



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE DENITRASA DE
Debaryomyces hansenii EN EXTRACTOS PROTEICOS DE
HÍGADO DE *Mus musculus* CON COLITIS**

T E S I S

Que para obtener el título de

B I Ó L O G A

Presenta:

Lirio Sarabia Cruz

Directora de tesis:

Dra. Claudia Marissa Calderón Torres

Revisores:

Dra. Ana María García Bores

Dra. Verónica Freyre Fonseca

Dra. Yadira Ledesma Soto

Dr. Miguel Murguía Romero



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 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.

Reconocimiento

El presente trabajo estuvo dirigido por la Dra. Claudia Marissa Calderón Torres y se realizó en el laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED), perteneciente a la División de Investigación y Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Y en el laboratorio 306 Oriente del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.



Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) y se contó con beca de conclusión de estudios y de titulación por el proyecto:

DGAPA- PAPIIT-IN226716

“Evaluación de la expresión genética y detoxificación de la oxidación en la levadura *Debaryomyces hansenii* hacia la biotecnología en enfermedades crónico-degenerativas”



Agradecimientos

Mis sinceros agradecimientos a la Dra. C. Marissa Calderón Torres por el tiempo, los conocimientos y las experiencias compartidas. Por sus palabras que me motivaron a superar nuevas pruebas, me alentaron a continuar y a mejorar día con día. Sobre todo, agradezco su confianza.

Por formar parte de esta tesis al aportar sus pertinentes y acertados comentarios a:

Dra. Ana María García Bores por sus sabias palabras y su amor a la ciencia que comparte con pasión.

Dra. Verónica Freyre Fonseca por su amable atención, enseñanzas, consejos y propiciar que esta tesis fuera más parsimoniosa.

Dra. Yadira Ledesma Soto, por sus consejos en el laboratorio y por la atención que con entusiasmo siempre brinda.

Dr. Miguel Murguía Romero por su ayuda con los estadísticos y la alegría con la que transmite sus conocimientos.

A mis compañeras de laboratorio Editha y Elenka por hacer gratos mis días de trabajo y por la ayuda que me brindaron. Tengan un bello viaje y muchas aventuras.

A mis compañeros y amigos más cercanos: Gaby, Vale, Bere, Lalo, Juan, Mauro, Luis, Viri, Cara, Mayra, Jess, Marisol, Tavo, Carlos, Rodolfo, Edie, Alejandro, July, Brasil y Benito. Por su amistad valiosa, las aventuras, las risas, la confianza y los momentos compartidos a lo largo de este camino. Les deseo el éxito. La grandeza los espera.

A mi gran amigo de la vida, Panfi. Tu presencia en mi camino ha sido sustancial. Tu visión amplia de la vida me ayuda a contemplar mejor los paisajes, gracias.

A Erick "El Vikingo Prado" y a Perlita. El curso habría sido muy distinto sin ustedes. Todas esas clases, practicas, idas al campo, alegrías, tristezas, charlas y más, le han



dado esa chispa especial a mis días. Gracias por acompañarme. Con certeza sé que son los mejores. Los quiero mucho, par de campeones.

Querido Chapito, gracias por estar junto a mí, por procurar mi bienestar, por animarme y ser el mejor compañero.

Que con entusiasmo me han apoyado incondicionalmente a lo largo de este recorrido, a Nalle y su familia, por abrirme las puertas de su hogar y abrazarme en su núcleo.

Y principalmente a la UNAM, por brindar los espacios adecuados para la búsqueda del conocimiento y permitirme crecer académica y personalmente.

“Por mi raza hablará el espíritu”



Dedicatoria

A mis hermanas, Sayra y Maritza

Ustedes representan mi fuerza, motivación y alegría. Por ustedes, principalmente, he logrado vencer cada obstáculo. Gracias por la complicidad, por su comprensión, amistad, cariño y por ayudarme siempre (a estudiar, empacar, aprender, enseñar). Por todo lo que representan y me dan sin condiciones. ¡Las amo sin medida!

A mi amado padre José N. S. T.

La confianza, el amor y los consejos que hasta el día de hoy me regalas, son de las mayores riquezas que poseo. El espacio de esta página es insuficiente cuando se trata de expresar la felicidad que siento al tenerte en mi vida. Sin tu dirección este camino habría sido muy difícil. ¡Gracias por impulsarme, te amo!

A mi mami Patricia C. A.

La fuerza con la que cada día te despiertas, la alegría que te caracteriza, la disciplina con la que vives, son mi inspiración. Gracias por enseñarme con acciones y voluntad. Eres un ejemplo y motivo para seguir. ¡Lo logramos ma, te amo!

A mi abuelito Julio y a mis tías

De quienes he aprendido mucho y han cuidado de mí. Sus palabras me dieron aliento y alegría cuando lo necesité.



Cita textual

“Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos. Pero los hay que luchan toda la vida: esos son los imprescindibles.”

— Bertolt Brecht



Índice

	Páginas
Índice	I
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	V
Abreviaturas	VI
Resumen	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Radicales libres	3
1.2 Especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y estrés oxidante	5
1.2.1 Formación de óxido nítrico	7
1.2.2 Formación de peroxinitrito	9
1.3 Tirosina como blanco de oxidación de las ERN	10
1.4 Formación de 3-nitrotirosina	11
1.5 Colitis y estrés oxidante	13
1.5.1 Hígado	15
1.6 Enzimas denitrinasas en <i>Debaryomyces hansenii</i>	16
2. ANTECEDENTES	18
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. PLANEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVO GENERAL	22
6.1 Objetivos particulares	22

	Páginas
7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1 Extractos de proteínas totales de hígado de <i>M. musculus</i>	23
7.2 Cuantificación de ERO en hígado de <i>M. musculus</i>	23
7.3 Cultivos de <i>D. hansenii</i>	24
7.4 Extractos de proteínas totales de <i>D. hansenii</i>	24
7.5 Cuantificación de proteínas totales	25
7.6 Incubación de los extractos proteicos de los hígados con los extractos proteicos de <i>D. hansenii</i>	25
7.7 Cuantificación de 3-NT por ELISA	26
7.8 Cuantificación de nitritos	26
7.9 Análisis estadístico	26
7.10 Modelo de trabajo	27
8. RESULTADOS	28
8.1 Niveles de ERO en extractos de proteína de hígados de <i>M. musculus</i> con y sin colitis	28
8.2 Niveles de 3-NT en extractos de hígado de <i>M. musculus</i> con y sin colitis sin el tratamiento de <i>D. hansenii</i>	29
8.3 Concentración de proteínas con 3-NT en hígado de <i>M. musculus</i> con el tratamiento de <i>D. hansenii</i>	29
8.4 Concentración de nitritos en extractos de hígado de <i>M. musculus</i> con y sin colitis sin extractos proteicos de <i>D. hansenii</i>	31
9. DISCUSIÓN	33

	Páginas
9.1 Niveles de ERO en extractos de proteína de hígados de <i>M. musculus</i> con y sin colitis	33
9.2 Niveles de 3-NT en extractos de hígado de <i>M. musculus</i> con y sin colitis sin el tratamiento de <i>D. hansenii</i>	34
9.3 Concentración de proteínas con 3-NT en hígado de <i>M. musculus</i> con el tratamiento de <i>D. hansenii</i>	35
9.4 Concentración de nitritos en extractos de hígado de <i>M. musculus</i> con y sin colitis sin extractos proteicos de <i>D. hansenii</i>	36
10. CONCLUSIONES	37
11. REFERENCIAS	39
12. APÉNDICES	

Índice de figuras

	Páginas
Figura 1. Balance REDOX y ECNT	5
Figura 2. El daño celular es provocado principalmente por la peroxidación de lípidos de la membrana	6
Figura 3. Producción biológica de NO• catalizada por óxido nítrico sintasa	7
Figura 4. NO• como mediador endógeno y su reacción con el O ₂ ^{-•}	8
Figura 5. Estructura del aminoácido tirosina	10
Figura 6. Formación de 3-NT	12
Figura 7. Esquema del daño que causa la colitis	14
Figura 8. Incremento de ERO en colitis y su relación con la colangitis	16
Figura 9. Incubación de los extractos proteicos de hígado con los extractos proteicos de <i>D. hansenii</i>	25
Figura 10. Modelo de trabajo	27
Figura 11. Niveles de ERO en extractos de proteínas totales de hígado de <i>M. musculus</i>	28
Figura 12. Niveles de 3-NT en extractos de proteínas totales de hígado de <i>M. musculus</i>	29
Figura 13. Niveles de 3-NT en extractos de proteínas totales de hígado de <i>M. musculus</i> después de la incubación con los extractos de proteína totales de <i>D. hansenii</i>	30
Figura 14. Niveles de nitritos en extractos de proteínas totales de hígado de <i>M. musculus</i>	31
Figura 15. Curva patrón de BSA	45

	Páginas
Figura 16. <i>Curva patrón de BSA nitrada</i>	46
Figura 17. <i>Curva patrón de nitritos</i>	47
Figura 18. <i>Niveles de ERO</i>	48

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Principales factores de riesgo de las ECNT con mayor prevalencia</i>	1
Tabla 2. <i>Formación de radicales libres</i>	3
Tabla 3. <i>Principales ERO y ERN</i>	4

Abreviaturas

3-NT	3-nitrotirosina
AOX	Sistemas de defensa antioxidantes
CEP	Colangitis esclerosante primaria
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
EII	Enfermedades inflamatorias intestinales
EN	Estrés nitrosativo
EO	Estrés oxidante
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
NO•	Óxido nítrico
O ₂ -•	Radical superóxido
ONOO-	Peroxinitrito
RL	Radicales libres
Tir	Tirosina

Resumen

Los sistemas celulares tienen mecanismos para mantener en equilibrio las reacciones REDOX. Estos incluyen vitaminas y enzimas a los que se les denominan antioxidantes, pues contrarrestan o neutralizan a las especies reactivas de oxígeno (ERO) originadas por el metabolismo celular. Sin embargo, se han asociado a diferentes enfermedades con el estrés oxidante (EO), por ejemplo, Alzheimer, diabetes tipo II, colitis, entre otras. El EO se establece por la disminución de los sistemas antioxidantes y el aumento exagerado de ERO. Una de las consecuencias del EO es la formación del compuesto oxidado 3-nitrotirosina (3-NT) en proteínas y se asocia con diferentes enfermedades degenerativas. La 3-NT se forma por la reacción del superóxido con óxido nítrico, lo que resulta en peroxinitrito y este último reacciona con la tirosina de las proteínas formando 3-NT como producto final. La formación de esta molécula representa un daño irreversible para las proteínas, pues no se ha descrito algún sistema celular que lo revierta y esto puede resultar en daños mayores como la pérdida o ganancia de las funciones de las proteínas. No obstante, la levadura *Debaryomyces hansenii* cuenta con enzimas con la actividad de denitrasas cuando crece en estrés salino y su función es eliminar el grupo nitro de esta molécula sin degradar o hidrolizar a las proteínas.

En la presente tesis se plantea que la concentración de 3-NT de las proteínas de los hígados de ratones enfermos de colitis disminuirá después de estar expuestas a las denitrasas de los extractos proteicos de *D. hansenii*.

El objetivo del presente estudio es evaluar la actividad de las denitrasas de los extractos de proteínas totales de *D. hansenii* en los extractos de proteínas totales de hígado de *Mus musculus* con colitis.

Por medio de la utilización de la reacción de peróxido con el compuesto 2' 7'-diacetato de diclorofluoresceína se determinó la concentración de ERO en los extractos de hígados de *Mus musculus* con y sin colitis. La disminución de 3-NT se determinó por ELISA en los extractos proteicos de los hígados de *M. musculus* con y sin colitis antes y después de ser incubados con los extractos de proteínas totales

de *D. hansenii* crecida en medio de cultivo para levadura, adicionado con cloruro de sodio 1 y 2 M. Finalmente, a las muestras se les determinó la concentración de nitritos mediante la reacción de Griess.

Los resultados muestran que los niveles de ERO son mayores en los extractos proteicos de los hígados de los ratones con colitis ($p < 0.05$, *t*-Student). Asimismo, los niveles de 3-NT en los extractos proteicos de hígado de ratón con colitis son mayores que los niveles encontrados en las muestras control, sin embargo, no muestran diferencias significativas ($p > 0.05$, Mann-Whitney). La concentración de 3-NT en las muestras de los extractos proteicos de hígado después de la incubación con los extractos proteicos de *D. hansenii* disminuye en las muestras donde la levadura se sometió a estrés salino ($p < 0.05$, Mann-Whitney). Mientras que los niveles de nitritos aumentan en los extractos proteicos de los hígados con los extractos proteicos de la levadura ($p < 0.05$, Mann-Whitney).

Finalmente se concluye que el daño a las proteínas oxidadas en su tirosina por peroxinitrito en los hígados de ratón enfermo de colitis puede ser revertido por las enzimas denitrasas de *D. hansenii*.

1. Introducción

El sistema de salud enfrenta uno de los mayores retos debido a la incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), pues son la primera causa de muerte a nivel mundial de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS). Además, su incidencia va en aumento por el envejecimiento de la población y los estilos de vida actuales que acentúan el sedentarismo, la mala alimentación, el sobrepeso y obesidad, el consumo de alcohol y de tabaco, niveles altos de presión arterial, colesterol y glucosa, entre otros. Estos factores terminan por contribuir al desarrollo de enfermedades como diabetes, colitis, enfermedades cardiovasculares, neurológicas, entre otras que representan una verdadera epidemia (Tabla 1). Las ECNT son padecimientos de larga duración cuya evolución generalmente es lenta (OMS, 2013; Córdova-Villalobos *et al.*, 2008).

Tabla 1. Principales factores de riesgo de las ECNT con mayor prevalencia. Modificado de Córdova-Villalobos *et al.* (2007).

Factores de riesgo	Enfermedad				
	Enfermedad cardiovascular	Diabetes	Cáncer (pulmonar, gástrico, hepático, colorrectal, mamario, cervicouterino)	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	Enfermedades cerebrovasculares
Consumo de tabaco	*	*	*	*	*
Consumo de bebidas alcohólicas			*	*	*
Dieta no saludable	*	*	*	*	
Inactividad física	*	*	*	*	*
Presión arterial alta	*	*			*
Sobrepeso y obesidad	*	*	*	*	*
Glucosa elevada	*	*	*		
Colesterol elevado	*	*	*		

La incidencia y el aumento de las ECNT se consideran un problema de salud pública que son el resultado de cambios sociales y económicos; pues los tratamientos suelen ser complejos y de costos elevados. Además, son la causa más frecuente de incapacidad prematura. Por lo que la prevención y control de las ECNT deben ser una prioridad para el sector salud, así, la OMS también resalta la importancia del conocimiento del origen y desarrollo de este grupo de enfermedades para poder tratarlas y sugiere continuar e incrementar las investigaciones sobre el tema (OMS, 2013).

El interés sobre el estudio de los radicales libres (RL) y el estrés celular ha incrementado en el área de la salud con la finalidad de conocer los mecanismos que mantienen el equilibrio celular y cómo su desequilibrio se relaciona con el envejecimiento de las mismas. La comprensión de estos mecanismos en las ECNT y su conexión con el progreso de este grupo de enfermedades podría ayudar a mejorar la calidad de vida del humano, pues es una herramienta para conocer el origen de diferentes enfermedades, sobre todo de tipo crónico-degenerativas (Rodríguez *et al.*, 2001).

La investigación que se presenta en esta tesis se centra en la acumulación de la 3-nitrotirosina (3-NT) por varias razones: su formación es el producto de la reacción de peroxinitrito (ONOO-) con el aminoácido tirosina (Tir) de proteínas y su presencia se relaciona con estrés oxidante (EO), algunas enfermedades degenerativas, sobre todo con las pertenecientes al grupo de ECNT (Souza *et al.* 2008). Además, en mamíferos no se ha reportado ningún sistema eficaz que repare el daño que pueda causar dicho compuesto, por lo que revertir la formación de esta molécula podría significar una mejoría en la salud, sin embargo, la información al respecto es escasa.

1.1 Radicales libres

Los compuestos conocidos como RL son especies químicas, moléculas o átomos, que poseen al menos un electrón desapareado en su último orbital. Dicha condición les confiere un alto poder oxidante, por tanto, son capaces de reaccionar inmediatamente con múltiples biomoléculas pudiendo unirse con ellas y alcanzar un estado químico más estable. Por ejemplo, pueden robar un átomo de hidrógeno, unirse químicamente a otra molécula (Maldonado 2010; Solache, 2009). Un compuesto puede convertirse en RL captando o perdiendo un electrón, asimismo, pueden formarse cuando un enlace covalente se rompe de forma homolítica y cada electrón de la pareja compartida permanece en un átomo, tabla 2 (Königsberg, 2008).

Tabla 2. Formación de radicales libres. Modificada de Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri (2005).

Radical formado por la pérdida de un electrón de un no radical	$X \rightarrow e^- + X^{\bullet}$
Radical formado por la ganancia de un electrón de un no radical	$Y + e^- \rightarrow Y^{\bullet}$
Radicales formados por la ruptura de enlaces covalentes	$A: B \rightarrow A + B^{\bullet}$

Los RL se clasifican de acuerdo con el tipo de átomo del cual provienen. Así, hay especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) y especies reactivas derivadas del nitrógeno (ERN) (Gutiérrez, 2006). A su vez, cada una de ellas presenta varios tipos de RL o pro-radicales tal como se refiere en la tabla 3 (Hernández-Rodríguez *et al.* 2014; González-Torres *et al.* 2000). Por su parte, las ERN pueden o no ser RL. Algunos ejemplos de radicales son el óxido nítrico (NO•) y dióxido de nitrógeno (NO₂•), y de los no radicales son el catión nitronio (NO₂⁺) y peroxinitrito ONOO⁻, por mencionar algunos. Dentro de las ERN, el NO• es de gran importancia ya que es una molécula de señalización involucrada en numerosos procesos biológicos, sin

embargo, cuando se produce en exceso está implicada en proceso de citotoxicidad (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014; Chirino *et al.*, 2006).

Tabla 3. Principales especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno. Así como sus correspondientes pro-radicales. Tomada de Gutiérrez (2006).

Especies reactivas derivadas del oxígeno	
Radicales	No radicales
Superóxido (O₂•)	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)
Radical hidroxilo (•OH)	Ácido hipocloroso (HOCl)
Radical peroxilo (R-O ₂ •)	Ácido hipobromoso (HOBr)
Radical alcoxilo (RO•)	Ozono (O ₃)
Hidroperóxido (HO ₂ •)	Oxígeno singulete (¹ Δg)
Especies reactivas derivadas del nitrógeno	
Óxido nítrico (NO•)	Ácido nitroso (HNO ₂)
Dióxido de nitrógeno (NO ₂ •)	Catión nitrosilo (NO ⁺)
	Anión nitrosilo (NO ⁻)
	Tetróxido de dinitrógeno (N ₂ O ₄)
	Trióxido de dinitrógeno (N ₂ O ₃)
	Peroxinitrito (ONOO⁻)
	Ácido peroxinitroso (ONOOH)
	Catión nitrilo (NO ₂ •)
	Alquil-peroxinitritos (R-OONO)

En los tejidos sanos, las fuentes principales de RL son generados tanto a través de procesos fisiológicos propios del organismo como la respiración, metabolización y defensa; así como por factores ambientales. Por ejemplo, la contaminación, radiación, aditivos químicos, medicamentos, etcétera. Cuando los RL se encuentran en niveles basales intervienen en procesos importantes como la defensa frente a patógenos, la detoxificación de xenobióticos, la señalización celular, la agregación plaquetaria, entre otros (López y Porcal, 2014). El problema de los RL es su aumento descontrolado que desencadena en una condición denominada EO.

1.2 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidante

El EO ha cobrado importancia debido a las consecuencias que puede tener en la salud. El consumo constante de bebidas alcohólicas, de tabaco y de alimentos procesados, además de ser factores de riesgo para desarrollar algunas de las ECNT, contribuyen con la formación de RL (Figura 1). Sin embargo, el cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción entre la producción de pro-oxidantes como RL, ERO y ERN que se originan como resultado del metabolismo celular, y los sistemas de defensas antioxidantes (AOX) que incluyen enzimas y donadores de electrones encargados de eliminar y reducir los efectos de las ERO/ERN. No obstante, los AOX pueden ser sobrepasados por la generación excesiva de pro-oxidantes y en consecuencia se establece una condición de EO, llamado estrés nitrosativo cuando se origina por la sobreproducción ERN. En general, el EO puede ocasionar daños a biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos insaturados al modificar su estructura y su función biológica (Figura 2), lo que compromete la viabilidad celular y afecta a la salud; de esta forma es considerado componente central de diversas patologías (López y Porcal 2014; Dorado *et al.* 2003; Poljsak, 2001).

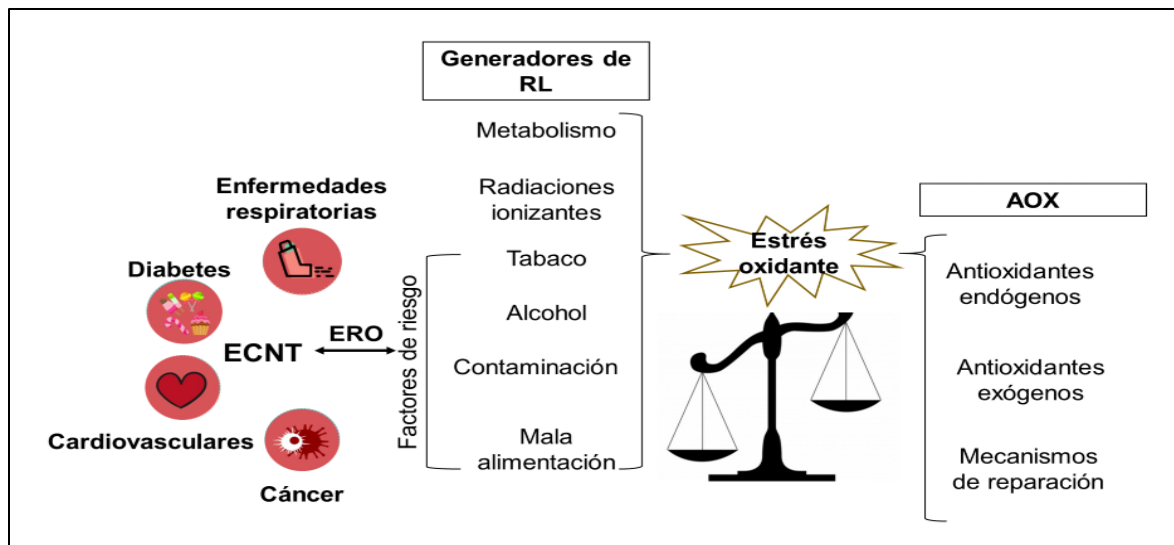


Figura 1. Balance REDOX y enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT). La producción de radicales libres (RL) se da por diferentes causas, ya sean del mismo metabolismo o por fuentes externas, sin embargo, los sistemas antioxidantes (AOX) se encargan de neutralizarlos. Cuando hay una condición de estrés oxidante (EO), la generación de RL puede contribuir con la progresión de las ECNT (Dominio propio).

La condición de EO en organismos vivos se evalúa mediante la utilización de marcadores bioquímicos de daños por oxidación a biomoléculas, por ejemplo, la peroxidación lipídica, la oxidación de aminoácidos en proteínas y ácidos nucleicos, así como con la capacidad antioxidante relacionada con la determinación de enzimas, entre otras. Uno de los principales marcadores utilizados para determinar que ha ocurrido oxidación de proteínas es el compuesto 3-NT (Souki *et al.*, 2007).

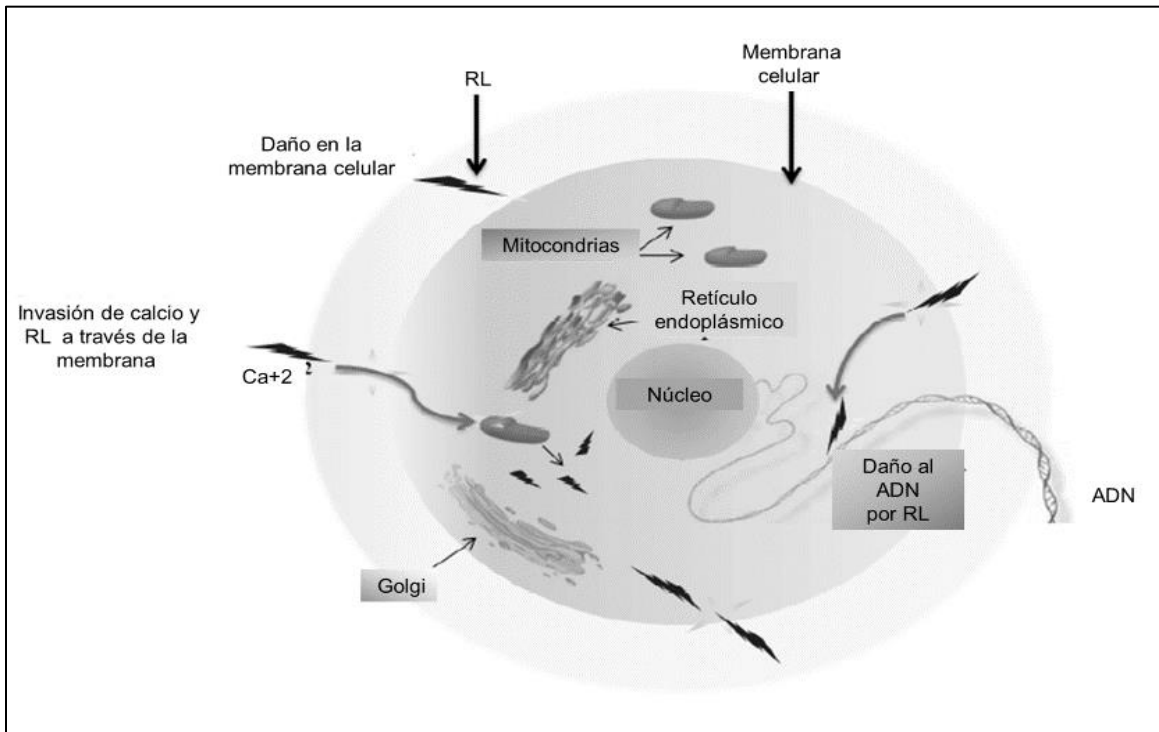


Figura 2. El daño celular es provocado principalmente por la peroxidación de lípidos de la membrana. Permitiendo la producción de radicales libres (RL) y el ingreso de calcio (Ca²⁺). Esto provoca daño por oxidación, simultáneamente se liberan más radicales libres al medio intracelular, los cuales provocan una reacción en cadena, oxidando a su paso proteínas, carbohidratos, lípidos de membrana, incluso el propio ADN. Modificada de Maldonado *et al.* (2010).

1.2.1 Formación de óxido nítrico (NO•)

Dentro del EO uno de los radicales que más atención ha tenido en los últimos años es el NO•, esta molécula es sintetizada por acción de la enzima óxido nítrico sintasa; la cual es una familia enzimática que se compone por tres isoformas que son: la sintasa neuronal (nNOS), la sintasa endotelial (eNOS) y la sintasa inducible (iNOS). Las tres isoformas generan NO• durante el proceso de conversión del aminoácido L-Arginina en L-Citrulina, obteniéndolo como co-producto de la reacción (Figura 3). Mientras que la nNOS y la eNOS producen NO• de forma constante hasta una concentración fisiológica del orden nanomolar, la iNOS se expresa en respuesta a un estímulo, generalmente de tipo pro-inflamatorio y produce NO• dentro del rango micromolar, superando mil veces el producido por las enzimas neuronal y endotelial (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014; Lozano-Juste, 2011; Cuellar *et al.*, 2010; García *et al.*, 2007). La naturaleza lipofílica del NO• permite que se difunda con gran facilidad a través de la membrana a células adyacentes, mediando así el mecanismo de señalización celular (Moncada *et al.*, 1991).

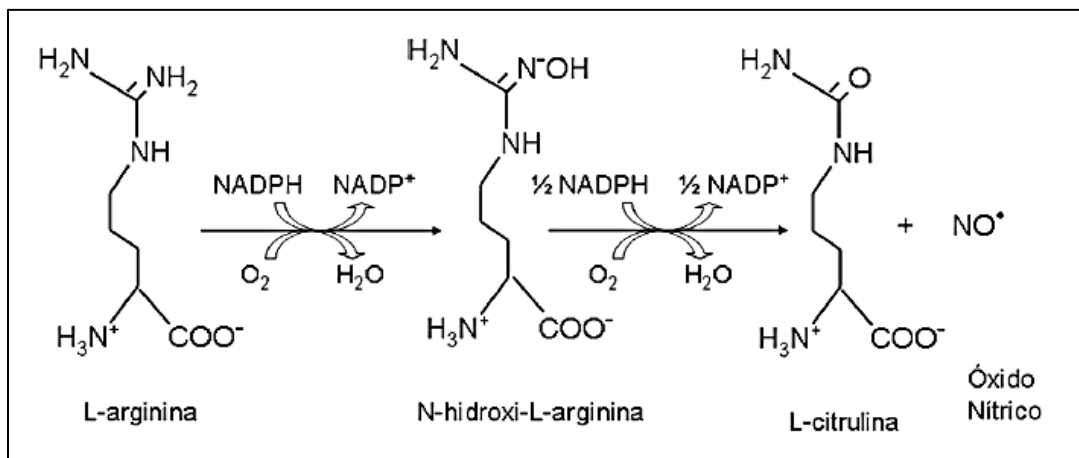


Figura 3. Producción biológica de NO• catalizada por óxido nítrico sintasa. A partir de L-arginina se produce NO• y L-citrulina. La reacción requiere NADPH y oxígeno molecular. Tomada de Cuéllar *et al.* (2010).

El NO• es considerado un mediador endógeno en diferentes procesos biológicos al participar en una gama amplia de procesos fisiológicos como la vasodilatación,

neurotransmisión, destrucción de patógenos, etcétera (Cuellar *et al.*, 2010; Rodríguez, 2008; García *et al.*, 2007; Carrizo, 1998, Kamisaki *et al.*, 1998).

A pesar de los efectos beneficiosos que el NO• tiene en el organismo, se debe tener en cuenta su papel como RL. El NO• es una molécula con un potencial REDOX alto, muy inestable y que puede reaccionar rápidamente (Figura 4), lo que implica que es capaz de oxidar especies dando lugar a la formación de compuestos radicales y no radicales denominados ERN (Carrizo, 1998). Desde este punto de vista el NO• es una molécula oxidante y reactiva, puede reaccionar con algunos derivados del oxígeno, produciendo compuestos tóxicos, como el peroxinitrito.

La sobreproducción de NO• puede alterar funciones claves en el organismo como la inhibición de la glicólisis porque es citotóxico a nivel de la cadena respiratoria ya que bloquea la síntesis de trifosfato de adenosina mitocondrial (ATPm) (Clementi *et al.*, 1998) o bien inhibe la enzima glutatión peroxidasa implicada en procesos antioxidantes (Asahi *et al.*, 1995). Así, bajo determinadas condiciones, se puede llegar a una muerte celular inducida por apoptosis. Otro ejemplo del daño de la producción descontrolada de NO• es la muerte neuronal en algunas zonas del cerebro, lo que ocurre en procesos neurodegenerativos (Cuellar *et al.*, 2010; García *et al.*, 2007).

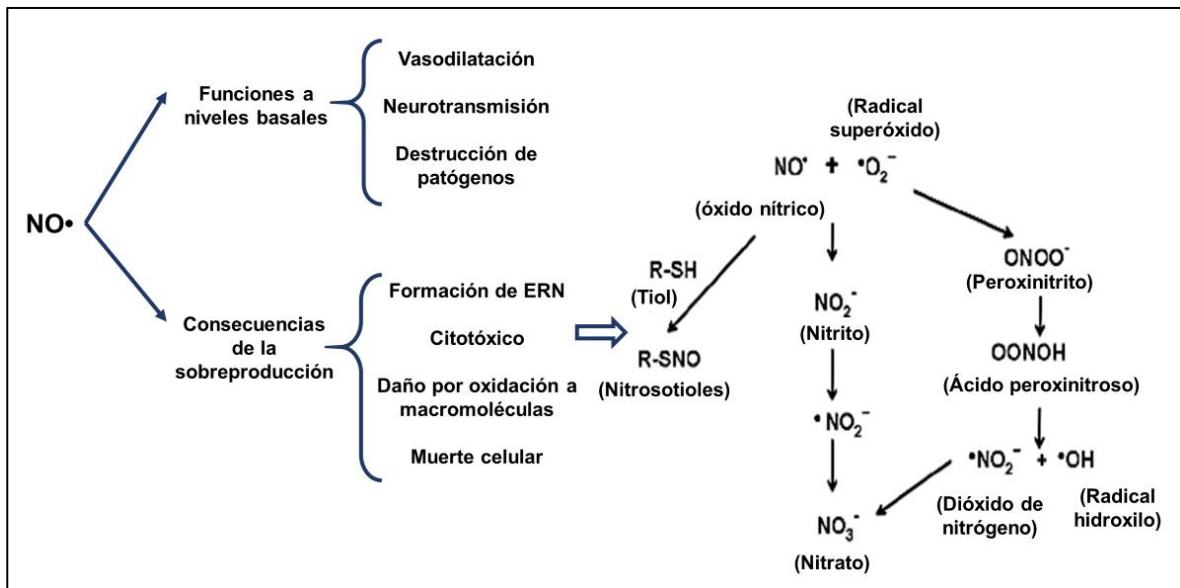
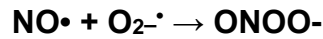


Figura 4. Óxido nítrico como mediador endógeno y su reacción con el radical superóxido. Modificado de Cuéllar *et al.* (2010).

1.2.2 Formación de peroxinitrito (ONOO-)

En lo que se refiere al ONOO-, es otra de las moléculas representativas de las ERN y se forma por la reacción entre el NO• y el anión superóxido (O₂^{-•}) (Ischiropoulos, 1998).



El ONOO- es un potente oxidante que atraviesa membranas celulares mediante canales aniónicos y puede causar la oxidación de moléculas como lípidos, proteínas y aminoácidos (cisteína, metionina, triptófano, fenilalanina, histidina y tirosina), iones metálicos, cofactores, etcétera. Además, estas modificaciones pueden inducir cambios conformacionales en sus estructuras causando la pérdida de sus funciones. Por ejemplo, el ONOO- puede inactivar enzimas como la superóxido dismutasa, que es una enzima antioxidante (Chirino *et al.*, 2006; Navarro-Antolín y Lamas, 2002). Asimismo, el ONOO- daña varias moléculas de la mitocondria, lo cual afecta la respiración celular, disminuye la síntesis de energía y afecta el metabolismo del calcio. Esta interacción finalmente desencadena el proceso de muerte celular conocido como apoptosis (Cuellar *et al.*, 2010; Radi *et al.*, 2000).

Si bien el ONOO- es un RL por sí misma, es capaz de producirlos mediante reacciones de homólisis formando radicales hidroxilo, dióxido de nitrógeno y trióxido de carbono, o bien por reacciones REDOX directamente con la oxidación de tioles y centros metálicos por transferencia monoelectrónica (Chirino *et al.*, 2006; Navarro-Antolín y Lamas, 2002).

Las principales reacciones en las que interviene el ONOO- son: a) oxidación de tioles con formación tanto de radical tío como de ácido sulfénico y disulfuro, b) peroxidación de lípidos, c) modificaciones en el ADN mediante cambios estructurales de sus bases, d) citotoxicidad, e) nitración en residuos de tirosina formando 3-NT. Lo que puede desencadenar señales que terminen en un proceso de apoptosis celular. Muchos estudios han considerado al ONOO- como una de las principales especies reactivas responsable de procesos neurodegenerativos en enfermedades como Alzheimer y Parkinson, junto con la formación de 3-NT (ver revisión de Campolo, 2013; Ferrer-Sueta y Radi, 2009; Chirino *et al.*, 2006).

1.3 Tirosina como blanco de oxidación de las ERN

Los residuos de aminoácidos más susceptibles de sufrir oxidación o nitración son cisteína, tirosina, metionina y triptófano. De todos estos, el que reacciona con más frecuencia con las ERN, particularmente del ONOO-, es la Tir de las proteínas. El ONOO- se forma por la reacción del radical $O_2^{\cdot-}$ con el NO^{\cdot} , luego reacciona rápidamente con la Tir para formar 3-NT, que se relaciona con procesos inflamatorios y la que constituye un reflejo de estrés nitrosativo (Ischiropoulos, 1998).

La tirosina es uno de los veinte aminoácidos estándar encontrados en las proteínas (Figura 5). Una de las características de este aminoácido es que posee una cadena lateral aromática (grupo fenol), que le confiere que sea relativamente apolar y pueda participar en interacciones hidrofóbicas. A su vez, el grupo hidroxilo (-OH) del grupo fenol puede formar puentes de hidrógeno y constituye un grupo funcional importante en algunas enzimas. Además de poseer los grupos funcionales ionizables característicos de los aminoácidos (grupos α -amino y α -carboxilo), el grupo fenol de su cadena lateral puede desprotonarse y encontrarse como fenolato, aportando una carga negativa extra. Su presencia en las proteínas es de aproximadamente un 3,2 %, y posee un índice hidropático de -1,3 (un valor negativo predice la tendencia de los aminoácidos a buscar un ambiente acuoso), lo que determina dentro de las proteínas que los residuos de Tir puedan encontrarse tanto expuestos al solvente como en zonas menos expuestas (Campolo, 2013; Radi, 2013; Murray *et al.*, 2005).

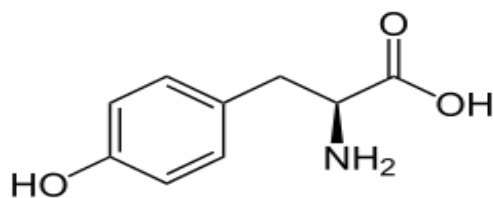


Figura 5. Estructura del aminoácido tirosina. Modificado de Campolo (2013).

El grupo fenol le otorga a la Tir dos roles especiales que contribuyen a la funcionalidad de diversas proteínas: por un lado, puede recibir grupos fosfato por medio de las proteínas cinasas específicas de Tir; por otro lado, los residuos de

dicho aminoácido pueden participar en procesos de transferencia electrónica, es decir, puede funcionar como intermediario formando un radical tirosilo tras la oxidación monoelectrónica del aminoácido. La respuesta celular a numerosas proteínas de señalización extracelulares involucra la fosforilación de residuos de Tir de ciertas proteínas. Ejemplos de esto, son las vías de señalización desencadenadas por factores tales como: la insulina, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento vascular endotelial, entre otros. Los receptores de membrana de estos mensajeros poseen dominios intracelulares con actividad tirosina-cinasa (se llaman por esto receptores tirosina-cinasa) que derivan en la fosforilación de residuos de Tir del propio receptor tras la unión del ligando. El reconocimiento de dichos residuos de Tir fosforilados por proteínas especializadas es el primer paso de una vía de señalización (Campolo, 2013; Radi, 2013; Nelson y Cox, 2006; Murray, 2005; Kamisaki, 1998).

1.4 Formación de 3-Nitrotirosina (3-NT)

Una vez que se ha generado la 3-NT en las proteínas por la oxidación de la Tir por ONOO-, esta modificación se considera irreversible, ya que en mamíferos no se ha descrito un sistema enzimático que pueda revertir o eliminar el grupo NO₂; por ello se le asocia con la alteración en la estructura y función de las proteínas, pues puede conducir a la pérdida o ganancia de funciones, modular la actividad catalítica de alguna enzima, afectar la susceptibilidad proteolítica y el sistema de transducción/señalización como la fosforilación de la Tir (Campolo, 2013; Corpas *et al.*, 2009; Kang y Akbarali, 2008; Kamikasi *et al.*, 2003; Navarro-Antolín y Lamas, 2002; Ischiropoulos, 1998). Las proteínas nitradas en la Tir son abundantes en los tejidos y células afectadas por alguna enfermedad, como en algunos trastornos inflamatorios como la colitis, en la aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedades neurodegenerativas, etcétera (Parcher *et al.*, 2007; Greenacre y Ischiropoulos, 2001; Kamikasi *et al.*, 1998). Para que las proteínas nitradas puedan volver a su estado normal se requieren de enzimas denitrasas que elimine el grupo nitro sin

degradar o hidrolizar a la proteína (Lozano-Juste, 2011; García *et al.*, 2007). Pero, hasta el momento no se ha logrado aislar una enzima denitrasa en mamíferos.

La nitración en Tir es una modificación covalente que resulta de la adición de un grupo nitro (-NO₂) en la posición orto respecto del hidroxilo fenólico (Figura 6) (Abello *et al.*, 2009; Souza, 2008).

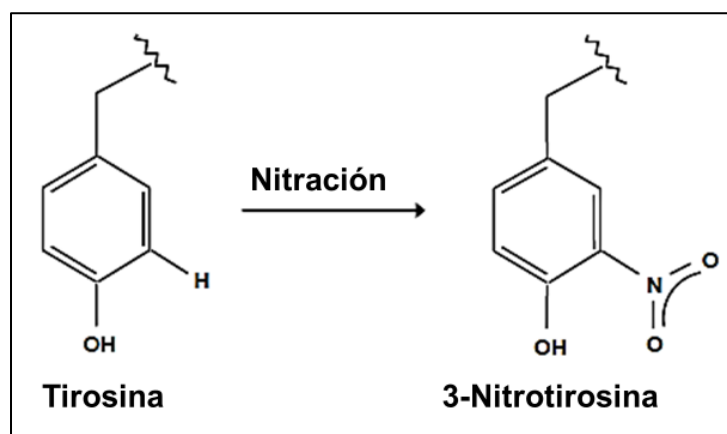


Figura 6. Formación de 3-NT. Modificado de Abello *et al.* (2009).

Esta nitración que ocurre post-traducción, es decir, después de que la proteína fue sintetizada, implica una modificación en la función proteica debido a que cambia el pKa de la Tir de 10-10.3 a 7.2-7.5 modificando así el punto isoeléctrico de la proteína. El grupo nitro es un sustituyente voluminoso, que puede generar restricciones estéricas a la proteína, siendo probable que este cambio sea el que reduzca la fosforilación del compuesto (Rojas, 2015; Campolo, 2013; Souza, 2008).

En conjunto, la nitración del anillo fenólico de la Tir puede crear restricciones estéricas locales, disparar cambios conformacionales de la proteína e impedir la fosforilación de la Tir. Además, el potencial de reducción estándar del par radical nitrotirosilo/nitrotirosina es 0.2 a 0.3 V más positivo que el del par radical tirosilo/tirosina, lo que es capaz de alterar los procesos de transferencia electrónica intramoleculares dependientes de Tir en proteínas (Campolo, 2013; Kamisaki, 1998).

1.5 Colitis

El conocimiento de RL, ERO/ERN ha permitido relacionar al EO directamente con diferentes padecimientos dentro del grupo de ECNT como Alzheimer, Huntington, Parkinson, diabetes, hipertensión, artritis, colitis, así como con diversas complicaciones cardíacas y renales; con la carcinogénesis y con el envejecimiento (Poljsak, 2001). En el presente estudio se propone a la colitis como modelo de estudio de una enfermedad crónica, debido a que mantiene predicciones desfavorables que van en aumento por una serie de complicaciones como lo son: su desarrollo y evolución con recaídas, su limitada eficacia médica, el deterioro de la calidad de vida de los pacientes, y porque se tiene mayor riesgo al padecerla de desarrollar cáncer colorrectal es casos extremos (Quera y Palma, 2008).

Además, la colitis se considera una enfermedad sistémica, es decir, puede asociar síntomas o complicaciones a nivel de otros órganos o sistemas. Al conjunto de estos síntomas se les denomina manifestaciones o complicaciones extraintestinales. Los principales órganos que pueden resultar con daño son los ojos, piel, articulaciones, los conductos biliares y el hígado. Estas afectaciones extraintestinales dependen de varios factores y se llegan a presentar en casos muy graves de colitis por malnutrición o como consecuencia de los fármacos, así deteriorando la calidad de vida de las personas pues incrementa la susceptibilidad a padecer otras enfermedades. De esta manera, dichas complicaciones se desarrollan de forma independiente de la colitis (Fortea y Marín-Jiménez, 2015).

La colitis es una de las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) crónicas más comunes junto con la enfermedad de Crohn; y es una enfermedad inflamatoria que afecta a la mucosa del colon. La enfermedad se inicia en el recto y de forma continua puede alcanzar una extensión variable en sentido proximal hasta el ciego (Figura 7). Los síntomas típicos incluyen diarrea con moco y sangre, dolor abdominal, pérdida de peso y fiebre en casos graves. Dicha enfermedad es crónica, pero puede mantenerse en remisión por periodos largos, acompañada o no de síntomas sistémicos (dependiendo de la extensión de la colitis y de la gravedad del brote) y/o de las manifestaciones extraintestinales (Vergara *et al.*, 2015).

En un estudio realizado por Namba *et al.* (2009) se menciona que en un modelo murino al que se le induce colitis con dextran sulfato de sodio (DSS) las ERO incrementan, pues el DSS causa daño epitelial e incrementa la respuesta inflamatoria en el colon. En condiciones normales las ERO y ERN intestinales tienen efectos bactericidas, pues participan en la defensa intestinal al haber una activación de macrófagos, linfocitos y neutrófilos como respuesta del sistema inmune. Sin embargo, una sobreproducción de estas moléculas resulta en una afección mayor al causar daño celular y tisular. Asimismo, exageran la inflamación y dan lugar a efectos de largo alcance como la carcinogénesis (Wang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2014; Rana *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2012).

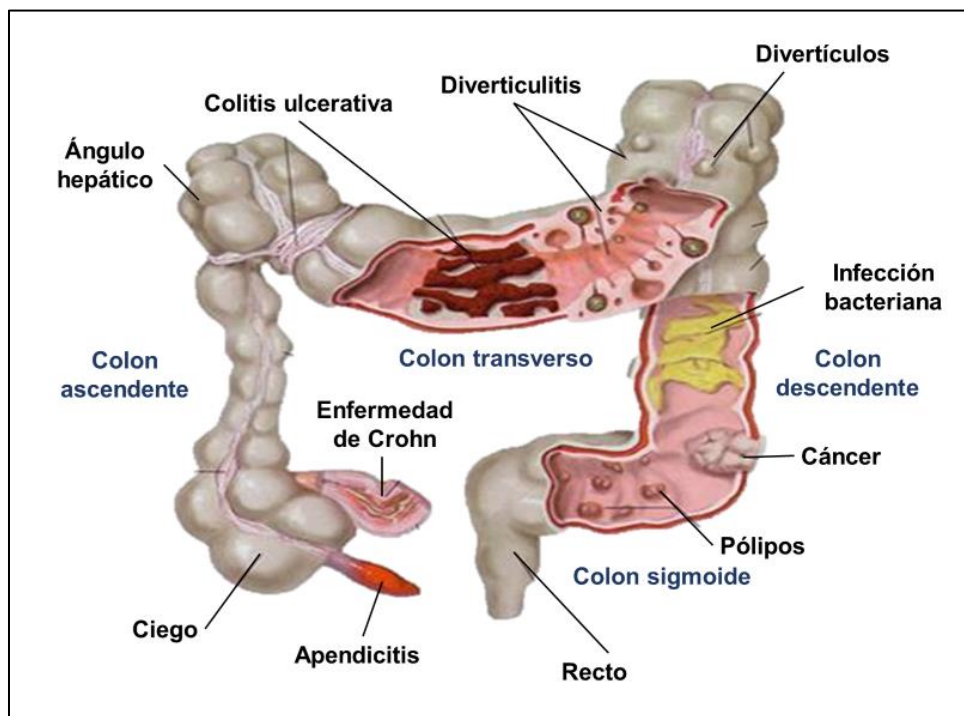


Figura 7. Esquema del daño por colitis en el humano (Imagen de dominio público).

Durante la colitis, la mucosa inflamatoria del colon, submucosa, y la lámina propia a menudo se infiltran con neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos. La infiltración de neutrófilos produce una gran cantidad de ERO, lo que provoca EO y la activación de enzimas proteolíticas. Las enzimas proteolíticas y las ERO actúan sobre las células endoteliales causando una lesión celular y la posterior permeabilidad de la barrera epitelial, lo que conlleva a la invasión de patógenos que

a su vez facilita la infiltración de células y daño inflamatorio. Finalmente, el resultado es la ulceración de la mucosa intestinal (Wang *et al.*, 2016).

La permeabilidad intestinal es un proceso biológico que incluye la interacción del sistema inmunitario con varias sustancias que se encuentran en la región luminal, así como su interacción con el hígado, que es regulada y dirigida en el tracto digestivo, esta interacción implica o conduce a una variedad de efectos metabólicos en el hígado. La interacción o el intercambio intestino-hígado se ha relacionado con la progresión de diferentes enfermedades, tanto hepáticas como del metabolismo general. Esta comunicación está determinada por procesos como inflamación local y sistémica, EO, señales de proliferación, apoptosis o fibrogenesis. Dentro de los factores internos que afectan la permeabilidad intestinal se cuentan entidades como la enfermedad de Crohn y la colitis, el síndrome metabólico y la obesidad (Gómez-Cortés *et al.*, 2015). Un ejemplo de las consecuencias del daño a la permeabilidad intestinal por la colitis y la generación de ERO en el intestino es la colangitis (Dohan *et al.*, 2015; Erkan, 2011). La colangitis es una enfermedad crónica del hígado que puede asociarse con la colitis ulcerosa y con otras enfermedades que implican infección del colón como las EII (Aguilar *et al.*, 2016; Chapman *et al.*, 2010).

1.6 Daños en hígado por EO

Como consecuencia del daño celular causado por el EO aumenta la patogénesis de muchas enfermedades hepáticas. El impacto de las ERO puede ser especialmente importante en el hígado debido a su gran exposición a concentraciones altas de oxígeno, ya que posee una velocidad metabólica alta, que lo hace un consumidor muy importante de esta molécula con gran capacidad oxidante (Gutiérrez y Morales, 2004).

El hígado es un órgano que tiene funciones diversas como participar en el metabolismo intermediario de carbohidratos, aminoácidos y lípidos, en la síntesis y secreción de varias proteínas del plasma, de lípidos y de glicolípidos. Entre ellas, las enzimas, así como las sales biliares, colesterol y algunas vitaminas. También almacena energía en forma de glucógeno. El hígado forma parte del sistema

endocrino al producir y degradar hormonas. Y es el primer órgano irrigado por la sangre proveniente del intestino, allí se lleva a cabo la regulación de los niveles de la mayoría de los componentes de la sangre pues actúa sobre numerosas sustancias tóxicas. Por esta razón se encuentra expuesto a sufrir daño por los efectos nocivos de patógenos, toxinas y ERO provenientes del intestino (Figura 8) (Aguilar, 2010).

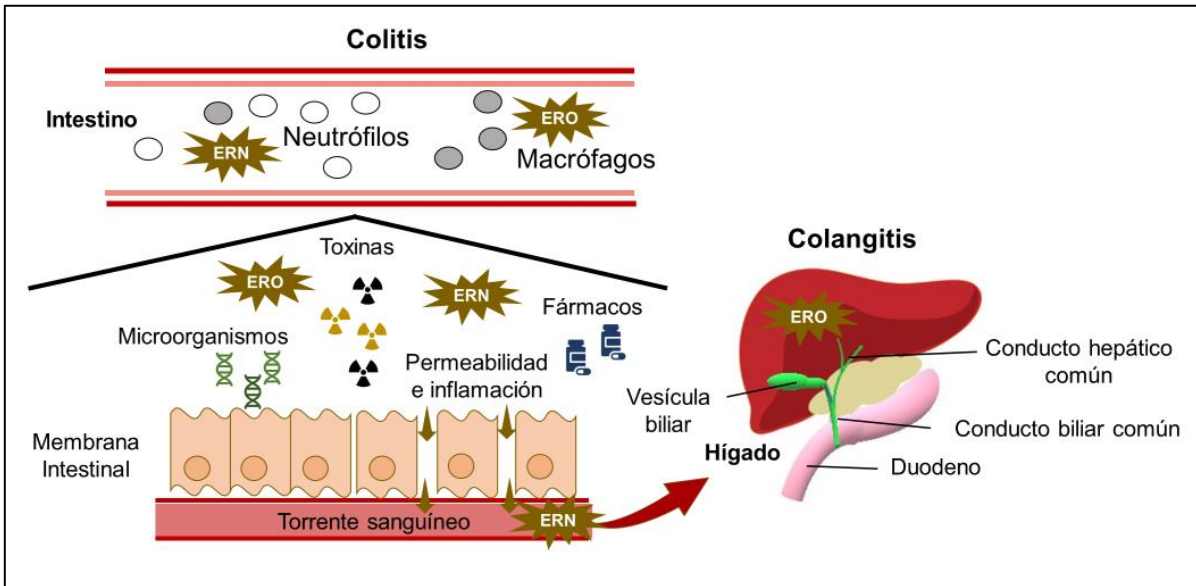


Figura 8. Incremento de ERO en colitis y su relación con la colangitis. Durante la colitis hay un incremento en la producción de células como neutrófilos y macrófagos que producen especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) como defensa intestinal. Sin embargo, la producción en exceso de estas moléculas puede provocar daños celulares y tisulares, aumentando la inflamación y la permeabilidad de la barrera intestinal. Lo que provoca un aumento exagerado de ERO y ERN que pueden llegar al hígado por el eje intestino-hígado (Dominio propio).

1.7 Enzimas denitrasas en *Debaryomyces hansenii*

En síntesis, el EO es causante de la progresión y patogenicidad de algunas ECNT. Sin embargo, las enzimas denitrasas son capaces de revertir la oxidación de la Tir. Los estudios de las enzimas denitrasas como el realizado por Kwo *et al.* en 1999, indican que la nitración de la Tir inhibe la fosforilación de péptidos. No obstante, dicho daño puede revertirse mediante la actividad específica de estas enzimas. Además, la nitración de las proteínas es suficiente para inducir la eliminación

acelerada de estas por el proteasoma, pero no del producto 3-NT (Souza *et al.*, 2003). Aunque únicamente en las bacterias *Variovorax paradoxus* (*V. paradoxus*) cepa JS171 y *Burkholderia* sp. cepa JS165 se han descrito genes que codifican para este tipo de enzimas (Nishino y Spain, 2006), hay poca evidencia de la existencia de las enzimas denitrificasas en animales y posible reacción.

Los organismos eucariontes adaptados a condiciones extremas del ambiente, son una buena fuente para la búsqueda de genes implicados en la desintoxicación de biomoléculas oxidadas, ejemplo de ello es la levadura extremo-halotolerante *Debaryomyces hansenii* (*D. hansenii*), es decir, puede crecer sin sodio y en medios con altas concentraciones de sales, normalmente habita en aguas marinas y en lugares con baja actividad hídrica donde su tolerancia salina es una ventaja. En los últimos años, la importancia de dicho organismo ha incrementado pues se han encontrado diversas aplicaciones en la industria alimenticia como la producción de lácteos, y en aplicaciones biotecnológicas debido a la capacidad para soportar condiciones extremas tales como temperaturas bajas y pH elevado (Michán *et al.*, 2012; Cabrera-Orefice *et al.*, 2010; Navarrete *et al.*, 2009).

El presente estudio se enfoca en uno de los mecanismos que posee *D. hansenii* para sobrevivir en ambientes de estrés salino. Durante este tipo de estrés, Calderón-Torres *et al.* (2011) reportaron niveles altos de ERO, sin embargo, también reportaron que el gen *DhARO4* participa en la disminución de estos compuestos, este codifica para la primera enzima de la síntesis de aminoácidos aromáticos, específicamente la Tir. La Tir puede neutralizar el efecto de las ERN como el ONOO- convirtiéndola en 3-NT, además dichos autores mencionan que *D. hansenii* posee la actividad de la enzima denitrificasa y es capaz de asimilar a la 3-NT como única fuente de nitrógeno (Castro *et al.*, 2017).

2. Antecedentes

La generación de ERO está involucrada en una variedad de mecanismos intracelulares. El rol protector que juegan los radicales durante la colitis en el intestino se relaciona con un incremento de células inmunológicas como macrófagos (Li *et al.*, 2014), neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos. Sin embargo, cuando hay una sobre producción de las ERO pueden dañar la barrera intestinal y provocar la infiltración de dichas moléculas y microorganismos al torrente sanguíneo (Wang *et al.*, 2016). Asimismo, durante la colitis hay aumento en la expresión de la enzima NADPH oxidasa específicamente de NOX 1 (Kato *et al.*, 2016) descrita en macrófagos y neutrófilos, cuya función primaria es producir ERO como medida de señalización celular para proteger la barrera de la mucosa intestinal de patógenos. También estimula células del colón y promueve su restauración (Mouzaoui *et al.*, 2014). Sin embargo, NOX 1 también juega un papel antagónico pues su producción en exceso provoca lesiones epiteliales e inflamación crónica, lo que puede aumentar el riesgo de tener cáncer intestinal (Ramonaitė *et al.*, 2014).

Por otra parte, la colitis es una enfermedad que puede presentar manifestaciones extraintestinales con una frecuencia del 30% de los casos. Uno de los órganos comúnmente afectados es el hígado. Las consecuencias hepatobiliares por una colitis aguda pueden ser: colelitiasis, colangitis esclerosante primaria (CEP), esteatosis hepática, hepatitis autoinmune, amiloidosis hepática, etcétera (Aguilar-Sánchez *et al.*, 2016), mientras que, de estos la presencia de colangitis es más frecuente (Chapman *et al.*, 2010). Loftus *et al.* (2005) mencionaron que la CEP podría ser un factor de riesgo independiente para desarrollar displasias o cáncer colorrectal en pacientes con colitis.

El EO es un factor importante durante la colitis y la nitración de las proteínas. La formación de 3-NT es una modificación postraducciona capaz de alterar la función de proteínas que se asocian a estados de enfermedades agudas y crónicas, o bien, puede funcionar como un indicador de riesgo de enfermedad. La nitración de la Tir tiene consecuencias sobre la función de las proteínas como la pérdida o ganancia

de función, o bien, que no ocurran efectos sobre esta (Souza *et al.*, 2008). Los factores principales de este fenómeno dependen de la estructura proteica, el mecanismo de nitración y el ambiente en el cual se localiza la proteína (Campolo, 2013).

En algunas enfermedades asociadas con el estrés nitrosativo (EN) se identifican niveles altos de 3-NT, por ejemplo, en desórdenes inflamatorios, neurodegenerativos, cardiovasculares, entre otros (Teixeira, 2016). Sin embargo, algunos estudios mencionan que la nitración de las proteínas puede ser un proceso reversible relacionado con la señalización celular, pues podría jugar un papel similar a la fosforilación y desfosforilación de la Tir, pero por enzimas denitrasas con el compuesto 3-NT. También mencionan que el epítipo de la 3-NT es eliminado por dichas enzimas de las proteínas sin eliminarlas o hidrolizarlas (Kamikasi *et al.*, 1998), pero las enzimas y el mecanismo de acción son desconocidos. Asimismo, indican que las proteínas oxidadas en sus Tir son degradadas por el proteasoma, pero el epítipo nitrado permanece.

La actividad de las denitrasas se ha identificado en las bacterias *Burkholderia* sp. JS165 y *V. paradoxus* JS171 por Nishino y Spain en 2006. Los datos que reportan señalan que estas bacterias pueden crecer en medios donde la 3-NT es la única fuente de nitrógeno hasta 5 y 2 mM respectivamente. También mencionan que la disminución de 3-NT conduce a un incremento en la concentración de nitritos y amoníaco en el medio.

En la levadura extremófila *D. hansenii* Calderón-Torres *et al.* (2011) reportaron que la expresión del gen *DhARO4* aumentaba durante estrés salino al igual que la actividad específica de la enzima *DhAro4p*. Sin embargo, no aumenta la concentración de dicho aminoácido, pero sí aumenta la concentración de 3-NT. Por esta razón, se sugiere que la Tir recién sintetizada es rápidamente oxidada a 3-NT como un mecanismo para disminuir los niveles de las ERO que se forma durante la exposición de las levaduras a NaCl 2M (Calderón-Torres *et al.*, 2006). Sin embargo, quedaba pendiente que hacía la levadura con el compuesto oxidado 3-NT, fue en el trabajo de Castro *et al.* en 2017, que reportaron que la levadura puede

crecer en presencia de 10 mM de 3-NT como única fuente de nitrógeno, es decir que lo asimila y también reportaron *in vitro*, que los extractos de proteínas totales tienen actividad de denitrasa al añadir 3-NT comercial. Así, proponen que *D. hansenii* tiene genes que codifican para enzimas denitrinasas en la levadura.

La degradación de 3-NT por las enzimas denitrinasas en *D. hansenii* después de crecer en estrés salino, da pauta a nuevas investigaciones sobre la eliminación de proteínas nitradas en enfermedades degenerativas como el modelo propuesto de daño a hígado por colitis.

3. Justificación

El progreso de varias enfermedades ha sido asociado con el EO, pese a que existen compuestos para prevenir y reducir los efectos de las ERO como vitaminas, enzimas, entre otros antioxidantes, sin embargo, son escasos los estudios sobre compuestos que reviertan el daño cuando la oxidación de biomoléculas ya ocurrió, específicamente sobre la formación del compuesto 3-NT. El conocimiento de las enzimas denitrasas de la levadura *D. hansenii* podría permitir aclarar el papel de la 3-NT en mamíferos.

4. Planteamiento del problema

La formación y acumulación del compuesto oxidado 3-NT resulta en afecciones mayores. Sin embargo, la levadura *D. hansenii* cuenta con genes de enzimas denitrasas, que se transcriben durante estrés salino para asimilar la 3-NT. La función de estas enzimas es eliminar el grupo nitro de la 3-NT sin degradar o hidrolizar a la proteína. El planteamiento de este trabajo es el siguiente: ¿Es posible que la concentración de 3-NT disminuya en los extractos de proteínas totales en los hígados de los ratones enfermos de colitis después de estar expuestas a las denitrasas de los extractos proteicos de *D. hansenii*?

5. Hipótesis

Los estudios de *D. hansenii* indican que mantiene niveles altos de ERO al ser sometida a estrés salino, sin embargo, para evitar el daño a sus proteínas sintetiza Tir libre, la que es oxidada y resulta en 3-NT. Por ello cuando esta levadura es cultivada en 3-NT como única fuente de nitrógeno, puede crecer sin ningún problema. Lo que lleva a suponer que la concentración de 3-NT presente en los extractos de proteínas de hígado de *M. musculus* enfermo de colitis disminuirá al agregar los extractos proteicos de *D. hansenii* debido a la actividad de las enzimas denitrasas de la levadura.

6. Objetivo general

Evaluar la actividad de la enzima denitrasa presente en los extractos proteicos de la levadura *D. hansenii* en proteínas de hígado de *M. musculus* con colitis.

1.6 Objetivos particulares

1. Comparar los niveles de ERO en los extractos proteicos de hígado de *M. musculus* con y sin colitis.
2. Cuantificar los niveles de 3-NT en las proteínas de hígado de *M. musculus* con y sin colitis
3. Determinar y analizar la concentración de 3-NT en las proteínas de hígado de ratón sin exposición y después de estar expuestas a las denitrinasas de *D. hansenii*.
4. Determinar y comparar la concentración de nitritos de los extractos de hígado de *M. musculus* con y sin colitis, antes y después de la incubación con los extractos de la levadura.

7. Materiales y métodos

7.1 Extractos de proteínas totales de hígado de *M. musculus*

Los hígados de ratones (*M. musculus*) con y sin colitis fueron donados por el laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Investigación en Biomedicina, de la FES-Iztacala. La inducción de colitis se realizó de acuerdo con el modelo propuesto por Ledesma *et al.* (2015), con ratones de la cepa BALBc (Envigo México). Se asignaron dos grupos: el grupo Control que recibieron alimento y agua *ad libitum* y el grupo Colitis a los que se les administró DSS al 4% en el agua durante diez días. Ambos grupos se sacrificaron el décimo día mediante asfixia en una cámara de CO₂. Rápidamente se extrajeron los hígados, se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron en refrigeración a -70 °C hasta su uso.

Para la extracción de proteínas totales se tomaron 200 mg de tejido de hígado, los cuales fueron macerados con un micro homogeneizador de teflón, 500 µL con buffer de fosfatos 10 mM (PBS 1x) y 5 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PFMS) 100 mM como inhibidor de proteasas, todo se realizó en hielo. Luego del macerado, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos eppendorf nuevos.

7.2 Cuantificación de ERO en hígado de *M. musculus*

La concentración de ERO se determinó en los extractos de hígado de *M. musculus* con y sin colitis de acuerdo con el método de Hempel *et al.* (1999). El cual determina la producción de ERO mediante la reacción de peróxido de hidrógeno con el compuesto 2' 7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA). El DCFH₂-DA se incorpora en las células donde es convertido por acción de esterasas intracelulares en 2' 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂); que a su vez es oxidado por peróxido de hidrógeno convirtiéndose en 2' 7'-diclorofluoresceína (DCF). La DCF es un compuesto fluorescente. Por lo que se tomaron lecturas en un espectrofotómetro de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 580 nm, cada 10 minutos durante una hora. El incremento de

fluorescencia obtenido se calculó a partir de la intensidad de señal emitida por cada extracto y fue empleado como índice de generación de ERO.

7.3 Cultivos de *D. hansenii*

Los cultivos de *D. hansenii* se hicieron con la cepa CBS 767, en el medio enriquecido YPD (extracto de levadura 1%, peptona 1% y glucosa 2%). A los cultivos con tratamiento de estrés salino se les añadió cloruro de sodio (NaCl) 1M y 2M. Primero se hicieron pre-cultivos en medio YPD, los cuales se mantuvieron a 28 °C en agitación constante (250 rpm) durante 24 horas. Una vez que las células se encontraban en la fase estacionaria se tomaron alícuotas de estos para inocular los medios con valor de densidad óptica (DO) de 0.01 a 0.2 (Calderón-Torres *et al.*, 2006). Una vez que los cultivos alcanzaron una DO de 0.8 a 1 se colectaron las células por centrifugación a 3,500 rpm 5 min. Todo se realizó bajo condiciones de esterilidad (Michan *et al.*, 2012; Cabrera-Orefice *et al.*, 2010; Navarrete *et al.*, 2009).

7.4 Extractos de proteínas totales de *D. hansenii*

Los paquetes celulares de la levadura colectados por centrifugación fueron resuspendidos en un volumen mínimo del medio de cultivo y se transfirieron a tubos eppendorf previamente pesados, los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm 1 min, el sobrenadante de cada tubo se descartó. Cada tubo eppendorf con el paquete celular se pesó para obtener el peso en mg de levadura. El paquete celular de cada tratamiento se lavó con 1 mL de PBS 1x a 4°C. Después se centrifugó a 13,000 rpm 30 seg, el sobrenadante se descartó y se les añadió PBS 1x (1:1), PFMS 100 mM (1%) y perlas de vidrio; todo a 4°C. Las células se rompieron en vórtex durante 30 segundos y se colocaron en hielo durante otro minuto, este procedimiento se repitió seis veces. Después del rompimiento celular los tubos se conservaron en hielo durante 3 min y se centrifugaron a 13,000 rpm 3 min, el sobrenadante se colocó en tubos eppendorf nuevos.

7.5 Cuantificación de proteínas totales

La determinación de la concentración de proteínas totales de los extractos, tanto de levadura como de los hígados de *M. musculus* con y sin colitis, se realizó mediante espectrofotometría de luz ultravioleta, para ello se construyó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) y fue leída a una longitud de onda de 280 nm. Las concentraciones de las proteínas en ambos extractos fueron calculadas a partir de una curva patrón de BSA (Apéndice I).

7.6 Incubación de los extractos proteicos de los hígados con los extractos proteicos de *D. hansenii*

Una vez conocida la concentración de proteínas de cada uno de los extractos de hígado y de levadura se calculó el volumen de las muestras para tener 200 µg·ml de proteínas en una proporción de 1:1 para cada tratamiento. Las combinaciones de los tratamientos se muestran en la figura 9. La reacción entre los extractos fue a temperatura ambiente durante 30 min y luego las muestras se congelaron para mantenerse a -70 °C hasta su uso. Para cada ensayo se realizaron tres repeticiones.

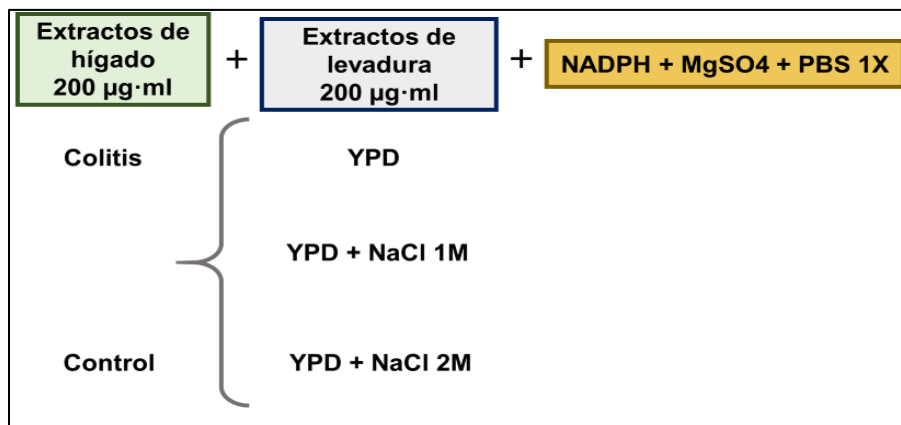


Figura 9. Combinación y reacción de los extractos proteicos de hígado y de *D. hansenii*. Las combinaciones fueron: extracto de proteínas de hígado de *M. musculus* con colitis con los extractos de proteínas de *D. hansenii* crecida en YPD, YPD + NaCl 1M, y YPD + NaCl 2M. También se realizaron estas combinaciones para los extractos de hígado de ratón sin colitis; así mismo a cada muestra se le añadió 3.7 µl de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH) como co-factor de las denitrasas y sulfato de magnesio (MgSO₄), después se ajustó el volumen a 100 µl con PBS 1x.

7.7 Cuantificación de 3-NT por ELISA

Las proteínas modificadas con 3-NT de los extractos proteicos de hígado tanto del grupo control como los del grupo colitis, se determinaron antes y después de la incubación con los extractos de la levadura (YPD, YPD + NaCl 1M y 2M). La concentración de 3-NT fue cuantificada mediante un ensayo de ELISA de reconocimiento del anticuerpo primario de dicha molécula (Ab116691, ABCAM), la cual viene inmovilizada en una placa de 96 pozos. La cuantificación del compuesto se hizo con una curva estándar de BSA nitrada siguiendo las recomendaciones del manual de ABCAM (Apéndice II). De cada muestra se tomó una alícuota que se añadió a cada pozo de la placa y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo 3-NT y que cambia de color cuando se le añade el sustrato peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase* o HRP por sus siglas en inglés). La placa se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 600 nm.

7.8 Cuantificación de nitritos

La concentración de nitritos en los extractos de hígado de las muestras control y colitis se determinó antes y después de la incubación con los extractos de la levadura (YPD, YPD + NaCl 1M y 2M), para ello se empleó un sistema comercial de ensayo colorimétrico de la reacción de Griess. Los reactivos de Griess, en este caso sulfanilamida reacciona con los nitritos y en presencia de *n*-(1-naftil)-etilendiamina forman una sal de diazonio de color violeta, éste es un cromóforo capaz de absorber energía o luz visible, por lo que el aumento de la coloración violeta aumenta la lectura de absorción a una longitud de onda de 545 nm, también se realizó una curva estándar de nitrito (Apéndice III).

7.9 Análisis estadístico

Para determinar las diferencias estadísticas de ERO de los tratamientos se compararon las medias mediante la prueba de *t*-Student considerando valores con diferencias significativas cuando $p < 0.05$ (*P value*), mientras que para comparar los

valores de la concentración de 3-NT y de nitritos, se utilizó la prueba estadística de Mann-Whitney con $p < 0.05$ en Excel.

Modelo de trabajo

En este trabajo proponemos como modelo de estudio de la actividad de denitrasa de la levadura, para revertir la oxidación de 3-NT, lo siguiente que en *D. hansenii* crecida en estrés salino, se producen en exceso ERO y ERN y en respuesta se sintetiza Tir libre como fuente antioxidante para evitar el daño a sus proteínas, incrementando la concentración de 3-nitrotirosina (3-NT) (Figura 10). Por otra parte, el hígado de *M. musculus* con colitis también presenta niveles altos de ERO a causa de la enfermedad, así aumentando las posibilidades de formar 3-NT en las proteínas de dicho órgano. No obstante, los extractos de la levadura que tienen actividad de denitrasa tendrán la capacidad de revertir el daño ocasionado por estrés oxidante en las proteínas del hígado.

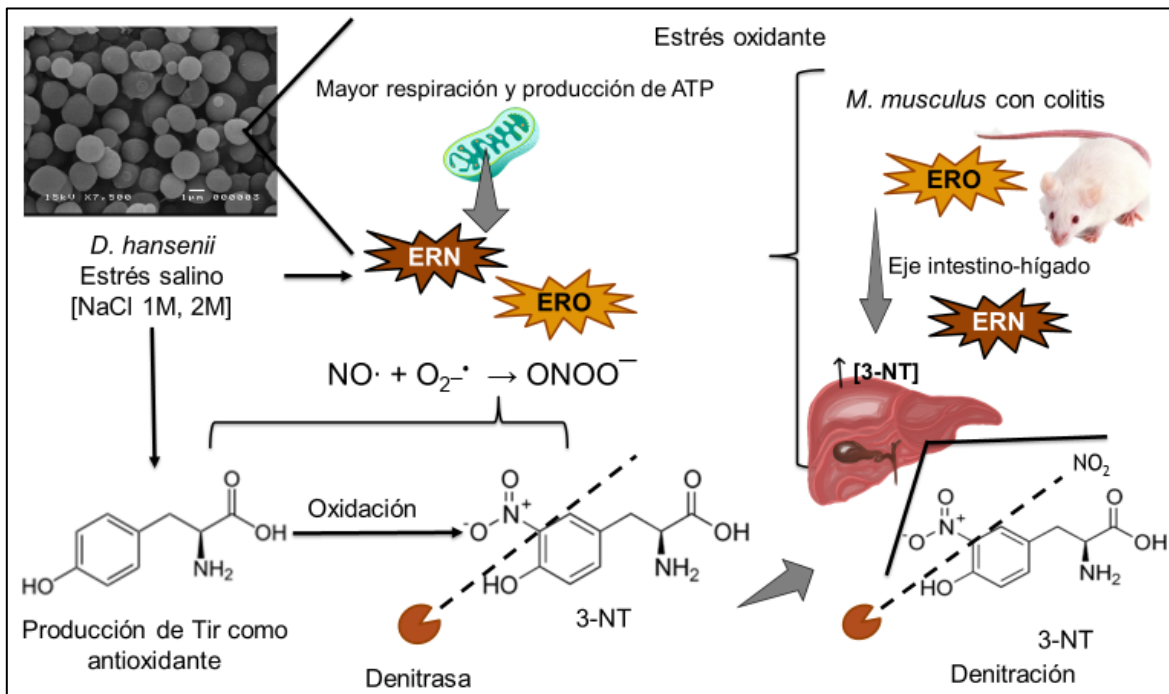


Figura 10. Modelo de trabajo. Actividad de denitrasa de la levadura *Debaryomyces hansenii* para disminuir 3-NT en hígados de ratón con colitis (Dominio propio).

8. Resultados

8.1 Niveles de ERO en extractos de proteína de hígados de *M. musculus* con y sin colitis

Las ERO determinadas en los extractos proteicos de los hígados de ratón con y sin colitis que se presentan en la figura 11, corresponden al promedio de los datos a los 60 min de la reacción de peróxido de hidrógeno con DCFH₂-DA en los extractos proteicos de los hígados de *M. musculus* del grupo control (n=4) y del grupo colitis (n=5).

Las ERO son mayores en los extractos de los hígados pertenecientes a los organismos con colitis comparados con los organismos que no tenían la enfermedad. Las diferencias de los valores que indican la generación ERO, son evidentes entre las muestras de los ratones sin y con colitis ya que entre ambas muestras hay una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de 98.87 unidades relativas de fluorescencia (URF), así, se sugiere la presencia de una condición de EO en el hígado de un ratón enfermo de colitis. Para observar las lecturas de las ERO de las muestras CN y DSS desde el tiempo cero observe el apéndice IV.

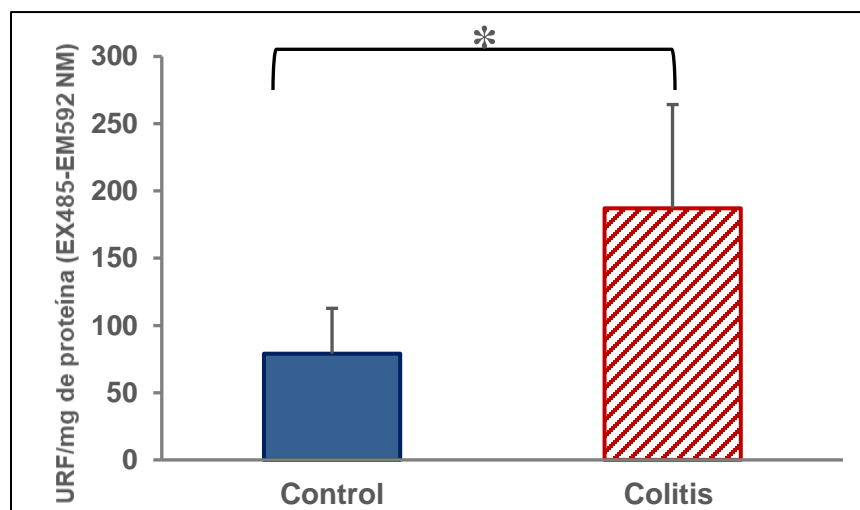


Figura 11. Niveles de ERO en extractos de hígado de *M. musculus* sin colitis (n=4) y con colitis (n=5) a los 60 minutos de reacción con el compuesto DCFH₂-DA. Los resultados son expresados como media \pm SD. (*) Representa diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$, t-Student).

8.2 Niveles de 3-NT en extractos de hígado de *M. musculus* con y sin colitis sin en tratamiento de *D. hansenii*

Al observar que en los hígados de los ratones enfermos de colitis había niveles mayores de ERO, se decidió determinar la presencia de 3-NT como marcador de EO, específicamente al ocasionado por la oxidación de la Tir de las proteínas en las muestras de hígado de ratones sanos y enfermos de colitis.

En la figura 12 se presentan los resultados de la cuantificación de 3-NT y se observa que los niveles de 3-NT son mayores en los hígados de los organismos con colitis (78.13 ng/mL) al ser comparados con los datos de los organismos sanos (36.81 ng/mL). Sin embargo, al comparar las muestras con la prueba de Mann-Whitney no hay diferencias estadísticamente significativas.

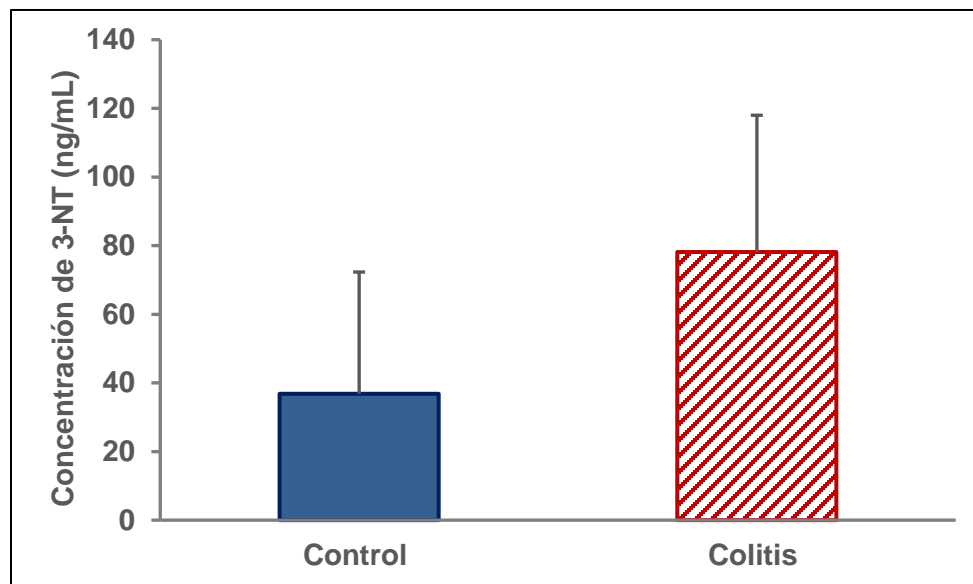


Figura 12. Niveles de 3-NT en proteínas de hígado de *M. musculus* sin colitis ($n=3$) y con colitis ($n=3$). Los resultados son expresados como media \pm SD.

8.3 Concentración de proteínas con 3-NT en hígado de *M. musculus* con el tratamiento de *D. hansenii*

Para determinar la capacidad de denitrasa de *D. hansenii*, se midió la concentración de 3-NT en los extractos proteicos de los hígados de *M. musculus* con y sin colitis, concentración que también se cuantificó después de ser incubados cada uno con los extractos de la levadura crecida en medio YPD, YPD + NaCl 1M y 2M. En la

figura 13 se observa que la concentración de 3-NT en las muestras de hígado de ratón con colitis (64.7 ng/mL) es más alta en comparación con las muestras sin colitis (43.83 ng/mL) ambas incubadas con los extractos de la levadura crecida en YPD, además la diferencia de las concentraciones fue significativa con la prueba de Mann-Whitney ($p < 0.05$). Asimismo, se observa que hay una concentración menor de 3-NT en los extractos de las muestras de colitis cuando se incubaron en el extracto NaCl 1M: 33.88 y NaCl 2M: 26.77 ng/mL comparadas con las muestras control 54.5 y 49.8 ng/mL, respectivamente. Ambas incubadas con los extractos de *D. hansenii* cultivada en medio YPD NaCl 1M y 2M. Sin embargo, al ser comparadas estadísticamente con la prueba de Mann-Whitney, únicamente las muestras que corresponden a la incubación con los extractos de la levadura crecida en YPD + NaCl 2M resultaron significativas.

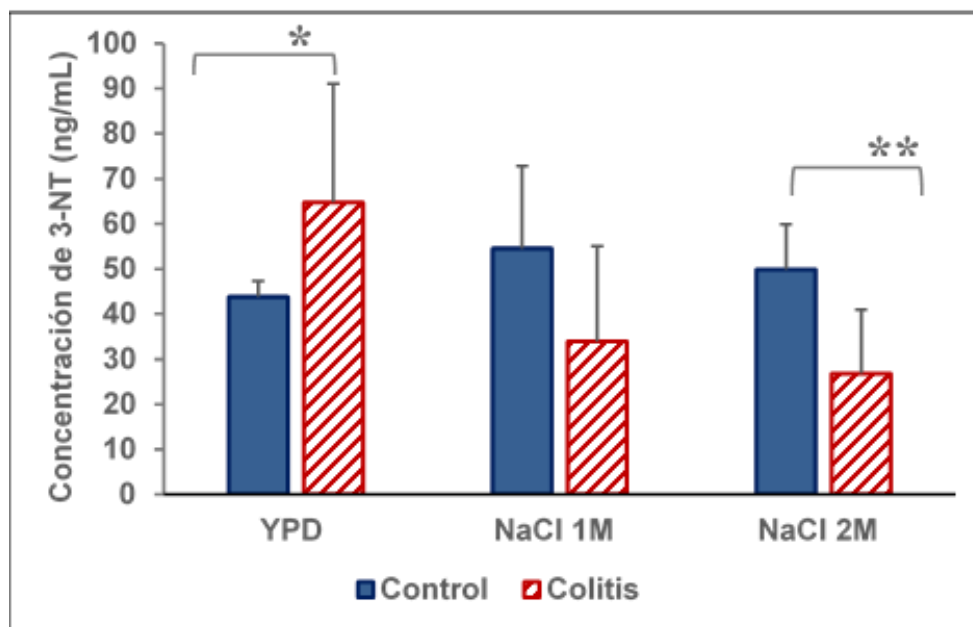


Figura 13. Niveles de 3-NT en proteínas de hígado de *M. musculus* sin colitis ($n=3$) y con colitis ($n=3$) después de la incubación con los extractos de *D. hansenii* (cultivada en medio YPD, YPD+NaCl 1M y YPD+NaCl 2M). Los resultados son expresados como media \pm SD. (* y **) Representan diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$ y $p < 0.001$ respectivamente).

8.4 Concentración de nitritos en extractos de hígado de *M. musculus* con y sin colitis sin extractos proteicos de *D. hansenii*

Los datos que corresponden a la concentración de nitritos presentes en las muestras de los grupos control y colitis después de la incubación con los extractos de *D. hansenii* se muestran en la figura 14. En el trabajo de Nishino *et al.* (2006) se reportó que en la reacción de las enzimas denitrinasas sobre el compuesto 3-NT provoca la reducción de este compuesto, de esta forma se libera nitrito como producto final.

Por lo anterior y para verificar que en las incubaciones con los extractos de proteínas totales de *D. hansenii* se produce nitrito, se midió este último y se observó que aumentó la concentración de esta molécula en los extractos de las muestras control y colitis incubadas con cada uno de los extractos de la levadura.

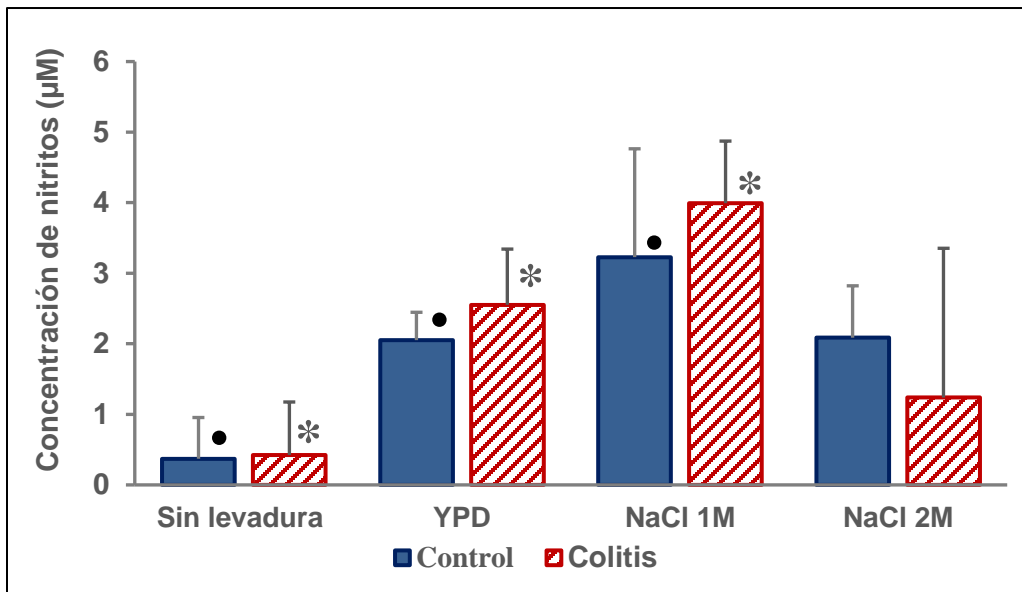


Figura 14. Niveles de nitritos en los extractos de proteínas de hígado de *M. musculus* sin colitis ($n=4$) y con colitis ($n=5$) después de ser expuestas a los extractos de *D. hansenii* crecida en YPD, YPD + NaCl 1M y 2M. Los resultados son expresados como media \pm SD. (* y *) Representan diferencias significativas entre los grupos ($p<0.05$).

En la figura 14 se observa que las concentraciones de nitritos fueron significativamente diferentes con la prueba de Mann-Whitney, entre los grupos

colitis incubados con los extractos de la levadura cultivada en medio YPD (2.55 μM) y YPD + NaCl 1M (3.99 μM) comparados con las muestras de colitis sin ningún extracto de *D. hansenii* (0.4245 μM). Asimismo, hay diferencias significativas entre los extractos control incubados con los extractos de la levadura crecida en YPD (2.05 μM) y YPD + NaCl 1M (3.22 μM) contra las muestras control sin extractos de levadura (0.3705 μM). Con lo anterior se corrobora que la reducción de 3-NT observada aumentó la concentración de nitritos.

9. Discusión

9.1 Niveles de ERO en extractos de proteína de hígados de *M. musculus*

Dentro de las células se forman ERO y ERN en diferentes organelos, principalmente en las mitocondrias a partir de la cadena respiratoria, en los peroxisomas y en el citosol. De esta manera, una de las células donde hay mayor producción de RL derivados del oxígeno es el eritrocito. Mientras que los órganos que producen mayores concentraciones de RL son: el cerebro, el hígado y el riñón, debido a que presentan un metabolismo alto (Gutiérrez, 2006). El presente trabajo resalta la producción alta de ERO en el hígado de ratón con colitis. En condiciones normales, las ERO se producen en todo el organismo a niveles basales. En el intestino tienen efectos bactericidas y participan en su defensa. Sin embargo, cuando hay una alteración en el sistema digestivo, como en la colitis, se incrementa la actividad de algunas células del sistema inmune como monocitos, macrófagos, leucocitos, neutrófilos y células endoteliales. Ya que están involucradas en la respuesta inflamatoria y en la recuperación de la mucosa intestinal (Wang *et al.*, 2016). Pero cuando estas células se agregan e infiltran en el tejido, aumentan considerablemente el consumo de oxígeno. Además, se activan las iNOS y Nox1 que producen NO• en exceso. Nox1 es una molécula altamente expresada en el epitelio del colon ya que está implicada en los procesos de proliferación y migración celular al ser una de las principales respuestas de regeneración cuando existe una lesión causada por colitis, además ayuda en la protección de la barrera epitelial de patógenos (Kato *et al.*, 2016, Ramonaite *et al.*, 2014). Asimismo, Nox1 juega un papel antagónico, pues su expresión se relaciona con la inducción y expansión de las lesiones ocasionadas por ERO en las EII, mientras que los AOX disminuyen durante la colitis favoreciendo la progresión de la enfermedad (Mouzaoui *et al.*, 2014).

Los efectos integrados del NO•, como la actividad antimicrobiana, la actividad de señalización celular y las acciones tóxicas en la barrera a lo largo del intestino pueden promover o disminuir la colitis. Al incrementar los niveles de ERO y ERN se potencia la respuesta inmunitaria (Li *et al.* 2014). Pero simultáneamente hay una

condición de EO que ocurre tras la defensa intestinal que puede dañar la barrera de la mucosa intestinal, aumentando la inflamación y permitiendo la alteración de otros sistemas u órganos como el hígado. Lo anterior, se observa en los resultados obtenidos en este trabajo, pues los niveles de ERO en los hígados de los ratones con colitis fueron mayores (187.09 URF) comparados con los hígados de los ratones sanos (88.22 URF). Es decir, hay un incremento en la producción de RL en el hígado cuando hay una condición de colitis. Esto puede deberse a la infiltración de especies reactivas originadas en el intestino, y que al causar daño a la barrera intestinal la atraviesan y se propagan al igual que otras moléculas pro-inflamatorias hasta llegar al flujo sanguíneo donde afectan al eje intestino-hígado (Gómez-Cortez *et al.*, 2015). De esta manera, la duración y progresión de la colitis son factores de riesgo para desarrollar algunas enfermedades hepáticas principalmente la CEP. Además, hay una alteración en las sales biliares y mayor probabilidad de desarrollar displasias y cáncer colorrectal (Loftus *et al.*, 2005). Dentro de las EII, la colitis corresponde al 75-80% de los casos clínicos, y de estos el porcentaje de tener CEP relacionado con colitis es del 2.4 y 7.5%. Mientras que la incidencia de los pacientes con EII que llegan a presentar CEP puede ser hasta del 80% (Aguilar-Sánchez *et al.*, 2016; Chapman *et al.*, 2010).

9.2 Concentración de proteínas con 3-NT en hígado de *M. musculus*

Mientras tanto, así como las ERO llegan al hígado, pueden llegar citocinas pro-inflamatorias que podrían activar a las enzimas iNOS, que se expresan en todas las células hepáticas y conducir a la producción de ERN, principalmente NO•. Lo que facilita la formación del ONOO- que puede reaccionar con Tir y favorecer la nitración de las proteínas. La modificación de residuos de Tir a 3-NT a partir del ONOO- podría tener un impacto fuerte sobre la función de diversas proteínas endoteliales y plasmáticas. De esta forma se contribuye con el desarrollo de distintos desórdenes vasculares asociados a patologías que cursan con eventos de hemólisis severa, como la colitis. (Campolo, 2013). Así, la formación de ONOO- favorece la formación, incremento y acumulación del compuesto oxidado 3-NT en las proteínas de órganos relacionados con enfermedades degenerativas y por lo tanto también favorece a

que dichas macromoléculas sean degradadas en diferentes sistemas de proteólisis. Incluso puede comprometer la viabilidad celular e inducir a las células a apoptosis (Souza *et al.* 2008). En este sentido, los resultados de este estudio indican que la concentración de 3-NT en los hígados de los ratones con colitis es mayor (78.13 ng/mL) que la concentración que se presenta en los extractos proteicos de hígado de ratones sanos (36.81 ng/mL). Esta tendencia es acorde con el aumento de ERO observado, y es indicativo de que la colitis sí tiene un efecto en otros órganos que no puede ser descartado porque la presencia de 3-NT es un marcador específico de que hay EO en las células (Hernández-Rodríguez *et al.* 2014). Además, si bien es cierto que, en condiciones normales, es posible detectar niveles bajos de 3-NT libre o unida a proteínas, la concentración que observamos en los hígados de los ratones con colitis no se puede considerar basal. Porque es el doble de la concentración de los controles sin colitis y concuerda con las observaciones de Abello *et al.* (2009) quienes mostraron que hay un incremento considerable de 3-NT bajo condiciones como la inflamación, que causan el aumento de NO•. En situaciones patológicas asociadas con estrés nitrosativo como en asma, esclerosis sistémica, complicaciones renales, EII, artritis reumatoide y lesiones vasculares, Parkinson y Alzheimer, diabetes, entre otras, hay un aumento significativo en los niveles de 3-NT (Teixeira, 2016).

9.3 Concentración de proteínas con 3-NT en hígado de *M. musculus* con el tratamiento de extractos de proteínas de *D. hansenii*

En varios trabajos, se ha postulado o se indica que la nitración de proteínas induce paulatinamente la eliminación de éstas por el proteasoma. Sin embargo, la 3-NT no se degrada, asimismo, dicha nitración resulta en modificaciones estructurales de las proteínas y esto puede interferir en diferentes procesos. No obstante, son pocos los estudios que se encargan de investigar la denitrificación. Kamikasi *et al.* en 1998 señalaron que la oxidación de los residuos de Tir en las proteínas puede comprometer la señalización celular a través de las vías de la tirosina-cinasa, por lo que la denitración de las proteínas podrían permitir el restablecimiento de su función y de esta manera convertirse en sustratos para la tirosina-cinasa. Entonces, aunque

la actividad de enzimas denitrasas no se ha encontrado en mamíferos, la eliminación de 3-NT en proteínas es un proceso reversible mediante la acción de enzimas denitrasas, como las que presenta *D. hansenii* cuando se encuentra en estrés salino reportada por Castro *et al.* en 2017. Con base en esto, los resultados observados en el presente trabajo son importantes pues revelan que al agregar los extractos proteicos de la levadura cultivada en estrés salino (NaCl 1 y 2M) a los extractos proteicos de los hígados de ratones con colitis disminuye considerablemente la concentración de 3-NT al ser comparados con los controles (Figura 11). Lo que indica que las denitrasas de la levadura actúan sobre las proteínas de los hígados con 3-NT producido durante el EO por la colitis. Mientras que las concentraciones de 3-NT presentes en los hígados de los organismos sanos, corresponden a la suma de las concentraciones basales del compuesto tanto en la levadura como del propio hígado, además debe tomarse en cuenta que la actividad de denitrasas fue reportada en la levadura únicamente durante estrés salino. Los hallazgos en este estudio son consistentes con lo que reportan Calderón *et al.* en 2011, donde mencionan que hay un incremento de ERO en *D. hansenii* durante estrés salino, el aumento de la síntesis de Tir libre que funciona como antioxidante para evitar el daño a sus proteínas por EO, de esta manera neutraliza la producción de ERO y aumenta la concentración de 3-NT. Aunque la actividad de las denitrasas también fue reportada en las bacterias *Burkholderia sp.* y *Variovorax paradoxus* por Nishino y Spain en 2006, la actividad que presenta la levadura *D. hansenii* en presencia de 10 mM supera al de las bacterias que solo asimilan 3-NT 2 y 5 mM.

9.4 Concentración de nitritos en extractos de hígado de *M. musculus* con y sin colitis sin extractos proteicos de *D. hansenii*

La manera de acción de las enzimas denitrasas es reducir el compuesto 3-NT, liberando el grupo nitro (NO_2^-) y amoniaco en el medio (Nishino y Spain, 2006). Este hecho explica las concentraciones de nitritos encontradas en los extractos de hígado de ratones con y sin colitis después de su reacción con las denitrasas de las levaduras. Los NO_2 mostraron ser mayores comparados con los extractos de hígados a los que no se les agrego los extractos de la levadura (Figura 12), de esta

manera se comprueba que la eliminación del compuesto 3-NT en los hígados de los organismos con colitis no es un hecho azaroso, sino que corresponde a la actividad de las denitrasas de la levadura, que liberan a la Tir de las proteínas del grupo nitro adherido a las proteínas del hígado durante el EO ocasionado por la colitis.

Los hallazgos encontrados en el presente estudio indican que la 3-NT de proteínas de órganos afectados por colitis pueden volver a su estado nativo después de tratarlas con los extractos de *D. hansenii* cultivada en estrés salino donde muestra actividad de las enzimas denitrasas.

10. Conclusiones

En una condición de colitis, los niveles de ERO incrementan en el hígado de *M. musculus*.

La colitis induce al aumento en la concentración de proteínas con 3-NT en el hígado de ratón.

Los extractos proteicos de *D. hansenii* con la actividad de denitrasa revierten la formación de 3-NT en el hígado ratón con colitis.

La concentración de nitritos aumenta en los extractos de hígado después de la incubación con los extractos de *D. hansenii*. Lo que indica la eliminación del grupo nitro de la 3-NT.

11. Referencias

- Abello N, Kerstjens H, Postma D y Bischoff R. (2009). Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *Journal of Proteome Research*. 8(7):3222-38
- Aguilar J. (2010). Inmunología del hígado y vacunación terapéutica. *Biología Aplicada*. 27(1): 1-9
- Aguilar-Sánchez V, Guzmán-Rojas P, Bravo-Paredes E y Ríos-Pérez C. (2016). Association between ulcerative colitis and primary esclerosing cholangitis. *Revista de Gastroenterología de Perú*. 36(2): 175-178
- Asahi M, Fujii J, Suzuki K, Seo H, Kuzuya T, Hori M, Tada M, Fujii S y Taniguchi N. (1995). Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*. 270(36):21035-9
- Cabrera-Orefice A, Guerrero-Castillo S, Luévano-Martínez L, Peña A y Uribe-Carvajal S. (2010). Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?). *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 42:11–19
- Calderón-Torres M, Peña A y Thóme P. (2006). DhARO4, an amino acid biosynthetic gene, is stimulated by high salinity in *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*. 23:725–734
- Calderón-Torres M, Castro D, Montero P, y Peña A. (2011). DhARO4 induction and tyrosine nitration in response to reactive radicals generated by salt stress in *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*. 28(10):733-746
- Campolo N. (2013). Nitración y oxidación de tirosina por peroxinitrito mediada por metales de transición (Mecanismos de reacción y relevancia biológica). Tesina de Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Uruguay
- Carrizo P, Dubin M y Stoppani A. (1998). Efectos fisiopatológicos del óxido nítrico y su relación con el estrés oxidativo. *Medicina (Buenos Aires)*. 58:367-373
- Castro D, Murguía-Romero M, Thomé P, Peña A y Calderón-Torres M. (2017). Putative 3-nitrotyrosine detoxifying genes identified in the yeast *Debaryomyces hansenii*: in silico search of regulatory sequences

responsive to salt and nitrogen stress. *Electronic Journal of Biotechnology*; 29:1-6

- Cathcart R, Schwiers E y Ames B. (1983). Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Analytical Biochemistry*. 134:111–116
- Chapman R, Fevery J, Kalloo A, Nagorney D, Boberg K, Shneider B y Gores G. (2010). Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. 51:660-78
- Chirino Y; Orozco-Ibarra M y Pedreza-Chacerri J. (2006). Participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Revista de Investigación Clínica*. 58(4):350-358
- Clementi E, Brown G, Feelisch M y Moncada S. (1998). Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95:7631-7636
- Córdova-Villalobos J, Barriguete-Méndez J, Lara-Esqueda A, Barquera S, León-May M y Aguilar-Salinas C. (2008). Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Pública de México*. 50(5):419-427
- Corpas F, Chaki M, Leterrier M y Barroso J. (2009). Protein tyrosine nitration a new challenge in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 4(10):920-923
- Cuéllar P, Solís M, Sánchez M, García R y Arias S. (2010). El óxido nítrico: una molécula biológica llena de contrastes. *Acta Universitaria*. 20:24-33
- Dohan A, Faraoun S, Barral M, Guerrache Y, Boudiaf M, Dray X, Hoeffel C, Allez M, Farges O, Beaugerie L, Aparicio T, Marteau P, Fishman E, Lucidarme O, Eveno C, Po-card M, Dautry R y Soyer P. (2015). Extra-intestinal malignancies in inflammatory bowel diseases: An update with emphasis on MDCT and MR imaging features. *Diagnostic and Interventional Imaging*; (96): 871-883
- Dosal M y Villanueva M (2008) Curvas de calibración en los métodos analíticos. *Introducción a la Metrología Química*. Consultado en: <http://depa.fquim.unam.mx>
- Dorado C, Rugerio C y Rivas S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Monografía. Revista de la Facultad de Medicina*. (46)6

- Erkan G. (2011). Inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. Ulcerative colitis epidemiology, Pathogenesis and Complications. Dr Mortimer O'Connor (Ed.), ISBN: 978-953-307-880-9
- Ferrer-Sueta G., & Radi R. (2009). Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals, *Chemical Biology*. 4:161-177
- Fortea J y Marín-Jiménez (2015). Capítulo 9: ¿Qué otras enfermedades pueden aparecer relacionadas con la colitis ulcerosa? Consultado en: <http://www.geteccu.org>
- García G, Clavijo D, Mejía O, García A, Vittorino M y Casadiego C. (2007). Escenciales en biomedicina (biología, patobiología y bioclínica) humana de las NOS (óxido nítrico-sintetasas). *Revista CES Medicina*. 21(2):61-82
- Gómez-Cortés, E., R. Pérez-Cabeza de Vaca, J. Martínez-Hernández, N. Guerrero-Celis, P. Mondragón-Terán y S. Alcaráz-Estrada. (2015) Permeabilidad intestinal y eje intestino-hígado. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. 20:83-89
- González-Torres, M., M. Betancourt-Rule y R. Ortiz-Muñiz (2000) Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*. 25(1):3-9
- Greenacre S y Ischiropoulos H. (2001). Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein and signal transduction. *Free Radical Research*. 34:541-581
- Gutiérrez J. (2006). ¿Qué sabe usted acerca de radicales libres? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(4):69-73
- Gutiérrez-Salinas, J y Morales-González J. (2004). Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. *Medicina Interna de México*. 20: 287-95
- Hempel S, Buettner G, O'malley Y, Wessels D y Flaherty M. (1999). Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6) -carboxy-2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Radical Biology & Medicine*. 27:146-159
- Hernández-Rodríguez S, Gutiérrez-Salinas J, García-Ortiz L, Mondragón-Terán P, Ramírez-García S y Núñez-Ramos N. (2014). Estrés oxidativo y

nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. *Medicina Interna de México*. 30:295-308

- Ischiropoulos, H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 356(1):1-11
- Kamisaki Y, Wada K, Bian K, Balabanli B, Davis K, Martin E, y Murad F. (1998). An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine containing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95(20):11584–11589
- Kamisaki Y, Irie Y, Saeki M y Martin E. (2003). Histone H1.2 is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(10): 5634–5639
- Kang M y Akbarali H. (2008). Denitration of L-type calcium channel. *Federation of European Biochemical Societies Lett*. 582(20): 3033–3036.
- Kato M, Marumo M, Nakayama J, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C y Kamata C. (2016). The ROS-generating oxidase Nox1 is required for epithelial restitution following colitis. *Experimental Animal*. 65(3). 197–205
- Kim Y, Eun-Hee K y Hahm K. (2012). Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: Challenges and opportunities. *Mechanisms Of Disease. Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 27:1004–1010
- Konigsberg F. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. Editorial El Manual. México
- Kwo W, Kanadai R y Shanbhang V. (1999). Denitration of peroxynitrite-treated proteins by “protein nitrases” from rat brain and heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 201:11-16
- Ledesma-Soto Y, Callejas BE, Terrazas CA, Reyes JL, Espinoza-Jiménez A, González MI, León-Cabrera S, Morales R, Olguín JE, Saavedra R, Oghumu S, Satoskar AR, Terrazas LI. (2015). Extraintestinal Helminth Infection Limits Pathology and Proinflammatory Cytokine Expression during DSS-Induced Ulcerative Colitis: A Role for Alternatively Activated Macrophages and Prostaglandins. *BioMed Research International*. 1-17.

- Li B, Alli R, Vogel P y Geiger T. (2014). IL-10 modulates DSS-induced colitis through a macrophage–ROS–NO axis. *Mucosal Immunology*. 7:869-878
- Loftus E, Harewood G, Loftus C, Tremaine W, Harmsen W, Zinsmeister A, Jewell D y Sandborn W. (2005). PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing colangitis. *Inflammatory Bowel Disease*. 54:91-96. <http://gut.bmj.com>
- López G y Porcal W. (2014). Estrés oxidativo / nitro-oxidativo como blanco terapéutico en enfermedades neurodegenerativas. En García Rodríguez, J.C. (Ed.). *Neuroprotección en enfermedades Neuro y Heredo degenerativas*. Barcelona, España: OmniaScience. 157-190
- Lozano-Juste J. (2011). Biosíntesis, señalización y modo de acción del óxido nítrico en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España
- Maldonado O, Jiménez E, Bernabé M, Ceballos G y Méndez E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. Consultado en: www.uv.mx/rm
- Michan C, Martínez J, Álvarez M, Turk M, Sychrova H y Ramos J. (2012). Salt and oxidative stress tolerance in *Debaryomyces hansenii* and *Debaryomyces fabryi*. *FEMS Yeast Research*. 13:180–188
- Moncada S, Palmer R y Higgs E. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 43 (2):109-142
- Mouzaoui S, Djerdjouri B, Makhezer N, Kroviarski Y, El-Benna J y Dang P. (2014). Tumor necrosis factor-alpha-induced colitis increases NADPH oxidase 1 expression, oxidative stress, and neutrophil recruitment in the colon: preventive effect of apocynin. *Mediators of Inflammation*. 312484. <http://doi.org/10.1155/2014/312484>
- Murray R, Mayes P, Granner D y Rodwell V. (2005). *Harper bioquímica ilustrada*, 14ª Edición, Manual Moderno
- Namba T, Ken-Ichiro T, Yosuke I, Tomoaki I, Tatsuya H, Tomomi G, Motoyoshi E, Keizo S y Tohru M. (2009). Positive Role of CCAAT/Enhancer-Binding Protein Homologous Protein, a Transcription Factor Involved in the Endoplasmic Reticulum Stress Response in the Development of Colitis. *The American Journal of Pathology*. 174(5):1786-179

- Navarrete C, Siles A, Martínez J, Calero F y Ramos J. (2009). Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*. FEMS Yeast Research. 9:582–590
- Navarro-Antolín J y Lamas S. (2002). Papel de las especies derivadas del nitrógeno en fisiopatología vascular. Nefrología. 22:9
- Nelson D y Cox M. (2006). Lehninger principios de bioquímica, 4ª Edición, Ediciones Omega
- Nishino S y Spain J. (2006). Biodegradation of 3-Nitrotyrosine by *Burkholderia* sp. Strain JS165 and *Variovorax paradoxus* JS171. Applied and Environmental Microbiology. 77(2):1040-1044
- OMS (2013) Plan de acción mundial para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles 2013-2020. Consultado en: <http://www.who.int/nmh/events/2012/20121128.pdf>
- Parcher P, Beckman J y Liaudet L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiological Reviews. 87:315-424
- Poljsak B. (2001). Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2011:1-15. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/194586>
- Quera R y Palma R. (2008). Enfermedades inflamatorias intestinales: colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. Revista Médica Clínica Las Condes. 19(4):331-341
- Radi R. (2013). Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. Accounts of Chemical Research. 46:550-559.
- Ramonaite R, Skieceviciene J, Juzenas S, Salteniene V, Kupcinskas J, Matusevicius P y Kupcinskas L. (2014). Protective action of NADPH oxidase inhibitors and role of NADPH oxidase in pathogenesis of colon inflammation in mice. World Journal of Gastroenterology: WJG, 20(35), 12533–12541. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i35.12533>
- Rana S, Sharma S, Prasad K, Sinha S y Singh K. (2014). Role of oxidative stress & antioxidant defence in ulcerative colitis patients from north India. Indian Journal of Medical Research. 139:568-571
- Rodríguez J, Menéndez J y Trujillo T. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Revista Cubana de Medicina Militar. 30(1):36-44

- Rodríguez T. (2008). Efecto del óxido nítrico en fisiopatología cardiovascular a través de la activación de metaloproteasas. Tesis Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid
- Rojas de la Fuente C. (2015). Determinación de nitración de proteínas en tirosina en membrana sinovial de articulación metacarpofalángica de equino como posible marcador de osteoartritis en etapa inicial. Tesis de licenciatura. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
- Solache F. (2009.) Síntesis de análogos de la piperina mediante una adición vía radicales libres. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México
- Souki A, Cano C, Mengual E, García D, Torres D, Almarza J y Amell A. (2007). Marcadores biológicos de estrés oxidativo. Distribución por edad y sexo de las concentraciones basales de MDA, NO y ácido úrico en niños y adolescentes de Maracaibo-Venezuela. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. 26(2):92-97
- Souza J, Choi I y Chen Q. (2003). Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. Archives of Biochemistry and Biophysics. 380:360-366
- Souza J, Peluffo G. y Radi R. (2008). Protein tyrosine nitration — Functional alteration or just a biomarker? Free Radical Biology & Medicine. 45:357–366
- Teixeira D, Fernandes R, Prudêncio C y Viera M. (2016). 3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges. Biochimie. 125:1-11
- Vergara O, Takahashi T y González Q. (2006). Conceptos actuales en colitis ulcerativa crónica inespecífica. Cirujano General. 28(1):42-49
- Wang Z, Li S, Yu C, Xuefei T, Rong Z, Duan-Fang L y Deliang C. (2016). Oxidative stress and carbonyl lesions in ulcerative colitis and associated colorectal cancer. Oxidative. Medicine and Cellular Longevity. Consultado en: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9875298>

Apéndice I BSA

La construcción de una curva de calibración es la representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito. La calibración incluye la selección de un modelo lineal para estimar los parámetros que permitan determinar la concentración en una muestra desconocida, dentro de un determinado intervalo de trabajo. A continuación, se muestran las curvas de calibración utilizadas en el presente trabajo (Dosal y Villanueva, 2008).

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la curva de BSA con las siguientes concentraciones:

	Stock BSA (mg/mL) μL	H₂O destilada μL	Concentración final (mg/mL)
1	50	950	0.05
2	100	900	0.1
3	250	750	0.25
4	500	500	0.5
5	750	250	0.75
6	1000	-	1

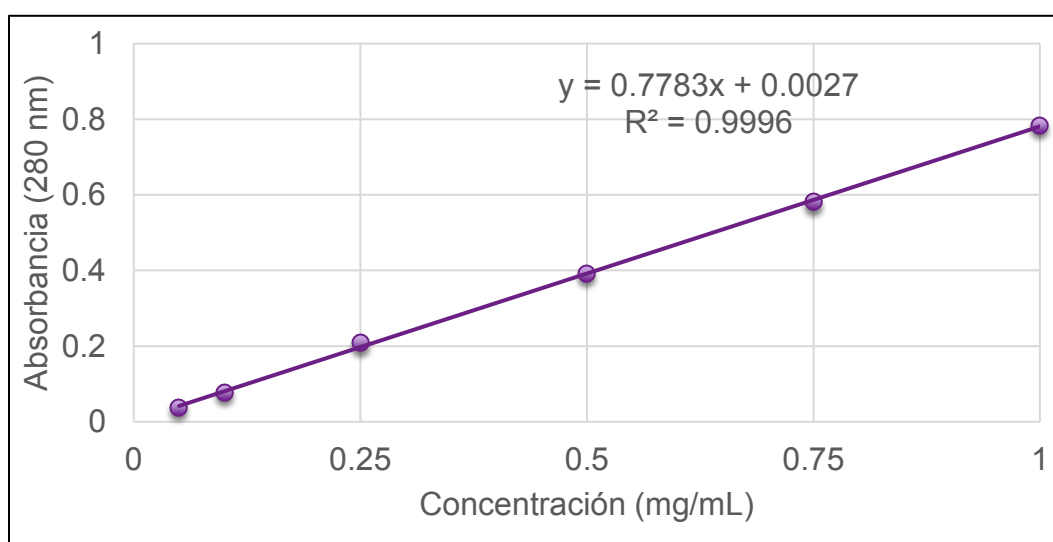


Figura 15. Curva patrón de BSA.

Apéndice II Curva de estándar de BSA nitrada

La concentración de 3-NT de las muestras se realizó por ELISA, para ello se construyó una curva patrón de BSA-nitrada.

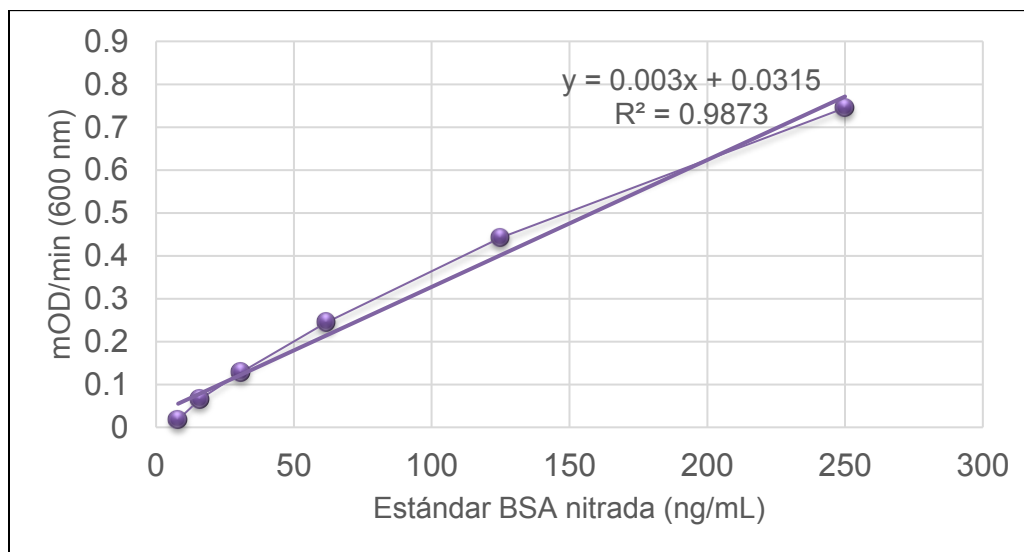


Figura 16. Curva patrón de BSA nitrada.

Apéndice III Curva de nitritos

La concentración de nitritos de las muestras fue calculada a partir de la siguiente curva patrón.

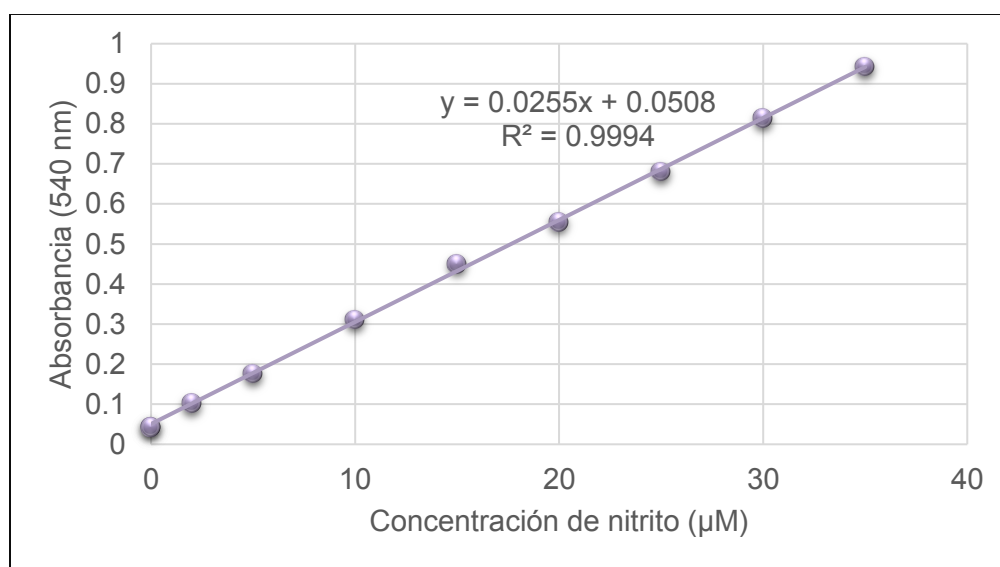


Figura 17. Curva patrón de nitritos

Apéndice IV ERO

Con la finalidad de evaluar la producción de ERO en los hígados de *M. musculus* con y sin colitis, se utilizó el ensayo de reacción de ERO con el compuesto DCF que emite una señal fluorescente tras su esterificación intracelular por acción de RL, es decir, la reacción química entre un ácido carboxílico y un alcohol.

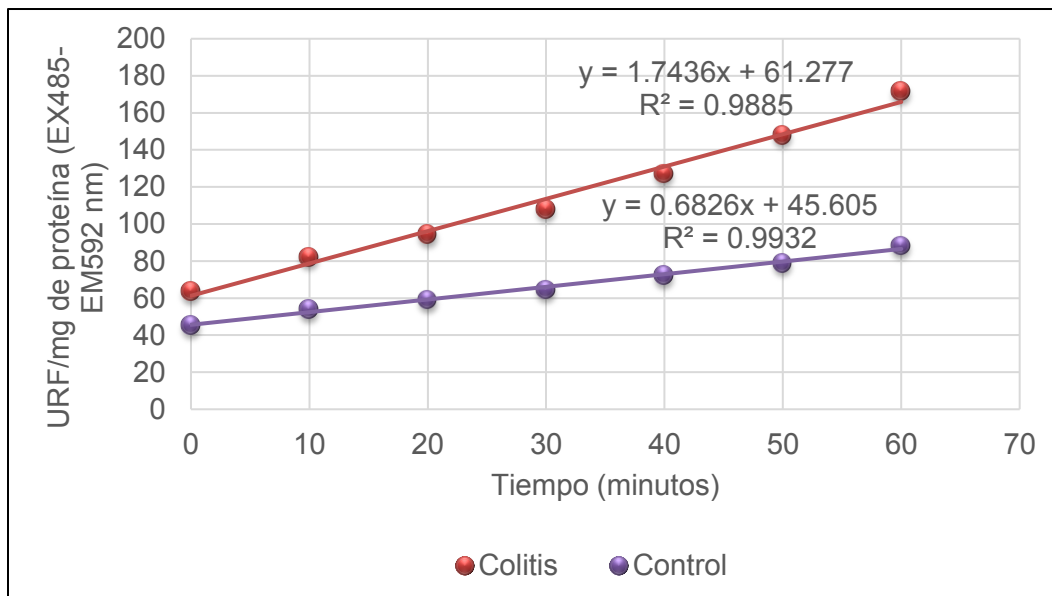


Figura 18. Promedios de niveles de ERO desde el tiempo cero.

El diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA) es un compuesto apolar que penetra en la célula. Se trata de una forma de fluoresceína reducida químicamente que se utiliza como indicador de ERO en las células, por ejemplo, para detectar la generación de productos intermediarios reactivos de oxígeno en neutrófilos y macrófagos. Tras la disociación de los grupos de acetato por parte de las esterasas intracelulares y la oxidación, el H_2DCFDA no fluorescente se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que es fluorescente. El DCF reacciona con el peróxido de hidrógeno intracelular, esta reacción es mediada por peroxidasas, citocromo C o Fe^{2+} . De hecho, se utiliza como sustrato fluorescente para enzimas peroxidasas (Cathcart *et al.*, 1983).