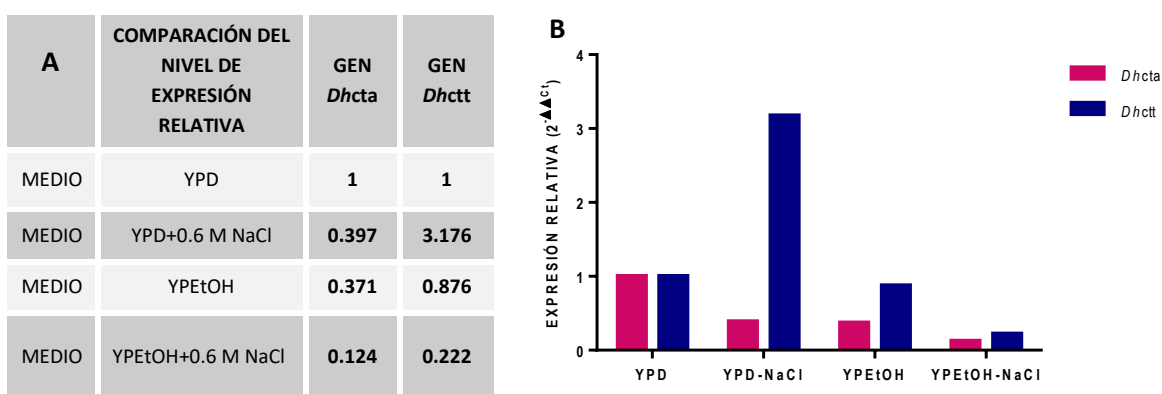


Figura 13. Niveles de expresión relativa de mRNA de genes *Dhcta* y *Dhctt*. En A se muestran los valores de expresión relativa de *Dhcta* y *Dhctt*, el gen normalizador fue *DhrRNA26S* y condición normalizadora YPD. En B se encuentra la gráfica de valores de expresión relativos.

La experiencia anterior resultó primordial para desarrollar, mejorar y corregir las técnicas para buscar los cambios genómicos y bioquímicos que producen las ROS en *D. hansenii*.

El sistema de detoxificación de especies reactivas no se centra sólo en las catalasas. Por ello, en esta tesis se muestra una propuesta de análisis global que incluye estudiar a las enzimas antes mencionadas y a la superóxido dismutasa, debido a que las dos enzimas participan en la dismutación de las ROS que dan origen a señalizaciones y a radicales altamente dañinos. Se abordará su presencia y actividad en dos distintas fuentes de carbono (glucosa o etanol) y concentraciones de sal (NaCl). Además se intenta dilucidar cuál de estas condiciones es capaz de causar daños a biomoléculas mediante una técnica que mide el contenido de grupos carbonilo en extractos crudos. En cuanto al daño de la ultraestructura celular, mediante la técnica de TBARS se obtendrá el grado de lipoperoxidación de los ácidos grasos de la membrana plasmática. Finalmente, con RT-qPCR se determinarán los niveles de expresión de los tres transcritos de las enzimas antioxidantes, *Dhcta* para catalasa A, *Dhctt* para catalasa T, así como *Dhsod*, transcrito de superóxido dismutasa de Cu-Zn de *D. hansenii*.

3.- HIPÓTESIS

- ❖ Si la fuente de carbono y diferentes concentraciones de NaCl provocan daño oxidante en el crecimiento de *D. hansenii*, entonces la expresión de las enzimas antioxidantes catalasas y superóxido diamutasa estará regulada transcripcional y/o pos-transcripcionalmente y habrá una mayor formación de malondialdehído y de grupos carbonilo en las condiciones de estrés.

4.- OBJETIVO

Obtener información y analizar los cambios en el estado redox de *D. hansenii* como consecuencia de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).

4.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Analizar en 6 diferentes medios de cultivo: YPD, YPD+0.6 M NaCl, YPD+1.2 M NaCl, YPEtOH, YPEtOH+0.6 M NaCl y YPEtOH+1.2 M, el tiempo que le toma a la levadura *D. hansenii* duplicarse, determinando en una curva de crecimiento la fase de adaptación (lag) y el crecimiento exponencial hasta llegar a fase estacionaria de crecimiento.
- ❖ Determinar, analizar y comparar la actividad total de superóxido dismutasa y catalasa de *D. hansenii* cuando es crecida hasta fase estacionaria en 6 distintos medios de cultivo: YPD, YPD+0.6 M NaCl, YPD+1.2 M NaCl, YPEtOH, YPEtOH+0.6 M NaCl y YPEtOH+1.2 M NaCl.
- ❖ Medir, analizar y comparar el contenido de grupos carbonilo en extractos crudos de *D. hansenii* cultivada hasta fase estacionaria en 6 medios distintos: YPD, YPD+0.6 M NaCl, YPD+1.2 M NaCl, YPEtOH, YPEtOH+0.6 M NaCl y YPEtOH+1.2 M.
- ❖ Medir, analizar y comparar el contenido de malondialdehído (MDA) en la membrana plasmática de células de *D. hansenii* cuando la levadura es cultivada hasta fase estacionaria de crecimiento en 6 medios de cultivo diferentes: YPD, YPD+0.6 M NaCl, YPD+1.2 M NaCl, YPEtOH, YPEtOH+0.6 M NaCl y YPEtOH+1.2 M.
- ❖ Llevar a cabo una cuantificación relativa por medio de la técnica RT-qPCR de los transcritos *Dhcta*, *Dhctt* y *Dhsod1* que corresponden a enzimas con actividad antioxidante (catalasa A, catalasa T y Cu-Zn superóxido dismutasa respectivamente) de *D. hansenii* crecida hasta fase estacionaria cultivada en los medios: YPD, YPD+0.6 M NaCl, YPD+1.2 M NaCl, YPEtOH, YPEtOH+0.6 M NaCl y YPEtOH+1.2 M. Además de determinar si existe regulación a nivel de la transcripción.

5.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- CEPA, MEDIOS DE CULTIVO Y PRE-CULTIVOS

Para llevar a los experimentos se utilizó la cepa silvestre de *D. hansenii* Y7426, la cual no contiene ninguna auxotrofia ni modificación genética. Para las distintas condiciones de cultivo se utilizó medio rico YPD que contiene extracto de levadura (Y) 1%, peptona de caseína (P) 2% y dextrosa anhidra (D) 2%. El medio de cultivo no fermentable YPEtOH contiene etanol (EtOH) 2% (v/v), en lugar de dextrosa anhidra. En ambos medios se añade 0.6 M ó 1.2 M de cloruro de sodio (NaCl) según se requiera y se cultivan a 28°C con agitación constante por el tiempo deseado. El pre-cultivo se realizó en medio YPD+0.6 M NaCl a 28°C en agitación constante por 72 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugó y lavó dos veces con agua estéril, se resuspende en 1mL de agua e inocula los medios experimentales a $DO_{600nm} = 0.05$.

5.2.- CURVAS DE CRECIMIENTO Y CONTEO CELULAR

Una vez que se inocularon los medios de cultivo experimentales YPD, YPD+0.6 M NaCl, YPD+1.2 M NaCl, YPEtOH, YPEtOH+0.6 M NaCl y YPEtOH 1.2 M NaCl se tomó 1 mL y se midió la D.O. a 600 nm en un espectrofotómetro; a la par se contó el número de células con una cámara de Neubauer. Para ambas técnicas se hicieron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 cuando así se requirió. Se tomaron muestras a las 0, 2, 4, 6, 8 y 10 h, el segundo día se muestreó a las 24, 27, 29 y 31 h, el tercer día se tomaron a las 48, 52, 54 y 57 h y el cuarto día las muestras fueron tomadas a las 74 y 76 h. El tiempo de duplicación se calculó a partir de la pendiente generada en la fase exponencial de crecimiento y el número de células por mililitro (células/mL) a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{CONCENTRACIÓN} = (\# \text{ células} \times 10,000) / (\text{cuadrantes} \times \text{dilución})$$

5.3.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS

Una vez que transcurrió el periodo de crecimiento por el tiempo requerido, los 6 medios experimentales se centrifugaron y lavaron dos veces con agua milliQ; la pastilla de células se disolvió en amortiguador de fosfatos (sodio, Na) 50 mM, pH 7.8, frío. Se transfirió a un tubo de vidrio, se añadieron $\frac{3}{4}$ de volumen de perlas de vidrio de 710-1180 μ , para romper las células agitando en *vortex* por un minuto x un minuto de reposo en hielo, 5 veces. El homogeneizado se centrifugó dos veces a máxima velocidad

en una centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415C para retirar los restos celulares, se colectó el sobrenadante y se mantuvo a 4°C.

5.4.- CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para calcular la concentración de proteínas totales de los extractos crudos, se puso a reaccionar 1 mL de reactivo de Bradford (Quick Start Bradford Protein Assay de BioRad, 5X) en dilución 1X con volúmenes diferentes de extracto crudo (1, 2 y 5 µL) por cinco minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 590 nm. Para construir una curva estándar se usaron concentraciones crecientes de albúmina de suero bovino (BSA: 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 µg de proteína/mL).

5.5.- ACTIVIDAD DE CATALASA

La actividad específica de catalasa se midió por el método reportado por Aebi (1984), con algunas modificaciones. En una celda de cuarzo se colocaron 2.9 mL de amortiguador de actividad de catalasa (NaH₂PO₄ 100 mM, pH7.0, Tritón X-100 al 0.01%), 100 µL de sustrato (H₂O₂ 500 mM) y alícuotas de 1-5 µL del extracto crudo de cada condición. En este método se determina la desaparición del peróxido de hidrógeno por el decaimiento en la absorbancia a 240 nm durante tres minutos. La actividad específica de catalasa se obtiene dividiendo la pendiente por minuto por el factor de dilución por el coeficiente de extinción molar de la catalasa entre el contenido total de proteína en la muestra:

$$AE: [(mmin/\varepsilon/V_{ext}P)/mgP/mL] = \text{mM H}_2\text{O}_2 \text{ oxidado}/\text{min}/\text{mgP}$$

Actividad específica = mmin/ε/mg de proteína
mmin: Pendiente por minuto del decaimiento en la absorbancia a 240nm
ε: Coeficiente de extinción molar: 0.0422 M/cm (Nelson y Kiesow, 1972)
V_{ext}P: Volumen de extracto proteico usado en el ensayo (mL)
mgP: Concentración de proteína por mililitro

5.6.- ACTIVIDAD TOTAL DE SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La actividad de la SOD se midió por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por los aniones superóxido generados en el sistema de la xantina-xantina oxidasa. En tubos de vidrio se colocaron 160 µL de la mezcla de reacción, 10 µL de xantina oxidasa comercial y alícuotas de 1-5 µL de extracto crudo; se agitan en *vortex* por 30 segundos y se dejan reaccionando por 15 minutos. La reacción se detuvo agregando 132 µL de CuCl₂ 0.8 mM y se mide la absorbancia

a 560 nm. Adicionalmente se preparan cuatro tubos con el mismo tratamiento a excepción de la muestra, que sirvieron como blanco. El espectro se calibra a 560 nm con la mezcla de reacción. A partir de los resultados obtenidos se calculan las unidades (U) de enzima por miligramo de proteína (U/mgP).

MEZCLA DE REACCIÓN		
3 mL	Xantina	0.3 mM
1.5 mL	NBT (nitroazul de tetrazolio)	150 µM
1.5 mL	EDTA	0.6 Mn
750 µL	Na ₂ CO ₃	400 mM
450 µL	H ₂ O	

5.7.- ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS (*PAGE, POLYACRILAMIDE GEL ELECTROPHORESIS, Laemmli 1970*)

La electroforesis es una técnica para separar biomoléculas de acuerdo a su carga y peso molecular mediante un soluto iónico y un campo eléctrico.

5.7.1.- GELES EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

En este tipo de geles se empleó SDS para desnaturalizar las proteínas, pues rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior de la muestra, mientras que los grupos sulfato en la superficie. Todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga normal de las cadenas de aminoácidos) (García-Pérez, 2000), de esta manera se pueden separar las cadenas polipeptídicas por su masa molecular.

El gel separador se hizo al 10% y el gel concentrador al 4.5% de acrilamida y bis-acrilamida (N, N'-metilen-bis-acrilamida) el gel concentrador. Se colocaron las muestras de proteína que previamente se incubaron con amortiguador de carga 4 X por cinco minutos a 95°C. Como marcador de peso molecular se usó Kaleidoscope (5 µL) de la marca Bio Rad. La electroforesis se corrió por 90 minutos a 150-200 volts en amortiguador de corrida 1X.

GEL SEPARADOR SDS, 10%	
H ₂ O	4.1 ml
Tris 1.5 M pH 8.8, SDS 0.4%	2.5 mL
Acrilamida 30%- Bis acrilamida	3.33 mL
PSA10%	130 µL
Temed	30 µL

GEL CONCENTRADOR SDS, 4.5%	
H ₂ O	6.1 mL
Tris 0.5 M pH6.8, SDS 0.4%	2.5 mL
Acrilamida 30% - Bis acrilamida	1.33 mL
PSA10%	130 µL
Temed	30 µL

AMORTIGUADOR DE CORRIDA	
Tris	1.5%
Glicina	7.2%
SDS	0.5%

AMORTIGUADOR DE CARGA	
Glicerol	20%
Tris-HCl pH6.8	0.5 M
Azul de bromofenol	0.05%

5.7.2.- TINCIÓN DE GELES EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Los geles desnaturizantes se dejaron en agitación por 10 minutos con 50 mL de azul de Coomassie (ácido acético 10%, metanol 10%, azul de Coomassie G-250 0.1% aforado a 100 mL con agua milli-Q). Transcurrido el tiempo se recuperó la solución anterior y el gel se lavó dos veces con agua corriente; después de los lavados se sumergió en 100 mL de solución desteñidora I (etanol 50%, ácido acético 10%) en agitación por 10 minutos, se retiró la solución anterior y se lavó dos veces con 100 mL de solución desteñidora II (etanol 10%, ácido acético 10%) hasta obtener fondo claro.

5.7.3.- GELES EN CONDICIONES NATIVAS

Los geles nativos se hacen para conservar la estructura nativa de las proteínas, en este caso, de catalasas y superóxido dismutasa. El gel separador fue hecho al 7.5% y el gel concentrador al 4.5%, respectivamente, en cuanto al contenido de acrilamida-bis-acrilamida. Por cada muestra se cargaron 20 µg de proteína con amortiguador de carga 1X y no se calentó. El gel se corrió por 23 horas a 25 volts en amortiguador de corrida 1X.

GEL SEPARADOR 7.5%	
H ₂ O	4.8 mL
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 mL
Acrilamida 30%- Bis acrilamida	2.5 mL
PSA10%	130 µL
Temed	30 µL

GEL CONCENTRADOR 4.5%	
H ₂ O	6.1 mL
Tris 0.5 M pH6.8	2.5 mL
Acrilamida 30%- Bis acrilamida	1.33 mL
PSA10%	130 µL
Temed	30 µL

AMORTIGUADOR DE CORRIDA	
Tris	1.5%
Glicina	7.2%

AMORTIGUADOR DE CARGA 4X	
Glicerol pH 6.8	20%
Tris-HCl	0.5 M
Azul de bromofenol	0.05%
β -mercaptoetanol	5%

5.7.4.- TINCIÓN PARA OBSERVAR ACTIVIDAD DE CATALASA

Para observar la actividad de catalasa, una vez desmontados los geles se lavaron tres veces con agua corriente por un minuto y se incubaron en una solución de H₂O₂ 100 mM por 15 minutos en agitación constante. Posteriormente se lavaron tres veces con agua corriente, el gel se sumergió en una solución 1:1 de ferricianuro de potasio:cloruro férrico (1 g de cada reactivo disuelto en 50 mL de agua por separado y se juntaron justo antes de vaciar) en agitación constante por 15 minutos y se retiró el exceso de colorante con agua.

5.7.5.- TINCIÓN PARA OBSERVAR ACTIVIDAD DE SUPERÓXIDO DISMUTASA

Cuando se desmontaron los geles, se lavaron tres veces con agua corriente. A continuación, se incubaron en una solución de 0.120 μ M de NBT disuelto en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH7.8 a 37°C por cinco minutos en agitación constante. Transcurrido el tiempo se retiró el colorante lavando con agua el gel se incubó por 30 minutos en una solución que contiene riboflavina 0.26 mM y TEMED 0.15 mM disueltos en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8. Para finalizar se lavó una vez con agua y se dejó bajo luz blanca hasta revelar la actividad de SOD.

5.8.- CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS

Se colocó una alícuota de 0.5 mg de proteína en un tubo de polipropileno de 1.5 mL con 100 μ L de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM disuelta en HCl 2 M. Se agitó en *vortex* por 30 s y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se agregaron 30 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 100%. Las muestras (extracto crudo) se colocaron 5 minutos en hielo, se centrifugaron dos minutos a 13,000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5415C, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 500 μ L de acetona fría 100%; esta mezcla se sonicó por 30 s y enfrió 5 minutos a -20°C. Las muestras se centrifugaron dos minutos a 13,000, se retiró el sobrenadante y las pastillas se dejaron secar a temperatura ambiente. Las pastillas se disolvieron en 200 μ L de

guanidina 6 M, se sonicaron e incubaron a 60°C por 30 minutos. Se leyó la absorbancia a 375 nm, en el espectrofotómetro que se calibró con agua MilliQ.

5.9.- OBTENCIÓN DE ESFEROPLASTOS

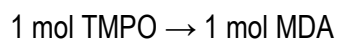
Para la obtención de esferoplastos se usa la metodología implementada por Avéret (1998) y Cabrera-Orefice (2014). A una pastilla de 10^8 células de *D. hansenii* se le agregó 1 mL de amortiguador SH (β -mercaptoetanol 5 M, Tris 1 M, pH 9.3) y se incubó 10 minutos a 30°C, posteriormente se centrifugaron por 5 minutos a 3,000 rpm en una centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces con amortiguador de lavado (KCl 0.5 M y Tris 10 mM, pH 7.0). Las muestras se resuspendieron en 2 mL de amortiguador de digestión (sorbitol 1.35 M, EDTA 1 mM y amortiguador de fosfatos 0.2 M, pH 7.4) y 1.5 μ L de zimoliasa (10 mg/mL) e incubaron por 30 minutos a 30°C. Las muestras se lavaron con amortiguador de protoplastos (1.2 M sorbitol y 10 mM tris-malato, pH6.8) y se resuspendieron en 2 mL de amortiguador de fosfatos (sodio) 50 mM, pH7.8.

5.10.- TBARS (SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO)

Se colocaron 2 mL de esferoplastos en tubos de vidrio y se agregaron 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 30%, se centrifugaron por 15 minutos a 3,000 rpm en una centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415C y se recuperaron los sobrenadantes. A 1.5 mL de cada sobrenadante se le añadió 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.67%, esta mezcla se hirvió por 20 minutos a 100°C. Los tubos se enfriaron inmediatamente en hielo y se leyó la absorbancia a 535 nm. El espectrofotómetro se calibró con agua MilliQ.

5.10.1.- CURVA ESTÁNDAR DE MDA

Para la construcción de la curva estándar se utilizó 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMPO), ya que este compuesto al someterse a hidrólisis ácida produce malondialdehído, producto que se mide en la peroxidación lipídica. La estequiometría de esta reacción es:



Se preparó una solución solución "A" con 0.01 g de TMPO disuelto en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.4. Se tomó una alícuota de 10 μ L de la solución "A" y se preparó una solución "B" con 0.121 mg de TMPO en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.4. De la solución "B" se tomaron cantidades

crecientes de 0 a 320 μL (0, 10, 20, 40, 80, 160, 240 y 320 μL), se aforaron a 1 mL con amortiguador de fosfatos 20 mM, pH7.4, se agregó 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 30% e incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Tras lo cual se tomó una alícuota de 750 μL y se adicionaron 500 μL de TBA al 0.67%; se hirvieron por 20 minutos, se enfriaron rápidamente y se leyó la absorbancia a 535 nm. El espectrofotómetro se calibró con agua MilliQ.

5.11.- SELECCIÓN DE GENES CONSTITUTIVOS A EVALUAR MEDIANTE RT-qPCR

Como se mencionó en los antecedentes, el gen que inicialmente se eligió como constitutivo (*DhrRNA26S*) variaba considerablemente su expresión de una condición a otra. Por esta razón se buscaron genes que se expresaran de manera constitutiva. En este trabajo se tomaron como referencia estudios sobre genoma mínimo, realizando una búsqueda exhaustiva sobre genes indispensables para la supervivencia de las células y que no modificaran su comportamiento o lo hicieran mínimamente, bajo diversas condiciones como cambios en pH, salinidad, disponibilidad de oxígeno, etc.

Los genes elegidos como posibles constitutivos fueron:

- **Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa:** Esta enzima es la primera de la vía de la biosíntesis de la fosfatidiletanolamina (PE), lípido que forma parte fundamental de la membrana plasmática en *D. hansenii* y no cambia su proporción de contenido en la membrana en un rango de pH de 4 a 6 (Turk, et al. 2007; Mendinger y Devine, 1965).
- **Proteína S3 de la subunidad 40S ribosomal:** En estudios en organismos dípteros como *Aedes aegypti* ha sido utilizado como gen de referencia y se demostró su estabilidad. Debido a que *D. hansenii* y *A. aegypti* pertenecen al mismo dominio se realizó la búsqueda de este gen en su genoma para hacer las pruebas pertinentes (Bedoya-Pérez, et al. 2013).
- **Subunidad grande de la enzima ribonucleótido reductasa (RNR):** Esta enzima es necesaria para mantener reservas suficientes de dNTP's (bases púricas o pirimidínicas) para la síntesis de DNA (Herrero, et al. 2008; Korch, et al. 1974; Burns, 1964).

- **Subunidad ribosomal 26S (*DhrRNA26S*):** En experimentos anteriores se usó las subunidades ribosomales (26S y 18S en eucariontes) como controles constitutivos, pues se pensó que su expresión se mantenía constante a lo largo del crecimiento del cultivo.

GENES DE PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES A EVALUAR *Dhcta*, *Dhctt* y *Dhsod*

Los genes cuya expresión fue evaluada son:

- ***Dhcta*:** Gen de la catalasa A, peroxisómica.
- ***Dhctt*:** Gen de la catalasa T, citoplásmica.
- ***Dhsod*:** Gen de la superóxido dismutasa de Cu-Zn.

5.11.1.- DISEÑO DE OLIGODESOXILIGONUCLEÓTIDOS

Con el uso de herramientas bioinformáticas disponibles en línea, se diseñaron 7 pares de desoxioligonucleótidos (cuatro genes constitutivos y tres a evaluar, *Dhcta*, *Dhctt* y *Dhsod1*). Se identificaron las regiones conservadas y variables en los genes y se confirmó que los desoxioligonucleótidos fueran inter e intraespecíficos, usando bases de datos como la de GÉNOLEVURES, NCBI, BioSyc, Kegg, SGD, entre otras.

5.12.- EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE *D. hansenii*

A un tubo de polipropileno de 2 mL que contiene una pastilla de células de *D. hansenii* provenientes de un cultivo de 24 h, se le adicionaron 200 µL de solución de lisis, 200 µL de PCI y $\frac{3}{4}$ partes de perlas de vidrio de 710-1180 µ. Se agitó un minuto en *vortex* y se colocó en hielo, repitiendo cinco veces. Al homogeneizado se le añadieron 200 µL de amortiguador TE y se centrifugó, recuperando la fase acuosa. A continuación, se mezcló por inversión con 1 mL de EtOH 100%, se centrifugó, retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en H₂O. La muestra se incubó cinco minutos a 57°C con RNAsa 10 mg/mL. Posteriormente se precipitó agregando acetato de amonio 4 M y etanol 100%. Después de centrifugar, la pastilla se lavó una vez con etanol 70%, dos veces con PCI y una vez con Cl. Se le agregó 1/10 de volumen de NaOAc 3 M (pH 5.2) y dos volúmenes de EtOH 100% y la mezcla se dejó por 30 minutos a -70°C. Al finalizar el tiempo de congelación la muestra se centrifugó, se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas.

SOLUCIÓN DE LISIS	
NaCl pH 8.0	100 mM
Tris-HCl	10 mM
Na ₂ EDTA 1 mM	1 mM
Tritón X-100	2%
SDS	1%

CI cloroformo: alcohol-isoamílico 24:1

PCI fenol: cloroformo: alcohol-isoamílico

TE pH 8.0	
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

5.12.1.- AMPLIFICACIÓN CON DESOXIOLIGONUCLEÓTIDOS EN DNA GENÓMICO

DE *D. hansenii*

La prueba de amplificación de cada gen se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L; 1 μ L de desoxioligonucleótido hacia delante (sentido) 200 nM, 1 μ L de desoxioligonucleótido de reversa (antisentido) 200 nM, 2 μ L de dNTPs 10 mM, 5 μ L de amortiguador de reacción 10X, 2.5 μ L de amortiguador MgCl 2.5 mM, 0.5 μ L de DNA polimerasa, 1 μ L de DNA genómico y 37 μ L de H₂O libre de nucleasas. El programa utilizado para la prueba de amplificación fue el siguiente:

1. 5 minutos a 94°C
 2. 1 minuto a 94°C
 3. 1 minuto a 55°C
 4. 1 minuto a 72°C
 5. 1 minuto a 94°C
 6. 1 minuto a 58°C
 7. 1 minuto a 72°C
 8. 10 minutos a 72°C
 9. 8°C -∞
- } 5 ciclos
- } 30 ciclos

5.13.- EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Para la extracción de RNA se siguió la metodología de Schmitt (1990), modificada por Calderón (2006). A partir de un pre-cultivo se inocularon los seis medios experimentales (YPD, YPD+0.6 M NaCl, YPD+1.2 M NaCl, YPEtOH, YPEtOH+0.6 M NaCl y YPEtOH 1.2 M NaCl) con la levadura *D. hansenii* a una DO_{600nm} = 0.05 y se dejaron crecer durante 72 h. Transcurrido el tiempo de crecimiento los seis medios se centrifugaron a 3,000 RPM en una centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415C, se descartó el

sobrenadante. Las pastillas de células se lavaron y resuspendieron en amortiguador AE a 4°C con 5 µL de dietil pirocarbonato (DEPC), se agitaron en *vortex* por unos segundos, la suspensión se transfirió a un microtubo de 2 mL que contenía ¾ de perlas de vidrio de 710-1180 µ, 450 µL de fenol ácido y 40 µL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% y se incubó por 10 minutos a 65°C. Cada 5 minutos los microtubos se agitaron por 30 s. Al terminar de incubar las muestras se enfriaron a -70°C por 5 minutos, se centrifugó recuperando la fase acuosa, se lavó dos veces con 500 µL de fenol:cloroformo:isoamílico (PCI), se precipitó con 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 100% y se dejó a -70°C por 30 minutos. Una vez que las muestras se sacaron de congelación, se centrifugaron, la pastilla se lavó con etanol 75%, se dejó secar y se resuspendió en H₂O-DEPC. Las muestras se guardaron a una temperatura de -70°C hasta su uso.

AMORTIGUADOR AE	
CH ₃ COONa	50 mM
EDTA	10 mM

5.14.- CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL

La pureza y el contenido de RNA (ng/µL) se determinó mediante el uso de un nanospectrofotómetro, leyendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm. El cociente DO_{260}/DO_{280} con valor de 2.0 indica una calidad de RNA óptima, valores inferiores a 2.0 (>1.95) indican presencia de DNA, proteínas, fenol u otros compuestos orgánicos. El cociente de DO_{260}/DO_{230} con valores superiores a 2.0-2.2 indican presencia de contaminantes como trizol, EDTA o carbohidratos.

5.15.- DIGESTIÓN DE DNA GENÓMICO

Con el fin de tener amplificaciones específicas en los ensayos de qPCR, se eliminó el DNA genómico que pudieran contener las muestras mediante el uso de la DNasa, RQ1 RNase-Free DNase de Promega Products. Por cada 1 ug de RNA en las muestras se adicionó 1 U de RQ1 RNase-Free DNase de Promega Product y 1 µL de RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Amortiguador; la mezcla se incubó a 37°C por 30 minutos. Para detener la digestión se adicionó 1 µL de RQ1 DNase Stop Buffer por cada unidad de enzima y se calentó durante 10 minutos a 65°C. Concluida la digestión, las muestras se observaron en una electroforesis desnaturalizante, cuantificaron, alicuotaron y guardaron a -20°C hasta su uso.

5.16.- ELECTROFORESIS DE RNA

La técnica de electroforesis en condiciones desnaturizantes permite visualizar la integridad del mRNA. Se preparó un gel de agarosa al 1% con formaldehído 2.4% en MAE 1X y amortiguador de corrida (formaldehído 3% en MAE 1X). En un microtubo se colocaron 5 µg de RNA total con amortiguador de carga 1.25 X y GelRed, se incubaron 15 minutos a 56°C y se cargaron en el gel. La electroforesis se corrió por una hora a 112 volts.

MAE 10X	
MOPS	200 Mm
Acetato de sodio	50 Mm
EDTA	10 Mm
Ajustar pH 7.0, esterilizar por filtración y guardar en frasco ámbar a 4°C.	

AMORTIGUADOR DE CARGA 1.25X	
Formamida	2.2 mL
Formaldehído	800 µL
MAE 10X	500 µL
Glicerol	400 µL
Azul de bromofenol	100 µL
Guardar a -20°C	

5.17.- ENSAYOS DE RT-qPCR

Los experimentos de RT-qPCR se llevaron a cabo en un volumen de 10 µL; con 50 ng de RNA, 30 nM de desoxioligonucleótidos 200 nM, 5 µL de Master Mix, 0.125 µL de enzima RT y volumen variable de H₂O, acoplado al kit ONE STEP de Qiagen, el cual usa como fluorocromo al SybrGreen. El equipo empleado para realizar este experimento fue el Rotor Q de Qiagen y se utilizó el siguiente programa:

- 1.- 10 minutos a 55°C para retrotranscribir el RNA
 - 2.- 7 minutos a 95°C para inactivar a la retrotranscriptasa y activar a la polimerasa
 - 3.- 10 s a 95°C para desnaturizar el DNA complementario
 - 4.- 20 sa 58°C para alineamiento de desoxioligonucleótidos
- } 40 ciclos
- 5.- Análisis de disociación del amplicón (T_m) en un rango de temperatura de 60°C – 95°C aumentando 1°C cada s.

5.17.1.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y VALIDACIÓN DE GENES DE REFERENCIA

Los análisis sobre la estabilidad y variación en los niveles de expresión de los genes de referencia fueron realizados con el programa NormFinder. También se realizó un análisis estadístico de forma manual.

5.17.2.- CUANTIFICACIÓN

La cuantificación en RT-qPCR que se realizó fue relativa, el cambio en los niveles de expresión de RNA interpretado como DNA complementario 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 (mRNA) ya que puede afectar la eficiencia de la reacción.

El método de la $2^{-\Delta\Delta C_t}$ asume una eficiencia de reacción del 100% tanto para el gen en estudio como para el gen de referencia. Este modelo expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores C_t de la muestra y los valores C_t del control tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$r = 2^{-[\Delta CP_{muestra} - \Delta CP_{control}]}$$

$$r = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

6.- RESULTADOS

6.1.- CURVAS DE CRECIMIENTO Y CONTEO CELULAR

Para conocer el número de células de *D. hansenii* que se inoculan a una $DO_{600nm} = 0.05$, se realizaron conteos celulares de esta densidad en la cámara de Neubauer (Figura 14). Esta técnica es poco precisa, por lo cual es recomendable que el número mínimo de células sea 10^6 , por debajo de los 2.5×10^5 la cantidad de células no es suficiente para una estimación confiable y por encima de 2.5×10^6 la probabilidad de cometer errores en el conteo es muy alta.

Tras contabilizar los medios de cultivo de *D. hansenii*, se encontró que el número de células que se inoculan en promedio son 3×10^6 .

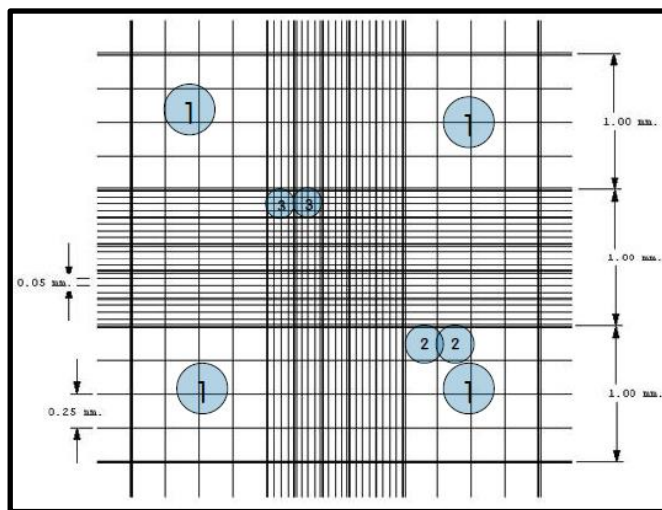


Figura 14. Cámara de Neubauer. El conteo de células se realizó colocando una muestra de 10 μ L, se esperó a que la muestra se distribuyera uniformemente por toda la cámara y se procedió a leer los cuatro cuadrantes con la cuadrícula más grande (los extremos). Finalmente, mediante la siguiente fórmula se obtuvo el número de células por mililitro.
 $CONCENTRACIÓN = (\# \text{ células} \times 10,000) / (\text{cuadrantes} \times \text{dilución})$

El tiempo de duplicación es el tiempo que le toma a las células dividirse durante el crecimiento exponencial. Para tener una aproximación de este valor se realizaron curvas de crecimiento en las seis condiciones experimentales, midiendo el incremento en la absorbancia a 600nm vs tiempo en horas. Se tomaron muestras durante períodos de dos y cuatro horas a lo largo de tres y cuatro días y se midió la absorbancia, diluyendo de ser necesario. La gráfica resultante se muestra en la figura 15;

en la cual se observa la fase de adaptación (lag) de las células en el medio, la fase exponencial o de crecimiento y la fase estacionaria, en dónde las células ya no se dividen aunque están metabólicamente activas.

A partir de los datos de absorbancia vs tiempo se calculó la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación en minutos (Tabla 3) mediante un método manual y con el programa bioinformático <http://www.endmemo.com>.

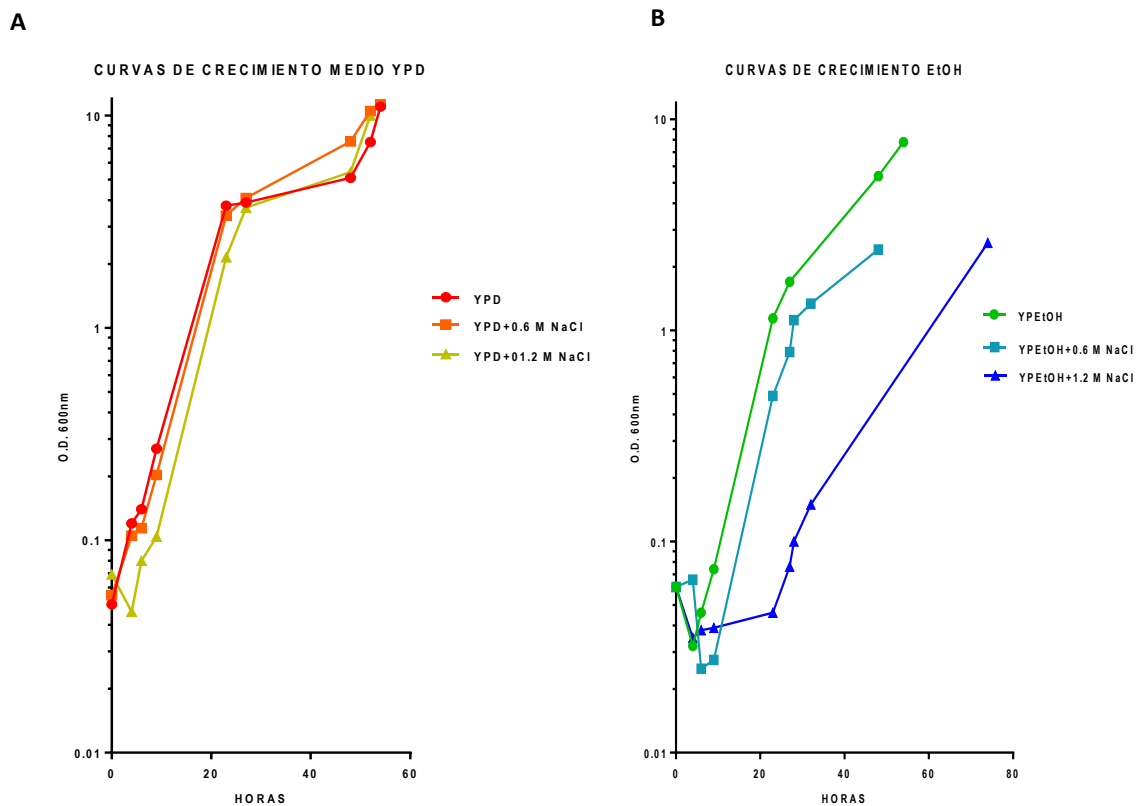


Figura 15. Curvas de crecimiento. En A se muestran las curvas de los medios con glucosa y en B los medios con etanol como única fuente de carbono. Se observa que en YPD, a mayor contenido de NaCl el cultivo crece más lento; en el caso de etanol, la pendiente de la curva es más suave que en glucosa sin sal. A medida que se incrementa la concentración de NaCl se incrementa mucho la pendiente de la curva. En la parte de abajo se muestra el tiempo de duplicación.

Tabla 3. Tiempo de duplicación de *Debaryomyces hansenii*.

MEDIO	TIEMPO DE DUPLICACIÓN (MINUTOS)	MEDIO	TIEMPO DE DUPLICACIÓN (MINUTOS)
YPD	221	YPEtOH	268
YPD+0.6 M NaCl	232	YPEtOH+0.6 M NaCl	306
YPD+1.2 M NaCl	248	YPEtOH+1.2 M NaCl	763

El tiempo de duplicación de la levadura en cada condición de crecimiento (YPD, YPD+0.6M NaCl, YPD+1.2M NaCl, YPEtOH, YPEtOH+0.6M NaCl y YPEtOH 1.2M NaCl) se calculó a partir de los datos de absorbancia de la curva de crecimiento.

Debido a la versatilidad metabólica y a los escasos estudios reportados acerca de *D. hansenii*, no se tiene claro cuáles son las condiciones que la llevan a un estado de estrés, Determinar las actividades enzimáticas antioxidantes (catalasa y superóxido dismutasa) ayudará a esclarecer las condiciones que tienen un efecto nocivo para *D. hansenii*.

6.2.- ACTIVIDAD DE SUPERÓXIDO DISMUTASA

Las enzimas antioxidantes son aquellas cuya función principal es catalizar reacciones que conviertan a las especies reactivas, en moléculas menos tóxicas o completamente inocuas. En este trabajo se estudió a la superóxido dismutasa (SOD) y a las catalasas A y T.

La actividad de superóxido dismutasa se mide a partir de un sistema en el que la enzima xantina oxidasa genera anión superóxido que oxida al nitro azul de tetrazolio (NBT), produciendo un compuesto de color morado-azul. Cuando los extractos crudos son agregados a la mezcla de reacción, la presencia de superóxido dismutasa inhibe la oxidación del NBT evitando que se produzca la coloración morada-azul. Para poder calcular las unidades de enzima SOD en las muestras, es necesario construir una curva estándar de máxima y nula autooxidación de NBT. Esta curva es medida a 560nm, se usan cuatro blancos para eliminar errores y ajustar las lecturas (Figura 16).

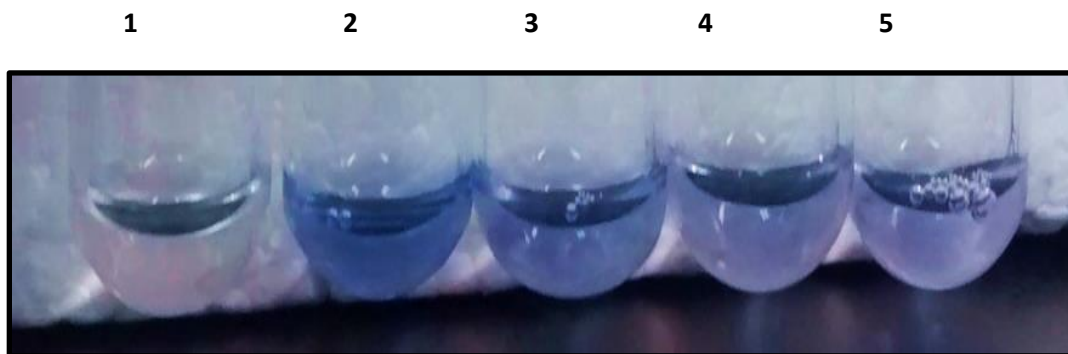


Figura 16. Muestras estándar de oxidación de NBT en el sistema de xantina-xantina oxidasa. Concentraciones decrecientes de xantina-xantina oxidasa para la generación de anión superóxido. Tubo 1, sin enzima; tubo 2, 0.005 U de xantina oxidasa; tubo 3, 0.00375 U; tubo 4, 0.0025 U; y tubo 5, 0.00125 U.

Se realizaron cinco determinaciones, cada una por triplicado de la actividad enzimática total de superóxido dismutasa. En la tabla 4 se muestra la media y la desviación estándar de los datos obtenidos.

Tabla 4. Actividad total de superóxido dismutasa.

MEDIO	YPD	YPD+0.6 M NaCl	YPD+1.2M NaCl	N
PROMEDIO (U de superóxido dismutasa/mg de proteína)	38.56	36.89	28.04	5
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	±5.10	±5.24	±7.78	5

MEDIO	YPEtOH	YPEtOH+0.6 M NaCl	YPEtOH+1.2M NaCl	N
PROMEDIO (U de superóxido dismutasa/mg de proteína)	53.47	50.43	101.97	5
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	±23.56	±6.54	±10.02	5

La actividad de SOD se expresa en unidades de superóxido dismutasa por miligramo de proteína (U SOD/mg de proteína). Para conocer si la actividad de superóxido dismutasa difiere en una condición con respecto a las otras cinco, se realizó una prueba de ANOVA. Esta es una prueba no paramétrica que compara las medias de dos o más condiciones para saber si son estadísticamente diferentes, la gráfica se muestra en la figura 17.

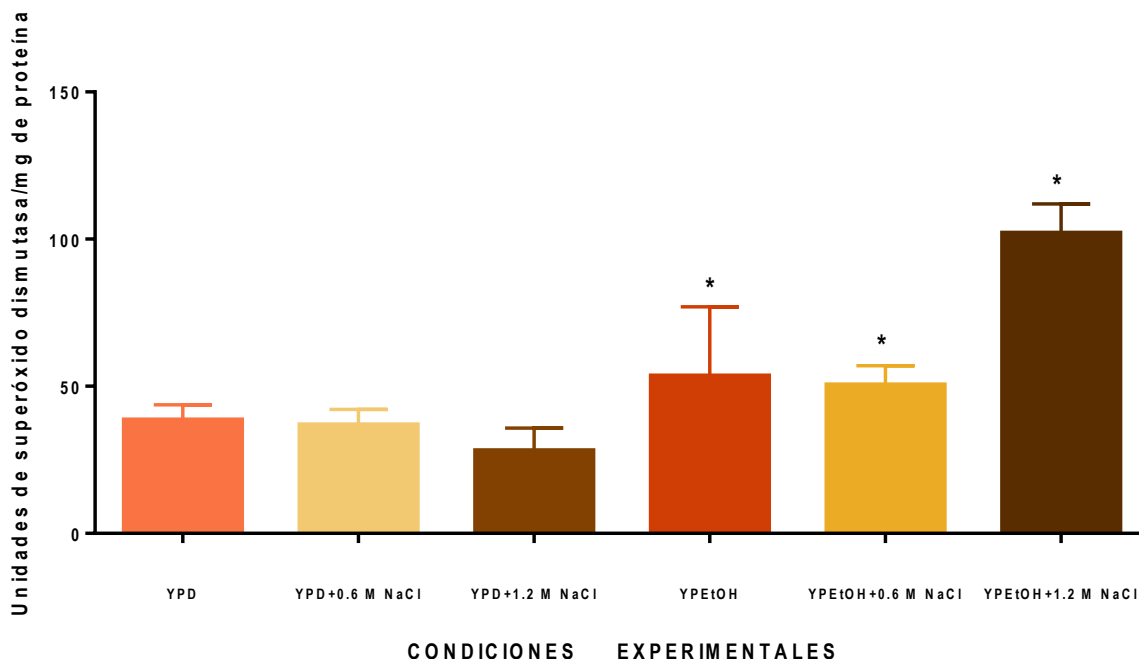


Figura 17. Actividad total de superóxido dismutasa de *D. hansenii*. La actividad fue medida en extractos crudos provenientes de cultivos de 72 horas en los medios que se indican. Se realizó una prueba de ANOVA, la diferencia significativa estadísticamente se indica con un asterisco.

* $p < 0.001$

El resultado de la prueba de ANOVA indica que en una misma fuente carbono, las diferentes concentraciones de NaCl no generan diferencia en la actividad de superóxido dismutasa. El uso de etanol genera aumento de actividad de la enzima con respecto a la actividad medida en glucosa, esto es estadísticamente significativo. Si se realiza una comparación entre las dos condiciones, diferente fuente de carbono y una misma concentración de sal, diferencia significativa estadísticamente, esta se indica con un asterisco en la figura 17.

6.3.- ACTIVIDAD DE CATALASA

La primera enzima en participar en la detoxificación de ROS es la superóxido dismutasa, el producto que ésta genera es peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es utilizado por la catalasa como sustrato para dismutarlo en un productos totalmente inocuos, O_2 y H_2O . En la tabla 5 se muestran los datos de media y desviación estándar de la actividad específica de catalasa de cuatro experimentos realizados por triplicado en las 6 condiciones de cultivo de *D. hansenii*.

Tabla 5. Actividad total de catalasa.

MEDIO	YPD	YPD+0.6 M NaCl	YPD+1.2M NaCl	N
PROMEDIO (nM de H ₂ O ₂ oxidado/min/mg de proteína)	474.84	438.42	465.40	4
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	±24.8	±49.3	±15.7	4

MEDIO	YPeTO	YPeTOH+0.6 M NaCl	YPeTOH+1.2 M NaCl	N
PROMEDIO (nM de H ₂ O ₂ oxidado/min/mg de proteína)	3557.44	1586.10	2200.99	4
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	±227.1	±118.5	±201.6	4

A los datos de actividad de catalasa se les aplicó la prueba de ANOVA. Esta prueba arrojó al usar etanol la actividad de catalasa aumenta con respecto a glucosa, este aumento se disipa al agregar NaCl. La gráfica y el resultado de la prueba estadística se muestran en la figura 18.

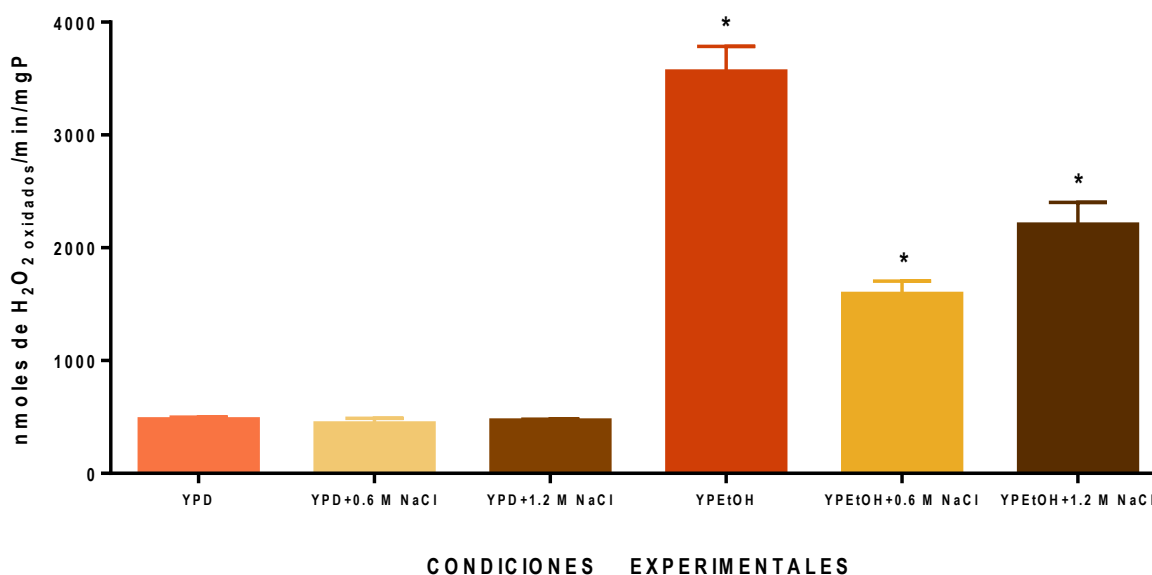


Figura 18. Actividad total de catalasa de *D. hansenii*. Actividad medida en extractos crudos provenientes de cultivos de 72 horas en los medios de cultivo indicados. Se realizó una prueba de ANOVA, la diferencia significativa estadísticamente se indica con un asterisco.

* p < 0.001

6.4.- ZIMOGRAMAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Los zimogramas constituyen una técnica electroforética para observar actividades enzimáticas, para lo cual se utilizan tinciones que implican la formación de dos regiones, una coloreada y otra no coloreada. La tinción puede ser sobre la zona de actividad o sobre el resto del gel; por lo general la actividad se visualiza como bandas:

Tinción positiva: se tiñen las bandas

Tinción negativa: se tiñe el gel

6.4.1.- ZIMOGRAMA DE SUPERÓXIDO DISMUTASA

Para poder observar en un gel las distintas isoformas de la superóxido dismutasa en *D. hansenii*, se corrió una electroforesis nativa de proteínas en donde se creó un sistema generador de anión superóxido. Esto se logra oxidando riboflavina por la acción de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina). La tinción del gel ocurre por la oxidación de nitro azul de tetrazolio (NBT) cuando es expuesto a luz blanca.

Este tipo de zimogramas son de tinción negativa. A partir de extractos crudos se cargaron 20 µg de proteína de cada condición experimental. En la tinción del gel se observan dos bandas idénticas con actividad de superóxido dismutasa en las seis condiciones experimentales (Figura 19).

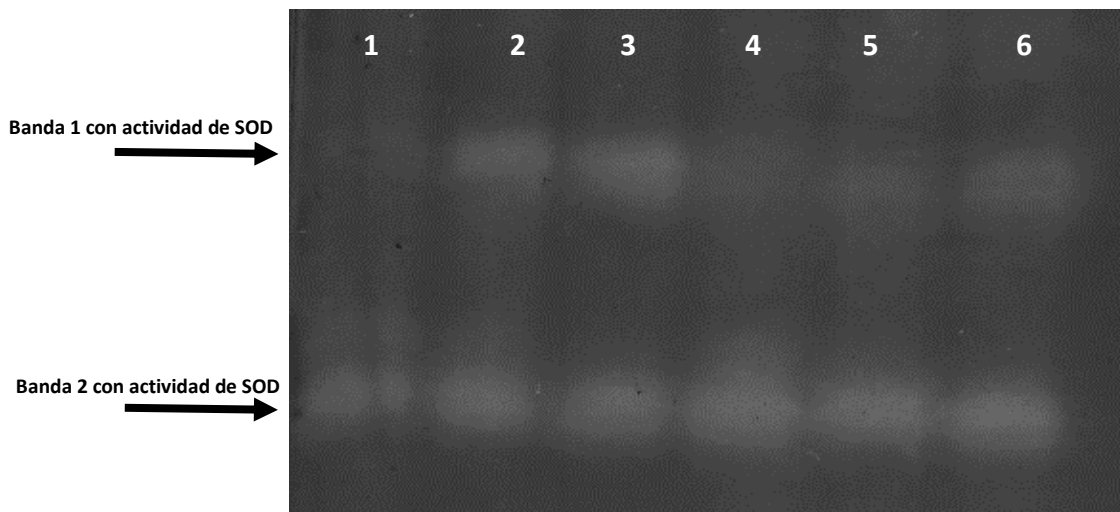


Figura 19. Zimograma de actividad de SOD. Carril 1 YPD; carril 2, YPD+0.6 M NaCl; carril 3, YPD+1.2 M NaCl; carril 4, YPEtOH; carril 5, YPEtOH+0.6 M NaCl; y carril 6, YPEtOH+1.2 M NaCl.

6.4.2.- ZIMOGRAMA DE CATALASA

Esta tinción es negativa; en este caso, se busca hacer reaccionar una solución de peróxido de hidrógeno con la banda en donde migró la catalasa. El gel se tiñe el gel utilizando una solución de ferricianuro de potasio y cloruro férrico (1:1); de esta forma, en la zona en que se encuentra la actividad de catalasa no se lleva a cabo la tinción.

En este zimograma se cargaron 20 µg de proteína de cada condición experimental y una muestra de catalasa comercial de bovino como referencia. La electroforesis se corrió y se realizó la tinción para el zimograma. En todas las condiciones se observó actividad de catalasa A. A diferencia de los resultados obtenidos por Segal-Kischinevzky (2011), en donde sólo se observó catalasa T en medio YPD durante la fase estacionaria de crecimiento. En este experimento se observó catalasa T en las tres condiciones de etanol en fase estacionaria de crecimiento (figura 20).

Cabe recordar que en los zimogramas de Segal-Kischinevzky, la catalasa A se aprecia muy abundante en la condición de etanol. En este caso no ocurre igual; probablemente esto se debe a que es una técnica cualitativa y no cuantitativa y en el laboratorio se han obtenido resultados variables.

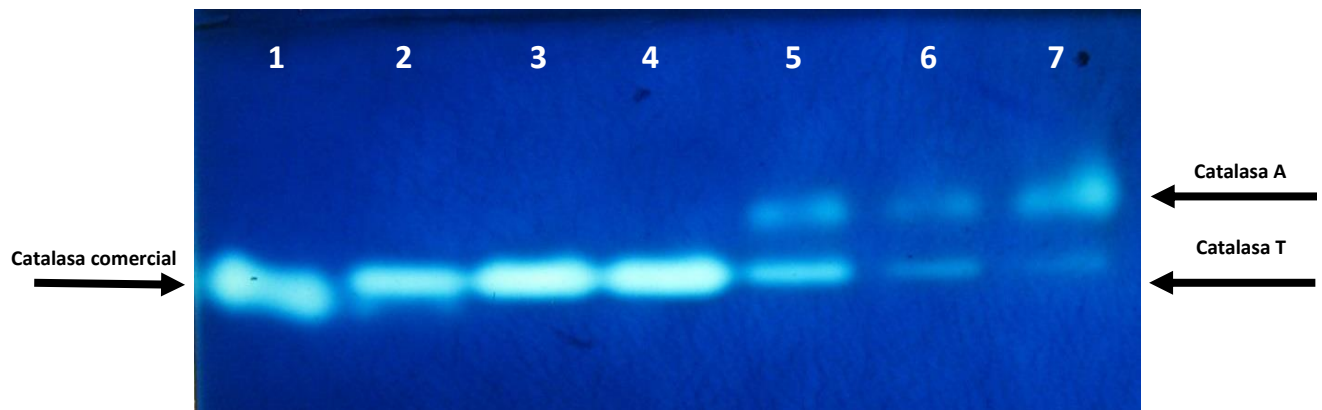


Figura 20. Zimograma de actividad de catalasa. Carril 1, catalasa comercial; carril 2, YPD; carril 3, YPD+ 0.6 M NaCl; carril 4, YPD+ 1.2 M NaCl; carril 5, YPEtOH; carril 6, YPEtOH+ 0.6 M NaCl; y carril 7, YPEtOH+ 1.2 M NaCl.

6.5.- CONTENIDO DE GRUPOS CARBONILO

Los grupos carbonilos (C=O, cetonas y aldehídos) son el producto final de reacciones oxidantes entre especies reactivas del oxígeno y proteínas. Se producen por el rompimiento de enlaces peptídicos y

por interacción proteína-lipoperóxido. La reactividad de los grupos carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) forma un complejo proteína-hidrazona que ayuda a evidenciar el estado de estrés oxidante.

Se utilizaron 5 mg de proteína de las seis condiciones experimentales y como referencia se utilizó extracto crudo de hígado de pollo. Las muestras se hicieron reaccionar con 2,4-dinitrofenilhidrazina para obtener un precipitado que se disolvió en guanidina, complejo que fue medido espectrofotométricamente a 375 nm. El contenido de carbonilos se reporta en nanomoles de grupos carbonilo por miligramo de proteína (nMC/mg de proteína). El experimento se realizó cinco veces, cada ensayo se hizo con tres repeticiones. En la tabla 6 se encuentran los datos con el promedio del contenido de grupos carbonilo y la desviación estándar para cada medio de cultivo.

Tabla 6. Contenido de grupos carbonilo.

CULTIVO	YPD	YPD+0.6 M NaCl	YPD+1.2 M NaCl	N
PROMEDIO (nMC/mg de proteína)	13.27	16.15	23.08	5
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	±0.99	±3.31	±3.28	5

CULTIVO	YPeOH	YPeOH+0.6 M NaCl	YPeOH+1.2 M NaCl	N
PROMEDIO (nMC/mg de proteína)	24.92	38.27	38.26	5
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	±7.42	±15.71	±19.59	5

Los resultados de esta prueba mostraron que la concentración de grupos carbonilos se presenta de manera ascendente en dos casos; el primero es por la concentración de sal y el segundo por la presencia de etanol. Con los datos de la tabla 6 se aplicó una prueba de ANOVA, encontrando que la proteína proveniente de los medios cultivados con etanol como fuente de carbono presentan mayor concentración de carbonilos y esto tiene diferencias significativa estadísticamente. En el caso de la concentración de sal, ocurre lo mismo que con las actividades enzimáticas: en una misma fuente de carbono no es significativa pero sí lo es entre concentraciones correspondientes en la otra fuente de carbono (Figura 21).

Se debe resaltar el hecho de que los grupos carbonilo no solo son producto de las ROS, también lo son de la interacción con metabolitos generados durante la lipoperoxidación lipídica. Por ello puede

haber una correlación en el contenido de este metabolito y el de MDA, que es medido mediante la técnica de TBARS.

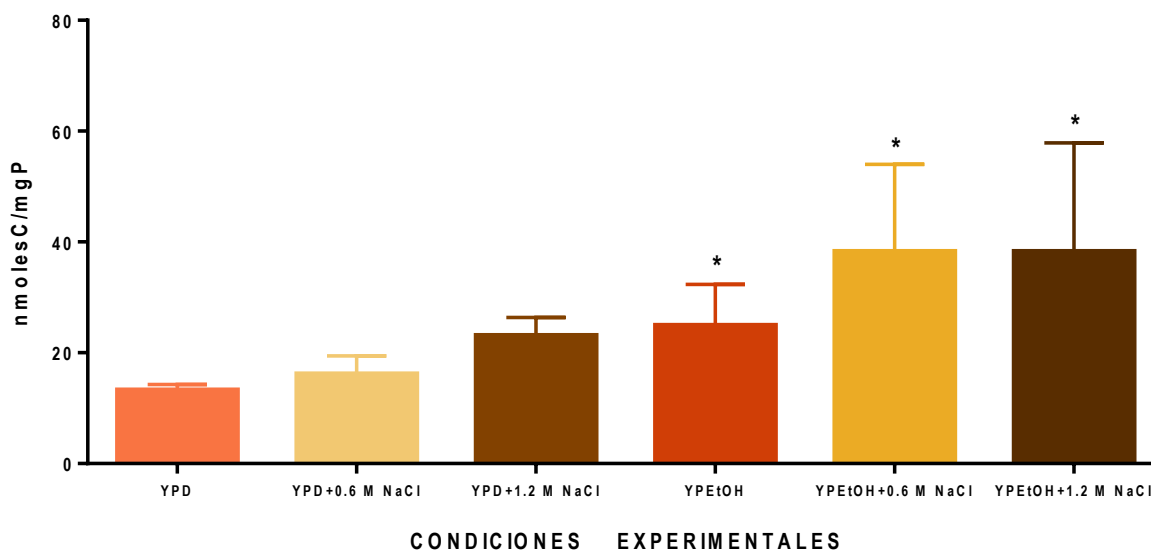


Figura 21. Contenido de grupos carbonilo en cada una de las condiciones experimentales. Prueba de ANOVA, la diferencia significativa estadísticamente se indica con un asterisco.
* $p < 0.001$

6.6.- LIPOPEROXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE MEMBRANA PLASMÁTICA: CONTENIDO DE MALONDIALDEHÍDO (MDA)

La oxidación de los ácidos grasos provoca que se originen isoprostanos, aldehídos y alcanos. Mediante la técnica de TBARS (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico, por sus siglas en inglés) es posible medir el contenido de malondialdehído (MDA), que en presencia de ácido tiobarbitúrico (TBA), pH bajo y alta temperatura forman un cromógeno que se mide a 535 nm. La estequiometría de esta reacción es de 1 mol de MDA que reacciona con 2 moles de TBA (Figura 22).

En la figura 23 se muestra la curva estándar, que se construyó con concentraciones crecientes de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMPO).

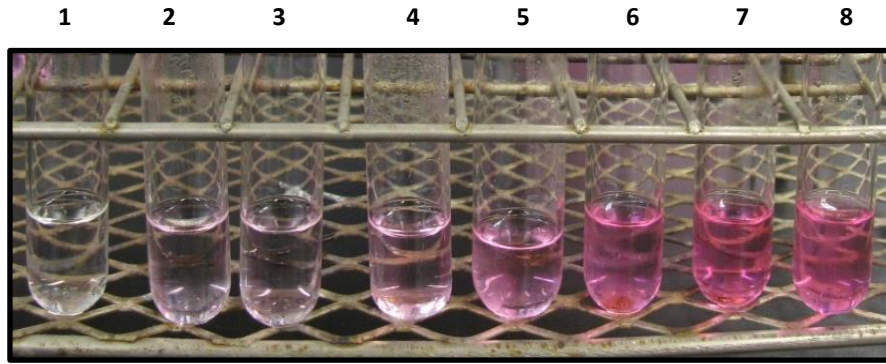


Figura 22. Cromógenos de curva estándar de MDA con TMPO. En el tubo 1 hay una concentración de 0 nmoles MDA, en el tubo 2 hay 0.73 nmoles, tubo 3 con 1.47 nmoles, tubo 4 con 2.95 nmoles, tubo 5 con 5.9 nmoles, tubo 6 tiene 11.81 nmoles y tubo 7 con 17.72 nmoles.

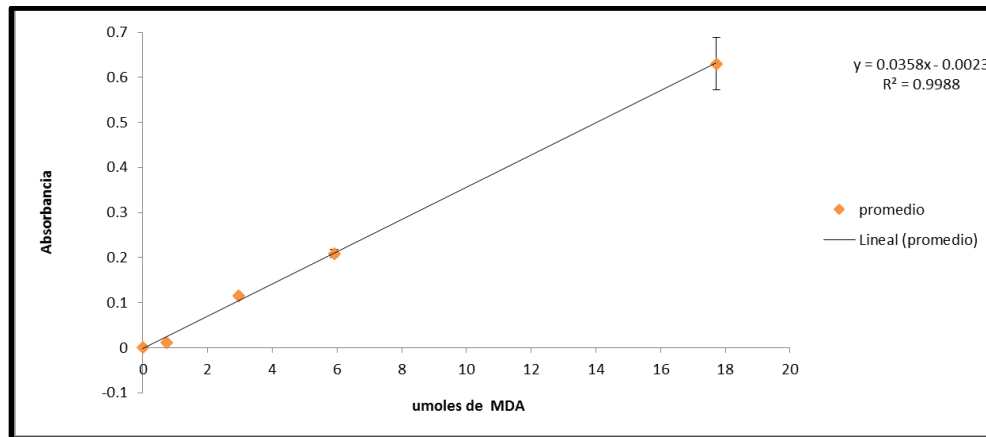


Figura 23. Curva estándar de TMPO para determinación de TBARS. La gráfica se construyó con la media de los valores obtenidos, se muestra la desviación estándar, así como la R^2 y la ecuación de la recta.

Las levaduras además de tener membrana plasmática, poseen pared celular. Dicha pared no permite el libre paso de sustancias hacia la célula, por ello fue necesario digerirla mediante el uso de la enzima zimoliasa. A las células sin pared se les conoce como esferoplastos (Figura 24). Para medir la concentración de MDA se utilizaron 10^8 esferoplastos (100,000,000) provenientes de cada condición experimental. El contenido de MDA se expresa en nanomoles de MDA por 10^8 células.

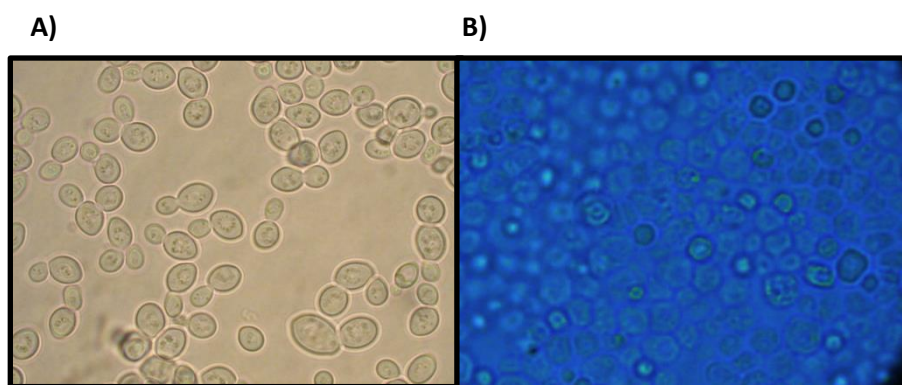


Figura 24. Fotografía de células y esferoplastos de *D. hansenii*. En la imagen A se muestran las células intactas de *D. hansenii*, en la B se observan las células sin pared celular, es decir, esferoplastos. Estos pierden la forma ovalada que caracteriza a las levaduras

El número de veces que se repitió este ensayo fue de tres; en cada ensayo las seis muestras se hicieron por triplicado para evitar errores. Los datos del contenido de MDA por muestra se exhiben en la tabla 7:

Tabla 7. Contenido total de MDA.

CULTIVO	YPD	YPD+0.6 M NaCl	YPD+1.2 M NaCl	N
PROMEDIO (nmolMDA/10 ⁸ cél.)	0.018	0.0173	0.016	3
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	±0.003	±0.001	±0.001	3

CULTIVO	YPEtOH	YPEtOH+0.6 M NaCl	YPEtOH+1.2 M NaCl	N
PROMEDIO (nmolMDA/10 ⁸ cél.)	0.010	0.0104	0.0085	3
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	±0.0006	±0.0002	±0.0008	3

En los resultados de esta prueba se obtuvo que el mayor contenido de MDA ocurre en los medios con glucosa como fuente de carbono, de manera opuesta a los resultados de actividad y concentración de carbonilos mostrados en este estudio. En el medio YPD se presenta el nivel más elevado de MDA, conforme aumenta la concentración de sal el contenido de MDA disminuye. Las muestras que provienen de medios con etanol tienen el mismo comportamiento, mayor concentración de sal, menor contenido de MDA. En este caso, al aplicarle la prueba de ANOVA se corroboró que la diferencia significativa estadísticamente la tienen los cultivos con etanol como fuente de carbono (Figura 25).

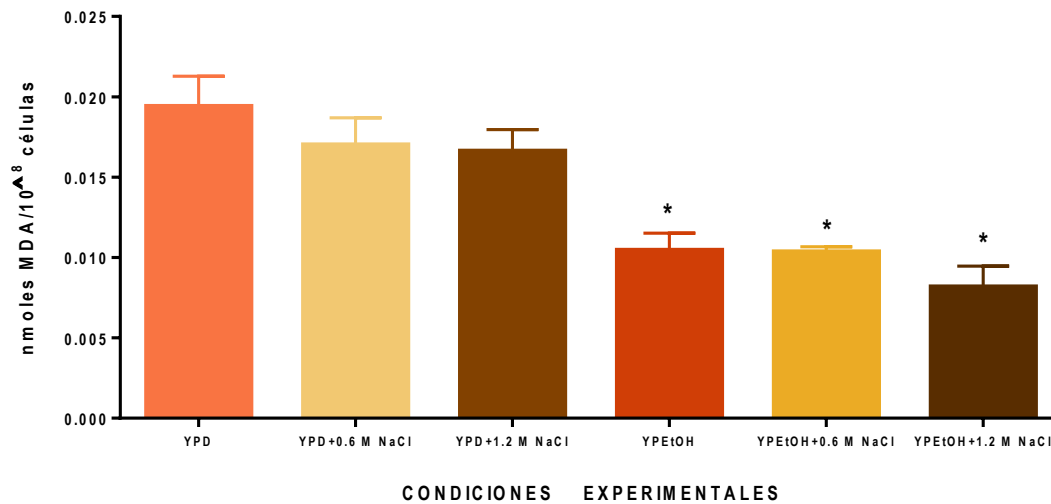


Figura 25. Contenido de MDA en 10⁸ esferoplastos de *D. hansenii*. Se aplicó la prueba estadística de ANOVA, que mostró que el contenido de MDA en los medios con etanol es significativamente menor que el encontrado en los esferoplastos provenientes de medios con glucosa como fuente de carbono.

* p < 0.001

6.7.- CUANTIFICACIÓN DEL RNA RETROTRANSCRITO MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

La técnica de RT-qPCR permite amplificar y cuantificar moléculas de RNA →DNA complementario específicas, con lo cual se tienen datos fiables y precisos sobre la expresión génica de las células (Vinueza-Burgos, 2009). Los genes de referencia son genes que no debieran modificar su expresión en cualquiera de las diversas condiciones a las que se exponen los organismos tales como pH, temperatura, iones, etc. Estos se usan para normalizar la cantidad de copias de los genes experimentales y de referencia en determinada condición contra la concentración de los mismos transcritos en otra condición.

Para el análisis de cuantificación relativa, Nailis (2006), propone el uso de al menos tres genes de referencia y varias estrategias de normalización proporcionan robustez a los experimentos.

6.8.- DISEÑO DE DESOXIOLIGONUCLEÓTIDOS

Los desoxioligonucleótidos u oligos para RT-qPCR son secuencias pequeñas (20-25 bases) de DNA que flanquean cada uno de los extremos (3' y 5') de un gen con la finalidad de alinearse a esta cadena de ácidos nucleicos. La enzima polimerasa se sintetice de manera complementaria ese fragmento de DNA. Por lo sensible de la técnica de qPCR es recomendable que cada amplicón sea menor a 200 pares de bases para evitar dimerizaciones.

En este trabajo se evaluó la expresión de tres genes (SOD1, catalasa A y catalasa T) además de evaluar la expresión de cuatro genes candidatos a ser genes de referencia de *D. hansenii*. Las secuencias de nucleótidos de los tres genes constitutivos elegidos y el gen de la superóxido dismutasa (*Dhsod*) fueron buscadas primero en el genoma de *S. cerevisiae* por ser el genoma anotado más cercano a *D. hansenii*. Posteriormente se buscó el gen homólogo en la levadura de interés y se alinearon ambas secuencias (*S. cerevisiae* y *D. hansenii*); así se consiguió identificar regiones conservadas y variantes para el diseño de los oligos (desoxioligonucleótidos). Los desoxioligonucleótidos para *Dhcta*, *Dhctt* y *DhrRNA26S* ya habían sido previamente diseñados. A continuación, se muestra la secuencia de los desoxioligonucleótidos (sentido y antisentido); en cada cuadro se especifica la secuencia del desoxioligonucleótido, la temperatura de alineamiento, el contenido de C-G y el tamaño del amplicón. Genes de referencia:

Enzima fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa			
	SECUENCIA 5' → 3'	T_M	GC%
PRIMER SENTIDO	CTTCACTTG GTT GAGGG	57.27°	52.63
PRIMER	TTAATTGACAACGACTC	57.33°	33.33
LONGITUD DEL	183 pb		

Proteína S3 de la subunidad ribosomal 40S			
	SECUENCIA 5' → 3'	T_M	GC%
PRIMER SENTIDO	AAGGACCCAGCAACCAA	60.03°	50
PRIMER	AAGCGGAAGCTTCAACT	60.18°	50
LONGITUD DEL	148 pb		

Subunidad grande de la ribonucleótido difosfato reductasa (RNR)			
	SECUENCIA 5' → 3'	T_M	GC%
PRIMER SENTIDO	TATGGCGTGGTTTCCGA	59.46°	50
PRIMER	TGAATGCCTATGGCCAC	59.22°	45.45
LONGITUD DEL	200 pb		

Genes experimentales:

Superóxido dismutasa			
	SECUENCIA 5' → 3'	T _M	GC%
PRIMER SENTIDO	ACATGGTGCTCCAGAAG	60.04°	55
PRIMER	TCGGTACCGGCGTGAAT	60.18°	55
LONGITUD DEL	162 pb		

Catalasa T			
	SECUENCIA 5' → 3'	T _M	GC%
PRIMER SENTIDO	ATAGGTGCCCAAACGGC	59.98°	61
PRIMER	GCCTGGGGATTGTAATG	59.31°	60.87
LONGITUD DEL	198 pb		

Catalasa A			
	SECUENCIA 5' → 3'	T _M	GC%
PRIMER SENTIDO	CCAACGGATGTCCAATC	59.55°	56
PRIMER	CCAGATCCCTTGCGGTG	59.38°	61.90
LONGITUD DEL	151 pb		

6.9.- PRUEBA DE AMPLIFICACIÓN DE DESOXIOLIGONUCLEÓTIDOS CON DNA GENÓMICO

Con el fin de corroborar la especificidad y funcionalidad de los seis pares de desoxioligonucleótidos, se realizó una prueba de amplificación en DNA genómico de *D. hansenii* en PCR de punto final. Debido a que los seis juegos presentan T_m y tamaños similares fue posible usar un solo programa para su amplificación (Figura 26).

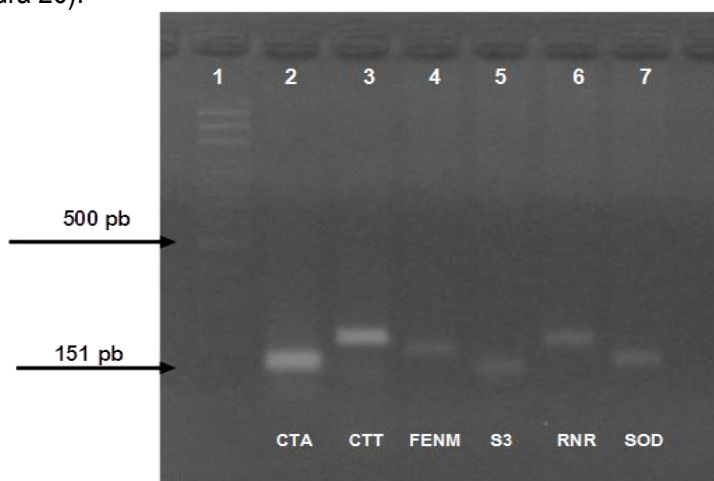
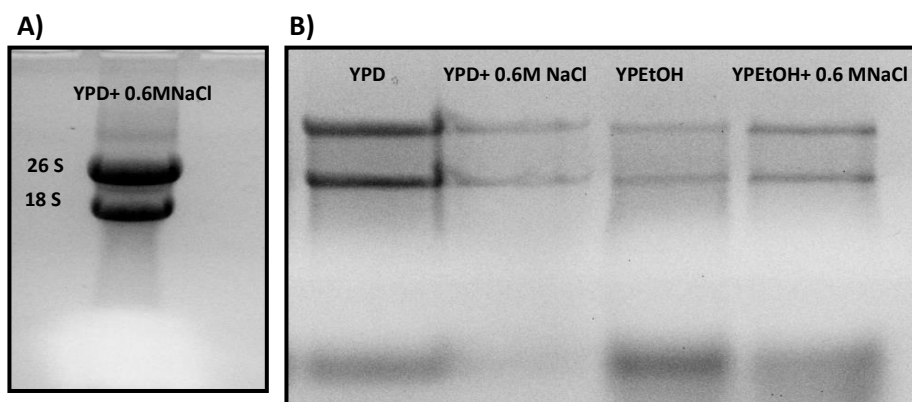


Figura 26. PCR en punto final con DNA genómico de *D. hansenii*. Prueba en PCR punto final de los desoxioligonucleótidos diseñados para RT-qPCR, sobre DNA genómico de *D. hansenii*. Carril 1, marcador de peso molecular; 2, *Dhcta*; 3, *Dhctt*; 4 *DhFENM*; 5, *DhS3*; 6 *DhRNR*; y 7, *Dhsod*.

Los 6 pares de desoxioligonucleótidos analizados, amplificaron de manera exitosa los genes correspondientes de *D. hansenii*.

6.10.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL

Obtener RNA íntegro, de buena calidad y conocer su concentración es crucial para realizar experimentos de RT-qPCR. Aislarlo a partir de células que crecieron utilizando etanol como fuente de carbono resultó muy complicado. Se probaron varios métodos de extracción de RNA total y después de la extracción se realizó una “descontaminación” de las muestras con DNAsa para eliminar cualquier resto de DNA que pudiera ser amplificado. Una vez obtenido, para conocer la concentración de RNA total se realizó una lectura a 280 nm-260 nm en el nanoespectrofotómetro. Finalmente se verificó la integridad del material genético en un gel desnaturante de agarosa en donde se observaron las dos subunidades ribosomales totalmente íntegras y en cantidades abundantes. En la figura 27 se observan las muestras de RNA obtenidas.



6.11.- VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES CONSTITUTIVOS

Existen disponibles en la red programas que analizan la idoneidad de genes de referencia para cada experimento (Vinuesa-Burgos, 2009). En este trabajo se eligió NormFinder. Este programa bioinformático permite identificar entre las muestras analizadas del gen óptimo para normalización en

qPCR mediante el uso de un algoritmo que estima la variación global de la expresión de los genes candidatos de referencia y la variación entre las muestras (NormFinder). Los requerimientos básicos de NormFinder son un mínimo de 3 genes y 2 muestras por grupo, aunque es recomendable el análisis de 5-10 genes candidatos y al menos 8 muestras por grupo; se evalúa la estabilidad de cada gen por separado y se hace una combinación entre los genes de referencia para elegir la pareja que menos variación tenga.

El análisis de los genes de referencia hecho mediante NormFinder mostró que la proteína S3 de la subunidad ribosomal 40S es el gen cuya expresión varía menos en las seis condiciones experimentales. El valor de estabilidad encontrado fue 0.56; seguido por el gen FENM con un valor de 0.997. Si se decidiera usar un par de genes de referencia, la combinación entre S3 y FENM sería la más adecuada con un valor de estabilidad de 0.598 (Tabla 8).

Tabla 8. Estabilidad de genes constitutivos.

Gene name	Stability value	Best gene	S3
S3	0.560	Stability value	0.560
RNR	1.379		
FENM	0.997	Best combination of two genes	S3 and FENM
26S	1.754	Stability value for best combination of two genes	0.598

A partir de los distintos valores de Ct (ciclo en que la amplificación superó la fluorescencia basal, *threshold*) de los genes de referencia, se realizó una gráfica de “cajas y bigotes” en donde se muestra el cuartil superior, el inferior, la media y la desviación estándar del Ct de amplificación de los candidatos a utilizarse como genes de referencia. De acuerdo con la recomendación anterior y el análisis arrojado por NormFinder, se vuelve a corroborar que el mejor gen de referencia es el S3 (Figura 28).

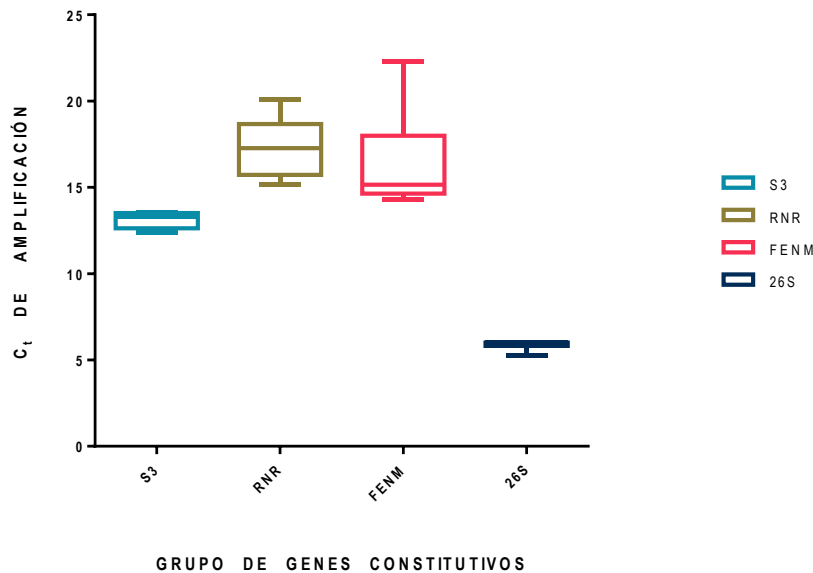


Figura 28. Validación de genes de referencia para qPCR. De acuerdo a los criterios sugeridos en la literatura y por uso de algoritmos, el mejor gen de referencia de las cuatro opciones mostradas en esta gráfica es el S3, ya que es el que mostró un nivel de expresión similar en todas las condiciones de estudio.

6.12.- CUANTIFICACIÓN DE TRANSCRITOS DE CATALASA A, T Y SUPERÓXIDO DISMUTASA Cu-Zn

Con la elección del gen de referencia S3, se prosiguió a realizar la cuantificación de los transcritos (mRNA) de *Dhsod*, *Dhctt* y *Dhcta* obtenidos de fase estacionaria de crecimiento. La condición que se utilizó como normalizadora fue YPD+0.6 M NaCl; a partir de esta elección se compararon el número de copias de los transcritos en las cinco condiciones restantes.

En el caso de la *Dhsod*, se observó que su transcripción sólo aumenta en presencia de 1.2 M de NaCl en medios que contienen glucosa. En los medios con etanol el nivel de transcripción de *Dhsod* se ve disminuido a 1/4 y 1/3 de la cantidad que hay en la condición normalizadora (YPD+0.6 M NaCl). La expresión del gen que codifica a la catalasa A, aumenta en presencia de sal y en la condición de etanol este aumento es notoriamente mayor; este dato confirma los datos obtenidos por Segal-Kischinevzky (2011) del análisis tipo *Northern blot*. Por su parte, la expresión de *Dhctt* en glucosa es ligeramente mayor que en etanol, aunque no se observa ningún patrón de expresión en las seis condiciones de cultivo (Tabla 9, figuras 29 y 30).

Tabla 9. Niveles de expresión relativa de mRNA de los genes *Dhcta*, *Dhctt* y *Dhsod*.

CULTIVO	<i>Dhcta</i>	<i>Dhctt</i>	<i>Dhsod</i>
YPD	0.5	0.16	0.16
YPD+0.6 M NaCl	1	1	1
YPD+1.2 M NaCl	1.74	0.87	1.23

CULTIVO	<i>Dhcta</i>	<i>Dhctt</i>	<i>Dhsod</i>
YPeOH	2	0.87	0.23
YPeOH +0.6 M NaCl	4.59	0.65	0.30
YPeOH +1.2 M NaCl	2.82	1.14	0.30

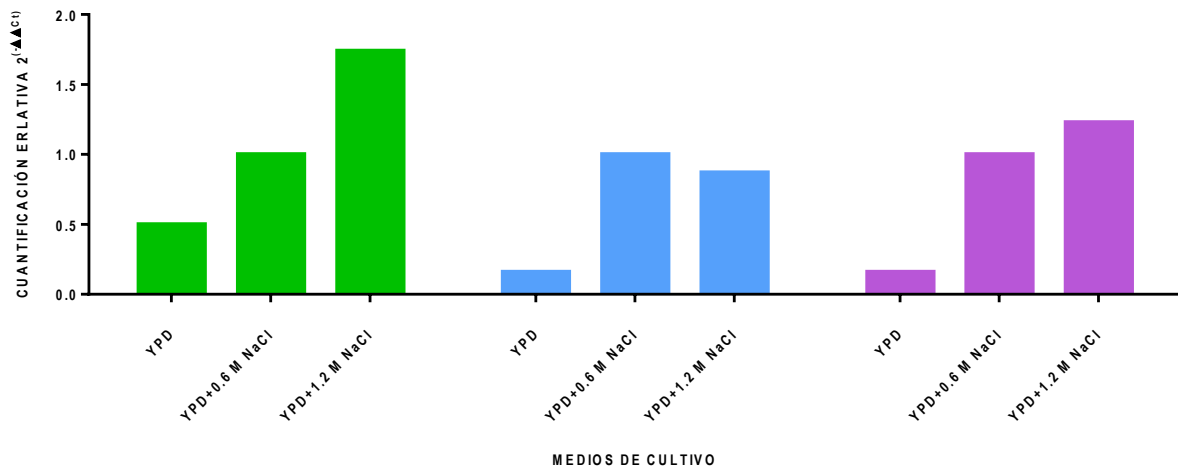


Figura 29. Nivel de expresión de *Dhcta* en verde, *Dhctt* en azul y *Dhsod* en morado en medios de cultivo con glucosa como fuente de carbono. Bajo la condición de glucosa como fuente de carbono, la cantidad de transcritos de *Dhcta*, *Dhctt* y *Dhsod1* aumenta de acuerdo a la concentración de NaCl en los medios de cultivo.

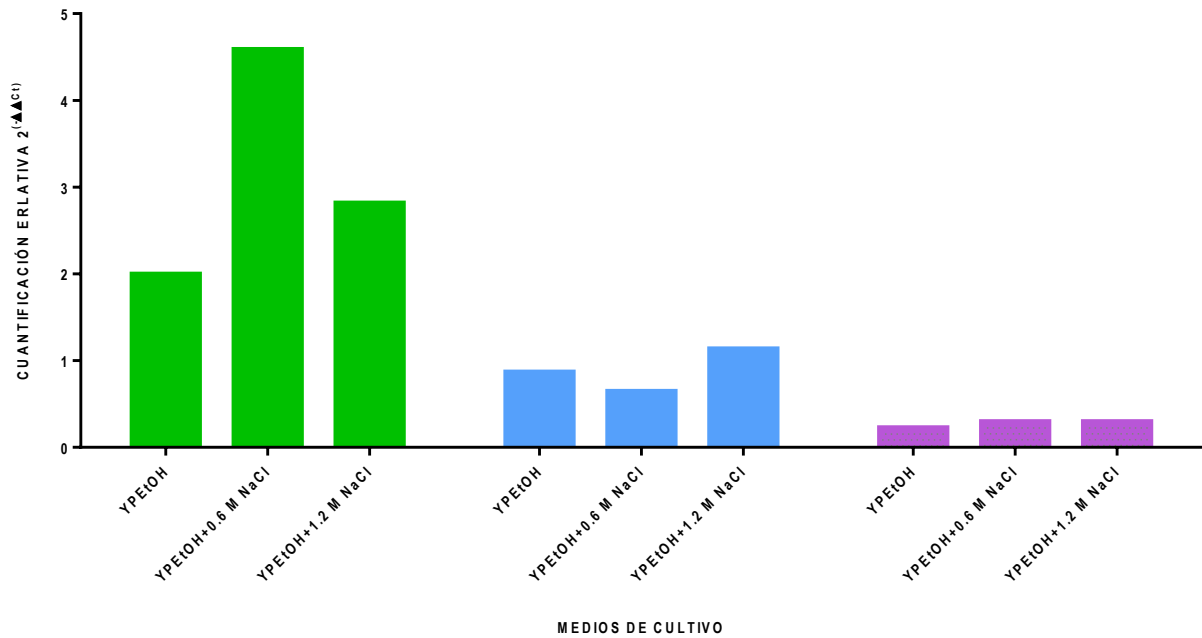


Figura 30. Nivel de expresión de *Dhcta* en verde, *Dhctt* en azul y *Dhsod* en morado en medios de cultivo con etanol como fuente de carbono. En medio de cultivo con etanol como fuente de carbono, el transcrito de *Dhcta* aumenta al incrementarse la concentración de NaCl a 0.6 M y disminuye en 1.2 M. Los transcritos de *Dhctt* y *Dhsod* presentan poca variación por la presencia de NaCl.

7.- DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se presentaron dos técnicas para medir directamente el daño causado por estrés oxidante, dos técnicas para determinar la actividad de enzimas antioxidantes, una técnica que calcula el nivel de transcripción de genes codificantes para enzimas antioxidantes y una técnica que determina el crecimiento y duplicación celular. Los resultados de esta tesis se correlacionaron con los datos obtenidos por Ramírez-Hernández (2012) debido a que en él se tienen las bases de este tema así como del modelo de estudio. Esta investigación se realizó con la finalidad de comprender los procesos bioquímicos y de regulación genómica que se dan en condiciones estresantes, así como sus repercusiones a nivel fisiológico y molecular.

CURVAS DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACIÓN

Como se mencionó en la introducción, en las décadas de los 60's y 70's del siglo pasado, se llevaron a cabo estudios de taxonomía y microscopía electrónica para observar la ultraestructura en diversas levaduras. Desde ese momento se tenía claro que al ser *D. hansenii* una levadura marina, la presencia y exposición a NaCl, con su concomitante presión osmótica, debían incitar a que la levadura presentara mecanismos osmorreguladores finamente controlados que le permitieran crecer y mantener un metabolismo activo y funcional.

De manera general, las estrategias de osmorregulación que podemos encontrar son cambios morfológicos en los organismos: forma, volumen y tamaño de las células así como cambios en la composición lipídica de las membranas, aumento de mananos en pared y cambios en el número de ultraestructuras como mitocondrias, peroxisomas, vacuolas y estromas (Gezeliuz, Norkrans, 1970; Hernández-Saavedra, Romero-Geraldo 2001). A nivel bioquímico, ocurre la síntesis de solutos compatibles (polioles), ajustes en el contenido de cationes y compartimentalización de iones segregados por la misma célula, así como la producción y acumulación de carbohidratos y aminoácidos (libres). En organismos halotolerantes, la presencia de iones no tiene efectos sobre la integridad, estabilidad y actividad de sus enzimas, ya sea porque las proteínas están adaptadas a tolerar altas concentraciones de sal o porque el interior celular está virtualmente libre de ellos.

Al parecer, los estudios pioneros de microscopía electrónica en levaduras halotolerantes refuerzan la noción (posterior) de que las características morfológicas se modifican de acuerdo a la concentración de sal (iones) y el tipo de fuente de carbono disponible en el medio.

Con respecto a *D. hansenii*, se sabe que la presencia de sal provoca que las células disminuyan ligeramente su tamaño y volumen. Las mitocondrias decrecientan en número, tamaño y tasa de respiración, hay formación de canales membranales que se conectan a todas las “vesículas” (estromas con contenido proteico, vacuolas de almacenaje lipídico, fosfolipídico o proteico, o lisosomas con contenido enzimático) y conlleva a que la membrana tenga potencial para ensamblarse rápidamente (Gezeliuz y Norkrans, 1970). En 1992 Hernández Saavedra demostró que en ambientes de alta osmolaridad, la producción de glicerol sí tenía relevancia y que la acumulación de carbohidratos y aminoácidos es despreciable (prácticamente nula) en el rango de concentración de entre 5-10% de NaCl en el medio de cultivo.

El tema de la fuente de carbono fue abordado por Kreger-van Rij en 1970, siendo quien aseveró que *D. hansenii* guarda una correlación directa entre la morfología celular y las reacciones para asimilar la fuente de carbono disponible (Kurtzman, 1975). Estos cambios morfológicos y bioquímicos son distintos a los que se presentan cuando hay presencia y aumento en la concentración de iones extracelular, debido a que la degradación de polioles tiene enzimas y sitios específicos para llevarse a cabo. En las levaduras metilotróficas como *Pichia pastoris* el metanol se degrada en el peroxisoma, el metabolismo se inicia con la enzima alcohol oxidasa que se encarga de oxidar al metanol (en presencia de oxígeno), produciendo formaldehído y peróxido de hidrógeno. El peróxido es degradado por la catalasa y el formaldehído es convertido a dihidroxiacetona (DHA) y gliceraldehído fosfato (GAP) por acción de la transcetolasa dihidroxiacetona sintasa. La DHA se libera al citosol y allí es fosforilada por la dihidroxiacetona quinasa para formar DHAP. Esta molécula experimenta dos reacciones: la primera es la interconversión de triosas fosfato para formar GAP y alimentar la segunda fase glucolítica; la segunda reacción es la condensación de DHAP con una molécula de GAP que da origen a fructosa 1,6-bifosfato (1,6FBP) y luego fructosa-6-fosfato (F6P). De forma alterna, la F6P puede formar biomasa o incorporarse a la vía de las pentosas fosfato para formar xilulosa 5-fosfato (Xu5P) y realimentar el ciclo en DHAP (Poutou, et al. 2005). Por su parte *Candida albicans* es capaz de degradar eficientemente etanol llevando a cabo este proceso en el citoplasma. El etanol es oxidado a acetaldehído por la alcohol deshidrogenasa, posteriormente este sustrato es convertido en acetil-CoA. En *Saccharomyces cerevisiae* la degradación se inicia cuando la alcohol deshidrogenasa convierte al etanol en acetaldehído; éste es transformado en acetato por la acetaldehído deshidrogenasa y finalmente este acetato es convertido en acetil-CoA por la acetil-CoA sintetasa. En el citoplasma la acetil-CoA puede entrar al ciclo del glioxilato, en donde la condensación de dos de estas moléculas

originan succinato, que entra a la mitocondria al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Aunque también la acetil-CoA originada de la degradación de etanol puede entrar directamente a la matriz mitocondrial gracias a una lanzadera de acetil-carnitina. Esta lanzadera transfiere los grupos acetil a la carnitina y una vez en la matriz mitocondrial transfiere de nuevo el grupo acetil a la CoA, posteriormente entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Willis, 2014).

En levaduras, el uso de fuentes de carbono no fermentables, tales como el metanol (que es oxidado) y ácido oleico (llevado a β -oxidación) (Poutou, et al. 2005), está íntimamente ligado a la biogénesis y alta actividad en los peroxisomas. En estos organelos se tiene presencia de enzimas como la catalasa y al menos una oxidasa generadora de peróxido de hidrógeno. Los peroxisomas tienen una membrana sencilla y pueden variar de tamaño, cantidad y contenido enzimático dependiendo del ambiente extra e intracelular. Por ejemplo, en la oxidación de metanol se origina formaldehído que es altamente tóxico, razón por la que queda confinado dentro del peroxisoma. Cantidades significativas de glutatión (GSH) se observan en este organelo, indicando que este tripéptido participa en la detoxificación del formaldehído, en la forma S-HMG. A nivel génico, se ha visto una alta expresión de genes codificantes para catalasa peroxisómica y glutatión peroxidasa. En *Candida boidinii* además se encontró una peroxidoxina que reduce hidroperóxidos alquil. Por las razones anteriores, la localización de los peroxisomas así como su matriz son esenciales en las levaduras metilótrofas pues de ellos depende su metabolismo energético (Yurimoto, et al. 2011).

Un rasgo importante de enfatizar entre la presencia de iones (NaCl, en el rango de 0 – 10% en el medio) y una fuente de carbono no fermentable, es que la presencia de sal en el medio de cultivo no genera especies reactivas de oxígeno, esto de acuerdo a la microscopía y estudios bioquímicos. En cuanto al metabolismo de polioles, su degradación genera ROS vía respiración.

Tomando en consideración los datos descritos previamente y los resultados obtenidos en esta tesis (antecedentes), se propone que el crecimiento de *D. hansenii* en los medios que contienen glucosa como fuente de carbono está dentro de los parámetros normales. El crecimiento retardado en el medio que contenía 1.2 M de NaCl probablemente se dio para llevar a cabo un correcto proceso de osmorregulación. Esta noción es apoyada por resultados previos de citometría de flujo, en dónde se observó que la disminución de tamaño entre 0 y 0.6 M de NaCl no eran diferentes estadísticamente, esto se comprobó con la prueba de Tukey y los reportes de Hernández-Saavedra (2001).

En cuanto a los tres medios que corresponden a etanol como única fuente de carbono, *D. hansenii* tiene un crecimiento lento y tiempo de duplicación mayor. Con citometría de flujo se hicieron notorios dos cambios morfológicos: disminución de tamaño y aumento de granulosidad con respecto a su medio equivalente en glucosa.

Existen reportes donde se asevera que la concentración de iones y temperatura son dos aspectos fundamentales de los que depende la adaptación osmotolerante. En este trabajo ambos aspectos se mantuvieron controlados; por lo tanto, el crecimiento pobre y la tardanza en duplicarse de los medios cultivados con etanol podrían atribuirse a que la levadura se encuentra en estado de estrés (oxidante).

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y ZIMOGRAMAS: SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

En *D. hansenii* se han observado tres isoformas de la Cu-Zn SOD, dos homodímeros con actividad de entre 5000~6000 unidades de SOD/miligramo de proteína y el heterodímero, que tiene 300% más actividad que las otras dos. Hernández-Saavedra y Rojas-Posada determinaron que la secuencia de SOD1 corresponde a la forma súper activa de la enzima y la SOD2 es la forma convencional (Hernández-Saavedra, Romero-Geraldo, 2001; Rojas-Posada, 2003). La expresión de SOD1 es constitutiva pero bajo estímulos oxidantes existe sobreexpresión del gen y también de la MnSOD. Ramírez-Serrano (2003) menciona que adicional a que la superóxido dismutasa es el primer eslabón en una cadena anti oxidante (enzimática), esta enzima también actúa como quelante de metales. En esta situación, la superóxido dismutasa pierde actividad como antioxidante (Ramírez-Serrano, 2003).

En este estudio se observó que la actividad total de superóxido dismutasa en los tres medios con glucosa como fuente de carbono es estadísticamente menor con respecto a los medios con etanol; asimismo con glucosa, la actividad de la enzima disminuye conforme aumenta la concentración de NaCl. Sin embargo, estadísticamente no hay diferencia entre 0 M, 0.6 M y 1.2 M de NaCl.

En los medios de cultivo que disponen de etanol no hay diferencia estadística entre 0M y 0.6M de NaCl, el medio de EtOH+1.2 M de NaCl, presentó el doble de actividad con respecto a los otros dos medios de etanol y menor concentración de sal. Al realizar una comparación de la actividad de superóxido dismutasa entre los medios que contienen glucosa vs. etanol y las diferentes concentraciones de NaCl, se obtuvo que la sal no tiene efecto sobre la actividad de la enzima, sin

embargo, el cambio en la fuente de carbono (glucosa por etanol) produce aumento en la actividad (aproximadamente 0.5 veces más).

CATALASA

La actividad de catalasa en los tres medios con glucosa (YPD, YPD+0.6M NaCl y YPD+1.2M NaCl) como fuente de carbono muestran poca variación entre sí, esta variación no es significativa estadísticamente.

En los medios con etanol, la actividad de catalasa incrementa entre 3 y 7 veces más con respecto a los medios de glucosa. En esta fuente de carbono, la mayor actividad se presenta en el medio YPEtOH. El resultado anterior contrasta con los datos de actividad de superóxido dismutasa, en YPEtOH la presencia de sal (1.2 M NaCl) dispara el aumento en la actividad de superóxido dismutasa; en cuanto a la catalasa, la ausencia de sal aumenta su actividad.

La determinación de actividad de catalasa es total, es decir, se mide tanto la citoplásmica como la peroxisómica. Como se ha mencionado con anterioridad, la presencia de NaCl podría hacer que haya una mejor adecuación de los sistemas enzimáticos así como de la síntesis de solutos compatibles. En *S. cerevisiae* la presencia de sales tales como CaCl_2 y MgCl_2 permitieron que tuviera mayor tolerancia al etanol (Ciesarová, *et al.* 1996); en *D. hansenii* existe la posibilidad de que se presente el mismo efecto iónico con el NaCl. Por ello en el medio YPEtOH se obtuvo mayor actividad de catalasa que en los medios de etanol con 0.6 M y 1.2 M de NaCl.

Algunos autores afirman que una exacerbada cantidad de anión superóxido es capaz de inactivar a la catalasa y glutatión peroxidasa, ya que son sistemas enzimáticos codependientes. En este trabajo se determinó que la actividad de superóxido dismutasa así como la de la catalasa aumentan cuando la fuente de carbono de la que disponen es etanol y las actividades no se afectan con NaCl cuando la fuente de carbono es glucosa. Se puede pensar que este fenómeno es debido a la síntesis de solutos compatibles; en los medios con etanol; probablemente sí ocurre dicha síntesis pero su efecto benéfico no se aprecia claramente por el efecto que esta fuente de carbono (etanol) tiene en el metabolismo.

ZIMOGRAMAS

Al ser los zimogramas una técnica cualitativa más que cuantitativa, nos enfrentamos a que los resultados puedan variar por la composición y calidad del extracto crudo.

En este trabajo, los zimogramas de superóxido dismutasa mostraron dos bandas con actividad. No se colocó una muestra comercial de superóxido dismutasa debido a que no se contaba con ella, por lo anterior no es posible discernir si las dos bandas que se observan corresponden a una isoforma de SOD1 como se menciona en la literatura, o si se trata de la actividad de MnSOD. Ramírez-Serrano menciona que la actividad de MnSOD decreciente conforme la levadura crece (aumento de densidad celular). Esto hace suponer que las bandas con actividad de superóxido dismutasa podrían ser las isoformas de Cu-ZnSOD. La tinción llevada a cabo con esta técnica no fue de la calidad esperada y debe mejorarse.

Con respecto a los zimogramas de catalasa, se utilizó la técnica empleada por Segal-Kischinevzky. En su trabajo reportó a la catalasa A en las cuatro condiciones experimentales (YPD, YPD+0.6 M NaCl, YPEtOH y YPEtOH+0.6 M NaCl) y las dos fases de crecimiento (exponencial y estacionaria); la catalasa T, solo la obtuvo en YPD en fase estacionaria.

Contradictoriamente, en este trabajo se encontró catalasa T en las seis condiciones experimentales y la catalasa A solamente en los medios de etanol, esto en la fase estacionaria de crecimiento.

GRUPOS CARBONILO

La detección de grupos carbonilos en proteínas es una medida directa de estrés oxidante, las proteínas son quienes llevan a cabo las funciones celulares y su función depende en gran medida de su localización ya que están adaptadas a microambientes específicos.

Se determinó la cantidad de grupos carbonilo en extractos crudos encontrando que la mayor concentración de grupos carbonilos se halla en los medios que contenían etanol como fuente de carbono. El aumento en la concentración de NaCl produce incremento en el contenido de grupos carbonilos, esto ocurre tanto en glucosa como en etanol. Los medios con mayor cantidad de grupos carbonilos son los que contienen 1.2 M de NaCl. Al igual que en el caso de las actividades enzimáticas, no existe diferencia estadística en el contenido de grupos carbonilos entre las distintas concentraciones de NaCl (0 M, 0.6 M y 1.2 M de NaCl) en una misma fuente de carbono.

En este trabajo se ha analizado cómo el NaCl y el etanol pueden cambiar y afectar el metabolismo de la levadura. La determinación de grupos carbonilo es una técnica directa de comprobación de daño por estrés oxidante; algunos autores plantean que una alta concentración de grupos carbonilo conllevan a que se arreste el ciclo celular. Datos de nuestro laboratorio muestran que *D. hansenii* tiene un crecimiento muy pobre y lento en medio mínimo con etanol como fuente de carbono. En medio rico con etanol, los datos de la curva de crecimiento, el tiempo de duplicación (>12 h) y el contenido de grupos carbonilo, sugieren que efectivamente sucede el arresto celular.

La literatura indica que, ante estrés oxidante, los sistemas de tiorredoxina evitan la reducción de enzimas que pueden formar puentes disulfuro durante su ciclo catalítico, tales como RNR. Esta enzima es quien mantiene un acervo de dNTPs para la síntesis de DNA; se hace énfasis ya que en este y otros trabajos se ha observado que en condiciones oxidantes hay variación en la expresión de su transcrito. En la literatura se menciona también un decremento en el contenido de aminoácidos libres porque su síntesis y utilización no son prioridad en esas circunstancias, debido a que se prefiere generar la energía necesaria para su desarrollo, esta energía viene dada por la utilización de carbohidratos, ácidos grasos y/o lípidos.

CONCENTRACIÓN DE SUSTANCIAS REACTIVAS (MALONDIALDEHÍDO, MDA) AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

La formación de malondialdehído (MDA) ocurre por la peroxidación de lípidos; al igual que los carbonilos, ésta es una medida directa del estado oxidante.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el mayor contenido de MDA se presenta en los medios con glucosa y que este contenido disminuye cuando aumenta la concentración de NaCl; los medios con etanol presentan menos MDA y con NaCl el contenido disminuye. Estos resultados contrastan con el contenido de carbonilos; muchos autores afirman que subproductos de la peroxidación lipídica así como el producto final (MDA) de este proceso, reaccionan con las proteínas para formar grupos carbonilos. En el caso de *D. hansenii* y bajo las condiciones experimentales de este trabajo no se vio que exista correlación entre estos dos aldehídos.

Se sabe con certeza que la composición y concentración lipídica en las membranas se modifica con la presencia de NaCl, esto causa disminución de la fluidez y permeabilidad pues así se evita que los solutos compatibles salgan de la célula. En *S. cerevisiae* se han encontrado peroxidases

(hidroperoxidasas de fosfolípidos, PHGPXs) asociadas a membranas plasmática, capaces de reducir los hidroperóxidos lipídicos; una proteína PHGPXs, llamada Gpx3 censa y transduce la respuesta a peróxido de hidrógeno sobre el factor de transcripción Yap1 que regula la transcripción de genes involucrados en la respuesta a estrés oxidante, también se encontraron glutarredoxinas que desempeñan una función sobrepuesta en la detoxificación de hidroperóxidos externos.

Si el fenómeno antes descrito ocurriera en *D. hansenii*, ayudaría a entender los resultados obtenidos de dicha técnica. Al ser el etanol una condición que propicia la formación de especies reactivas, la levadura entonces tendría la cantidad de enzimas y moléculas antioxidantes necesaria para contender contra las diversas ROS. Es por ello que en glucosa se tiene alto contenido de MDA pues al ser un medio “ideal” para la levadura, esta no despliega ningún mecanismo de defensa adicional al “pool” que presenta de manera normal.

La presencia de NaCl en el medio de cultivo genera cambios lipídicos y cambios en el comportamiento de las membranas, el cambiar la fuente de carbono indudablemente debe generar cambios más drásticos. Por ejemplo, se sabe que hay cambios en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, esto es una fuerte evidencia pues en ellos es en donde se inician los procesos de peroxidación lipídica, sus dobles enlaces hacen que el resto de la molécula sea susceptible a perder electrones.

En *D. hansenii* no se había comprobado la existencia de las peroxidasas mencionadas, sin embargo, una búsqueda y alineación del gen de Gpx3 de *S. cerevisiae* en el genoma de *D. hansenii* mostró que el gen que la codifica sí está presente, lo siguiente es confirmar que lleve a cabo la misma función que en *S. cerevisiae*.

CUANTIFICACIÓN DEL RNA POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)

Mediante la técnica de RT-qPCR se buscó esclarecer la regulación transcripcional de las tres enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa A y catalasa T). Considerando los antecedentes planteados en este trabajo, se indagó si una catalasa se expresa preferencialmente en los medios con glucosa (T) y otra catalasa se expresa preferencialmente en los medios con etanol (A).

La condición normalizadora que se utilizó en este ensayo fue YPD+ 0.6 M NaCl; es decir, que el contenido de los tres transcritos (*Dhcta*, *Dhctt* y *Dhsod*) en esta condición es igual a 1.

El transcrito *Dhcta* mostró un patrón de expresión muy claro: el transcrito aumentó conforme se incrementó la concentración de sal en las condiciones de cultivo y su mayor expresión se dio cuando la fuente de carbono empleada fue etanol. Este transcrito corresponde a una proteína peroxisómica, su cuantificación demostró que este gen se transcribe ante estímulos nutricionales, presencia de iones y disponibilidad de fuente de carbono, lo que indirectamente está indicando que también hay alta biogénesis del organelo al que es confinada, el peroxisoma.

El transcrito *Dhctt* no exhibió ningún patrón de comportamiento por la presencia de NaCl ni por la fuente de carbono, su nivel de expresión más bajo se mostró en el medio YPD y la expresión más elevada fue en YPD+0.6 M NaCl y YPEtOH+1.2 M NaCl. La diferencia de transcrito entre las 6 condiciones de cultivo es prácticamente nula. Por los resultados que se obtuvieron, se puede inferir que al tratarse de un transcrito de una proteína citoplasmática está adaptada al alto contenido de iones y a cambios nutricionales o derivados del ambiente externo, entonces, su regulación puede ser a nivel postraduccional.

En el caso del transcrito *Dhsod*, su mayor expresión ocurrió en YPD+1.2 M NaCl, este transcrito parece tener un patrón de regulación poco marcado cuando la fuente de carbono es glucosa; el transcrito aumentó conforme incrementó la concentración de NaCl. En los medios con etanol se presentó menor cantidad de transcrito, entre 1/3 y 1/4 menos con relación a la condición normalizadora; cuando se aumentó la concentración de NaCl también lo hizo la cantidad de transcrito, pero en una mínima cantidad. Si se correlaciona la actividad total de superóxido dismutasa con la cantidad de transcrito se obtiene que su actividad es muy alta en etanol (en los tres medios) mientras que la cantidad de transcrito es poca, probablemente se debe a que 1) al igual que con la catalasa, existe una regulación postraduccional que hace que la enzima sea “súper activa” como lo mencionó anteriormente Hernández-Saavedra (2001), o bien 2) la alta actividad enzimática medida se debe a un gran aporte por parte de la MnSOD.

Para concluir, los resultados de RT-qPCR junto con la actividad total de las enzimas, catalasa y superóxido dismutasa, sugieren que la mayor actividad de catalasa obtenida en los medios con etanol se debe principalmente al aporte de la catalasa A. La catalasa T se propone que tiene una expresión

constitutiva y constante que no se ve afectada por la concentración de iones o disponibilidad de nutrientes. En el caso de *la SOD* probablemente un estímulo adverso estimula una actividad altísima y por ello la cantidad de transcrito es significativamente menor en los medios con etanol.

8.- CONCLUSIONES

Al analizar y conjuntar los resultados obtenidos en los experimentos realizados en este trabajo con *D. hansenii* como modelo de estudio, se puede concluir: Que entre las dos fuentes de carbono, glucosa y etanol, claramente el etanol representa una fuente de estrés, probablemente oxidante. La presencia de NaCl (0.6 M y 1.2 M) en los medios de cultivo no es causa de estrés oxidante, sin embargo, su presencia puede estar ligada a la producción de glicerol como soluto compatible en respuesta a la presión osmótica ejercida por este u otros iones. Las dos nociones anteriores son apoyadas por el tiempo de duplicación obtenido a partir de las curvas de crecimiento, las actividades enzimáticas y el contenido de grupos carbonilo en las muestras de proteína. El gen que si parece estar regulado por la concentración de NaCl y después por la fuente de carbono es *Dhcta*. Los genes *Dhctt* y *Dhsod* probablemente están regulados a nivel de postranscripcional. Contrariamente a lo que se esperaba, la mayor susceptibilidad a que los ácidos grasos poliinsaturados se peroxiden es en medio con glucosa como fuente de carbono, probablemente este fenómeno se debe a que la señalización redox en esta fuente de carbono no es tan alta como en etanol.

9.- PERSPECTIVAS

Los resultados mostrados en este trabajo aportan información acerca de la regulación redox en *D. hansenii*; esto da pauta a la planeación de experimentos para lograr una mejor comprensión de este fenómeno. En el tema particular del estrés oxidante, se ha logrado dilucidar poco de la regulación génica, en gran parte porque el genoma de la levadura no ha sido curado ni corregido (del todo); por ello considero indispensable llevar a cabo estudios bioinformáticos pues así se podrán identificar las regiones génicas de interés.

Debido a que este trabajo inició con el propósito de analizar la respuesta de tres genes antioxidantes no se abordó de la manera correcta el estudio bioquímico de las proteínas (catalasa A, T y superóxido dismutasa Cu-Zn), por esa razón considero vital el análisis de ciertas fracciones de los extractos proteicos, así como la purificación y caracterización proteica. Al tratarse de análisis más específicos de las proteínas, aportarían información cualitativa y cuantitativa para entender su cinética y la regulación de su actividad; ya que como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, *D. hansenii* es un organismo halófilo; es evidente pensar que su metabolismo tiene requerimientos específicos que no hemos comprendido.

Por último, son necesarios estudios de microscopía electrónica (de transmisión, barrido o fluorescencia) son necesarios, pues el análisis de la morfología amplía y sobretodo complementa cualquier otro estudio realizado. Como se ha mencionado con anterioridad, las condiciones de crecimiento son determinantes para dar pie a cambios en la morfología; cambios que están precedidos por modificaciones en la expresión génica, en actividad bioquímica, etc.

10.- REFERENCIAS

- Aebi H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* **105**:121-126.
- Avéret N., Fitton V., Bunoust O., Rigoulet M., Guérin B. (1998). Yeast mitochondrial metabolism: From *in vitro* to *in situ* quantitative study. *Molecular and Cellular Biochemistry* **184**:67-79.
- Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D. (2000) Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press.
- Barziliai A., Yamamoto K. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* **3**:1109-1115.
- Bedoya-Pérez L., Cancino-Rodezno A. Flores-Escobar B., Soberón M., Bravo A. (2013). Role of UPR Pathway in Defense Response of *Aedes aegypti* against Cry11Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Molecular Sciences* **14**:8467–8478.
- Buege J. A., Aust S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology* **225**:302-310.
- Buettner, G. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alphanatocopherol. *Archives in Biochemistry and Biophysics* **300**:535-543.
- Butler E., Kosman D. J. (1992). Molecular Genetics of Superoxide dismutase in yeast and related fungi. *Advances in Genetics* **30**:251-319.
- Burns V. W. (1964). Regulation and coordination of purine and pyrimidine biosyntheses in yeast. I. Regulation of purine biosynthesis and its relation to transient changes in intracellular nucleotide levels. *Biophysical Journal* **4**:151-166.
- Cabrera-Orefice A., Guerrero-Castillo S., Díaz-Ruiz R., Uribe-Carbajal S. (2014). Oxidative phosphorylation in *Debaryomyces hansenii*: physiological uncoupling at different growth phases. *Biochimie* **102**:124-136.
- Calderón-Torres M., Peña A., Thomé P. (2006). *DhARO4*, an amino acid biosynthetic gene, is stimulated by high salinity in *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **23**:725-734

Carpena X., Loprasert S., Mongkolsuk S., Switala J., Loewen P. C., Fita I. (2006). Catalase-
peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* inferred from pH-induced structural changes.
Biochemistry **327**:5171-5179.

Céspedes-Miranda E., Hernández-Lantigua I., Llópez-Janer N. (1996). Enzimas que
participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas.
Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas **15**:1561-3011.

Ciesarová Z., Šmogrovičová D., Dömény Z. (1996). Enhancement of yeast ethanol tolerance.
Folia Microbiologica **41**:485-488.

Díaz A., Loewen P.C., Fita I., Carpena Xavi. (2012) Thirty years of heme catalase structural
biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **525**: 102-110

Díaz A., Muñoz-Clares R. A., Rangel P., Valdés V. J., Hansberg W. (2005). Functional and
structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen. *Biochimie* **87**:39-45.

Díaz-Acosta A., Membrillo-Hernández J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación
de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Revista especializada en Ciencias
Químico-Biológicas* **9**:34-44.

Djinovic K., Gatti G., Coda A., Antolini L., Pelosi G., Desideri A., Falconi M., Marmocchi F.,
Rotilio G., Bolognesi M. (1992). Crystal structure yeast Cu,Zn Superoxide Dismutase Crystallographic
Refinement at 2.5Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **225**:791-809.

García-Campos M. A. (2013) Las catalasa de *D. hansenii*: análisis de la complementación
heteróloga en una mutante acatalasémica de *S. cerevisiae*. Biología. Facultad de Ciencias, Tesis de
licenciatura, UNAM.

García-Pérez H. M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos. Univ.
Diag. **2**:31.

García-Triana B., García-Morales O., Clapes-Hernández S., Rodes-Fernández L., García-
Piñeiro J. C. Enzimas que participan como barrera fisiológica para eliminar los radicales libres: I.
Superóxido dismutasa. *Yeast* **21**:1307-1316.

Gezelius K., Norkrans B. (1970). Ultrastructure of *Debaryomyces hansenii*. *Archives für Mikrobiologie* **70**:14-25.

Gutteridge J. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* **41**:1819-1828.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1999). Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. *Oxford University Press*.

Hansberg, W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico* **1**:19-54.

Hernández-Saavedra N., Romero-Geraldo R. (2001). Cloning and sequencing the genomic encoding region of cooper-zinc superoxide siamutase enzyme from several marine starins of the genus *Deabaryomyces*. *Yeast* **13**:1227-1238.

Herrero E., Ros J. Bellí G. Cabisco E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780**:1217-1235.

Jang H. H., Lee K. O., Chi Y. H., Jung B. G., Park S. K., Park J. H., Lee J. R., Lee S. S., Moon J. C., Yun J. W., Kim W. Y., Kang J. S., Cheong G. W., Yun D. J., Rhee S. G., Cho M. J., Lee S. Y. (2004). Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* **5**:625-35.

Klotz M. G., Loewen P. C. (2003). The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Molecular Biology Evolution* **20**:1098-1120.

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

Korch C. T., Lacroute F., Exinger F. (1974). A regulatory Interaction between Pyridine and Purine Biosyntheses via Ureidossuccinic Acid. *Molecular Geeral Genetics*. **133**:63-75.

Kreger-Van R., Veenhuis M. (1975). Electron Microscopy of Ascus Formation in the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of General Microbiology* **89**: 256-264.

Kurtzman C. P., Smiley M. J., Baker F. L. (1975). Scanning electron microscopy of ascospores of *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycopathologia* **55**:29-34.

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

Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Llorente B., Durrens P., Malpertuy A., Aigle M., Artiguenave F., Blandin G., Bolotin-Fukuhara M., Bon E., Brottier P., Casaregola S., Dujon B., De-Montigny J., Lépingle A., Neuvéglise C., Ozier-Kalogeropoulos O., Potier S., Saurin W., Tekaija F., Toffano-Nioche C., Wésolowski-Louvel M., Wincker P., Weissenbach J., Souciet J., Gaillardin C. (2000). Genomic exploration of the ascomycetous yeast: 20. Evolution of the gene redundancy compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **487**:122-133.

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

Lushchak V., Gospodaryov D. V. (2005). Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biology International* **29**:197-192.

Marnett L. J. (1998). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **1-2**:83-95.

Marth E.H. (1978). Standard methods for the examination of dairy products. *American Public Health Association*.

Maté M. J., Zamocky M., Nykyri L. M., Herzog C., Alzari P. M., Betzel C., Koller F., Fita I. (1999). Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* **1**:135-149.

Mendinger E., Devine J. R. E. (1965). Lipids of *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology* **89**:1488-1493.

Mirzaei H., Regnier F. (2006). Identification of yeast proteins Chromatographic top-down approach for identification of carbonylated, fragmented and cross-linked proteins in yeast. *Journal of Chromatography A* **1141**:22-31.

Muñoz I., Moran J.F., Becana M., Montoya G. (2005). The crystal structure of an eukaryotic iron superoxide. *Protein Science* **14**:387-394.

Nailis H., Coenye T., Van-Nieuwerburgh F., Deforce D., Nelis H. J. (2006). Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Molecular Biology* **7**:25- 33.

Nakase T., Suzuki M. Phaff H., Kurtzman. (1998). *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij Nom. In *The Yeast- A Taxonomy study* 157-173).

Navarrete C., Siles A., Martínez J.L., Calero F., Ramos J. (2009). Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research* **4**:582-590.

Nelson D. P., Kiesow L. (1972). Enthalpy of Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase at 25C (with Molar Extinction Coefficients of H₂O₂ Solutions in the UV). *Analytical Biochemistry* **49**:474-478.

Nicholls P., Fita I., Loewen P. C. (2000). Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry* **51**:51-106.

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

Norkrans B. (1966). Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archives für Microbiologie* **4**:374-392.

Osredkar J., Sustar N. (2011). Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc. *Clinical Toxicology* 1-18.

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* 87-120.

Poutou R. A., Quevedo B. E., Córdoba H. A., Sáenz H., Barrera L. A. (2005). Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. *Nova-Publicación Científica* **3**:75-85.

Ramírez-Hernández M. (2012). Análisis de la actividad diferencial de catalasas en distintas condiciones de cultivo de *Debaryomyces hansenii*. Biología. Facultad de Ciencias, Tesis de licenciatura, UNAM. Pp:24, 60-79,

Ramírez-Serrano R. (2003). Efecto de estímulos oxidativos y metales en los niveles de expresión de Cu,Zn SOD de la levadura marina *debaryomyces hansenii*. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Tesis*.

Reverter G., Cabisco E., Tamarit J., Ros J. (2004). Oxidative damage to specific proteins in Replicative and Chronological-age *Saccharomyces cerevisiae*. Common targets and prevention by calorie restriction. *The Journal of Biological Chemistry* **279**:31983-31989.

Rojas-Posada D. I. (2003). Clonación, secuenciación y mapeo cromosómico de las dos formas de la enzima superóxido dismutasa tipo CuZn (Cu,ZnSOD) de la levadura marina *Debaryomyces hansenii*. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste*.

Salmon T. B., Evert B. A., Song B., Doetsch P. W. (2004). Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* **32**:3712-3723.

Schmitt M. E., Brown T. A., Trumpower B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. **18**:3091-2.

Segal-Kischinevzky C., Rodarte-Murguía B., Valdés-López V., Mendoza-Hernández G., González A., Alba-Lois L. (2011). The Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii* has Two Catalase Genes Encoding Enzymes with Differential Activity Profile. *Current microbiology* **3**:933-943.

Sheng Y., Stich T. A., Barnese K., Gralla E. B., Casvio D., Britt R. D., Cacelli D. E., Valentine J. S. (2011). A Comparison of Two Yeast MnSODs: Mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* versus Cytosolic *Candida albicans*. *Journal of American Chemistry Society* **133**:1-29.

Sorensen B.B., Samuelsen 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. (2001). Food Microbiology Protocols (Methods in Biotechnology). *Humana Press; Softcover reprint of hardcover 1st ed. 2001 edition*, 978.

Steels E. L., Learmonth R.P., Watson K. (1994). Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology* **140**:569-576.

Thomé-Órtiz P. E., 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.

Turk M., Montiel V., Zigon D., Plemenitas A., Ramos J. (2007). Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Mycrobiology* **153**:3586-3592.

Tokuoka K. (1993) Sugar-and salt-tolerant yeast. *Journal Applied Bacteriology* **74**:101-110.

Vargas F., Rivas C., Nursamaa A., Zoltan T. (2007). Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en química* **2**:3-15.

Vinueza-Burgos C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética y celular (Real Time PCR the new age genetic information).

Voronovsky A. Y., Abbas C. A., Dmytruk K. V., Ishchuk O. P., Kshanovska B. V., Sybirna K. (2004) *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) DNA sequences containing genes involved in riboflavin synthesis. *Yeast* **21**:1307-1316.

Wills C. (2014). Regulation of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry and Molecular Biology* **25**:245-280.

Yurimoto H., Oku M., Sakai Y. (2011). Yeast methylotrophy: Metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis. *International Journal of Microbiology* **2011**:1-8.

Zámocky M., Regelsberger G., Jakopitsch C., Obinger C. (2001). The molecular peculiarities of catalase-peroxidases. *FEBS Letters* **42**:177-182.