



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Validación de genes de referencia y
transcripción diferencial vinculada a estrés
oxidativo en *Debaryomyces hansenii* durante
estrés osmótico**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

DIANA JULIETA MARTÍNEZ PÉREZ



DIRECTORA DE TESIS:

**Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky
Ciudad Universitaria, Ciudad de México
CIUDAD DE MÉXICO, 2020**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1. Datos del alumno
Martínez
Pérez
Diana Julieta
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
No. de cuenta 307240824

2. Datos del tutor
Dra.
Segal
Kischinevzky
Claudia Andrea

3. Datos del sinodal 1
Dr.
González
Flores
James Enrique

4. Datos del sinodal 2
Dra.
Cancino
Rodezno
María de los Ángeles

5. Datos del sinodal 3
Q.
Escobar
Sánchez
Viviana

6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Sánchez
Sánchez
Norma Silvia

Agradecimientos

A la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky, tutora de este proyecto, gracias por compartir y aportar tus conocimientos y consejos.

A la Q. Viviana Escobar Sánchez, gracias por todo la dedicación y tiempo que te tomaste para guiarme y por todas las ideas que aportaste para construir este trabajo. Gracias por el constante apoyo técnico que me brindaste.

Al M. en C. Julio Prieto, por toda la asesoría técnica brindada en el desarrollo de la técnica de PCR en tiempo real.

A los sinodales de este trabajo, a la Dra. Claudia Segal, a la Q. Viviana Escobar, a la Dra. Ángeles Cancino, a la M. en C. Norma Sánchez y al Dr. James González, muchas gracias por la revisión de este trabajo, cada uno de sus comentarios fueron importantes para la consolidación de este trabajo.

Parte de este trabajo fue financiado con el proyecto PAPIIT IN225320 "Estudio de la regulación de la expresión de los genes que codifican para las superóxido dismutasa y catalasas en la levadura eurihalina *Debaryomyces hansenii*".

Agradecimientos personales

A mis padres Victoria y Roberto, y mi hermano Gerardo, quienes son mi inspiración, llevo siempre conmigo una parte de ustedes. Gracias por acompañarme en la luz y la oscuridad todos estos años, los amo.

A mis amigos, ustedes son una fuente constante de experiencias, aprendizaje y retos.

Agradezco especialmente a Claudia y Viviana, quienes son más que el cargo que ostentan en este trabajo. Viviana, disculpa que no logre expresarme tan acertadamente como los libros que compartimos. Quiero agradecerles todo el tiempo y la confianza que depositaron en mí. Sin lugar a dudas, cada uno de sus consejos tanto en el ámbito académico como el personal, me van a acompañar toda la vida. Ahora entiendo que cualquier proyecto nace de una idea y se consolida con el compromiso, organización y perseverancia.

A mis padres

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	10
1. RESUMEN	13
2. INTRODUCCIÓN	14
2.1 Breviario de ecofisiología	14
2.2 Respuestas asociadas a estrés: respuesta general a estrés y vía de las MAP cinasas	15
2.3 Respuesta al estrés hiperosmótico	17
2.3.1 <i>Estrés osmótico</i>	17
2.3.2 <i>Mecanismos de osmoadaptación en levaduras en respuesta al incremento de la salinidad</i>	17
2.3.3 <i>Activación de la vía HOG</i>	18
2.3.4 <i>Mantenimiento de la homeostasis iónica y biosíntesis de glicerol</i>	20
2.3.5 <i>Cambios en los componentes de la membrana e integridad de la pared celular presentes en la osmorregulación</i>	21
2.3.6 <i>Control del ciclo celular durante estrés hiperosmótico</i>	22
2.3.7 <i>Control de la biosíntesis de proteínas</i>	22
2.4 El fenómeno de protección cruzada permite la tolerancia tanto al estrés oxidante como al estrés osmótico.....	23
2.5 PCR tiempo real, principales aplicaciones y su importancia para la cuantificación de los cambios de expresión génica	25
2.5.1 <i>PCR cuantitativa de transcripción inversa</i>	25
2.5.2 <i>Transcripción reversa y síntesis del DNA complementario</i>	26
2.5.3 <i>Métodos de detección de los productos de PCR en tiempo real</i>	27
2.5.4 <i>Determinación del ciclo umbral (threshold cycle, C_t)</i>	28
2.5.5 <i>Curvas de disociación (melting curves)</i>	30
2.5.6 <i>Métodos de cuantificación en la PCR tiempo real</i>	32
2.5.6.1 <i>Cuantificación absoluta o método de la curva estándar</i>	32
2.5.6.2 <i>Cuantificación relativa</i>	34
2.5.7 <i>Importancia de los genes de referencia</i>	36
2.6 Genes evaluados en respuesta a cambios en la salinidad del medio	37
2.6.1 <i>Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT- Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase)</i>	37
2.6.2 <i>Proteína S3 de la subunidad 40S ribosomal (rpS3)</i>	38

2.6.3	<i>Subunidad grande de la enzima ribonucleótido reductasa (RNR1)</i>	39
2.6.4	<i>Superóxido dismutasa (SOD1)</i>	42
2.6.5	<i>Catalasa A (CTA1) y Catalasa T (CTT1)</i>	43
2.7	<i>Debaryomyces hansenii</i> una levadura eurihalina	45
3.	ANTECEDENTES	49
4.	HIPÓTESIS	52
5.	OBJETIVO GENERAL	52
5.1	OBJETIVOS PARTICULARES	52
6.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	53
6.1	Curvas de crecimiento	53
6.2	Extracción del RNA y confirmación de calidad e integridad	53
6.3	Transcripción reversa y síntesis de cDNA	54
6.4	Oligonucleótidos	55
6.5	Condiciones de la PCR tiempo real	58
6.6	Análisis de selección y validación de genes de referencia	59
6.7	Cuantificación absoluta	60
6.8	Cuantificación relativa	61
6.9	Ensayo de actividad enzimática de catalasa	62
7.	RESULTADOS	64
7.1	Efecto del incremento en la concentración de NaCl en velocidad de crecimiento de <i>Debaryomyces hansenii</i>	64
7.2	Síntesis de cDNA procedente de células sometidas a diferentes condiciones de crecimiento	66
7.3	Estabilidad transcripcional de los genes candidatos a genes de referencia en <i>D. hansenii</i> durante la etapa de crecimiento exponencial en respuesta a NaCl	68
7.4	Cuantificación absoluta del mRNA de genes implicados en la respuesta antioxidante y biosíntesis de ribosomas en <i>D. hansenii</i>	78
7.5	Determinación de los cambios en la expresión transcripcional de genes vinculados en la defensa antioxidante en respuesta a diferentes concentraciones de sal usando el método C_t comparativo y REST.	84
7.6	Actividad específica de catalasa en <i>D. hansenii</i> durante la etapa de crecimiento estacionario en respuesta a la osmolaridad del medio	92
8.	DISCUSIÓN	94
8.1	El aumento de NaCl en el medio ocasiona el descenso en el la velocidad de crecimiento a partir de 2 M.	94

8.2	Expresión del mRNA en respuesta a cambios en la osmolaridad del medio de los genes de defensa antioxidante (<i>DhSOD</i>, <i>DhCTA</i> y <i>DhCTT</i>) y biosíntesis de ribosomas (<i>DhrpS3</i>).....	95
8.2.1	<i>Proteína ribosomal S3</i>	96
8.2.2	<i>Superóxido dismutasa</i>	98
8.2.3	<i>Catalasas A y T</i>	98
8.3	Estabilidad de los transcritos <i>DhrpS3</i>, <i>DhSOD</i>, <i>DhCTA</i> y <i>DhCTT</i> como posibles candidatos a genes de referencia para medir los cambios en expresión génica en respuesta a la osmolaridad del medio	100
8.4	Cambios diferenciales en la expresión relativa de los transcritos usando al gen <i>DhrpS3</i> como referencia.....	101
8.5	El incremento en la concentración de NaCl favorece la disminución de la actividad específica de catalasa en la etapa de crecimiento estacionario	102
9.	CONCLUSIONES	104
10.	PERSPECTIVAS	105
11.	BIBLIOGRAFÍA	106

Lista de abreviaturas

A: Nucleótido adenina.

ACT1: Gen que codifica para actina, la cual es un constituyente estructural del citoesqueleto.

AMV-RT: Enzima transcriptasa reversa del virus aviar de mieloblastosis.

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local (*Basic Local Alignment Search Tool*), que funciona a través de un programa que compara secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de otras secuencias, permitiendo encontrar las regiones de similitud y calculando la importancia estadística de las coincidencias.

C: Nucleótido citosina.

CAT: Enzimas catalasas.

cDNA: DNA complementario.

C_t: Ciclo umbral de detección en PCR tiempo real (*Threshold cycle*), también llamado C_p (*Crossing point*).

CTA: Enzima catalasa A.

CTT: Enzima catalasa citoplasmática T.

DHAP: Dihidroxiacetona fosfato.

DhCTA: Gen que codifica para la enzima catalasa A en *Debaryomyces hansenii*.

DhCTT: Gen que codifica para la enzima catalasa T en *D. hansenii*

DhPEMT: Gen que codifica para la enzima fostatidiletanolamina N-metiltransferasa en la levadura *D. hansenii*.

DhRNR: Gen que codifica para la enzima ribonucleótido reductasa *D. hansenii*.

DhrpS3: Gen que codifica para la proteína ribosomal S3 *D. hansenii*.

DhSOD: Gen que codifica para la enzima superóxido dismutasa en *D. hansenii*

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

dNDP: Deoxirribonucleósido difosfato.

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfatados.

E: Eficiencia de la una reacción de PCR en tiempo real.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraácetico.

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

G: Nucleótido guanina.

gDNA: DNA genómico.

Gdp: Enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, la cual es codificada por los genes *GDP 1/GDP2*.

Gpp: Enzima glicerol-3- fosfatasa la cual es codificada por los genes *GPP1/GPP2*.

GSH: Enzima glutatión peroxidasa.

H₂O₂: Peróxido de hidrogeno.

HOG: Vía de la alta osmolaridad de glicerol (*High Osmolarity Glycerol*).

KCl: Cloruro de potasio.

M: Concentración molar (gmol/L).

M: Pendiente del gráfico del C_t contra el logaritmo de la concentración de cada una de las diluciones en PCR tiempo real.

MAPK o ERK: MAP cinasa.

MAPK: Cascada de señalización de cinasas activados por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinase*).

MAPK:Fus3p: Ruta MAP cinasa de respuesta a feromonas en *S. cerevisiae*.

MAPK:Hog1p: Ruta MAP cinasa de repuesta a cambios osmóticos en *S. cerevisiae*.

MAPK:Kss1p: Ruta MAP cinasa para el desarrollo de hifas en *S. cerevisiae*.

MAPK:Smk1p: Ruta MAP cinasa para la formación de esporas en *S. cerevisiae*.

MAPK:Stl2p: Ruta MAP cinasa para el mantenimiento de la integridad celular en *S. cerevisiae*.

MAPKK, MAP2K, MEK o MKK: MAP cinasa, cinasa.

MAPKKK, MAP3K, MEKK o MKKK: MAP cinasa cinasa cinasa.

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

MMLV-RT: Enzima transcriptasa reversa del virus de leucemia murina

mRNA: RNA mensajero.

NaCl: Cloruro de sodio.

NDP: Ribonucleósido difosfato.

O₂⁻: Anión superóxido.

OH⁻: Radical hidroxilo.

PC: Fosfatidilcolina.

PCR: Reacción en cadena la polimerasa.

PDA1: Gen que codifica para la enzima piruvato deshidrogenasa.

PE: Fosfatidiletanolamina.

qRT-PCR: PCR en tiempo real cuantitativa.

RNA: Ácido ribonucleico.

rRNA RNA ribosomal.

SOD: Enzima superóxido dismutasa.

STRE: Elemento de respuesta a estrés (*Stress Responsive Element*).

T: Nucleótido, timina.

T_m: Temperatura (°C) de desnaturalización de un producto de amplificación.

UDG: Enzima uracil-DNA glicosilasa (*Uracil DNA Glycosylase*).

1. RESUMEN

Debaryomyces hansenii es una levadura eurihalina en la que se han desarrollado investigaciones que buscan dilucidar los mecanismos involucrados en su tolerancia a la sal. En este trabajo nos enfocamos en la búsqueda de genes de referencia que puedan ser empleados en la evaluación de los cambios de expresión génica cuando la levadura es cultivada en medio rico con concentraciones crecientes de NaCl (0 a 3 M), así como en la determinación de la concentración de NaCl en la cual se presentan los efectos en respuesta al estrés osmótico durante el crecimiento exponencial.

Mediante el análisis de la curva de crecimiento y la cuantificación del RNA mensajero a través de la qRT-PCR en tiempo real de los genes implicados en la síntesis de la fosfatidilcolina (*DhPEMT*), en la formación de los desoxirribonucleótidos (*DhRNR*), en la maduración de la subunidad 40S y el inicio de la traducción (*DhrpS3*), así como los de respuesta a estrés oxidante (*DhSOD* y *DhCTA*) y estrés osmótico (*DhCTT*), se determinó por un lado, el uso del gen *DhrpS3* como referencia para utilizarse en ensayos con concentraciones de NaCl inferiores a 2 M. Por otro lado, los transcritos de todos los genes analizados mostraron una elevación cuando las células fueron cultivadas con 2 M de NaCl, mientras que en 2.5 M todos disminuyeron su expresión y simultáneamente pudimos determinar que la levadura disminuyó la velocidad de crecimiento. Basados en estos resultados, proponemos que las concentraciones superiores a 2 M de NaCl desatan una respuesta a estrés en *D. hansenii*, la cual queda evidenciada por la atenuación de la síntesis de proteínas y la reducción de la velocidad de crecimiento.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Breviario de ecofisiología

En el medio ambiente la distribución y la abundancia de las especies biológicas se encuentra determinada por la interacción de los organismos y el medio en el que se desarrollan. El medio ambiente impone las condiciones y los recursos, que de acuerdo con la evolución y potencialidades intrínsecas de cada organismo, resultarán en su permanencia y el futuro desarrollo de un nicho ecológico. Si bien el nicho ecológico está determinado por diversos factores que interactúan y le dan el contexto que requiere un organismo para poder sobrevivir, crecer y reproducirse, es la especie la que define al nicho ecológico (Polechová, J., y Storch, D., 2019; Peterson, A.T., *et al.* 2011).

Es posible hacer una clasificación evaluando la respuesta o desempeño de un organismo con respecto a un gradiente o factor, entendiendo que el desempeño de una especie en el ambiente no depende necesariamente de una sola variable, sino que es un evento multifactorial, es decir que se influenciado por más de un factor biótico y/o abiótico (Peterson, A.T., *et al.* 2011). Aunque el desempeño de una población se puede medir en múltiples respuestas, comúnmente se hace referencia a la tasa de crecimiento en un determinado tiempo. La curva propuesta por Shelford contempla tres zonas, en cuyos extremos se halla una zona de intolerancia en la que las condiciones y/o recursos son hostiles o limitados de manera tal que propician que las poblaciones utilicen sus recursos energéticos solo para la sobrevivencia, es decir, no hay crecimiento. El segundo nivel, está conformado por la zona de tolerancia, en la cual los organismos además de sobrevivir, pueden crecer. Hacia el centro de la curva, se encuentra la zona del óptimo fisiológico, en la cual los organismos exhiben su máximo desempeño, es decir sobreviven, crecen y se reproducen (Remade, 1984 en Costamagno, S., *et al.* 2016). Los intervalos de cada una de estas zonas varían en todas las especies y pueden ser tan amplios como en los organismos eurioicos o plásticos (por ejemplo algunos organismos oportunistas y cosmopolitas caracterizados por poseer un margen amplio de tolerancia a factores ambientales y una rápida adaptación a nuevas condiciones, tal es el caso de algunas especies patógenas de amibas de vida libre), o con intervalos estrechos y desarrollo limitado a ciertas condiciones como en algunas especies coralinas (figura 1).

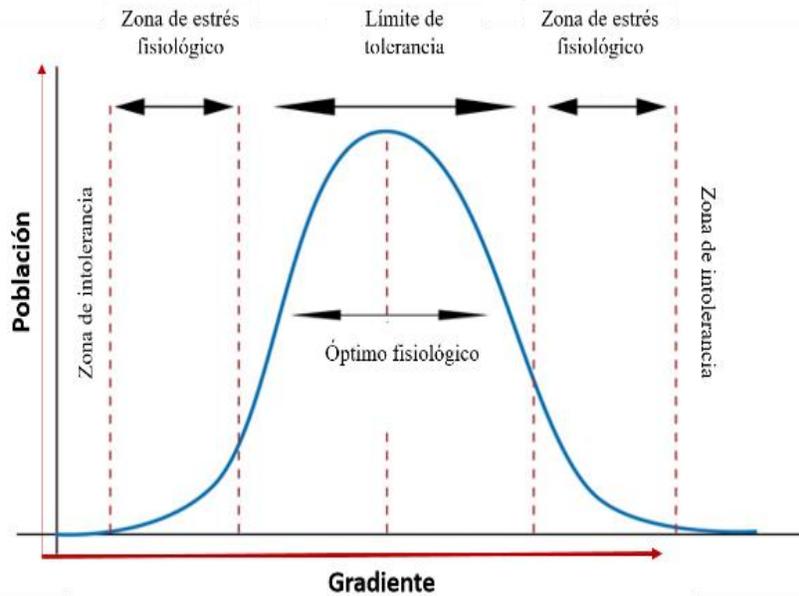


Figura 1. Distribución y abundancia de organismos según la Ley de tolerancia de Shelford.

Muchos años de evolución han permitido la adaptación de los organismos para poder desarrollarse en ambientes determinados donde las fluctuaciones tanto en las condiciones como en los recursos, pueden comprometer su supervivencia. De acuerdo con la magnitud de los cambios y en la medida que éstos se alejen del óptimo fisiológico, los organismos pueden entrar en estrés (Kapahi, P., *et al.*, 1999).

Definir concretamente qué es el estrés impone riesgos importantes, debido a que antes se tendría que suponer una situación normal de crecimiento para una determinada población.

2.2 Respuestas asociadas a estrés: respuesta general a estrés y vía de las MAP cinasas

La capacidad para percibir y responder a las variaciones en las condiciones y/o recursos del medio son propiedades fundamentales para la permanencia y supervivencia de los organismos en su nicho ecológico. Muchas de estas variaciones pueden ocasionar estrés y acarrear consecuencias dañinas, por lo que, con el fin de contrarrestar sus efectos, las células se valen de mecanismos de adaptación con base en respuestas moleculares rápidas y efectivas que les permiten recuperar su homeostasis y mantener la viabilidad celular y proliferación (Chen y Thorner, 2007; Estruch, 2000). Estos mecanismos de respuesta son importantes porque posibilitan la capacidad de colonizar nichos

sumamente variados y bajo condiciones inconstantes, como la temperatura, salinidad, presión o la disponibilidad de nutrientes (Causton, H., *et al.*, 2001).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, estas respuestas se valen de complejas vías de señalización; una de ellas es la respuesta general a estrés que opera como un mecanismo central que protege a la célula de las condiciones que amenazan su viabilidad. Su activación es inmediata tras la exposición al agente y cumple un papel importante en la regulación de la expresión de genes, aunque su actividad es transitoria y una vez recuperado el equilibrio en el medio, la expresión de genes recobra sus niveles basales (Gasch, A., *et al.*, 2000).

Característicamente, los genes que han de ser expresados en la respuesta general a estrés tienen como mecanismo de regulación común en su promotor al elemento STRE (por sus siglas en inglés *Stress Responsive Element*), con la secuencia consenso AGGGG (Estruch, F., 2000); esta secuencia es reconocida por los factores transcripcionales Msn2p y Msn4p que se encargan de mediar la transcripción de los genes vinculados en la respuesta a estrés. Bajo condiciones normales, los factores Msn2p y Msn4p se localizan en el citoplasma y solo ante una situación de estrés son translocados rápidamente al núcleo donde al unirse a STRE regularán la inducción o represión coordinada de genes sensibles. Además de la respuesta general, existen respuestas específicas para contender con alguna condición adversa particular, implicando así la activación de rutas y factores de transcripción diferentes a Msn2p y Msn4p (Estruch, F., 2000; González-Hernández, J. y Peña, A., 2002).

Otras rutas activadas por estrés, como la familia de proteínas cinasas (MAPK-*Mitogen Activated Protein Kinase*), son unidades de señalización altamente conservadas en los eucariontes que utilizan varias vías de transducción de señales intracelulares, cuyo papel es esencial en la respuesta y adaptación a agentes estresantes. De este modo la vía de las MAP cinasas transmite, amplifica e integra señales que pueden provenir de más de un tipo de estímulo y tras su activación logra desencadenar una respuesta fisiológica a través del control de la expresión de genes (Qi, M. y Elion, E., 2005; Chen, R. y Thorner, J., 2007; Garrington, T. y Johnson, G., 1991; González-Hernández, J. y Peña, A., 2002).

Cada cascada está compuesta de tres proteínas cinasas que se activan secuencialmente. Inicialmente una MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK, MAP3K, MEKK o MKKK) activa a una MAP cinasa cinasa (MAPKK, MAP2K, MEK o MKK) y esta a su vez fosforila y activa a la MAP cinasa (MAPK o ERK) (Qi, M. y Elion, E., 2005; Chen, R. y Thorner, J., 2007).

En *S. cerevisiae* se han descrito cinco rutas MAPK diferentes que interactúan entre ellas, estas son la vía de respuesta a feromonas (MAPK:Fus3p), la ruta de desarrollo de hifas (MAPK:Kss1p), la ruta de respuesta a cambios osmóticos (MAPK:Hog1p), la ruta del mantenimiento de la integridad celular (MAPK:Slit2p) y la ruta de formación de esporas (MAPK:Smk1p) (Hohmann, S., 2009).

2.3 Respuesta al estrés hiperosmótico

2.3.1 Estrés osmótico

El mantenimiento del balance hídrico dentro y fuera de la célula es fundamental para su crecimiento y supervivencia. La pérdida de este equilibrio desata una respuesta compleja conocida como estrés osmótico, el cual puede presentarse como estrés hiperosmótico o estrés hipoosmótico. El primero es generado por la baja actividad del agua, donde la concentración de solutos disueltos en el medio extracelular se eleva a niveles tan altos que sobrepasan la osmolaridad interna, por lo que el potencial del agua, es decir el agua libre para solubilizar o realizar un trabajo, es mayor al interior de la célula en comparación con el medio extracelular, ocasionando que el agua del interior de la célula salga hasta que se alcance un equilibrio donde el potencial del agua interno sea igual al de la solución que la contiene. La pérdida de agua genera una deshidratación celular, que gradualmente se verá reflejada en el descenso del volumen celular y la pérdida de presión de turgencia en células de levadura (Hohmann, S., 2009; Wood, J., 2011). En contraste, el estrés hipoosmótico implica la ruptura del balance hídrico cuando el potencial del agua es mayor en el medio que al interior de la célula, lo que conlleva al incremento del volumen celular.

2.3.2 Mecanismos de osmoadaptación en levaduras en respuesta al incremento de la salinidad

En 2002, Mager y sus colaboradores clasificaron en tres etapas la respuesta a estrés hiperosmótico en la levadura *S. cerevisiae*. En la primera etapa ubicaron los cambios celulares inmediatos en respuesta a la acción de fuerzas físico-mecánicas como la deshidratación y la pérdida de turgencia, que conducen a la contracción celular, en paralelo al reclutamiento de agua de la vacuola al citoplasma, el colapso del citoesqueleto y la despolarización de los filamentos de actina (Mager W. y Siderius, M., 2002; Wood, J., 2011).

En la segunda etapa tienen lugar los procesos de defensa primaria que actúan en la protección y recuperación. En esta fase hay una redirección de los recursos celulares del crecimiento a la

adaptación que se refleja con el arresto temporal del crecimiento celular como una estrategia de adaptación a las nuevas condiciones del medio (Mager, W. y Siderius, M., 2002). Sumado a los cambios en la regulación de su ciclo celular, también ocurre el cierre de los canales de glicerol Fps1p y la consecuente acumulación de solutos compatibles al interior de las células con la finalidad de recobrar el balance hídrico y con ello la presión de turgencia. Es en esta etapa que se activan las rutas de señalización en respuesta a estrés, donde la vía de las MAP cinasas mediada por la vía de alta osmolaridad al glicerol (HOG) y su efector Hog1 se relacionan con la inducción y represión de genes osmosensibles de forma transitoria, en función de la severidad del estrés (Gasch, A., et al., 2000; Warringer, J., et al., 2010).

Algunos de los genes inducidos se vinculan con el control de la producción de glicerol (Albertyn, J., et al., 1994), el mantenimiento de la homeostasis iónica (Márquez, J. y Serrano, R., 1996) y el metabolismo redox (Schüller, C., et al., 1994). Por el contrario, los genes que se ven reprimidos están involucrados principalmente con la traducción, biogénesis de ribosomas y la síntesis de aminoácidos (Molin, C., et al., 2009).

Aunque la adaptación a la hiperósmosis se inicia principalmente por la vía HOG en la respuesta primaria, se sabe que está sobrepuesta con otras vías MAP como la ruta de mantenimiento de integridad de la pared celular (CWI) y la misma respuesta general al estrés (Estruch, F., 2000; Kim, J., et al., 1995).

En la última etapa de la respuesta ocurren los eventos adaptativos sostenidos que permitirán el restablecimiento de la homeostasis, estos comprenden la suma de los procesos ocurridos en la fase primaria de la respuesta. En este punto los perfiles de transcripción genómica recobran un nuevo estado estable, en paralelo con la recuperación de los niveles normales de la actividad metabólica. El glicerol intracelular acumulado propicia el flujo de agua al interior de la célula, favoreciendo el incremento del volumen celular, aunque comparativamente menor con respecto al tamaño que tenía previo al estrés. Además, de la reestructuración del citoesqueleto y la pared celular, que hacen posible la reanudación de la división celular (Mager, W. y Siderius, M., 2002).

2.3.3 Activación de la vía HOG

La inducción o represión de genes en condiciones hiperosmóticas está regulada por diversos mecanismos, sin embargo la mayor parte de la respuesta transcripcional está controlada por la vía HOG, la vía de alta osmolaridad del glicerol (HOG-*High Osmolarity Glycerol*) y diversos factores de

transcripción río abajo, que median los cambios adaptativos en el metabolismo, síntesis proteica y ciclo celular (Gustin, M., *et al.*, 1998; Maeda, T., *et al.*, 1994). Aunque HOG se activa principalmente por el aumento de la osmolaridad externa (por ejemplo, por el aumento en la concentración de NaCl o sorbitol), también puede inducirse en respuesta a otros estímulos como el ácido acético, el arsenito, choque frío y choque térmico (Dunayevich, P., *et al.*, 2018; Kim, J., *et al.*, 2016).

La vía HOG se compone de dos ramas de señalización independientes y funcionalmente redundantes conocidas como Sln1 y Sho1 (figura 2), que convergen en la activación de la MAPKKK Pbs2, que a su vez activará a la MAPK Hog1 (Hohmann, S., 2009; Mager, T., *et al.*, 2002; Estruch, F., 2000).

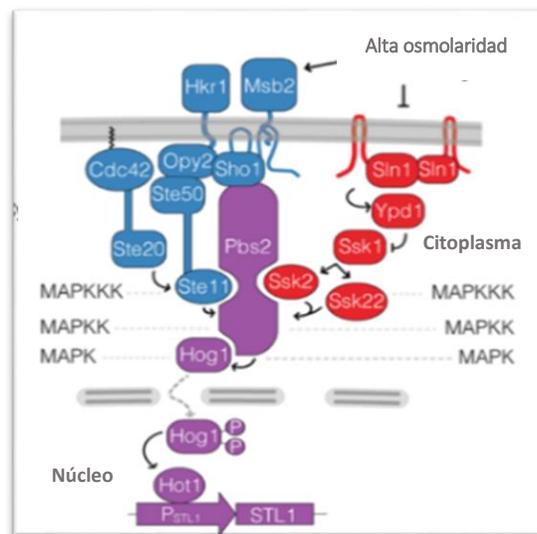


Figura 2. Ruta HOG con sus dos ramas de señalización (Sho1 en azul, Sln1 en rojo) que convergen en Pbs2, que fosforila y activa a Hog1. Tras la activación, Hog1 es translocado al núcleo, donde en conjunto con los factores de transcripción Sko1 y Skp1 (No se muestran) y Hot1, controlan la expresión génica.

Modificado de Dunayevich, et al., 2018.

En la primera de estas ramas, el osmosensor de membrana Sln1 transduce la señal a través de las proteínas Ypd1 y Ssk1 por fosforilación a las MAAPKKK Ssk2 y Ssk22, que a su vez fosforilan a Pbs2. En la segunda rama participan dos sensores transmembranales tipo mucina, Mbs2 y Hrk1 que activan a Sho1 el cual se une posteriormente un complejo donde la proteína Cdc42 promueve la activación de Ste20, para después iniciar la cascada al activar a la MAPK Ste11, que fosforila a Pbs2 (Dunayevich, P., *et al.*, 2018). En *S. cerevisiae* una vez activo Hog1 es translocado al núcleo, donde

se asocia con factores de transcripción como ScHot1, ScMns1p y ScMns2p/ScMns4p para con ello comenzar la regulación de la expresión de genes, entre ellos los transportadores necesarios para la acumulación de glicerol (figura 2) (Hohmann, S., 2009; Li, X., et al., 2008).

2.3.4 *Mantenimiento de la homeostasis iónica y biosíntesis de glicerol*

En todas las células la presencia de minerales es esencial para todas las actividades metabólicas, como el mantenimiento del potencial de membrana, regulación del pH, en la estructura de las proteínas, como cofactores de enzimas y en la señalización intracelular, por ello, es indispensable el control de los mecanismos que regulan la captación, utilización y almacenamiento de los minerales y con ello prevenir los daños derivados de su toxicidad (Cyert, M. y Philpott, C., 2013).

Pese a que el sodio es considerado tóxico en organismos sensibles como *S. cerevisiae*, donde conduce a estrés iónico, otras levaduras halotolerantes y halófilas pueden incluso reemplazar algunos requerimientos de potasio por sodio, mejorando su rendimiento celular (Grant, W., 2004), siendo dicha característica el objetivo de numerosos estudios que buscan la comprensión de los mecanismos detrás de la tolerancia al sodio.

Particularmente *S. cerevisiae* mantiene niveles bajos de este ion en el citoplasma, mediante efectivos sistemas de extrusión en el que participan transportadores como Nha1 ($\text{Na}^+ (\text{K}^+)/\text{H}^+$), los canales ENA1 (Bañuelos, M., et al., 1998; Márquez, J. y Serrano, R., 1996 ; Benito, B., et al., 1997) y los Nhx1⁺ que median su compartimentalización en la vacuola (Nass, R., et al., 1997).

Cuando la concentración extracelular de solutos, como NaCl, incrementa, en paralelo a las estrategias para el reestablecimiento del equilibrio hídrico, ocurre la producción y acumulación interna de altas concentraciones de solutos compatibles (Wood, J., 2011). Un osmolito compatible es toda aquella molécula de bajo peso molecular y fuertes propiedades de unión al agua que resulta inerte en los procesos metabólicos, al no interferir en la dinámica interna de la célula (Smiatek, J., 2012). Su función durante la hiperósmosis es la de revertir el gradiente de concentración de solutos, ya que su acumulación favorece la entrada de agua para alcanzar el equilibrio entre el potencial del agua interno y externo. Esta estrategia se encuentra altamente conservada en prácticamente todos los reinos, pudiéndose presentar además en respuesta al estrés osmótico, como un subproducto de la fermentación (Hohmann, S., 2009).

Si bien el glicerol es el principal osmolito compatible en *S. cerevisiae*, en otras levaduras se pueden encontrar una variedad de polioles como manitol, sorbitol y arabinitol, derivados de azúcar como trehalosa, sacarosa y sulfotrehalosa, además de aminoácidos o sus derivados como la prolina y el glutamato, o metilaminas como la glicina betaína (Hohmann, S., 2009; Grant, W., 2004; Pereira, I., et al., 2014).

En *S. cerevisiae*, el glicerol se sintetiza a partir de dihidroxiacetona fosfato (DHAP), un intermediario en la glucólisis, que es reducido por la acción de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Gpd) (codificada por los parálogos *GPD1/GPD2*) dependiente de NAD⁺ a glicerol-3-fosfato, que se desfosforila inmediatamente a glicerol por la acción de la glicerol-3- fosfatasa glicerol-3- fosfatasa (Gpp) (codificada por *GPP1/GPP2*). La sobreexpresión del gen *GPD1* aumenta la producción de glicerol a través de la acción de la cinasa Hog1, en tanto la expresión de *GPD2* y *GPP1* es inducida bajo condiciones anaeróbicas (Norbeck, J., 1998; Albertyn, J., et al., 1994).

La capacidad de mantener la concentración de glicerol intracelular no depende exclusivamente de su síntesis, la permeabilidad de la membrana plasmática tiene también un rol esencial al evitar la fuga del glicerol, en donde la actividad de Hog1 promueve tanto su retención a través del cierre de los canales Fps1, como su captación a través del sistema simporte de Stl1 (glicerol/H⁺) (Luyten, K., et al., 1995; Toh, T., et al., 2001; Tamás, M., et al., 1999; Duskova, M., et al. 2015).

2.3.5 Cambios en los componentes de la membrana e integridad de la pared celular presentes en la osmorregulación.

La pared celular y la membrana son la primera línea de defensa contra los cambios en los parámetros físico-químicos, al respecto, la fluidez de la membrana es el mejor indicador del grado de tolerancia a la sal, por lo que la pérdida de turgencia y el descenso del volumen celular se pueden correlacionar directamente con la actividad de HOG en la osmoadaptación (Turk, M., et al., 2011; Musa, H., 2018; Schaber, J., et al., 2010).

La importancia de la fluidez de la membrana se relaciona con el movimiento y difusión de sustancias, además de la regulación de la actividad de proteínas ancladas, especialmente de aquellas con actividad osmosensora como Sln1 y Sho1, que participan en la vía de señalización HOG (Turk, M., et al., 2007; Turk, M., et al., 2011; Hohmann, S., 2009; Kiewietdejonge, A., et al., 2006).

En *S. cerevisiae* se ha podido establecer que el aumento de sal ocasiona la reducción de la fluidez y el cierre del canal Fps1p, el cual se asocia también con la disminución del contenido de ergosterol

(Kiewietdejonge, A., *et al.*, 2006; Toh, T., *et al.*, 2001). Por otro lado, en estudios en la levadura osmotolerante *Hortaea werneckii*, se demostró que parte de su adaptación a estos ambientes depende de poseer membranas más fluidas con alto grado de insaturación de los ácidos grasos (Plemenitas, A. y Gunde-Cimerman, N., 2005).

2.3.6 Control del ciclo celular durante estrés hiperosmótico

Como se mencionó anteriormente, una parte de los efectos de la hiperósmosis se relacionan con un arresto transitorio del ciclo celular, en el cual la desorganización del citoesqueleto de actina actúa como un punto de control morfogénico que promueve la detención del crecimiento de las yemas. Este proceso está regulado a través de una compleja red de cinasas y ciclinas que participan activamente en todas las fases del ciclo celular, muchas de las cuales son activadas o reprimidas por Hog1 fosforilado.

En *S. cerevisiae* se ha podido identificar dos puntos de detención del ciclo celular en la transición de la fases G2 a M y de las fases G1 a S, el primero inducido por la acción de la cinasa Swe1, mientras que el segundo por Hog1p ante hiperósmosis (NaCl 0.4 M) (Bellí, G., *et al.*, 2001; Clotet, J. y Posas, F., 2007; Radmaneshfar, E., *et al.*, 2013).

2.3.7 Control de la biosíntesis de proteínas

En relación con el control del ciclo celular durante la hiperósmosis, existen reportes que señalan que después de un choque osmótico hay una represión transitoria de la síntesis de proteínas ribosomales y una baja eficiencia en la traducción (Norbeck, J., 1998), que favorece la traducción de ciertos RNA mensajeros (mRNA) y las proteínas que codifican bajo determinadas condiciones (Warringer, J., *et al.*, 2010). Parte de esta respuesta se ha vinculado con la actividad de Hog1 en el citoplasma donde participa en la activación de Rck2p (homólogo a la calmodulina), el cual posiblemente inhibe o atenúa la biosíntesis de proteínas al regular la traducción (Teige, M., *et al.*, 2001; Mager, W. y Siderius, M., 2002; Kim, J., *et al.*, 2016; Saito, H., 2010).

En 2009, Molin y sus colaboradores realizaron una evaluación de los cambios de la expresión génica en *S. cerevisiae*, empleando la tecnología de microarreglos. Evaluaron la estabilidad del mRNA en respuesta a una concentración de NaCl (0.4 M), logrando distinguir tres fases en virtud de la tasa de

transcripción diferencial tras proporcionar un choque osmótico: choque, adaptación y recuperación. Sus resultados muestran que existe una tasa de transcripción diferencial en los estados evaluados, donde Hog1 regula la expresión de casi todos los genes que son sobreexpresados tanto después del choque osmótico como en la fase de adaptación (30 min posteriores). Hog1 también interviene en la represión de genes, aunque no en la misma magnitud (Molin, C., et al., 2009).

En estudios similares se encontró que en el genoma de *S. cerevisiae* cerca de un 7% de los genes codificantes, incluidos aquellos relacionados con la síntesis de proteínas como las proteínas ribosomales (por ejemplo la rpS3), se inducen más de 5 veces como respuesta al incremento en la salinidad en un choque osmótico con 0.4 M de NaCl, al inicio y a la mitad del mismo, mostrando que además la respuesta es transitoria, pues estos niveles descienden tras el proceso adaptativo (Posas, F., et al., 2000).

2.4 El fenómeno de protección cruzada permite la tolerancia tanto al estrés oxidante como el estrés osmótico

El oxígeno molecular es un elemento esencial para los organismos aeróbicos en la producción eficiente de energía y al mismo tiempo los expone constantemente a estrés oxidante cuando existe un desbalance en los sistemas de óxido-reducción, que puede resultar tóxico para las células (Mager, W., et al., 2000).

El estrés oxidante es ocasionado por la acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales son moléculas altamente reactivas que pueden dañar a los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas.

Los radicales libres contienen uno o más electrones no apareados y se pueden formar como resultado de las actividades propias del metabolismo, donde la respiración mitocondrial es la fuente principal de ERO a través de la fosforilación oxidativa, donde al ocurrir una reducción incompleta del O_2 provoca la formación de moléculas reactivas como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) (Murphy, M., 2009); también pueden producirse durante la β -oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma y por la exposición a radiación UV e ionizante (Halliwell, B., 2006). Estas moléculas a su vez pueden tener efectos nocivos en la célula, como la agregación y fragmentación producto de la combinación errónea de péptidos ocasionadas por los daños producidos durante la peroxidación lipídica, además afecta la síntesis de aminoácidos,

genera la oxidación de proteínas, la formación de aductos y rupturas en la doble hélice del DNA (Navarrete, C., *et al.*, 2009; Hernández-Saavedra, N., 1999).

El proceso de respuesta y adaptación de las células para contender y protegerse de los daños causados por las ERO, ocurre a través de múltiples mecanismos de defensa que incluyen la acción de mecanismos enzimáticos (superóxido dismutasas, catalasas, glutatión peroxidasa, peroxirredoxinas) y no enzimáticos (glutatión, tiorredoxina, ascorbato, tocoferol, ácido úrico, β -caroteno) que participan en la remoción y reparación de los productos de la oxidación (Moradas-Ferreira, P., 2000; Mager, W., *et al.*, 2000).

En algunos trabajos se ha podido constatar que la respuesta celular a estrés oxidante se sobrepone con la respuesta a estrés osmótico, lo que permite mantener una protección cruzada ante diferentes agresiones ambientales (Garay-Arroyo, A., 2003; Lu, F.W. 2005; Mager, W., 2002; Prista, C., *et al.* 2016). El fenómeno de protección cruzada es un mecanismo a través del cual, a partir de una primera exposición a algún agente estresante, se puede desarrollar cierto grado de tolerancia a otros agentes, ya sean de igual o mayor magnitud que el primer estímulo. El hecho de poder desarrollar tolerancia a diferentes tipos de estrés a partir de un primer evento, implica la existencia un mecanismo de integración de señales y respuestas a diferentes formas de estrés, lo cual presupone que a pesar de que la agresión sea provocada por diferentes agentes, desencadena respuestas celulares comunes (Estruch, F., *et al.*, 2000).

Después de un choque hiperosmótico en *S. cerevisiae* ocurre una inducción de los genes que codifican enzimas implicadas en la respuesta a estrés oxidante, tal es el caso de la catalasa citoplasmática (CTT1), cuya expresión se regula por la respuesta general a estrés y la vía HOG. Los análisis de supervivencia y actividad enzimática tras el choque han permitido comprender la relevancia de la repuesta antioxidante en la osmoadaptación, de tal forma que en células que han crecido en condiciones de extrema salinidad por KCl al 1 % (0.13 M), llegan a presentar también una alta resistencia a dosis letales de H_2O_2 (10 mM) con la presencia de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GSH), la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Lu, F., 2005).

2.5 PCR tiempo real, principales aplicaciones y su importancia para la cuantificación de los cambios de expresión génica

El desarrollo de la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real ha contribuido a la simplificación y mejora de la cuantificación de ácidos nucleicos, convirtiéndose en una herramienta invaluable para la generación de múltiples investigaciones en diversas disciplinas, como es el caso del diagnóstico molecular en donde el uso de esta técnica utilizando DNA como templado, se encuentra más frecuentemente relacionado con la de detección y cuantificación de agentes infecciosos. Otras áreas clínico-terapéuticas la utilizan para la detección de translocaciones cromosómicas asociadas a fenotipos tumorales, así como en la medición de carga viral relacionada a la eficiencia de terapias farmacéuticas y progresión de enfermedades (Klein, D., 2002).

La expresión genética es comúnmente proporcional al número de copias de un gen determinado, y debido a que el RNA mensajero (mRNA) es la molécula de enlace entre el DNA y las proteínas, la variación en el número de copias transcritas en respuesta a ciertos estímulos, es generalmente proporcional al cambio en la expresión genética de un gen determinado (McPherson, M., et al. 2008). Dentro de las biociencias y la medicina el uso de la retrotranscripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*quantitative polymerase chain reaction*; qPCR, Q-PCR tiempo real o cuantitativa) permite cuantificar de manera confiable los cambios de expresión de transcritos específicos presentes en una muestra biológica (Klein, D., 2002; Ginzinger, D., 2002; Radonic, A., et al., 2004).

2.5.1 PCR cuantitativa de transcripción inversa

El uso específico de esta técnica para medir los cambios en la expresión transcripcional, emplea al RNA como molde, sin embargo, al ser ésta una molécula de naturaleza lábil, es necesaria su retrotranscripción a una molécula más estable, como el DNA complementario de doble cadena (cDNA), el cual posibilita su manipulación y el arranque de la reacción de extensión catalizada por la *Taq* DNA polimerasa en la PCR tiempo real (Derveaux, S., et al., 2010).

La síntesis del cDNA y el arranque de la reacción se pueden realizar a través de un método en dos pasos donde ocurren la transcripción reversa del mRNA (poli-A) a cDNA seguida de la reacción de

PCR tiempo real, o mediante un método de un solo paso, en el cual la síntesis del cDNA y la PCR tiempo real se llevan a cabo en el mismo tubo (Bustin, S., 2010).

2.5.2 Transcripción reversa y síntesis del DNA complementario

Debido a que en la PCR tiempo real se emplea la enzima *Taq* DNA polimerasa en la fase de extensión, es necesario generar cDNA a partir del RNA donde se expresa el gen de interés. Para ello se utiliza una polimerasa dependiente de RNA, una transcriptasa reversa (RT) que son enzimas provenientes de retrovirus, de la cuales las más utilizadas son la del virus aviar de mieloblastosis (AMV-RT) y la del virus de leucemia murina (MMLV-RT).

El método para generar las cadenas complementarias de cDNA, se vale del uso de secuencias nucleotídicas que hibridan en fragmentos específicos o aleatorios de RNA total extraído de la muestra de interés. De acuerdo a la especificidad en los sitios de hibridación y a la cantidad de cDNA que pueden producir se distinguen tres tipos de secuencias (Hernández, A., *et al.*, 1995):

1. Oligo-dT:

Son cadenas de poli desoxitimidina [oligo-dT ó secuencias poliT] se alinean en la región 3'UTR/Poli(A), las colas poliA que están presentes únicamente en los mRNA, por lo que su uso confiere un cDNA donde teóricamente se encuentran representados todos los mensajeros expresados en las células al momento de ser extraído el RNA. La mayor ventaja al trabajar con estos oligonucleótidos es que al ser inespecíficos, dan la posibilidad de trabajar con un buen número de secuencias blanco, sin embargo pueden producir cadenas de cDNA incompletas debido a que usualmente la retrotranscripción no progresa hasta la región 5' del mRNA.

2. Hexámeros al azar:

Se trata de secuencias aleatorias, en su mayoría hexámeros, que permiten la síntesis representativa tanto de regiones 5' como 3', generando un mayor rendimiento de cDNA. Debido a que los sitios de hibridación al RNA total son aleatorios, es posible contar con muestras donde están representados tanto el mRNA, como las especies de transferencia, ribosomales, o los no codificantes o pequeños.

Una variante emplea una combinación de hexámeros al azar con oligo-dT con la finalidad de exaltar las mejores cualidades de ambos métodos (Zhang, J. y Byrne, 1999).

3. *Oligonucleótidos específicos:*

El uso de oligonucleótidos específicos constituye la opción más sensible para la cuantificación, consiste en una secuencia conocida del RNA de interés. Pese a las considerables ventajas que presenta usar un método específico, el hecho de que cada reacción de RT se realice por separado para cada gen de interés, puede repercutir en diferencias en la eficiencia de la reacción de RT, lo cual implica variaciones en las futuras reacciones de PCR tiempo real además del incremento en el costo de los ensayos contra los otros tipos de oligonucleótidos (Pfaffl, M. 2004).

2.5.3 *Métodos de detección de los productos de PCR en tiempo real*

El seguimiento de la formación de productos durante la PCR ocurre ciclo a ciclo, gracias a reporteros que se unen al DNA bicatenario y que emiten tras su unión una señal fluorescente que puede ser detectada por el equipo. Durante la fase de extensión por cada nuevo producto de amplificación generado, el reportero emitirá una señal fluorescente.

El método de detección puede ser específico, cuando la secuencia de oligonucleótidos o sonda tenga anclado al reportero fluorescente, de modo que la señal solo será detectada por la formación específica del producto del gen de interés; o inespecífica, cuando se usan colorantes que emiten la señal fluorescente al intercalarse en las cadenas de los productos recién formados, las cuales pueden provenir tanto del gen de interés como de otras estructuras secundarias indeseables (Navarro, E., *et al.*, 2015; Pfaffl, M., *et al.*, 2004).

Específicamente el SYBR *Green* I es un colorante de cianina asimétrico (2-[N-(3-dimetilaminopropil)-N-propilamino]-4-[2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metilideno]-1 fenilquinolino), que se une al surco menor de la doble hélice, por lo que durante la reacción de PCR, cada vez que se genera una molécula nueva de DNA, se va incorporando también SYBR *Green*. Este complejo absorbe en luz azul ($\lambda_{\text{máx}}=497$ nm) y emite en luz verde ($\lambda_{\text{máx}}=520$ nm) (Navarro, E., *et al.*, 2015). En consecuencia, la fluorescencia emitida es directamente proporcional al número de copias obtenidas en cada ciclo de PCR.

Debido a que el SYBR *Green* es un colorante de unión inespecífica, capaz de intercalarse en cualquier molécula de doble cadena, sin discriminar entre productos específicos u otros productos tales como los dímeros de oligonucleótidos u horquillas, es indispensable validar a través de curvas de disociación de los productos de amplificación que la señal fluorescente efectivamente corresponda al gen de interés (Derveaux, S. *et al.*, 2010).

Existen otros sistemas de detección inespecífica, algunos de los más representativos son SYBR *Gold*, SYTO, BEBO, BOXTO, EvaGreen y bromuro de etidio, todos son agentes intercalantes del surco menor del DNA. Por su parte, en el uso de oligonucleótidos unidos a fluoróforos para la detección específica de productos se fundamenta en el principio de transferencia de energía fluorescente (FRET), en el cual las sondas tienen unidas dos moléculas fluorescentes, un reportero y un apagador. El método específico más usado son las sondas TaqMan (Ginzinger, 2002; Pfaffl, M., 2004), las cuales tienen secuencias cortas de unión a la región central de la secuencia a amplificar. En general son secuencias cortas de no más de 18 nucleótidos, que en el extremo 5' tienen anclado al reportero y en el extremo 3' al apagador. Cuando estas dos moléculas permanecen unidas a la sonda, toda la fluorescencia emitida por el reportero es absorbida por el apagador, por lo que no se detecta ninguna señal fluorescente. Cuando la DNA polimerasa se une al extremo 3' e inicia la elongación, a su paso se encuentra con la sonda y la degrada, debido a su actividad de exonucleasa 5'-3'. La hidrólisis de estas regiones, genera la separación del reportero fluorescente y el apagador, dando como resultado el incremento de la fluorescencia al suprimirse el fenómeno de FRET (Navarro, E., *et al.* 2015).

Otros métodos para la detección específica basadas la transferencia de energía fluorescente son las sondas *Molecular Beacon*, las *Scorpions* y las sondas FRET, aunque es posible encontrar más sistemas de detección (Navarro, E., *et al.* 2015).

2.5.4 Determinación del ciclo umbral (*threshold cycle, C_t*)

Los cálculos para realizar la cuantificación de la concentración inicial del gen de interés/blanco en la muestra de interés se centran únicamente en la etapa exponencial de la reacción de PCR y justo es en la fase logarítmica lineal en donde la eficiencia de la reacción es prácticamente del 100 % y por lo tanto la cuantificación es más precisa (figura 3). El punto exacto en el proceso de ciclado en que se detecta por primera vez la amplificación del producto (umbral o *threshold*), es decir el punto

donde la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal o ruido de fondo, es considerado como el punto en que la reacción de amplificación da comienzo.

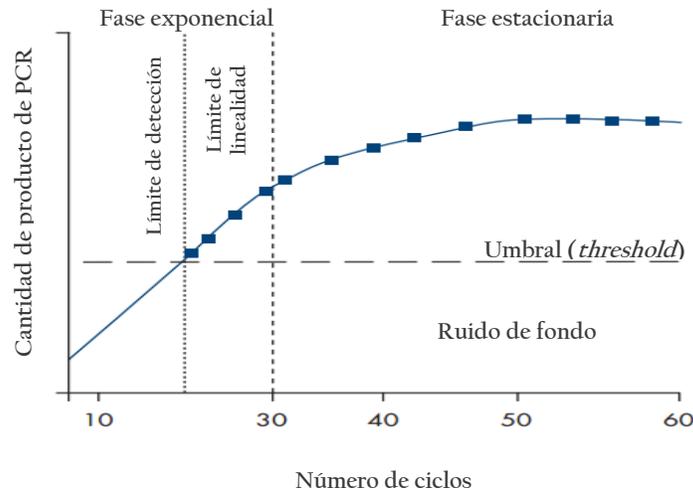


Figura 3. Cinética de amplificación en una reacción de PCR. El eje y está representado en escala logarítmica (Adaptado de Qiagen, 2010).

Fase geométrica o exponencial: Todos los reactivos se encuentran en abundancia, en este momento la eficiencia de la reacción es alta, muy cercana al 100%, teniendo un comportamiento 2^n .

Fase lineal: Los oligonucleótidos, los dNTP's y la enzima empiezan a disminuir, además de la generación de pirofosfato y del decaimiento de la actividad enzimática, lo que reduce la eficiencia de la amplificación de manera constante, por lo que no es recomendable realizar la cuantificación en esta fase.

Fase estacionaria o *plateau*: Es el punto en que se detiene la amplificación, es decir llega al límite de detección, donde la cantidad de producto formado se mantiene constante sin importar el número de ciclos que continúen en la reacción.

En la determinación de la línea de umbral (también llamada *threshold*) se utilizan las intensidades de fluorescencia detectadas en el ruido de fondo, que corresponden a los primeros ciclos de amplificación dentro del diagrama de cinética de la PCR, que usualmente abarca entre los ciclos 3 y 15; en esta parte del proceso los cambios en los niveles de fluorescencia emitidos que son detectados son muy pequeños. A esta sección del diagrama de cinética también se le conoce como línea base (*baseline*) (figura 4).

El número de umbral o *threshold* equivale a diez veces la desviación estándar de la medida de emisión de la línea base. El número de ciclo en el cual una muestra sobrepasa el umbral se conoce como C_t (*threshold cycle*, ciclo umbral de detección) o C_p (*crossing point*, punto de cruce). De esta forma, el C_t representa el número de ciclos que tomó a cada muestra generar la cantidad suficiente

de fluorescencia para llegar al umbral, marcando el inicio de la fase exponencial de la reacción de PCR. Además de ello, el C_t es inversamente proporcional al número de copias del blanco, por lo tanto cuanto más alto es el número de copias iniciales a amplificar, más pronto se observa un aumento significativo de la fluorescencia y por lo tanto los valores de C_t son más bajos.

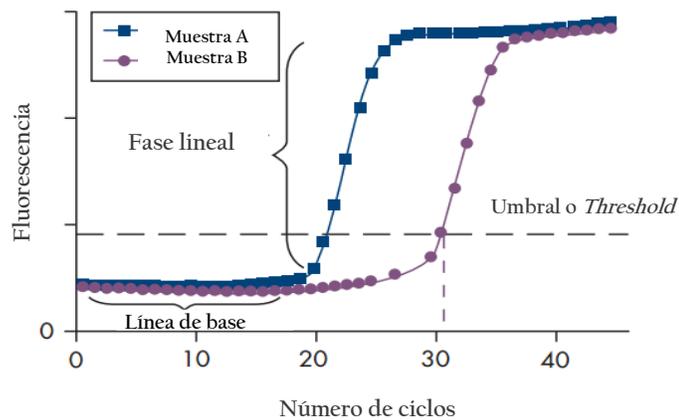


Figura 4. Diagrama de amplificación. Incremento de la fluorescencia de dos muestras (A y B). La muestra A contiene una mayor concentración del blanco respecto de B, y por lo tanto el valor de C_t de B es mayor. El eje y está en escala lineal (Adaptado de Qiagen, 2010).

2.5.5 Curvas de disociación (melting curves)

Los análisis por curva de disociación se realizan después de terminado el último ciclo de PCR y se llevan a cabo con la finalidad de corroborar que la amplificación corresponde a un solo producto particular, la secuencia blanco, y no a la presencia de estructuras secundarias (Derveaux, S. *et al.*, 2010).

Para ello, se eleva la temperatura paulatinamente desde 50°C hasta 95°C, donde el incremento de la temperatura provoca la desnaturalización gradual de la doble cadena de DNA, provocando la disociación del complejo que formaba con SYBR *Green*, por lo que hay una disminución de la intensidad de fluorescencia, ya que al separarse la doble cadena, el reportero queda libre y ya no emite luz. Cuando la temperatura desciende hasta la temperatura de desnaturalización específica del amplicón (T_m), la velocidad de disociación se incrementa drásticamente dado que el 50% del producto de amplificación se encuentra desnaturalizado, en esta sección la curva presenta un punto de inflexión que corresponde a la temperatura de fusión del amplicón. Cabe mencionar que los productos inespecíficos y los dímeros de oligonucleótidos se desnaturalizan a temperaturas más bajas que los productos específicos, por esa razón si durante la reacción se llegaron a generar, es

posible identificarlos por su propio pico de disociación (figura 5) (Navarro, E., *et al.*, 2015; Ririe, K., *et al.*, 1997).

La estrategia de cuantificación es el punto más importante para tener un exitoso análisis de PCR tiempo real (Pfaffl, M., 2004). De forma general existen dos estrategias a través de las cuales efectuar los cálculos, la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa, para conocer ya sea la concentración inicial del blanco en una muestra experimental o para conocer los cambios de expresión del transcrito en comparación con un gen de referencia.

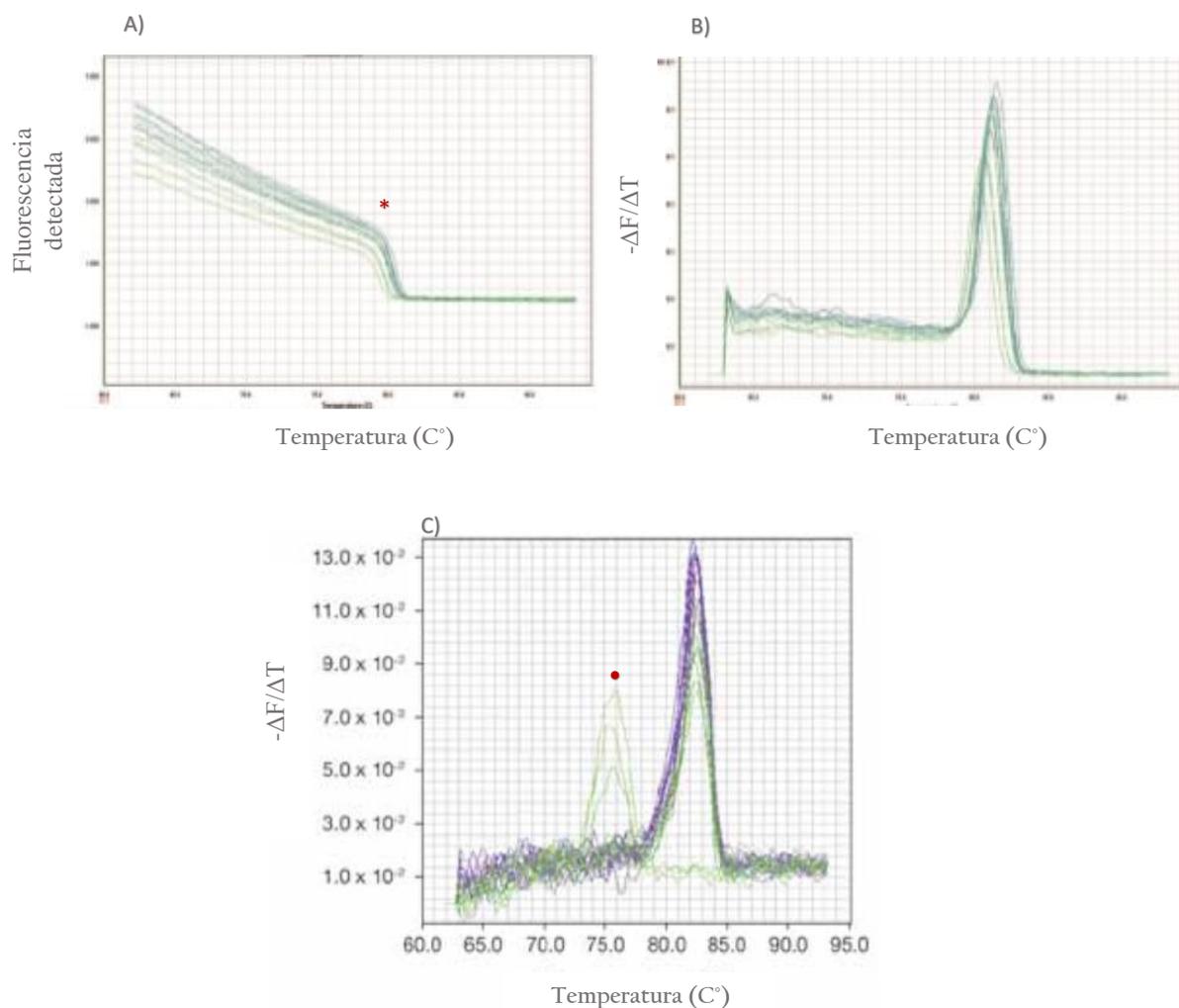


Figura 5. Curvas de disociación de productos de PCR usando SYBR Green I. A) Decaimiento de la fluorescencia con respecto a la temperatura y el punto de inflexión (*) que marca la T_m del producto de amplificación. En el eje x se representa el incremento de la T en °C, mientras que en el eje y el incremento en la fluorescencia. **B)** Pico único que corresponde a la temperatura de desnaturalización del producto, que se obtiene al calcular la derivada negativa (-ΔF/ΔT). **C)** La gráfica muestra la formación de más de un pico de disociación, debido a la amplificación de productos inespecíficos (•)

(Adaptado de Qiagen, 2010).

2.5.6 Métodos de cuantificación en la PCR tiempo real

La cuantificación del mRNA es la parte más importante para obtener resultados confiables y un PCR tiempo real exitoso (Pfaffl, M., 2004). En general hay dos estrategias a través de las cuales dichos cambios pueden ser calculados, la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa, estas estrategias permiten determinar la concentración inicial del gen blanco y los cambios en la expresión de un transcrito usando como referencia un gen de expresión constante, respectivamente.

2.5.6.1 Cuantificación absoluta o método de la curva estándar

La cuantificación absoluta o método de la curva estándar se usa generalmente para detectar una cantidad pequeña de genes en una o varias muestras, por ejemplo, la carga viral. Este método determina la concentración del gen de interés expresado como número de copias, utilizando para ello, curvas de calibración procedentes de la muestra en donde se exprese el gen de interés y un gen control (Ginzinger, D., 2002).

Inicialmente la curva estándar se construye utilizando al menos 5 diluciones seriadas de una muestra *stock* cuya concentración sea conocida. El rango dinámico en el cual debe hacerse la curva estándar tiene que tener nueve órdenes de magnitud, de $<10^1$ a $>10^{10}$, aunque estos valores dependen del tipo de estándar que se ocupe (Pfaffl, M., 2004). Se debe determinar el valor de C_t de cada una de las diluciones y con ellos se traza una gráfica en la que se comparen estos valores con respecto al logaritmo de la concentración de cada una de las diluciones (eje x), la gráfica resultante es una recta, cuyo valor de pendiente (m) es negativo (figura 6). Cuando se utilizan diluciones seriales con factor de 10 (o decimales), el valor de la pendiente es cercano a -3.33; el valor de la pendiente es utilizado en la ecuación para el cálculo de la eficiencia (Ec. 1), tanto de la curva estándar como de las muestras (Svec, D., et al., 2015; Kubista, M., et al., 2006).

$$E=10^{-1/pendiente}-1$$

Ecuación 1

El valor de la pendiente es un indicativo directo del valor de la eficiencia, de tal modo que pendientes más negativas que -3.3 (por ejemplo -3.8) indican una eficiencia de PCR de <1 , en tanto que pendientes más positivas (por ejemplo -3.0), indican eficiencias que superan el 100 %, lo cual puede

ocurrir cuando los valores ocupados en la cuantificación no corresponden a la fase lineal del diagrama de cinética de PCR o por la presencia de inhibidores en la muestra.

La eficiencia en la PCR está definida como la fracción de moléculas del gen blanco que son copiadas en cada ciclo de PCR, cuyo valor en un ensayo ideal, esto es, sin presencia de inhibidores en la mezcla de reacción, sin errores de pipeteo y con una muestra de buena calidad, es de al menos un 90 % ($E = 100\% - 10\%$ de error) (Svec, D., et al., 2015; Qiagen, 2010).

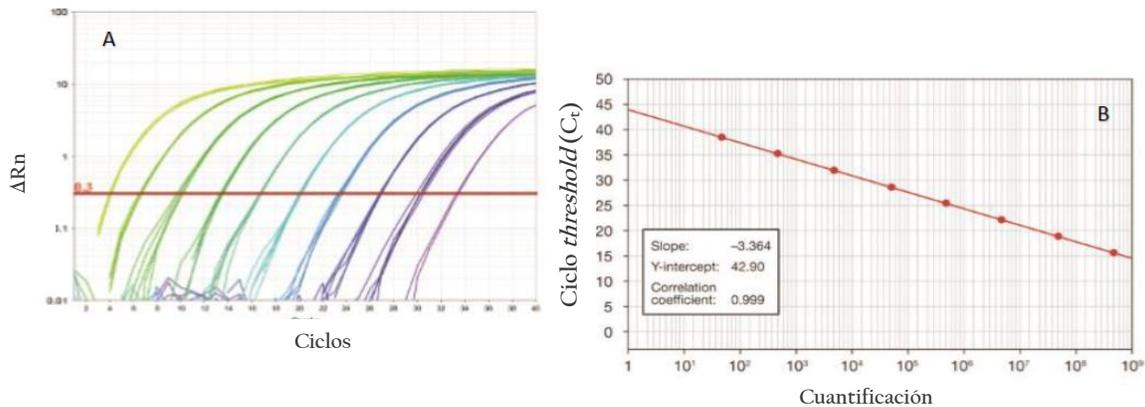


Figura 6. Diagrama de amplificación de una curva estándar. A) Diagrama de amplificación de una curva estándar construida a partir de un *stock* cuya concentración es conocida, de la cual se hicieron 9 diluciones seriales. **B)** Curva estándar en PCR tiempo real, que muestra los valores de C_t (eje y) contra el logaritmo de la concentración de cada una de las diluciones (eje x). Se observan los parámetros informativos, pendiente $m = -3.3$ y el coeficiente de correlación $R^2 = 0.99$, deseables para una eficiencia $E = 100\%$ (Adaptado de *Real-time PCR. Handbook of life technologies*).

Para estimar la concentración de RNA desconocida de las muestras blanco, sus valores de C_t tienen que caer dentro del rango dinámico probado en la curva estándar, para posteriormente interpolar su valor dentro de la curva estándar a fin de calcular su concentración (Figura 7).

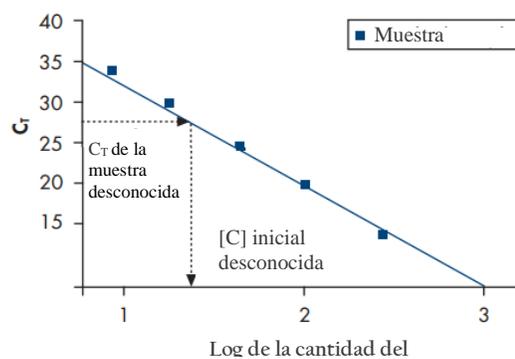


Figura 7. Cuantificación absoluta a través de curva estándar. Muestra la determinación de la concentración en una muestra de interés (Adaptado de Qiagen, 2010).

Como se mencionó anteriormente, las diluciones seriales de una muestra cuya concentración es conocida, permiten la construcción de una curva estándar, de la cual se pueden extraer parámetros informativos que serán de utilidad para la cuantificación, entre ellos, el valor de la eficiencia (E) es el más importante, seguido del establecimiento del rango dinámico del ensayo, es decir el límite de detección y el límite de cuantificación.

2.5.6.2 Cuantificación relativa

La cuantificación relativa determina el cambio en los niveles de expresión del mRNA de un gen de interés en diferentes condiciones experimentales (muestras) contra un gen de referencia (también llamado control endógeno, normalizador, constitutivo, calibrador o *housekeeping*), cuya expresión se dice constitutiva o estable en todas las condiciones que se prueben (es decir es expresado en todos los tratamientos en los que posee una expresión en número de copias que no varía), en otras palabras la cuantificación relativa permite conocer cuántas veces más o menos se expresa el gen de interés (o blanco) con respecto al gen de referencia constitutivo. Debido a que los resultados son expresados de manera relativa, no se necesita una curva de calibración con un estándar de concentración conocida. Este método de cuantificación tiene como principal uso la determinación de la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión de un gen (Pfaffl, M., 2004).

Este método asume que el o los blancos y el gen de referencia tienen eficiencias similares cercanas al 100% (+/- 10%). Dado que ese es un requisito indispensable, para la realización de este método se debe hacer un paso previo de validación, que busca demostrar que las eficiencias de los blancos y el control son similares (Pfaffl, M., 2004). Para ello, se construye una curva estándar del gen de referencia y el blanco, a partir de una referencia de RNA o cDNA, con los resultados de C_t obtenidos se calcula la eficiencia de la amplificación usando la ecuación 1. La diferencia de la eficiencia de ambos C_t (ΔC_t) se gráfica y si la pendiente resultante es menor de 0.1, entonces indica que los genes son comparables entre sí.

Aunque existen diversos modelos matemáticos para realizar los cálculos de la expresión del gen blanco, estos se basan en la comparación entre los valores de umbral (C_t).

El método C_t comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Livak, K. y Schmittgen, T., 2001) se inicia con el cálculo de la diferencia de C_t entre el gen de interés y el C_t del gen de referencia, cálculo que debe ser determinado para todas las muestras experimentales o tratamientos y la muestra calibradora:

$$\begin{aligned}\Delta C_t(\text{tratamiento } x) &= C_t(\text{gen de interés}) - C_t(\text{gen de referencia}) \\ \Delta C_t(\text{calibrador}) &= C_t(\text{gen de interés}) - C_t(\text{gen de referencia})\end{aligned}\quad \text{Ecuación 2}$$

Donde ΔC_t (tratamiento) indica la normalización en la muestra experimental 1 (tratamiento 1, condición 1); C_t (gen de interés) se refiere al valor de C_t del gen de interés en una muestra experimental 1 y C_t (gen de referencia) es el valor C_t del gen de referencia o normalizador en la muestra experimental 1. Se deberá aplicar la misma fórmula para todas las muestras experimentales en los que se quiera medir el cambio de expresión del gen de interés. ΔC_t (calibrador) se refiere a la condición estándar con la cual se va a normalizar, por ejemplo una condición de crecimiento óptimo.

Posteriormente se calcula el $\Delta\Delta C_t$ para cada muestra, para lo cual se emplean los valores de ΔC_t obtenidos en la ecuación 2:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{tratamiento}) - \Delta C_t(\text{calibrador}) \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde el *tratamiento* se refiere al nivel de expresión del mRNA en la condición experimental o tratamiento de un gen X (blanco) y el *calibrador* es el nivel de expresión del mismo gen X en la condición de referencia (puede ser el tratamiento sin estrés).

Si la eficiencia de ambos genes, tanto del de referencia como del gen blanco, es comparable, entonces la expresión normalizada de los genes se calcula usando la siguiente fórmula:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad \text{Ecuación 4}$$

Si la muestra a comparar es la que posee la menor expresión tendrá un mayor valor de ΔC_t , cabe destacar que por definición el valor $\Delta\Delta C_t$ del calibrador es 0 y su expresión relativa (2^0) es igual a 1.

El modelo matemático propuesto por Pfaffl en 2001, es la alternativa que toma en cuenta directamente los valores de eficiencia de la reacción y la desviación en el valor de CP (*crossing point* o C_t) de una muestra conocida. Donde la proporción del gen de interés o blanco de una muestra o tratamiento se expresa en comparación con un control o condición calibradora de un gen de referencia. Cabe mencionar que estos métodos, si bien no toman el valor de la eficiencia en sus ecuaciones para determinar la cuantificación, sí lo utilizan como un factor determinante para evaluar la calidad de sus curvas estándar y como requisito en la comparación de los genes a relacionar. Al igual que los modelos de cuantificación anteriores, el resultado, tomando en cuenta la eficiencia, arroja la proporción de los cambios de expresión de un gen blanco en comparación con el gen de referencia:

$$R = \frac{(E_{\text{blanco}})^{\Delta C_{P \text{ gen de interés (calibrador-tratamiento)}}}}{(E_{\text{referencia}})^{C_{P \text{ gen de referencia (calibrador-tratamiento)}}}} \quad \text{Ecuación 5}$$

donde E blanco es la eficiencia del gen de interés; E referencia es la eficiencia del gen de referencia; CP blanco es la desviación del CP (*crossing point*) del de interés en el control menos la desviación del CP de gen de interés en la muestra o tratamiento; Δ CP referencia, es la desviación del CP del gen de referencia en el control menos la desviación del CP de gen de referencia en la muestra o tratamiento (Pfaffl, M., 2001).

2.5.7 Importancia de los genes de referencia

Cuando se analizan los cambios de expresión de un gen por la vía de su cuantificación relativa, estos cambios solo pueden realizarse a través de la comparación con los niveles de expresión de otro gen, cuya expresión se mantenga constante bajo las condiciones experimentales que se pretenden analizar (de Lima Rebouças, E., *et al.*, 2013). Sin embargo, gran parte de los problemas para definir un buen gen referencia radica en la propia inestabilidad genética dentro de diversas condiciones a probar (Derveaux, S. *et al.*, 2010).

Una de las mayores dificultades en la obtención de patrones de expresión confiables, está en la capacidad de descartar todas aquellas variaciones inducidas por efectos no biológicos y dejar sólo las producidas por fenómenos biológicos. Una manera de conseguirlo es a través del uso normalizadores, cuya función es fungir como un control interno para todas las muestras a analizar y de este modo reducir las variaciones producto de los efectos no biológicos (Ling, D. y Salvaterra, P., 2011). Hay genes que clásicamente han sido usados como referencia, entre los más normalmente usados están algunas de las isoformas de actina -la β -actina es la más popular-, el gen que codifica para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la tubulina, ciclofilina, el factor de elongación 1- α , la ubiquitina y el RNA 18S, todos ellos requeridos para el mantenimiento celular (Ruan, W. y Lai, M., 2007). Sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado que el gen para la β -actina por ejemplo, es susceptible de sufrir cambios en su expresión en respuesta a hormonas, durante los procesos de crecimiento, envejecimiento y diferenciación, así como ante diferentes tipos de estrés (de Lima Rebouças, E., *et al.*, 2013; Wan, H., *et al.*, 2011; Ruan, W. y Lai, M., 2007). En *S. cerevisiae* se han explorado algunos genes candidatos a ser genes de referencia que puedan funcionar bajo diferentes condiciones fisiológicas, como el metabolismo de la glucosa y en fuentes de carbono no fermentables, en estos estudios se han destacado los genes *ACT1*, *IPPI1* y *PDA1* como adecuados para usarse como controles internos (Stahlberg, A., *et al.*, 2008).

En este proyecto se analizaron algunos genes candidatos para usarse como genes de referencia bajo condiciones de salinidad en *Debaryomyces hansenii*.

2.6 Genes evaluados en respuesta a cambios en la salinidad del medio

2.6.1 Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT- Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase)

La fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT) cataliza la síntesis de fosfatidilcolina (PC), a través de la transferencia gradual de tres grupos metilo de S-adenosilmetionina (AdoMet) a la fosfatidiletanolamina (PE) (Tasseva, G., 2016).

Si bien la formación de PC puede ocurrir a través las rutas CPD-DAG (fosfocolina citidililtransferasa-diacilglicerol) y la ruta CPD-colina, la primera es la más empleada tanto en mamíferos como en *S. cerevisiae*, mientras que la segunda ruta es activa cuando algunas enzimas de la vía CPD-DAG se encuentran defectuosas (Carman, G. y Henry, S., 1999).

La enzima fosfodietiletanolamina N-metiltransferasa forma parte de otra ruta de síntesis de PC, la cual opera a través de tres reacciones de metilación secuenciales donde la primera reacción de metilación es catalizada por la enzima Pem1 codificada por el gen *PEM1/CHO2*; las últimas dos reacciones de metilación subsecuentes son catalizadas por la enzima Pem2 codificada por *PEM2/OPI3* (Carman, G. y Henry, S., 1999; Cole, L., et al. 2012).

La PC es el componente estructural más abundante de las células eucariontes, cuya función es determinante en el mantenimiento de las barreras de permeabilidad de la membrana (Boumann, H., 2004; Van Meer, G., 2008).

Se ha visto que la configuración y composición de la membrana se ve afectada ante los cambios en las condiciones del medio, por ejemplo, en un experimento realizado en *S. cerevisiae* sometida a estrés por alta presión de dióxido de carbono, se observó cómo se induce la síntesis de AdoMet y la síntesis de PC a través de la metilación de la PE, con la inducción transcripcional de las metiltransferasas que participan en esta vía (Niu, L., 2017).

En organismos con marcada tolerancia a sal como *D. hansenii*, se ha observado que aun cuando los niveles de salinidad fluctúan (rango de NaCl entre 0 y 2 M), el porcentaje PC se mantiene constante (Turk, M., et al., 2007).

Considerando los resultados obtenidos por Turk y sus colaboradores en 2007, si los niveles de PC se mantienen constantes en un rango de salinidad por NaCl de 0 a 2 M, cabe la posibilidad que las enzimas relacionadas con su biosíntesis, como la Pem1 y la Pem2, así como los genes que las codifican permanezcan con niveles constantes de transcripción. Siendo así, consideramos que el gen *DhPEMT* podría ser un candidato para utilizarse como gen de referencia de expresión constitutiva en ensayos de cuantificación relativa de los cambios de expresión génica en respuesta a cambios en la osmolaridad.

2.6.2 Proteína S3 de la subunidad 40S ribosomal (*rpS3*)

En todos los dominios de la vida los ribosomas tienen como principal función ser el centro de la traducción y síntesis de proteínas. En eucariontes son complejos macromoleculares que se localizan en el citoplasma, integrados por dos subunidades, una grande 60S y una subunidad pequeña 40S, además de cerca de 75 proteínas ribosomales (proteínas r) y cuatro moléculas de RNA ribosomal (5S, 5.8S, 18S y 25S) en *S. cerevisiae* (Finken-Eigen, M., 1996; Woolford, J. y Baserga, S., 2013.). Tanto la traducción de proteínas como la biosíntesis de ribosomas resultan en procesos altamente energéticos que llegan a requerir cerca del 90% de la energía de la célula en fase de crecimiento exponencial (Warner, J., 1999). Considerando la relevancia de su función en el aseguramiento de la viabilidad celular, la biogénesis de los ribosomas en un proceso que obedece una regulación cuidadosa, que puede verse afectada severamente por la presencia de agentes que generen estrés en la célula (Ladror, D., 2014).

La proteína ribosomal S3 (*rpS3*) es un componente de la subunidad 40S del ribosoma que participa críticamente en su maduración al mediar la reorganización estructural y las etapas de ensamblaje de la subunidad, así como el inicio de la traducción. Además, posee funciones extra ribosomales en la reparación del DNA, en la regulación específica de genes mediante la vía NF- κ B, inducción de apoptosis, en la respuesta inmune, en las interacciones hospedero-patógeno, la regulación postraduccional, así como en la autorregulación de su traducción (Graifer, D., et al., 2014).

Se ha podido observar que cuando los niveles de ERO se incrementan, aparecen daños en los genes mitocondriales. El incremento de ERO se acompaña de la inducción y acumulación de *rsp3* en las mitocondrias, con la finalidad de reparar su DNA y en paralelo ocurre una notable disminución en la síntesis de proteínas (Kim, J., et al., 2013).

En relación al uso de proteínas ribosomales como genes de referencia en ensayos de PCR en tiempo real, Hsiao y sus colaboradores en 2001, publicaron un estudio en que se sugirió el uso de estos genes como referencia debido a que se expresan en todas las estirpes celulares humanas donde dirigen la biogénesis de ribosomas (Hsiao, L., *et al.*, 2001). Posteriormente en 2008, Thorrez y sus colaboradores proporcionaron información de la variación de la expresión de 81 genes que codifican para proteínas ribosomales, incluida la rpS3, en diferentes tejidos de ratón, donde observaron por un lado, que se trata de genes cuya expresión es elevada probablemente por las funciones en la biogénesis de proteínas, y por otro lado encontraron variaciones significativas en su expresión al evaluar en los diferentes tejidos. Dentro del grupo de genes evaluados por Thorrez, la proteína ribosomal L3 fue la más estable (Thorrez, L., *et al.*, 2008). Si bien, hasta el momento no hay evidencia del uso de gen *rpS3* como gen de referencia en humanos o levaduras, estudios realizados en dípteros de la especie *Aedes aegypti* lo han usado en conjunto con el gen de tubulina para la normalización en PCR en tiempo real (Bedoya-Pérez, L.P., *et al.*, 2013).

Nosotros analizaremos la estabilidad de la expresión del gen *DhrpS3* como candidato a usarse como gen de referencia en *D. hansenii*.

2.6.3 Subunidad grande de la enzima ribonucleótido reductasa (RNR1)

Las ribonucleótido reductasas (RNRs) son enzimas que catalizan la reducción de los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), proporcionando así los componentes básicos para la síntesis y reparación del DNA en todos los organismos. Su actividad está dada por la conversión de los ribonucleósidos difosfato (NDP) a su correspondiente desoxirribonucleósido difosfato (dNDP), a través de la sustitución de un grupo 2'-OH de un ribonucleósido di o tri-fosfatado a un átomo de hidrógeno (Nordlund, P y Reichard, P., 2006; Kolberg, M., 2004).

Todas las enzimas RNR comparten un mecanismo catalítico básico común que consiste en la formación transitoria de un radical tiol seguida de la regeneración del sitio activo de la enzima. Estas enzimas están formadas por dos componentes, uno generador que produce y alberga un radical que se encarga de la activación del segundo componente, que es un reductor. Se han descrito tres tipos enzimas con actividad de RNR, las cuales se clasifican en I, II y III, y que se diferencian de acuerdo a

su interacción con el oxígeno y la forma en que generan el radical tiol (Mader, R., *et al.*, 2001; Reichard, P., 1993).

Las RNR clase I se encuentran en la mayoría de los organismos. Son enzimas dependientes del oxígeno y están formadas por cuatro subunidades que difieren levemente en su estructura, dos subunidades R1 o α (aprox. 90 kDa cada una) y dos subunidades R2 o β o β' (aprox. 45 kDa). En la subunidad grande R1 (dímero α_2) se aloja el centro catalítico del radical cisteína y los sitios de regulación alostérica que determinan la preferencia del sustrato, mientras que la subunidad pequeña R2 (dímero β_2), utiliza como cofactor Fe(III) en un centro oxo-dihierro (Fe-O-Fe), donde se genera y acumula un radical tirosil (Guarino, E., 2014).

La función de las enzimas RNR clase II es independiente del oxígeno y tienen una subunidad que requiere de 5'-deoxiadenosilcobalamina para la generación del radical. Las enzimas clase III están presentes únicamente en condiciones de anaerobiosis y emplean un radical de glicina para la catálisis (Guarino, E., 2014).

Las levaduras cuentan con enzimas RNR clase I. En *S. cerevisiae*, la subunidad catalítica R1 se compone por un homodímero formado por la proteína Rnr1, codificada por el gen *RNR1*, que en condiciones normales se localiza en el citoplasma, en tanto que la subunidad R2 está formada por un heterodímero $\beta\beta'$ compuesto por las proteínas Rnr2/4, codificadas por los parálogos *RNR1* y *RNR2*, que se encuentra en el núcleo, anclada a través de la proteína nuclear Wtm1. Dado que Rnr4 no se une a hierro y por lo tanto no es posible la generación del radical tirosil, Rnr4 se encarga de mediar el plegamiento correcto y ensamblaje del cofactor di-hierro en Rnr2 para la generación del radical (Sanvisens, N., 2013; Das, A., *et al.*, 2018). Durante la fase S del ciclo celular y en respuesta a los daños sobre el DNA, la subunidad pequeña R2 (Rnr2/4) es translocada hacia el citoplasma, donde se ensambla con el complejo RNR activo y de este modo permite la síntesis de dNTPs.

Debido a que los dNTPs son los precursores de la síntesis del DNA, el mantenimiento de un nivel balanceado en su producción asegura la estabilidad genómica y además preserva la viabilidad celular durante la proliferación celular y en respuesta a los daños sobre el DNA (Guarino, E., 2014). Con la finalidad de evitar un exceso en la producción de dNTPs, en las células eucariontes existe una modulación enzimática de RNR mediante un mecanismo de regulación alostérica y transcripcional.

Se ha demostrado que cuando ocurre un aumento en los niveles de producción de dNTPs, hay una correlación con el incremento en la tasa de mutación, lo cual pone de manifiesto la relevancia de la enzima RNR en la viabilidad celular (Mader, R., *et al.*, 2001). En mamíferos se ha relacionado la actividad de la RNR en la progresión de algunas neoplasias, donde los tratamientos terapéuticos contemplan el uso de inhibidores de la enzima que repercuten en un retraso en la tasa de replicación del DNA.

El mantenimiento de este balance ocurre mediante un mecanismo *feedback* de regulación alostérica a través de la subunidad grande R1. Como se mencionó anteriormente, R1 está formado por un homodímero, cada monómero a su vez contiene dos sitios reguladores distintos: el sitio de especificidad (sitio S) y el sitio de actividad (sitio A). El sitio S actúa como un sensor de la concentración individual de cada dNTP y determina qué sustrato se reduce en el sitio catalítico. Una vez que el efector alostérico se une al sitio S, éste sufre un cambio conformacional que lo hace más susceptible a cierto tipo de sustratos, es decir, que puede discriminar entre ellos y de este modo mantener el equilibrio entre los cuatro dNTPs que se van generando. Es así que ATP y dATP promueven la reducción de CDP y UDP; dTTP y dGTP aumentan la reducción de GDP y ADP. Por su parte, el sitio A actúa como un interruptor, al controlar la actividad enzimática de RNR mediante la proporción de dATP (función inhibidora)/ATP (función activadora). Aunque los niveles intracelulares de ATP son mayores que los de dATP, este último posee una mayor afinidad al sitio A.

El mRNA de ambas subunidades está regulado transcripcionalmente por el ciclo celular, de tal modo que en la transición de la fase G1 del ciclo celular a la fase S, la subunidad R2 tiene una alta tasa de síntesis, mientras que la subunidad grande R1 se expresa de manera constitutiva (Mader, R., *et al.*, 2001).

En 2003, Chabes y sus colaboradores propusieron que en la fase G1 del ciclo celular de *S. cerevisiae*, los niveles de expresión de los genes que codifican para la enzima RNR son bajos y mantienen una correlación con una actividad enzimática mínima. En contraste, durante la fase S, existe una inducción de la transcripción de los mismos genes aunado al incremento en la actividad enzimática, y por lo tanto, de los niveles de dNTPs (Chabes, A., 2003).

Consideramos que el análisis de el gen de RNR puede proporcionar información interesante, ya que por un lado, en condiciones no estresantes esperaríamos ver que los niveles del transcrito del gen *DhRNR* permaneciera constante, y por otro lado, solo si las concentraciones de NaCl generen en *D. hansenii* una respuesta a estrés, podría observarse el incremento en el transcrito del gen.

2.6.4 Superóxido dismutasa (SOD1)

Las superóxido dismutasas son metaloenzimas efectivas para eliminar catalíticamente los radicales superóxido al aumentar la velocidad de dismutación del anión superóxido (O_2^-) a H_2O_2 y O_2 , evitando así la formación consecutiva de ERO como peróxido de hidrógeno, hipoclorito, peroxinitrato y radical hidroxilo, actuando como la primera línea de defensa contra las especies reactivas del oxígeno. El papel de la SOD en la protección contra la toxicidad del oxígeno ha sido estudiado para la comprensión de la senescencia celular ocasionado por estrés oxidante (Miller, A., 2012).

Estas enzimas son ubicuas y están presentes tanto en procariontes como en eucariontes, organismos donde se ha podido identificar cuatro enzimas diferentes que se caracterizan en virtud del grupo prostético o cofactor utilizado, ubicándose además en diferentes compartimentos celulares:

- i. Las Fe-SOD se encuentran en procariontes, en organelos subcelulares y en el espacio periplásmico, además del estar presente en los cloroplastos de las plantas.
- ii. Las Ni-SOD se han encontrado en bacterias del género *Streptococcus*.
- iii. Las Mn-SOD se encuentran tanto en la matriz mitocondrial y peroxisomas de eucariontes, como en el citosol de procariontes.
- iv. Las Cu/Zn-SOD (Sod1) se encuentran generalmente en el citoplasma de eucariontes y en el espacio de la membrana interna de las mitocondrias (Hernández-Saavedra, N., 1999).

Las levaduras cuentan con dos tipos de enzimas superóxido dismutasas, las Cu/Zn SOD (codificada por el gen *SOD1*) localizadas en el citoplasma, que se encarga de la remoción de los radicales superóxido del citoplasma y del peroxisoma. Las otras enzimas MnSOD (codificadas por el gen *SOD2*) que se ubican en la matriz mitocondrial cuya función es proteger a la mitocondria del anión superóxido generado durante la respiración. Se ha demostrado la importancia de la enzima en el citoplasma de *S. cerevisiae* y *E. coli*, en donde niveles bajos de actividad de SOD se relacionan con el

crecimiento lento de ambos organismos en condiciones aeróbicas (Longo, V., 1996; Dziadkowiec, D., 2007).

En 2003 el equipo de Garay-Arroyo demostró que la respuesta antioxidante está implicada en la adaptación de *S. cerevisiae* al estrés hiperosmótico en condiciones aeróbicas, donde SOD1 y CTT1 son proteínas que incrementan su actividad específica tras un choque osmótico con sorbitol 1 M; en este mismo trabajo se comprobó el grado de oxidación de proteínas después del choque osmótico, correlacionando el alza de estos mecanismos de defensa antioxidante en el aseguramiento de la viabilidad celular. Adicionalmente se demostró que la respuesta de SOD1 está regulada a través de la vía de la proteína cinasa A (PKA-cAMP) y SKN7 en lugar de la vía HOG (Garay-Arroyo, A., 2003).

2.6.5 Catalasa A (CTA1) y Catalasa T (CTT1)

Las catalasas son enzimas óxido reductasas, ampliamente distribuidas en todos los reinos de la vida que se encargan de catalizar principalmente la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno molecular (O_2), además de algunos pequeños peróxidos orgánicos como el hidroxiperóxido de etilo, por lo que tienen un rol esencial en la homeostasis redox (Foyer, C. y Noctor, G., 2000; Díaz, A., *et al.*, 2011).

Las catalasas se pueden clasificar en cuatro grupos dependiendo de su actividad y grupo prostético en su centro catalítico (Sooch, S., *et al.*, 2014):

i. Catalasas hemo monofuncionales (200-300 kDa)

Son enzimas ubicuas en la mayoría de los eucariontes y procariontes. Generalmente están constituidas por un tetrámero formado por cuatro subunidades idénticas que poseen un grupo prostético hemo en su centro catalítico. Este grupo a su vez se divide en tres clados, el primero con subunidades pequeñas de aproximadamente 55 a 69 kDa (c/subunidad de ~500 residuos de aminoácidos), comunes en eubacterias, algas, plantas y firmicutes; mientras que en el segundo clado se encuentran subunidades grandes de alrededor de 75 a 84 kDa (c/subunidad de ~750 residuos de aminoácidos), las cuales presentan un dominio C-terminal con cerca de 150 residuos de aminoácidos que le confieren ese tamaño. Este tipo de catalasas están comúnmente presentes en bacterias y hongos. El tercer clado es la familia más abundante, con subunidades pequeñas de 53-

75 kDa (c/subunidad de ~500 residuos de aminoácidos), presente en arqueas, bacterias, hongos y algunos eucariontes (Borges, P., et al., 2014; Díaz, A., et al., 2011; Zamocky, M., et al., 2008). *S. cerevisiae* tiene catalasas del clado 3 (Zamocky, M., et al., 2008).

ii. Catalasas bifuncionales- peroxidadas (120-340 KDa)

Corresponden a enzimas menos frecuentes que se puede encontrar en bacterias aeróbicas. Tienen actividad de catalasa y de peroxidasa y se presentan generalmente como dímeros de 750 residuos de aa en cada subunidad (Zamocky, M., et al., 2008).

iii. Catalasas no hemo o catalasas de manganeso (170 a 210 KDa)

Este grupo de catalasas está presente en bacterias y se caracterizan por tener un centro de di-manganeso en lugar del grupo hemo. En *Lactobacillus plantarum* se le ha visto en formación homohexámerica con subunidades de 30 kDa cada una (Whittaker, J., 2012).

iv. Catalasas secundarias:

Corresponden a un grupo minoritario de catalasas hemo con baja actividad catalítica; incluyen a enzimas bifuncionales como las cloroperoxidasas, bromoperoxidasas y catalasa-fenol oxidasas.

En levadura se pueden encontrar dos tipos de catalasas hemo monofuncionales, la catalasa peroxisómica A, codificada por el gen *CTA1*, misma que además puede ser translocada hacia la matriz mitocondrial cuando los cultivos son sometidos a respiración intensiva que favorece la acumulación de peróxido de hidrógeno en medios con fuentes de carbono no fermentables como la rafinosa (Petrova, V., et al., 2014), y la catalasa citosólica T, codificada por *CTT1*. En otros hongos también es posible que se presenten más de un tipo de catalasa o alguna otra enzima que elimine al H₂O₂ (Hansberg, W., et al., 2012).

Posiblemente la actividad de la catalasa A tiene un papel de respuesta general al daño oxidante, aunque se ha visto su relación con la dismutación del peróxido de hidrógeno que es producido durante la β -oxidación de ácidos grasos. En contraste, la expresión de la catalasa T se induce por una pobre disponibilidad de nutrientes, alta osmolaridad y peróxido de hidrógeno (Nicholls, P., et al., 2000), además de estar implicada en el desarrollo de tolerancia a través de la protección cruzada, por ejemplo, durante la respuesta a hiperósmosis, donde la expresión de *CTT1* es dependiente de la respuesta general a estrés y la vía HOG (Schüller, C., et al., 1994).

2.7 *Debaryomyces hansenii* una levadura eurihalina

Como se mostró anteriormente, la mayor parte de la investigación en eucariontes sobre los mecanismos subyacentes a la osmoadaptación de muchos organismos en ambientes con extrema salinidad se ha efectuado tradicionalmente en *S. cerevisiae* como modelo biológico. Aunque existen cuantiosas y fructíferas investigaciones al respecto, la limitación que presenta esta levadura a crecer en medios con una salinidad superior a 1.5 M de NaCl generaron el interés por dilucidar cómo funcionan estos mecanismos en organismos que *per se* tienen reconocida tolerancia a la sal o son colonizadores exitosos de ambientes donde predominan estas condiciones (Prista, C., *et al.*, 2016).

En general se entiende como un ambiente hipersalino aquel cuya concentración de NaCl es superior a la del agua de mar (0.6 M de NaCl, pH 8, en promedio), pudiéndose encontrar nichos además de los océanos, a los suelos salinos (marismas, desiertos y minas de sal) y los productos alimenticios (Musa, H., 2018).

Hasta hace relativamente poco los ambientes con extrema salinidad -proclives a estrés hiperosmótico- eran considerandos un hábitat casi exclusivo de procariontes. Investigaciones posteriores pudieron ubicar organismos eucariontes con la capacidad de crecer y desarrollarse en estos lugares donde pondera la baja actividad del agua. Los estudios de Gunde-Cimmerman en el año 2000 lograron posicionar a algunas especies de hongos xerófilos o xerotolerantes como organismos capaces de crecer en estas condiciones naturalmente salinas, esto es más allá de ser solo contaminantes de ciertos alimentos cuya conservación depende de altas concentraciones de sal o azúcar. Algunos de los organismos hasta ahora estudiados son *D. hansenii*, *H. werneckii*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida parapsilosis*, *Pichia guilliermondii* y *Wallemia ichthyophaga* (Gunde-Cimmerman, N., 2009; Butinar, L., *et al.*, 2005).

Los hongos cosmopolitas en ambientes hipersalinos abarcan i) organismos merismáticos tipo levadura, también llamados levaduras negras como *H. werneckii*, *Aureobasidium pullulans*, *Trimmatostroma salinum*, *Phaeothea triangularis* y diversas especies relacionadas con *Cladosporium*, que se caracterizan por presentar melanina en la hifas que les confiere un color oscuro, además de una “poli-extremotolerancia”, esto es la capacidad de tolerar el estrés ocasionado por niveles extremos de salinidad, pH, temperatura y radiación ionizante; ii) levaduras no melanizadas como *Y. lipolytica*, *D. hansenii*, *P. guilliermondii*, *C. parapsilosis*; iii) especies no melanizadas filamentosas del género *Wallemia*, *Alternaria*, *Scopulariopsis*; y iv) especies de los

géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y sus teleomorfos del género *Eurotium* y *Emericella*, todos con la peculiaridad de no necesitar sal para su viabilidad, lo cual manifiesta los mecanismos evolutivos que han orquestado para equilibrar y adaptarse a los cambios de presión osmótica (Musa, H., 2018).

En este sentido, el mar fue el nicho ecológico del que se aisló por primera vez a la levadura hemiascomiceto no melanizada *D. hansenii*, despertando un gran interés por su capacidad para desarrollarse en un ambiente donde converge una elevada concentración de sal y valores de pH ligeramente alcalinos, ambas condiciones estresantes para otros organismos (Norkrans, B. y Kylin, A., 1969; Norkrans, B., 1966).

Si bien *D. hansenii* (*Saccharomycetales: Saccharomycetaceae: Debaryomyces*) es una levadura cosmopolita de los océanos del mundo, en aguas saladas, poco profundas y mayormente alcalinas, también se han tenido hallazgos en suelos y glaciares antárticos así como aguas polares. Además, se presenta en productos alimenticios, congelados o conservados en salmuera (Gunde-Cimerman, N., 2009). Aunque fue catalogada como una levadura halotolerante y halófila, esta combinación de términos resultó inconsistente al demostrarse que también podía crecer en ausencia de NaCl añadida, condición *sine qua non* que la separa de los halófilos, aunado a que su crecimiento óptimo se encuentra en 0.6 M de NaCl, por ese motivo algunos investigadores optan por el término eurihalina o solo halotolerante, haciendo énfasis en que su óptimo fisiológico se caracterizaba por un amplio rango de tolerancia a sal (Sánchez, N., et al., 2018; Segal-Kischinevsky, C., et al., 2011).

D. hansenii tiene una capacidad para crecer en un amplio rango de pH y temperatura, asimilando además de un gran espectro de fuentes de carbono por ejemplo: glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, celobiosa, trehalosa, D-xilosa, glicerol, ribitol, D-manitol y succinato. En contraste con *S. cerevisiae*, la capacidad fermentativa es pobre cuando crece en glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, rafinosa y trehalosa, siendo además ausente cuando crece en lactosa (Breuer, 2006).

D. hansenii es capaz de crecer en medios con hasta 25% de NaCl (4.3 M), con crecimiento estimulado en presencia de 0.5 M de NaCl o KCl (Thomé-Ortiz, P., et al., 1998); acumula grandes cantidades de sodio y potasio intracelular aun cuando crece en hiperósmosis (Norkrans, B., 1966; Prista, C., et al., 2005); bajo estas circunstancias emplea el secuestro de Na⁺ en la vacuola y el movimiento del K⁺ hacia el citosol, sin presentar un grado significativo de fragmentación vacuolar, como se ha visto en *S. cerevisiae* cuando los niveles de NaCl se incrementan (Montiel, V. y Ramos, J., 2007; Herrera, R.,

et al., 2017); tiene la capacidad de intercambiar el Na^+ y el K^+ para su metabolismo, destacando que el Na^+ no produce toxicidad para la célula, a diferencia de otras levaduras osmosensibles, o en las levaduras negras, como *H. werneckii* ó halófilas como *W. ichthyophaga*, las cuales mantienen niveles bajos de sodio y potasio en estas condiciones o como en el caso de *S. cerevisiae*, que cuenta con mecanismos moleculares para la extrusión de sodio (Prista, C., *et al.*, 1997; Plemenitas, A. y Gunde-Cimerman, N., 2005). Se han podido identificar diversos transportadores catiónicos, algunos de ellos implicados en la extrusión de sodio, como los Ena 1 y 2, Nha (Na^+/H^+), (Almagro, A., *et al.*, 2001; Sánchez, N., *et al.*, 2018; Velkova, J. y Sychrova, H., 2006), el transportador antiporte Kha1 (Na^+/H^+) (Carcía-Salcedo, R., *et al.*, 2007), así como el transportador intracelular Nhx1 (Na^+/K^+) que media la extrusión del potasio de la vacuola y el movimiento del sodio en su interior (Montiel, V. y Ramos, J., 2007), además de transportadores de K^+ como Trk1 y Hak1 (Prista, C., *et al.*, 2005; Prista, C., *et al.*, 2007) (figura 8).

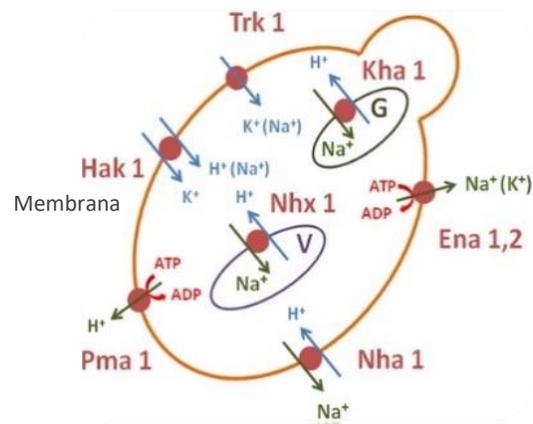


Figura 8. Mecanismos de transporte catiónico identificados en *D. hansenii*. V, vacuola; G, aparato de Golgi. Modificado de Prista, C., *et al.*, 2016.

Al igual que en *S. cerevisiae*, en *D. hansenii* el glicerol es el principal osmolito compatible bajo condiciones de estrés por NaCl (2 y 3 M), aunque también se ha observado la producción de trehalosa en condiciones de estrés salino basal a moderado, en donde posiblemente tenga una función importante como reserva de carbohidratos, en la estabilización de sus membranas y la preservación de la actividad enzimática, funciones que podrían explicar su elevada viabilidad en condiciones de estrés salino moderado (González-Hernández, J. y Jiménez-Estrada, M. 2005). Se ha demostrado el incremento en la inducción del gen *DhGPD* y en la actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en un rango de 1 a 3 M de NaCl, aunque proporcionalmente menor en comparación

con *S. cerevisiae*, demostrando así que la concentración de glicerol intracelular se puede regular de acuerdo a las necesidades de la célula, en relación a su capacidad para sensor los cambios en la osmolaridad del medio (Thomé, P. y Trench, R., 1999; André, L., *et al.*, 1988). Además de ello, existen reportes que demuestran la producción de eritritol y manitol como solutos compatibles en respuesta a estrés osmótico (Jovall, P., *et al.*, 1990).

Al respecto del transporte del glicerol, se han reportado dentro del genoma de *D. hansenii*, ocho copias del gen *DhSt1* el cual codifica para un transportador simporte (glicerol/H⁺) (Prista, C. *et al.*, 2016; Palma, M., *et al.*, 2007 en Prista, C., *et al.*, 2016).

3. ANTECEDENTES

En el año 2009, fue publicado el primer trabajo sobre la expresión global utilizando tecnología de microarreglos en *D. hansenii* en donde la respuesta transcripcional tras un choque osmótico con 2 M de NaCl fue evaluada en tres tiempos posteriores al choque (0.5, 3 y 6 horas). Los resultados muestran que solo un número muy limitado de genes son inducidos; solo 1.72% de los genes evaluados muestran diferencias significativas en sus patrones de expresión, de los cuales 65 son sobreexpresados en al menos 3 veces y 44 resultan reprimidos. La mayoría de los genes inducidos están relacionados con la síntesis de proteínas, mantenimiento celular y funciones mitocondriales, hecho que han atribuido a que la regulación de la traducción y el aumento de la tasa de respiración para la generación de energía, tienen un papel muy importante en el mecanismo de osmorregulación (figura 9) (Arroyo-González, N., et al., 2009).

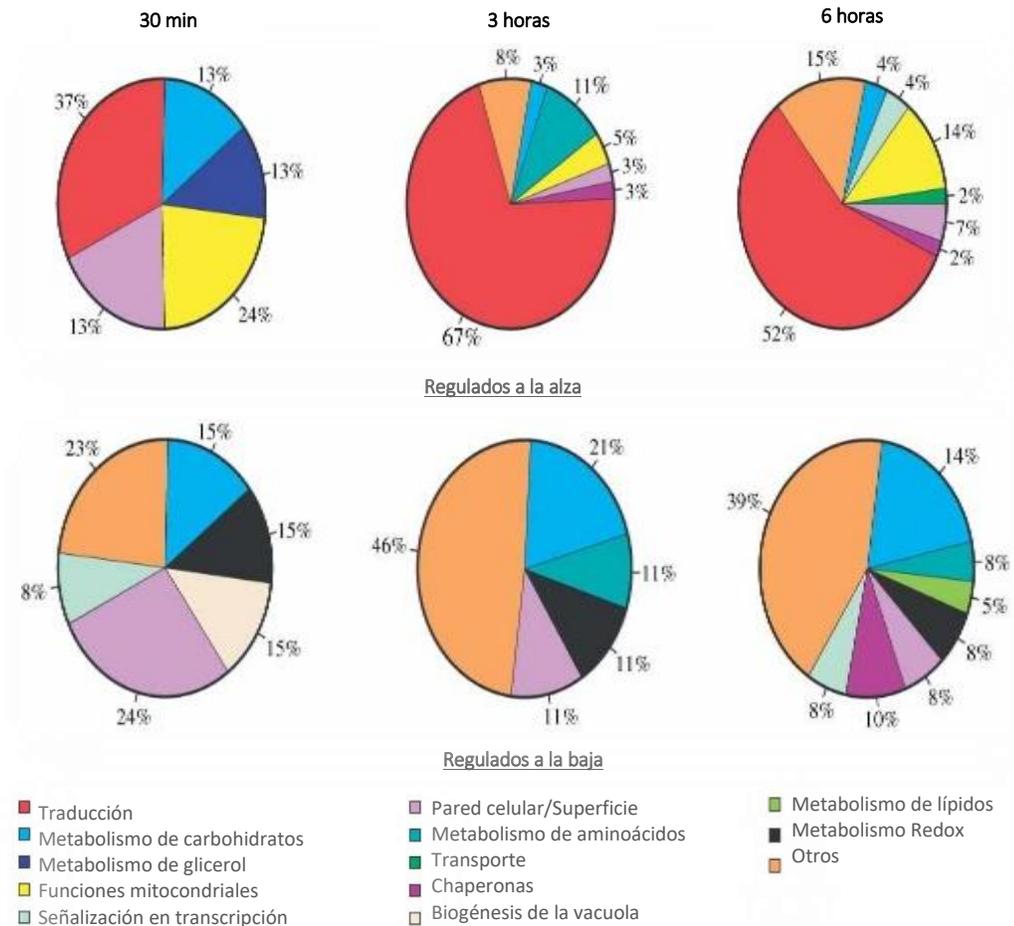


Figura 9. Porcentaje de expresión de genes putativos inducidos y reprimidos después de un tratamiento con 2 M de NaCl, medido en 3 diferentes tiempos (30 min, 3 y 6 h). Las diferencias transcripcionales significativas se observan a las 3 y 6 h. Los genes vinculados a la síntesis de proteínas son mayormente regulados al alza. Modificado de Arroyo-González, et al., 2009.

Adicionalmente evaluaron usando qRT-PCR tiempo real, los cambios en la expresión transcripcional de los genes *DhENA1* (codifica para una ATPasaNa) y *DhHWP1* (codifica para una manoproteína externa con propiedades adhesivas correlacionada con la virulencia de las hifas en *Candida albicans*), en las primeras 0.5, 3 y 6 horas tras un choque osmótico con 2 M de NaCl. Los resultados usando el gen de actina como referencia, demostraron que ambos genes presentan cambios significativos de respuesta en los tres tiempos evaluados (Arroyo-González, N., et al., 2009).

Con respecto a los cambios en los niveles de expresión transcripcional y actividad enzimática de las proteínas antioxidantes catalasa A y catalasa T, en respuesta al crecimiento en presencia o ausencia de sal añadida (0.6M NaCl), Segal-Kischinevzky y sus colaboradores en 2011, evaluaron dichos parámetros en la fase exponencial y estacionaria de *D. hansenii* cultivada en dos diferentes fuentes de carbono, glucosa y etanol. Sus resultados exhiben por un lado, que la fuente de carbono tiene un rol importante en la expresión de una u otra catalasa, donde la *DhCTA* es inducida en fuentes de carbono no fermentables como el etanol, en comparación a su crecimiento en glucosa, en tanto que el transcrito de *DhCTT* se induce cuando crece en glucosa, sin tener cambios de expresión cuando se añade NaCl 0.6 M (figura 10) (Segal-Kischinevzky, C., et al., 2011).

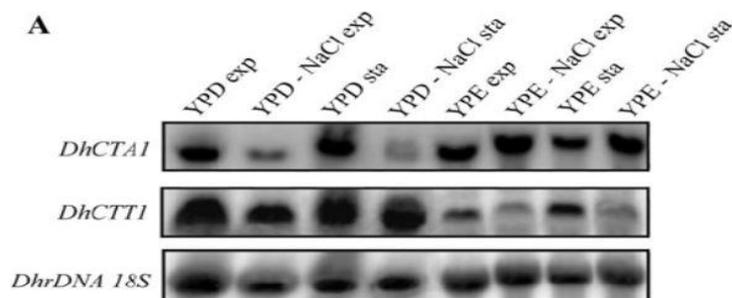


Figura 10. Northern Blot de *D. hansenii* cultivada en dos diferentes fuentes de carbono YPD (glucosa) y YPE (etanol) y en presencia o ausencia de 0.6 M de NaCl. El RNA total fue extraído en fase exponencial (exp) y fase estacionaria (sta). Se usó el gen *Dh18S* como normalizador. Tomado de Segal-Kischinevzky, et al., 2011.

Por otro lado, en la actividad específica de catalasa, observaron que cuando las células crecen en medios con etanol (2%), hay un claro aumento en su actividad, que curiosamente disminuye con la adición de NaCl, en contraste los medios con glucosa que muestran una actividad enzimática baja sin que la presencia o ausencia de sal induzca cambios significativos. Este hecho se correlaciona con los resultados de otras investigaciones en *D. hansenii* y en *S. cerevisiae*, en las que se ha manifestado

que el NaCl confiere una protección contra el estrés oxidante (Segal-Kischinevzky, C., et al., 2011;Navarrete, C., et al., 2009).

En 2008 Sánchez y sus colaboradores evaluaron cómo las elevadas concentraciones de NaCl podían ocasionar cambios en el volumen de las células, a través de la cuantificación del contenido de agua interna determinaron que el volumen de las células de *D. hansenii* desciende al aumentar la concentración de NaCl (de 0.6 M a 1 M) (Sánchez, N., et al ., 2008).

En 2012 Ramírez-Hernández evaluó algunos aspectos relacionados también con el tamaño y la complejidad de la célula cuando es expuesta a un crecimiento en presencia o ausencia de 1M de NaCl, tanto con glucosa como con etanol como fuente de carbono, encontrando que no hay un cambio significativo en tamaño y complejidad de las células cuando crecen en glucosa con o sin sal añadida. En contraste, el crecimiento en etanol ocasiona la formación de estructuras granuladas, misma que disminuyen cuando se añade NaCl (Ramírez-Hernández, M., 2012).

En investigaciones posteriores en *D. hansenii* (Ramírez-Hernández, M., 2017), se determinó la actividad específica de la enzima superóxido dismutasa y la de las catalasas, nuevamente bajo el modelo de crecimiento en dos diferentes fuentes de carbono, etanol y glucosa, adicionados con cantidades crecientes de NaCl (0, 0.6 y 1.2 M), los resultados muestran que cuando la fuente de carbono es glucosa no hay diferencias significativas en la actividad específica inducida por la adición de sal, en ambos grupos de enzimas. Sin embargo, todos los medios donde se usó etanol como fuente de carbono mostraron una actividad exacerbada tanto para las catalasas como para la superóxido dismutasa, actividad que disminuyó significativamente en los medios con sal añadida.

4. HIPÓTESIS

Si el incremento en la concentración de NaCl en cultivos de *Debaryomyces hansenii* estimula la activación de los mecanismos moleculares implicados en la osmoadaptación cuando hay estrés osmótico, entonces será posible encontrar variaciones en la tasa de crecimiento, patrones de expresión transcripcional y actividad enzimática de proteínas que participan en el mantenimiento de la homeostasis, síntesis de ribosomas, así como las vinculadas a la respuesta antioxidante como un fenómeno de protección cruzada.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta en el crecimiento, expresión génica y actividad enzimática relacionados al estrés oxidante durante estrés osmótico en la levadura *D. hansenii*.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar los cambios en la tasa de crecimiento de *D. hansenii* en medio de cultivo rico y diferentes concentraciones de NaCl.

Analizar posibles genes de referencia que puedan ser usados para evaluar los cambios de expresión transcripcional en respuesta al crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl en *D. hansenii*.

Cuantificar los cambios de expresión absoluta y relativa en *D. hansenii* en respuesta a concentraciones crecientes de NaCl, de genes relacionados con la progresión del ciclo celular, de integridad de la membrana y genes de respuesta a estrés oxidante, a través del uso de qRT-PCR en tiempo real.

Determinar la actividad enzimática de catalasa de extractos crudos de *D. hansenii* provenientes de cultivos con diferentes concentraciones de NaCl.

Proponer a través del análisis de la curva de crecimiento, la expresión transcripcional de genes vinculados en la respuesta a estrés oxidante y osmótico y la actividad enzimática, la concentración de NaCl en la cual *D. hansenii* desata una respuesta a estrés.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6.1 Curvas de crecimiento

Se evaluó la curva de crecimiento y el tiempo de duplicación de la cepa Y7426 de *D. hansenii* en diferentes condiciones de salinidad.

Se precultivó a la levadura en YPD-NaCl 0.6M (YPD: 1%-extracto de levadura; 2%-dextrosa; 2%-peptona de caseína, adicionado con 0.6 M de NaCl, cultivada por 60 h) y se inocularon a una densidad óptica (DO) de 0.05 cuatro diferentes medios de crecimiento (200 mL c/u) en YPD adicionados con concentraciones crecientes de NaCl: 0, 0.6, 2, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 y 3 M. El crecimiento se efectuó bajo una temperatura de crecimiento de 28 °C dentro de una incubadora con agitación constante de 180 rpm.

El crecimiento se siguió por 96 horas, registrando la lectura de A_{600nm} en intervalos de 2 horas. Cuando fue necesario se realizaron las diluciones pertinentes con la finalidad de ajustar al rango de detección del espectrofotómetro. Con los datos recabados se estimó la tasa de duplicación de las células, utilizando la herramienta en línea *Doubling Time* (<http://www.doubling-time.com>).

6.2 Extracción del RNA y confirmación de calidad e integridad

Para la evaluación de los cambios en la expresión de los transcritos así como para los análisis de selección y validación de genes de referencia, se tomó una alícuota de 50 mL, correspondiente a la fase exponencial media ($A_{600nm} = 2.0$), de los medios experimentales con 0, 0.6, 2 y 2.5 M de NaCl. Una vez tomada la alícuota, el crecimiento de todos los cultivos continuó hasta la fase estacionaria (72 horas), cuando se tomó la alícuota para la extracción de proteínas y ensayos de actividad enzimática.

El RNA total fue extraído inmediatamente después de coleccionar cada muestra en la fase exponencial media, siguiendo el protocolo modificado de fenol ácido propuesto por Schmitt *et al*, 1990. En la primera parte de la extracción, las células de cada una de las muestras fueron lavadas con amortiguador de fosfatos de sodio (20 mM, pH 7.4) y posteriormente fueron resuspendidas en 400 μ L de amortiguador AE frío (acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM) con 5 μ L de dietilpicrocarbonato (DEPC), la mezcla se agitó en vórtex por unos segundos y después fueron transferidas a un tubo de

plástico de 1.5 mL, precalentado a 65 °C, que contenía $\frac{3}{4}$ de volumen de microperlas de vidrio y solución de lisis (fenol ácido pH 4.5 y SDS al 6.6 %), la mezcla se incubó a 65 °C por 10 min con dos intervalos de agitación en vórtex por 30 s. Al término del tiempo, se congeló a -70 °C durante 5 min. Después la mezcla fue centrifugada en frío a máxima velocidad, recuperando la fase superior acuosa. En la segunda parte del proceso de extracción, el líquido sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo libre de RNAsas y estéril, al que se le agregó una solución de fenol (pH 4.5), cloroformo y alcohol isoamílico (PCI: proporción 25:24:1, respectivamente), posteriormente se agitó por 15 segundos y se centrifugó en frío a máxima velocidad, la capa superior acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se procedió a repetir el proceso de extracción con PCI. Se realizó un último ciclo de extracción usando una solución de cloroformo y alcohol isoamílico (CI: proporción 24:1), rescatando la fase superior acuosa al final de procedimiento. Para la precipitación del RNA total, se agregó 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Esta mezcla se congeló a -70 °C durante toda la noche. Transcurrido ese lapso, las muestras se centrifugaron en frío a velocidad máxima, descartando el sobrenadante. La pastilla se lavó dos veces con etanol al 75 %, para después dejar secar al aire, finalmente se resuspendió en 30 μ L de agua inyectable libre de RNAsas y DNAsas.

La evaluación de la concentración y calidad o pureza del RNA se determinó mediante análisis espectrofotométrico usando el equipo Nano Photometer Pearl (IMPLEN), considerando la relación de la absorbancia de A_{260}/A_{280} dentro de un rango de 1.8 y 2 como RNA puro.

La calidad y la integridad del RNA se confirmó a través de gel de electroforesis en agarosa al 1% teñido con GelRed, bajo condiciones desnaturalizantes (5 % de formaldehído v/v, 20 mM de MOPS, 5 mM de acetato de sodio a pH 7.0 y 1 mM de EDTA a pH 8.0). Se tomaron 5 μ g del RNA total de cada una de las muestras, las cuales se incubaron en una solución de RNA *loading mix* (20 % de formaldehído, 55 % de formamida, 10 % de glicerol al 80 %, 2 % de azul de bromofenol, 16 mM de MOPS, 4 mM de acetato de sodio a pH 7.0 y 0.8 mM de EDTA a pH 8.0), durante 15 minutos a 56 °C, posteriormente fueron cargadas en el gel y finalmente este fue corrido a 100 volts por una hora.

6.3 Transcripción reversa y síntesis de cDNA

Con el fin de eliminar el DNA genómico (gDNA) que pudiera estar presente en las muestras de RNA, la enzima RQ1 RNase-Free DNase de Promega. Se prepararon reacciones de 40 μ L, donde se digirieron 4 μ g del RNA total, añadiendo 4 μ L de la DNasa RQ1, 4 μ L del amortiguador de reacción

RQ1 DNase 10x y la cantidad suficiente de agua libre de RNAsas y DNAsas para 40 μ L. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos, al término del tiempo, se añadieron 4 μ L de la solución de STOP DNasa RQ1 y se incubó 10 minutos a 65 °C. Con el RNA puro se procedió de inmediato a la síntesis del cDNA.

En la síntesis de cDNA se utilizó el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis, de Thermo Scientific. Las reacciones de 20 μ L contenían 2 μ g de RNA total, 1 μ L de oligo dT, 4 μ L de amortiguador de la reacción 5x, 1 μ L de RiboLock, 2 μ L de dNTPs y 1 μ L de la enzima RevertAid H Minus M-MLV Reverse Transcriptase. La mezcla se incubó durante 60 minutos a 42 °C. Para terminar la reacción se incrementó la temperatura a 70 °C por 5 minutos más. El cDNA recién sintetizado se almacenó a -20 °C hasta su uso para las reacciones de PCR tiempo real. Cabe mencionar que se agregó un control negativo de la retrotranscripción (RT-) con la finalidad de identificar posibles contaminaciones en los reactivos, en este caso se empleó agua libre de RNAsas en lugar del RNA.

6.4 Oligonucleótidos

Debido a que el diseño de los oligonucleótidos es determinante para tener un ensayo exitoso de PCR tiempo real, se tomaron las secuencias de todos los genes a evaluar, los cuales fueron previamente diseñados por la M. en C. Mónica Ramírez ([Ramírez-Hernández, M., 2017](#)), y se analizaron en diferentes plataformas bioinformáticas (Primer3, Primer-BLAST, Oligo Calc., Oligo Calculator, Oligo Analyzer y Oligo 7), para determinar los criterios básicos de su diseño como: el tamaño del oligonucleótido, su especificidad (vía BLAST), contenido de GC y extensiones de polipirimidinas (TC) o polipurinas (AG), anclaje GC en el extremo 3', temperatura de fusión (T_m), el tamaño del amplicón y de manera general la posibilidad de formación de estructuras secundarias como dímeros de oligonucleótidos u horquillas de amplificación. Las características de los oligonucleótidos analizados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Lista de los genes a evaluar. Se presentan los criterios básicos de los oligonucleótidos y del amplicón.

Función del gen	Nombre	Rol	Secuencia de los oligonucleótidos 5'-3'	Tamaño de amplicón (pb)	T _m (C°) *
Fosfatidil etanolamina N-metiltransferasa	<i>DhPEMT</i>	Enzima que participa en la síntesis de PC en la membranas	Fw: CTTCACTTGGTTGAGGGCT Rv: TTAATTGACAACGACTCAAACACT	183	57.27 57.33
Proteína S3 de la subunidad 40S ribosomal	<i>DhrpS3</i>	Parte de la maduración de los ribosomas y reparación del DNA.	Fw: AAGGACCCAGCAACCAACAA Rv: AAGCGGAAGCTTCAACTGGT	148	60.03 60.18
Subunidad grande de la ribonucleótido difosfato reductasa	<i>DhRNR</i>	Síntesis de dNTPs	Fw: TATGGCGTGGTTTCCGATGA Rv: TGAATGCCTATGGCCACTCTTA	200	59.46 59.22
Catalasa A	<i>DhCTA</i>	Defensa antioxidante	Fw: CCAACGGATGTCCAATCCCAGAACC Rv: CCAGATCCCTTGGCGTGACACA	151	65.57 65.29
Catalasa T	<i>DhCTT</i>	Defensa antioxidante	Fw: TATGGTGCCCAAACGGCAGGC Rv: GCCTGGGGATTGTAATGGACGGG	198	65.91 65.32
Superóxido dismutasa	<i>DhSOD</i>	Defensa antioxidante	Fw: ACATGGTGCTCCAGAAGACG Rv: TCGGTACCGGCGTGAATAAC	162	60.04 60.18

* T_m corresponde a la temperatura (°C) de desnaturalización del producto de amplificación calculada con la herramienta en línea Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

La especificidad de los oligonucleótidos también fue corroborada realizando un ensayo de PCR punto final con cDNA proveniente de un cultivo de *D. hansenii*, crecido en YPD adicionado con 0.6 M de NaCl, correspondiente a la fase de crecimiento exponencial. Debido a que la mezcla de reacción de la síntesis de cDNA puede contener sustancias que resultan en la inhibición de la reacción de PCR, se realizó una dilución 1:5, la cual se empleó en los ensayos de PCR. Las reacciones fueron de 25 µL y contenían 2.5 µL de amortiguador 10x, 30 mM de MgCl₂, 0.5 µL de dNTPs, 0.25 µL de *Taq* Polimerasa y entre 200 y 300 nM de oligonucleótidos *reverse* y *forward* (dependiendo del *primer*). El programa de ciclos utilizado se muestra en la figura 11.

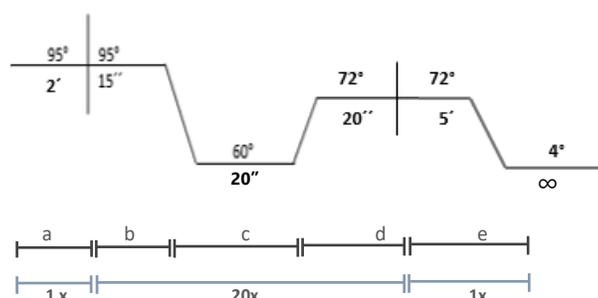


Figura 11. Programa de ciclos usado para PCR punto final. a. Desnaturalización inicial a 95 °C por 2 minutos, b. Desnaturalización a 95 °C por 15 s, c. Alineación de los oligonucleótidos a 60 °C por 20 s, d. Extensión a 72 °C por 20 s, repetir del paso 2 al 4, por 25 ciclos. e. Extensión final a 72 °C por 5 min.

Para definir cuál es la concentración óptima de oligonucleótidos que puede soportar la reacción sin la generación de dímeros o alguna otra estructura secundaria producto de la complementariedad de bases, se realizó una matriz de oligonucleótidos, en la cual se evaluaron todas las combinaciones de concentraciones posibles entre las secuencias *forward* y *reverse*, utilizando diluciones de los oligonucleótidos de 100 a 300 nM. La matriz se muestra en la tabla 2

Tabla 2. Matriz de oligonucleótidos	100 nM <i>Reverse</i>	200 nM <i>Reverse</i>	300 nM <i>Reverse</i>
100 nM <i>Forward</i>	100/100	100/200	100/300
200 nM <i>Forward</i>	200/100	200/200	200/300
300 nM <i>Forward</i>	300/100	300/200	300/300

Se realizaron las reacciones de PCR tiempo real para todas las combinaciones de oligonucleótidos en la matriz, por duplicado; el kit que se utilizó en este ensayo fue Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix, de Thermo Scientific. Todas las reacciones fueron de 20 μ L y contenían 10 μ L de la Master mix 2x, el volumen necesario de oligonucleótidos y agua. Ninguna de las combinaciones tenía templado, pues lo que se quería comprobar es que bajo ninguna de las concentraciones de oligonucleótidos hubiera amplificación de productos. La evaluación se hizo a través de la curva de disociación.

Los resultados de la matriz de oligonucleótidos, arrojaron las concentraciones de oligonucleótidos que se debían usar en los ensayos de PCR tiempo real, dicha determinación se hizo considerando la máxima concentración de oligonucleótidos que la reacción puede soportar sin que ocurra la formación de estructuras secundarias. En todos los casos no hubo productos amplificados, lo cual indicó que no hay complementariedad en las bases o presencia de contaminantes en las reacciones. Pese a que es preferible usar la mayor concentración de oligonucleótidos de acuerdo a la matriz, la concentración de oligonucleótidos para *DhrpS3*, *DhSOD*, *DhCTA* y *DhCTT* fue fijada en 200 nM para el *primer forward* y el *reverse*, y no en 300 nM, por un lado para hacer más eficiente el uso de los reactivos, y por otro lado, porque la amplificación con 200 nM había demostrado en ensayos de PCR tiempo real anteriores, que no disminuían la eficiencia de la reacción en comparación con la concentración de 300 nM, donde además la electroforesis en gel de agarosa indicaba la presencia de los productos de amplificación de manera clara. La concentración de oligonucleótidos para *DhPEMT* y *DhRNR*, fue de 300 nM para ambos, *forward* y *reverse*.

6.5 Condiciones de la PCR tiempo real

Los ensayos de PCR tiempo real se llevaron a cabo en el termociclador Rotor GeneQ 2-plex, de Qiagen, en tubos transparentes de 200 μL . Todas las reacciones fueron hechas colocando los tubos sobre una gradilla de metal fría, con la finalidad de mantener la reacción con una temperatura baja y estable durante el tiempo de preparación de todas las reacciones.

Se analizaron las muestras provenientes de dos experimentos biológicos, el primero utilizando el kit Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix y el segundo con Luminaris Color HiGreen Fluorescein qPCR Master Mix ambos de Thermo Scientific. La mezcla de todas las reacciones sin importar el kit empleado contenía: 10 μL del Master Mix, 200 nM o 300 nM de cada uno de las secuencias *forward* y *reverse* (según la matriz de oligonucleótidos para cada *primer*), la cantidad necesaria de agua libre de nucleasas y 2 μL de gDNA (de una muestra concentrada 990 $\text{ng}/\mu\text{L}$) o cDNA (a partir de una dilución 1:5 de cada una de las reacciones de retrotranscripción). La concentración final de MgCl_2 en la reacción fue de 2.5 mM. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado técnico, añadiendo tres tipos de controles: un control negativo de la reacción de PCR (NTC-*No template control*; se usó agua como templado, para de detectar posibles contaminaciones en los reactivos), un control negativo de la retrotranscripción (RT- Retrotranscripción sin RNA, se usó agua, para detectar contaminaciones en los reactivos por DNA o RNA), y un control positivo o estándar con gDNA de *D. hansenii*.

Con la finalidad de eliminar la contaminación cruzada con productos de amplificación procedentes de otros ensayos de PCR, el programa de PCR tuvo una fase de tratamiento previo de UDG (UDG-*Uracil-DNA Glycosylase*) a 50°C por 2 min (Longo, M., *et al.*, 1990). Posteriormente prosiguió con un ciclo desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 s, alineamiento a 60°C por 30 s y la extensión a 72°C por 30 s. Al final, se realizó un paso de validación por curva de disociación con una rampa que iba de 57°C a 95°C (Figura 12).

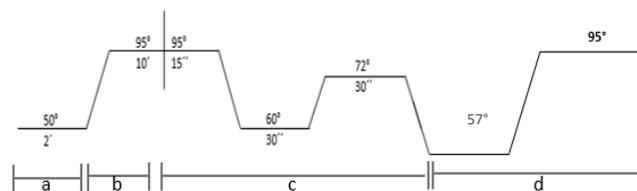


Figura 12. Programa de ciclos usado para PCR tiempo real. (a) Tratamiento UDG. (b) Desnaturalización inicial. (c) 40 ciclos: desnaturalización, alineación y extensión. (d) Curva de disociación.

6.6 Análisis de selección y validación de genes de referencia

En este trabajo se determinó la estabilidad del nivel de expresión de todos los posibles candidatos a genes de referencia. Para ello, se prepararon alícuotas con una dilución 1:5 del cDNA procedente de cada una de las reacciones de retrotranscripción y posteriormente se construyeron curvas estándar usando diluciones seriadas 1:3 cada cDNA. Se determinó la eficiencia (E) de la reacción de PCR tiempo real, la pendiente (M) y el coeficiente de correlación (R^2) de cada una de las parejas de oligonucleótidos analizadas. La eficiencia fue calculada utilizando la pendiente resultante de una curva estándar usando la fórmula $E=10^{-(1/M)}-1$ (Svec, D., *et al.*, 2015; Kubista, M., *et al.*, 2006).

Para confirmar que solo se amplificó un producto específico, se hicieron curvas de disociación con una rampa que iba de 57 °C a 95 °C. Cada una de las reacciones fue realizada por triplicado técnico, a partir de un mismo lote de cDNA con un duplicado biológico. La *baseline*, el ciclo de *threshold* y los valores de C_t , fueron determinadas automáticamente por el *software* del equipo. Para asegurar la comparabilidad entre los datos obtenidos de las diferentes condiciones experimentales, los valores de *threshold* fueron calculados manualmente y correspondieron a la media aritmética de todos los valores de *threshold* determinados automáticamente por el equipo. Utilizando este valor, se volvieron a analizar todos los datos para obtener los valores de C_t que serían empleados en todas las muestras analizadas.

Se utilizaron los valores promedio de C_t de cada muestra para calcular la estabilidad de los genes a través de las herramientas bioinformáticas *NormFinder* versión 0.953 (Andersen, C., *et al.*, 2004) y *BestKeeper* (Pfaffl, M., *et al.*, 2004).

NormFinder es una herramienta que analiza la varianza en los datos de la expresión de los genes analizados, permitiendo de este modo evaluar las diferencias inter e intra grupales (esto es la varianza entre y dentro de los tratamientos o condiciones experimentales). *NormFinder* determina los genes de referencia con una variación entre los grupos cercana a cero (Andersen, C., *et al.*, 2004). Para realizar el análisis en esta aplicación, se requieren al menos dos grupos experimentales. Los valores de C_t fueron transformados a logaritmo natural, los grupos analizados corresponden a cada una de las condiciones de NaCl (0, 0.6, 2 y 2.5 M). Aunado a esto se hizo un análisis dentro del sitio web de *Redfinder*, que emplea los mismos datos para establecer los mejores genes de referencia.

BestKeeper analiza la correlación pareada de los genes candidatos, para evaluar la estabilidad de la expresión de todos los genes. Para efectuar el análisis de estabilidad utiliza los valores de CP

(*Crossing point*, también C_t), con los que realiza una estadística descriptiva. Su análisis se basa en el uso de tres parámetros estadísticos: la desviación estándar (SD), el coeficiente de correlación (R) y el porcentaje de covarianza (CV). Estos resultados posteriormente son corregidos mediante el uso de la eficiencia de la reacción de PCR tiempo real. *BestKeeper* no hace distinción entre los tratamientos, por lo que una desviación estándar superior a 1, del listado de C_t correspondiente a cada gen de referencia, es descartado al considerarse inconsistente, por esta razón, la estadística descriptiva, específicamente los valores de SD y CV, arrojan una primera estimación de la estabilidad (Pfaffl, M., *et al.*, 2004). Utilizando solo aquellos genes con una expresión estable, se calcula el índice (*BestKeeper Index*) para cada muestra.

$$BestKeeper Index = \sqrt[z]{CP_1 \times CP_2 \times CP_3 \times \dots \times CP_z} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde z es el número de genes candidatos incluidos en el análisis.

Para analizar todas las posibles parejas de genes candidatos, el *software* realiza un análisis de correlación de Pearson, obteniendo un valor p de significancia. Todos los genes de referencia correlacionados se combinan en el índice y la correlación pareada entre cada gen de referencia y se calcula el índice. Posteriormente se calcula la correlación entre el índice y la contribución del gen de referencia a través del coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de determinación.

6.7 Cuantificación absoluta

Se realizó una cuantificación absoluta para determinar la concentración inicial de los genes blanco al inicio de la reacción, para ello se construyó una curva de calibración para cada gen, usando una muestra de gDNA de *D. hansenii* como templado (concentración = 1114 ng/ μ L), del cual se hicieron diluciones seriales 1:5. Cada una de las reacciones se hizo por triplicado técnico. Se determinaron los valores de la pendiente, el coeficiente de correlación y eficiencia.

Posteriormente se utilizaron los datos obtenidos de las curvas estándar para la selección y validación de los genes de referencia construidas con cDNA procedente de cada una de las condiciones experimentales, los valores de C_t obtenidos fueron interpolados en la curva estándar. El análisis de cuantificación absoluta se realizó usando el *software* del equipo y corroborado manualmente en Excel 2010, utilizando los datos de la ecuación de la recta para calcular la concentración inicial del blanco en cada muestra.

Debido a que las dos réplicas biológicas del experimento fueron realizadas con kits para PCR tiempo real diferentes, se decidió hacer una prueba de correlación a fin de determinar la comparabilidad de las cuantificaciones.

6.8 Cuantificación relativa

Los cambios en la expresión transcripcional de los genes que codifican para proteínas vinculadas a estrés y defensa antioxidante, las catalasas T y A, así como la superóxido dismutasa de *D. hansenii* fueron medidos en respuesta a las condiciones de crecimiento con 0, 2 y 2.5 M de NaCl. En estos ensayos se usó el gen *DhrpS3* como gen de referencia de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de selección de genes de referencia, y el crecimiento con 0.6 M de NaCl como condición normalizadora, al ser esta la concentración de NaCl del agua de mar, nicho donde fue aislada por primera vez *D. hansenii*.

Se empleó el promedio de C_t procedente de la dilución 1:9 de cada condición y en cada gen, obtenidos en la selección y validación de genes de referencia, los cuales fueron analizados siguiendo el método de C_t comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) y uno alternativo en la plataforma REST.

El método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, K. y Schmittgen, T., 2001) es un modelo que no toma en cuenta la eficiencia (E) de la reacción de PCR tiempo real, al suponer que existe una eficiencia óptima e idéntica entre el gen blanco y el gen de referencia, es decir una eficiencia de 100%.

Para normalizar las condiciones se aplicó la ecuación 2 descrita en la sección 2.5.6.2. Se consideró como condición normalizadora el crecimiento en YPD + 0.6 M de NaCl y al gen *DhrpS3* como gen de referencia.

$$\Delta C_t = C_t (\text{gen de interés}) - C_t (\text{gen de referencia}) \quad \text{Ecuación 2}$$

Ejemplo usando el gen *DhSOD*

$$\Delta C_{t \ 0 \text{ M}} = C_t \text{ DhSOD}_{0 \text{ M}} - C_t \text{ DhrpS3}_{0 \text{ M}}$$

$$\Delta C_{t \ 0.6 \text{ M}} = C_t \text{ DhSOD}_{0.6 \text{ M}} - C_t \text{ DhrpS3}_{0.6 \text{ M}} \quad \leftarrow \text{Condición calibradora}$$

$$\Delta C_{t \ 2 \text{ M}} = C_t \text{ DhSOD}_{2 \text{ M}} - C_t \text{ DhrpS3}_{2 \text{ M}}$$

$$\Delta C_{t \ 2.5 \text{ M}} = C_t \text{ DhSOD}_{2.5 \text{ M}} - C_t \text{ DhrpS3}_{2.5 \text{ M}}$$

Se hizo el mismo cálculo para el resto de los genes, usando siempre al gen *DhrpS3* como normalizador.

A continuación, se calculó el valor $\Delta\Delta C_t$ y la expresión relativa de los genes blanco en cada una de las muestras o tratamientos usando la ecuación 3, en donde el valor de ΔC_t 0.6 M de NaCl en cada gen, es el calibrador:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{tratamiento}) - \Delta C_t (\text{calibrador}) \quad \text{Ecuación 3}$$

Para la expresión del gen *DhSOD*:

$$\begin{aligned} \Delta\Delta C_t 0 \text{ M} &= \Delta C_t 0 \text{ M} - \Delta C_t 0.6 \text{ M} \\ \Delta\Delta C_t 2 \text{ M} &= \Delta C_t 2 \text{ M} - \Delta C_t 0.6 \text{ M} \\ \Delta\Delta C_t 2.5 \text{ M} &= \Delta C_t 2.5 \text{ M} - \Delta C_t 0.6 \text{ M} \\ \Delta\Delta C_t 0.6 \text{ M} &= \Delta C_t 0.6 \text{ M} - \Delta C_t 0.6 \text{ M} = 0 \end{aligned}$$

Se hizo el mismo cálculo para el resto de los genes.

El valor de $\Delta\Delta C_t$ de la condición calibradora, se obtiene al restarle su propio valor de ΔC_t , por lo tanto tiene un valor igual a 0.

Con estos valores se calculó el $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de cada blanco en cada condición. El valor de la condición calibradora es 1.

El segundo método que se empleó para calcular la expresión relativa del transcrito fue a través de REST © (*Relative Expression Software Tool*) (Pfaffl, M., 2004). Este método toma en cuenta los valores de eficiencia de las reacciones de PCR tiempo real comparando dos o más grupos de tratamiento.

6.9 Ensayo de actividad enzimática de catalasa

Para el cálculo de la actividad específica de catalasa, se tomaron 100 mL de los cultivos con 0, 0.6, 2 y 2.5 M de NaCl, de la fase de crecimiento estacionario. Las células se transfirieron a tubos de 50 mL y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min. La pastilla resultante se lavó dos veces con amortiguador de fosfatos de sodio (20 mM, pH 7.4), para posteriormente ser resuspendidas en 1 mL del mismo amortiguador. Tanto las células como los reactivos usados fueron mantenidos en hielo durante todo el proceso de extracción y cuantificación. La disrupción celular se llevó a cabo agregando aproximadamente $\frac{3}{4}$ de volumen de microperlas de vidrio a las muestras, enseguida se alternaron cinco ciclos de agitación y frío de 1 min cada ronda. El lisado se transfirió a microtubos de 1.5 mL, para ser posteriormente centrifugado en frío a 14,000 rpm durante 15 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, y se repitió el proceso de precipitación.

Inmediatamente después de obtener el extracto proteico se procedió con la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Se construyó una curva estándar de albumina sérica bovina

(BSA) a partir de una solución con una concentración inicial de 1 mg/mL, considerando 6 concentraciones crecientes (0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 y 15 µg/mL) que se mezclaron con una solución de NaCl 0.15 M, hasta obtener un volumen final de 100 µL, posteriormente se agregó 1 mL del reactivo Bradford (Amresco), la reacción se agitó vigorosamente y después se incubó en oscuridad por 2 minutos. Al cabo del tiempo se registró la A_{595nm} y con los datos recabados se graficó una curva de calibración. Para la cuantificación de las muestras experimentales se tomaron 2 µL del extracto proteico y 4 y 6 µL del extracto diluido 1:10, los cuales se mezclaron con 1 mL del reactivo Bradford, se registró la lectura A_{595nm} y posteriormente los datos obtenidos fueron interpolados en la gráfica de la curva de calibración con el fin de determinar su concentración. Cada una de las determinaciones se hizo por triplicado.

Para medir la actividad específica de catalasa, se utilizó el amortiguador de actividad de catalasa (NaH_2PO_4 100 mM, pH 7.0 y 0.01 % de Triton X-100) y una solución fresca de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 500 mM. En una celda de cuarzo se agregaron 2.9 mL del amortiguador de actividad y una alícuota del extracto proteico (entre 2.5 µL y 20 µL), se mezcló por inversión evitando la formación de burbujas, posteriormente se agregaron 100 µL de H_2O_2 500mM, se mezcló rápidamente por inversión y se colocó en el espectrofotómetro, donde fue monitoreada la reacción del decaimiento de la absorbancia a 240nm por un lapso de 2 minutos. El cálculo de la actividad específica se determinó mediante la ecuación 7, en la cual se establece la velocidad de descomposición del H_2O_2 , que es proporcional al decaimiento de la absorbancia a 240 nm.

$$AE \text{ catalasa} = \frac{\left(\frac{mmin}{\epsilon}\right)/alícuota(mL)}{mgP/ml} \quad \text{Ecuación 7}$$

AE catalasa= mmol H_2O_2 oxidado/min/mg de proteína

mmin= Pendiente por minuto del decaimiento de A_{240nm} .

ϵ = Coeficiente de extinción molar = 0.00422.

Alícuota (mL)= El volumen añadido del extracto proteico, expresado en mL.

mgP/mL= Concentración de proteína por mL de muestra.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto del incremento en la concentración de NaCl en velocidad de crecimiento de *Debaryomyces hansenii*

Con el fin de analizar el comportamiento de la cepa Y7426 de *D. hansenii* en diferentes condiciones de salinidad, se realizaron curvas de crecimiento evaluando tratamientos experimentales en medio YPD con 0, 0.6, 2, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 y 3 M de NaCl, el crecimiento fue monitoreado por 96 h (figura 13A y 13B) y con los datos recabados se determinó el tiempo de duplicación en cada condición, utilizando la herramienta en línea *Doubling Time* (figura 14).

No fue posible determinar el tiempo de duplicación para las muestras que tenían más de 2.5 M de NaCl, ya que, tras 96 horas de crecimiento, las células no presentaban una fase exponencial y estacionaria evidente. Por ese motivo, se decidió analizar el comportamiento de *D. hansenii* solo en las condiciones de 0, 0.6, 2 y 2.5 M de NaCl.

De acuerdo con los datos obtenidos, no hay diferencias en el tiempo de duplicación entre las condiciones con 0 y 0.6 M de NaCl, en contraste, el tiempo de duplicación en 2 M incrementa cerca de un 60% con respecto al obtenido en 0 M, mientras que en 2.5M el tiempo se duplica en comparación con la condición sin sal añadida (figura 14).

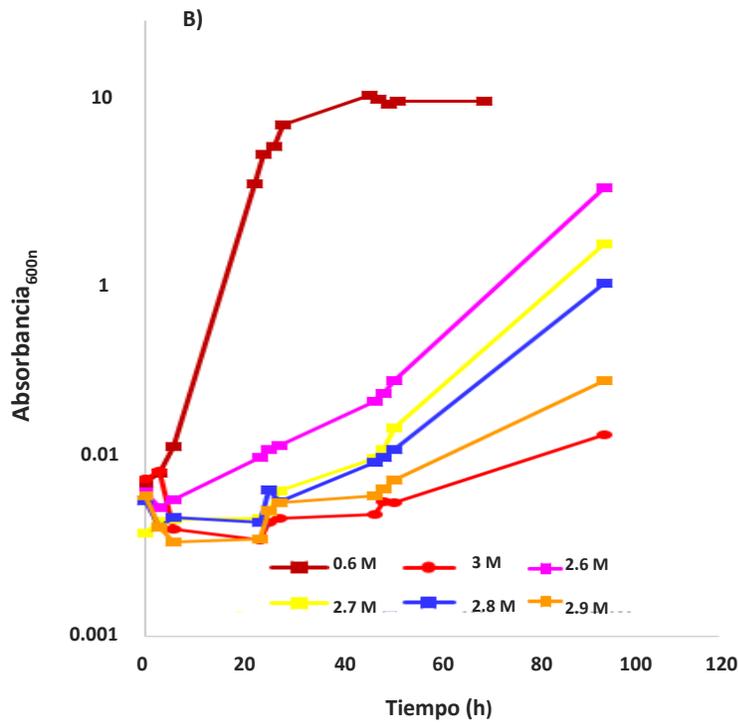
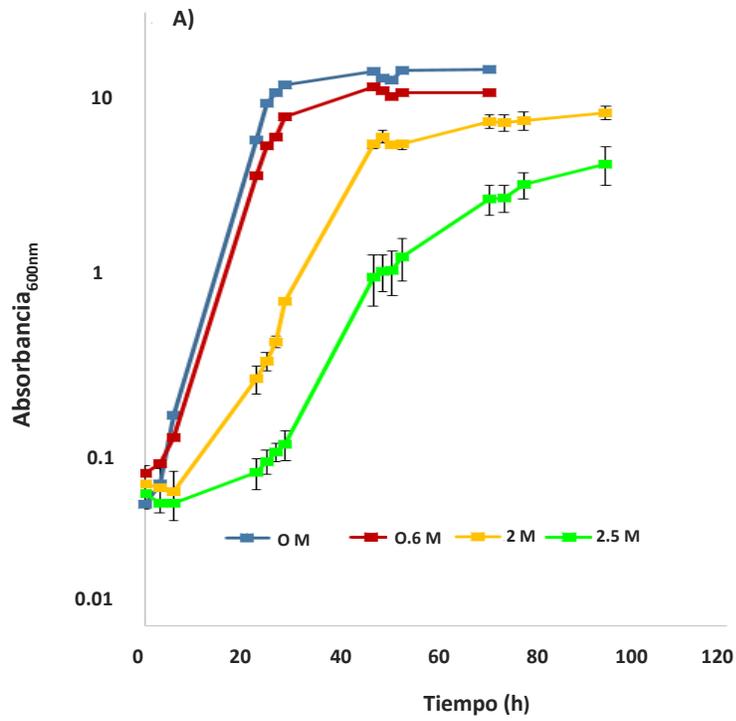
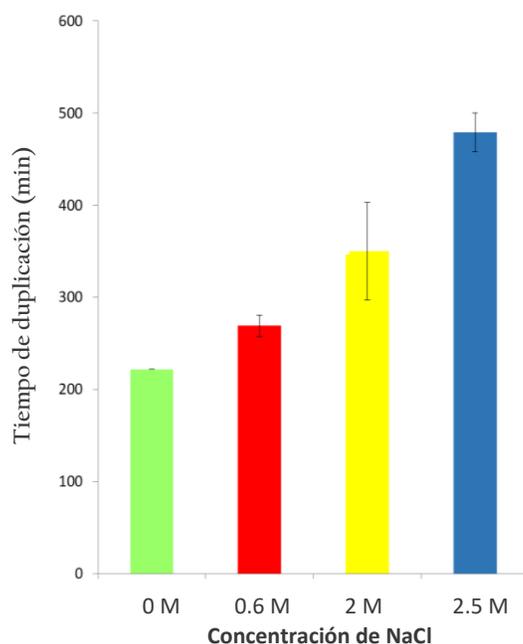


Figura 13. Curva de crecimiento de *D. hansenii* cultivada en medio rico YPD adicionado con diferentes concentraciones de NaCl, durante 96 horas. **A)** Curva evaluando 0, 0.6, 2 y 2.5 M de NaCl. **B)** Curva evaluando 0.6, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 y 3 M de NaCl.



Condición experimental	Tiempo de duplicación
YPD + 0 M de NaCl	222 +/- 11
YPD + 0.6 M de NaCl	269 +/- 52
YPD + 2 M de NaCl	350 +/- 21
YPD + 2.5 M de NaCl	479 +/- 25

Figura 14. Tiempo de duplicación de *D. hansenii* cultivada en medio rico YPD adicionado con concentraciones crecientes de NaCl. Se muestra el promedio del triplicado con desviación estándar obtenida para cada tratamiento.

7.2 Síntesis de cDNA procedente de células sometidas a diferentes condiciones de crecimiento

El RNA total fue extraído a partir de 50 mL de cada cultivo en medio rico YPD adicionado con concentraciones crecientes de NaCl, de la fase exponencial media ($A_{600\text{nm}} = 2.0$). La evaluación de la cantidad y calidad del RNA fue verificado tomando como criterio de inclusión solo las muestras que tuvieran valores de la relación de $A_{260/280\text{nm}}$ superiores a 1.80, ya que estos son considerados como indicador de la buena calidad del RNA (Fleige, S., y Pfaffl, M., 2006). Para descartar la contaminación por fenoles y carbohidratos se midió la relación de $A_{260/230\text{nm}}$ con un criterio de inclusión de las muestras con un valor superior a 2. De acuerdo a ambos indicadores, todas las muestras de RNA tuvieron niveles aceptables en los rangos de absorbancia (tabla 3). La integridad del RNA de cada muestra fue corroborada a través de un gel de electroforesis en agarosa al 1% teñido con GelRed,

bajo condiciones desnaturalizantes, en donde en todas las muestras se visualizaron las bandas del RNA ribosomal (rRNA) 28S y 18S, lo cual es indicativo de un RNA no degradado (figura 15). Debido a que las muestras de RNA extraídas mostraron valores aceptables de pureza y un RNA integro, se procedió con la síntesis de cDNA.

Condición	[ng/ μ L]	A _{260/280}	A _{260/230}
0 M	546	2.17	2.509
0 M	625	2.16	2.458
0.6 M	414	2.13	2.393
0.6 M	414	1.14	2.495
2 M	251	2.085	2.288
2 M	255	2.107	2.23
2.5 M	255	2.09	2.298
2.5 M	317	2.11	2.227

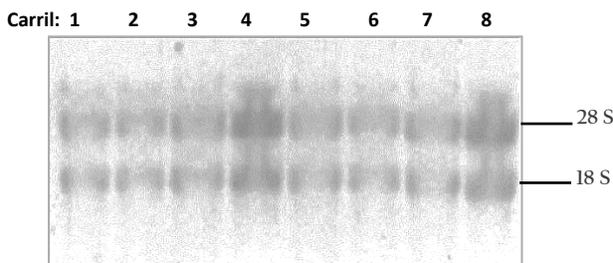


Tabla 3/Figura 15. Extracción de RNA de las diferentes muestras biológicas. En la tabla 3 se muestra la cuantificación en ng/ μ L y la calidad del RNA extraído, las repeticiones de cada tratamiento corresponden a los dos experimentos biológicos realizados. Se observa que en todos los casos el valor de la relación de A_{260/280} y A_{260/230} son superiores a 1.8 y 2, respectivamente, por lo que se considera que las muestras son puras, es decir libres de proteínas y de contaminación por fenoles y carbohidratos. En la figura 15 se observa la integridad del RNA (5 μ g) que fue corroborada en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed en condiciones desnaturalizantes, donde se aprecia la presencia de las bandas de rRNA 18S y 28S. (carril 1 y carril 2: RNA de la condición con 0 M de NaCl; carril 3 y carril 4: RNA de la condición con 0.6 M de NaCl; carril 5 y carril 6: RNA de la condición con 2 M de NaCl; carril 7 y carril 8: RNA de la condición con 2.5 M de NaCl).

Para corroborar la especificidad de los oligonucleótidos a utilizarse, se realizó un ensayo de PCR punto final utilizando como templado una muestra de cDNA, obtenida a partir del RNA correspondiente a un cultivo de *D. hansenii* crecido en medio YPD con 0.6M de NaCl, donde se observa una banda única correspondiente al peso molecular de cada producto de amplificación (figura 16).

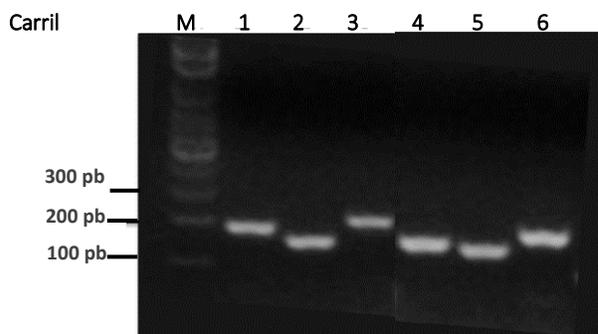


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed, muestra la especificidad de los oligonucleótidos en PCR punto final utilizando cDNA de *D. hansenii* como templado. M: Marcador de peso molecular; 1: *DhPEMT* (183 pb); 2: *DhrpS3* (148 pb); 3: *DhRNR* (200 pb); 4: *DhSOD* (162 pb); 5: *DhCTA* (151 pb); 6: *DhCTT* (198 pb).

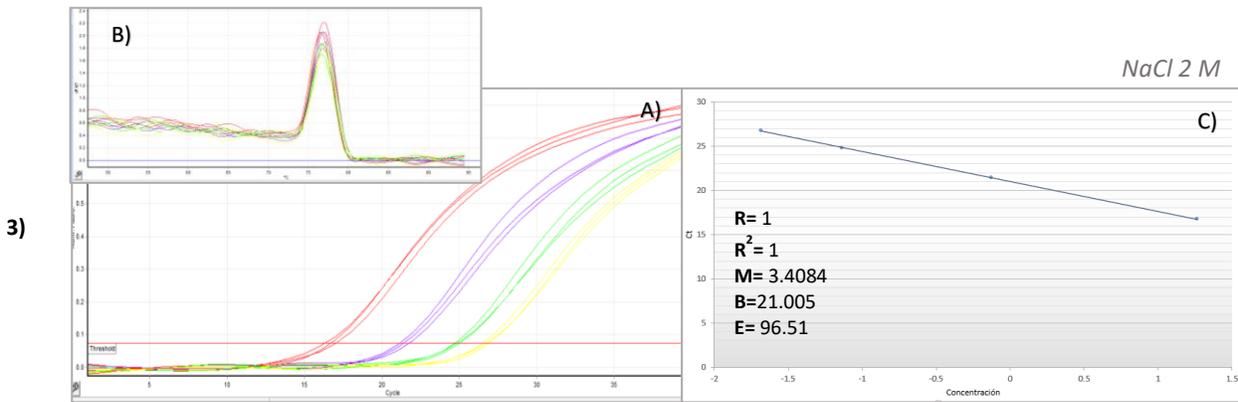
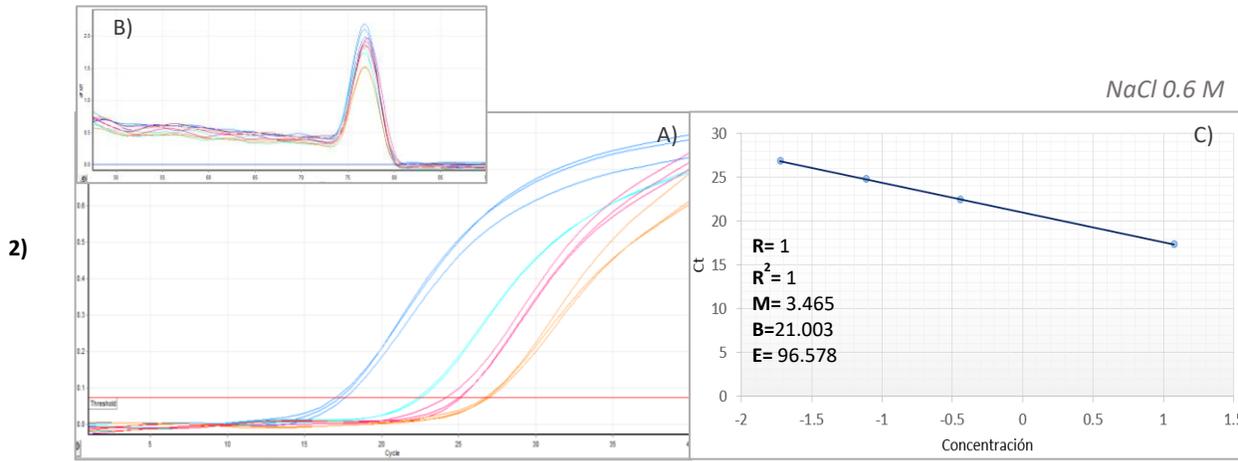
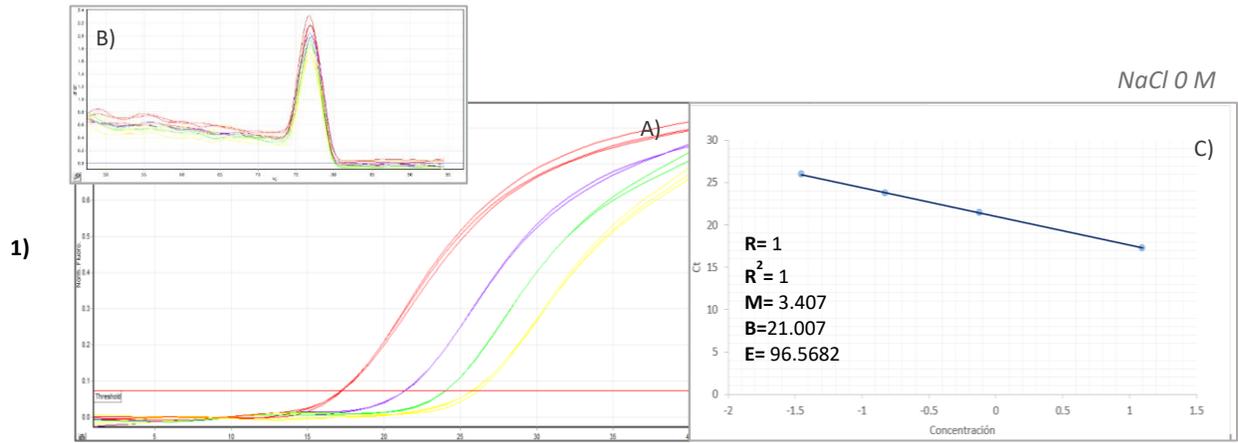
7.3 Estabilidad transcripcional de los genes candidatos a genes de referencia en *D. hansenii* durante la etapa de crecimiento exponencial en respuesta a NaCl

Para la selección y validación de los genes de referencia a utilizar en los ensayos de cuantificación relativa, se construyeron curvas con cada uno de los genes candidatos, *DhSOD*, *DhPEMT*, *DhRNR*, *DhrpS3*, *DhCTA* y *DhCTT*, usando como templado cDNA producto de la retrotranscripción de 2 µg de RNA extraídos en la fase exponencial media de las cuatro diferentes condiciones experimentales, *D. hansenii* en YPD con concentraciones crecientes de NaCl: 0, 0.6, 2 y 2.5 M (figuras 17-20).

Los ensayos de PCR en tiempo real para los transcritos *DhSOD*, *DhrpS3*, *DhCTA* y *DhCTT*, tuvieron eficiencias superiores al 95% y a través del análisis por curva de disociación se confirmó la amplificación de un solo producto específico y sin la presencia de estructuras secundarias (figuras 17-20). Sin embargo, la amplificación de los transcritos de *DhPEMT* y *DhRNR* presentó dificultades, debido a que mostraban una amplificación tardía, por arriba del ciclo 25, aunado a la nula presencia de la fase de meseta en el diagrama de PCR, por lo que no fue posible cuantificar la eficiencia de la reacción. Con la finalidad de conseguir una buena eficiencia en estas reacciones, se realizaron modificaciones el programa de PCR en la temperatura de alineamiento (57° y 58°C) y se probaron diferentes concentraciones de los oligonucleótidos (límite en 500 nM), sin embargo, la amplificación tardía prevaleció, por lo cual no fue posible estimar la eficiencia de la reacción y por lo tanto se decidió eliminar ambos genes de los experimentos posteriores (datos no mostrados).

Existen numerosos factores por los cuales la amplificación de un producto puede tener mala eficiencia, entre ellos la presencia de inhibidores en la muestra de cDNA o en los oligonucleótidos, una incorrecta temperatura de alineamiento o presencia de estructuras secundarias que merman la eficiencia al competir por los reactivos y oligonucleótidos de la reacción. Por un lado, tomando en cuenta que todas las reacciones parten de un mismo lote de cDNA, a partir del cual se han amplificado otros transcritos, podemos descartar que existan inhibidores en el templado. Por otro lado, debido a que en la matriz de oligonucleótidos se pudo determinar la no complementariedad de bases en los transcritos *DhPEMT* y *DhRNR*, y que los criterios básicos de su diseño, analizados en diferentes plataformas bioinformáticas, fueron aceptables, nosotros consideramos la falla en la amplificación de estos transcritos puede estar ocasionada por una degradación en los oligonucleótidos que puede ser causada por múltiples ciclos de congelación y descongelación, pérdida de la integridad en oligonucleótidos de más de un año, degradación por hidrólisis, entre otras.

DhSOD



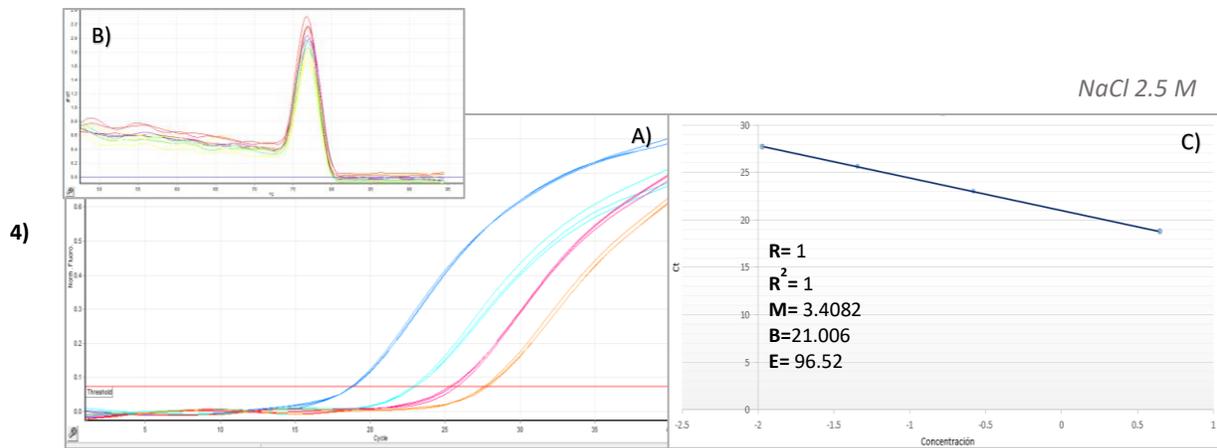
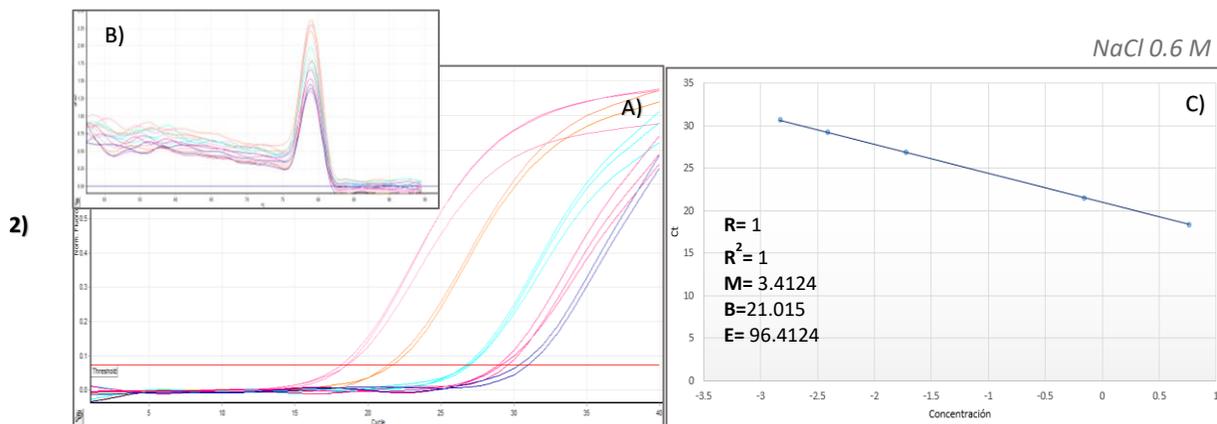
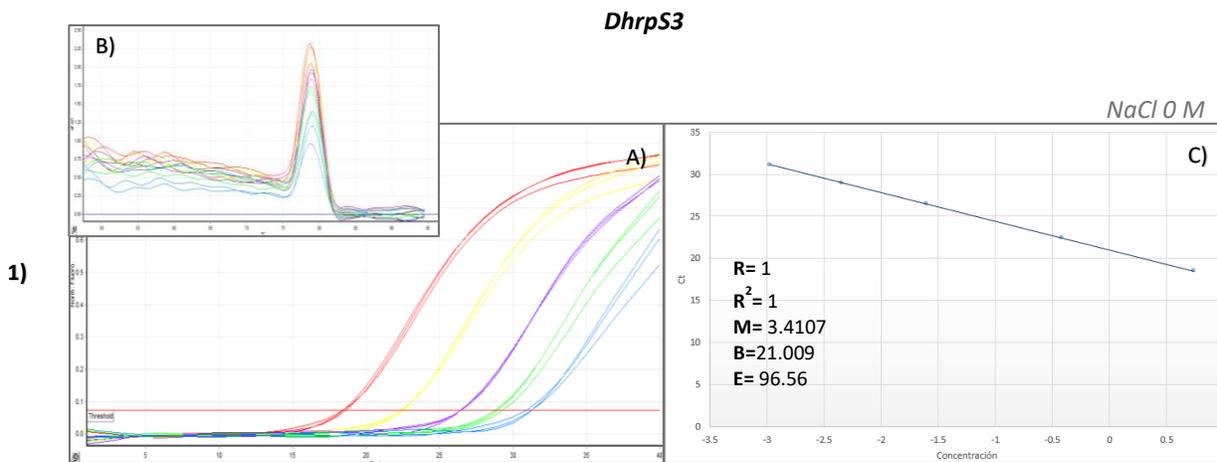


Figura 17. Diagrama de amplificación del gen *DhsOD* usando cDNA proveniente de mRNA extraído de células cultivadas en diferentes concentraciones de NaCl. 1) cDNA de la condición experimental 0 M; 2) cDNA de la condición experimental 0.6 M; 3) cDNA de la condición experimental 2 M; 4) cDNA de la condición experimental 2.5 M; A) Diagrama de amplificación del cDNA con diluciones seriales 1:3; B) Curva de disociación, muestras en todos los casos la formación de un solo producto de amplificación; C) Curva estándar, muestra los valores de pendiente (M), coeficiente de correlación (R^2), ordenada al origen (B) y eficiencia de la reacción de tiempo real (E).



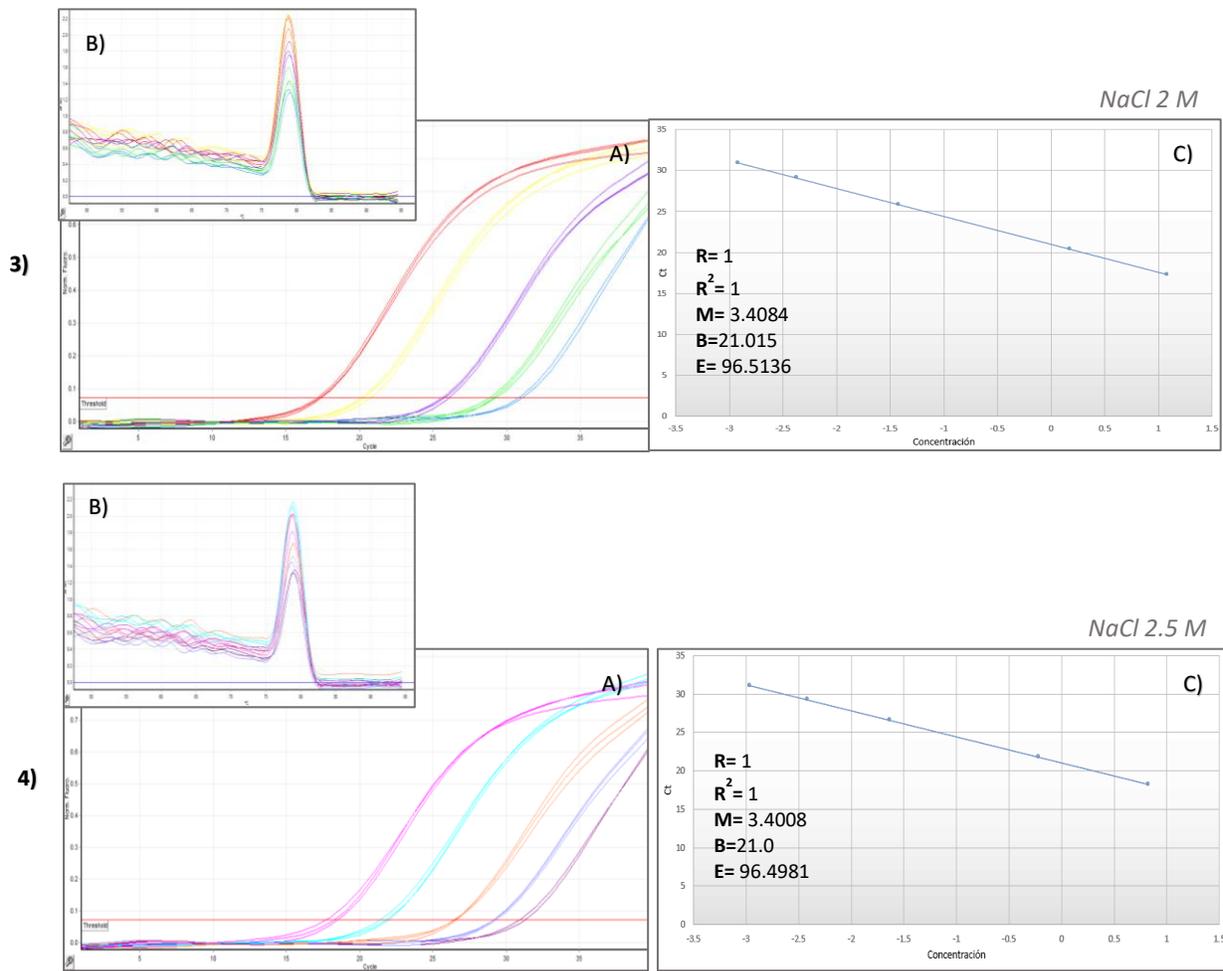
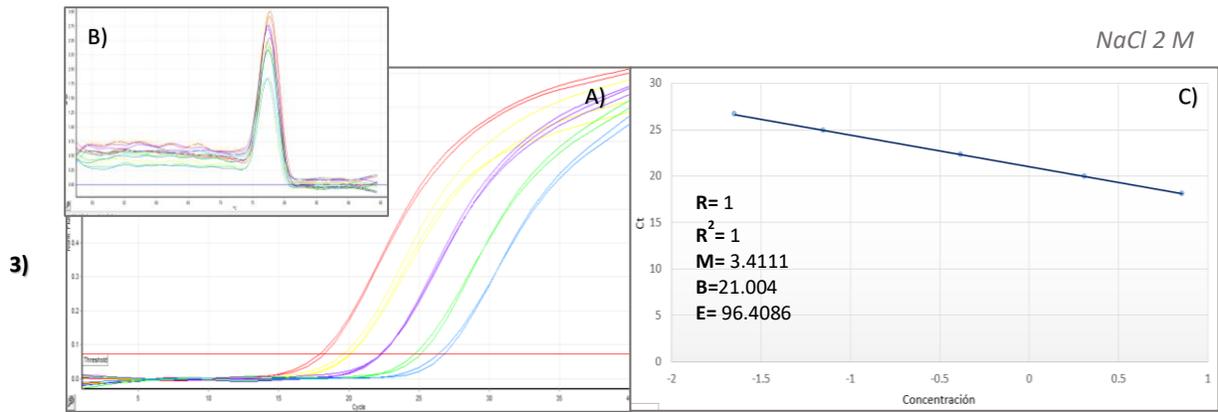
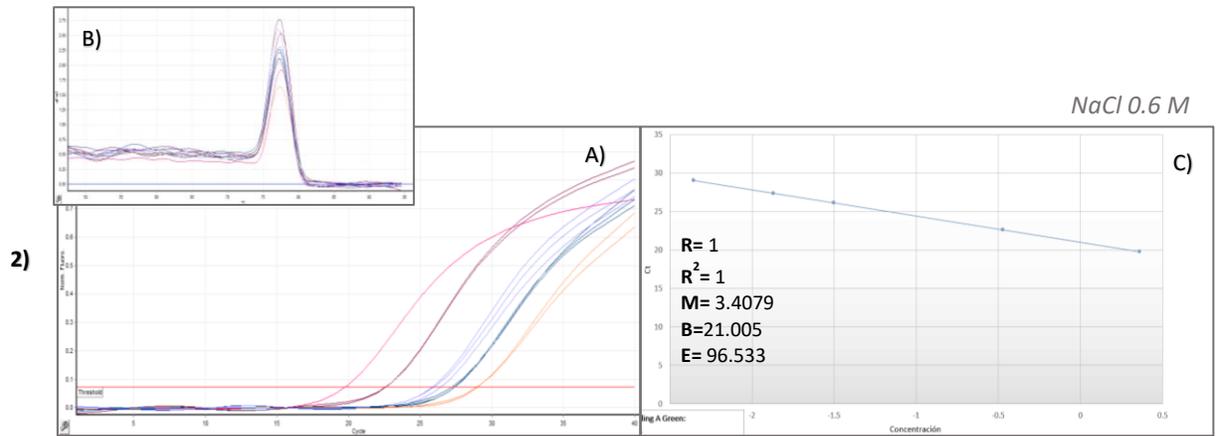
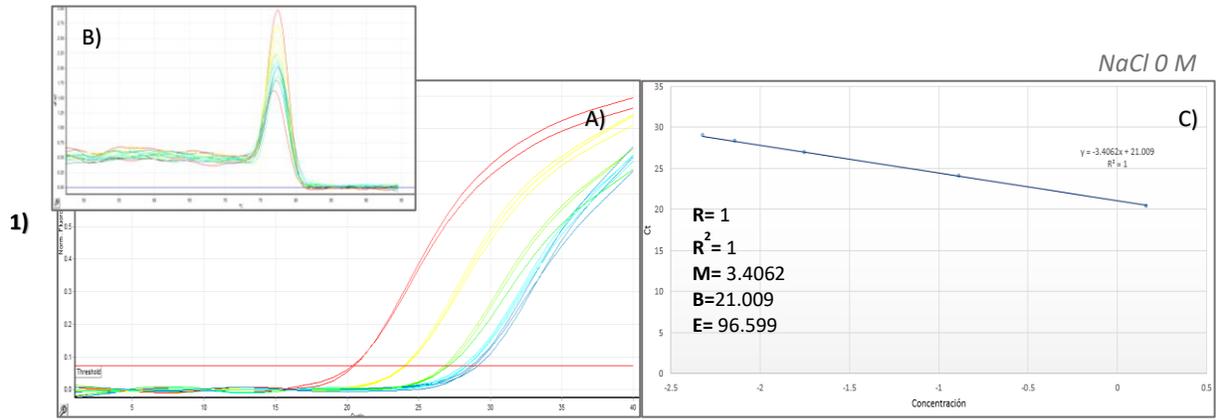


Figura 18. Diagrama de amplificación del gen *Dhrp53* usando cDNA proveniente de mRNA extraído de células cultivadas en diferentes concentraciones de NaCl. 1) cDNA de la condición experimental 0 M; 2) cDNA de la condición experimental 0.6 M; 3) cDNA de la condición experimental 2 M; 4) cDNA de la condición experimental 2.5 M; A) Diagrama de amplificación del cDNA con diluciones seriales 1:3; B) Curva de disociación, muestras en todos los casos la formación de un solo producto de amplificación; C) Curva estándar, muestra los valores de pendiente (M), coeficiente de correlación (R^2), ordenada al origen (B) y eficiencia de la reacción de tiempo real (E).

DhCTA



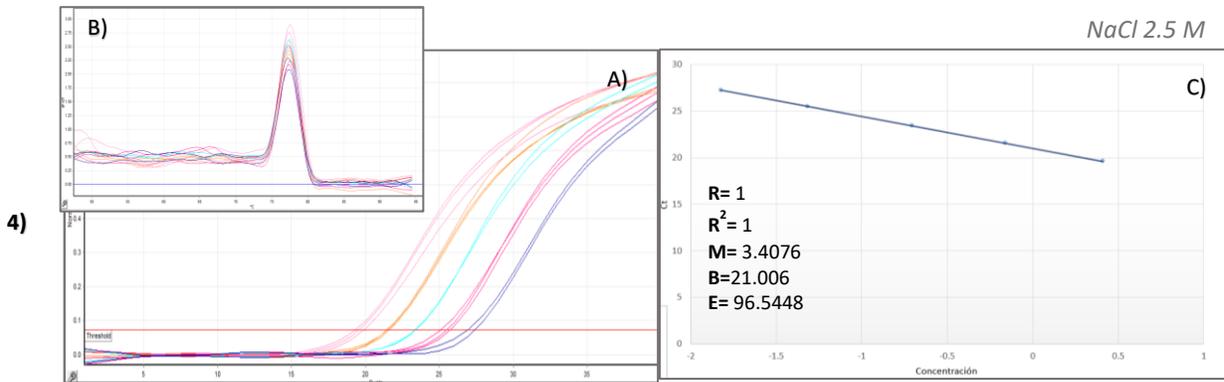
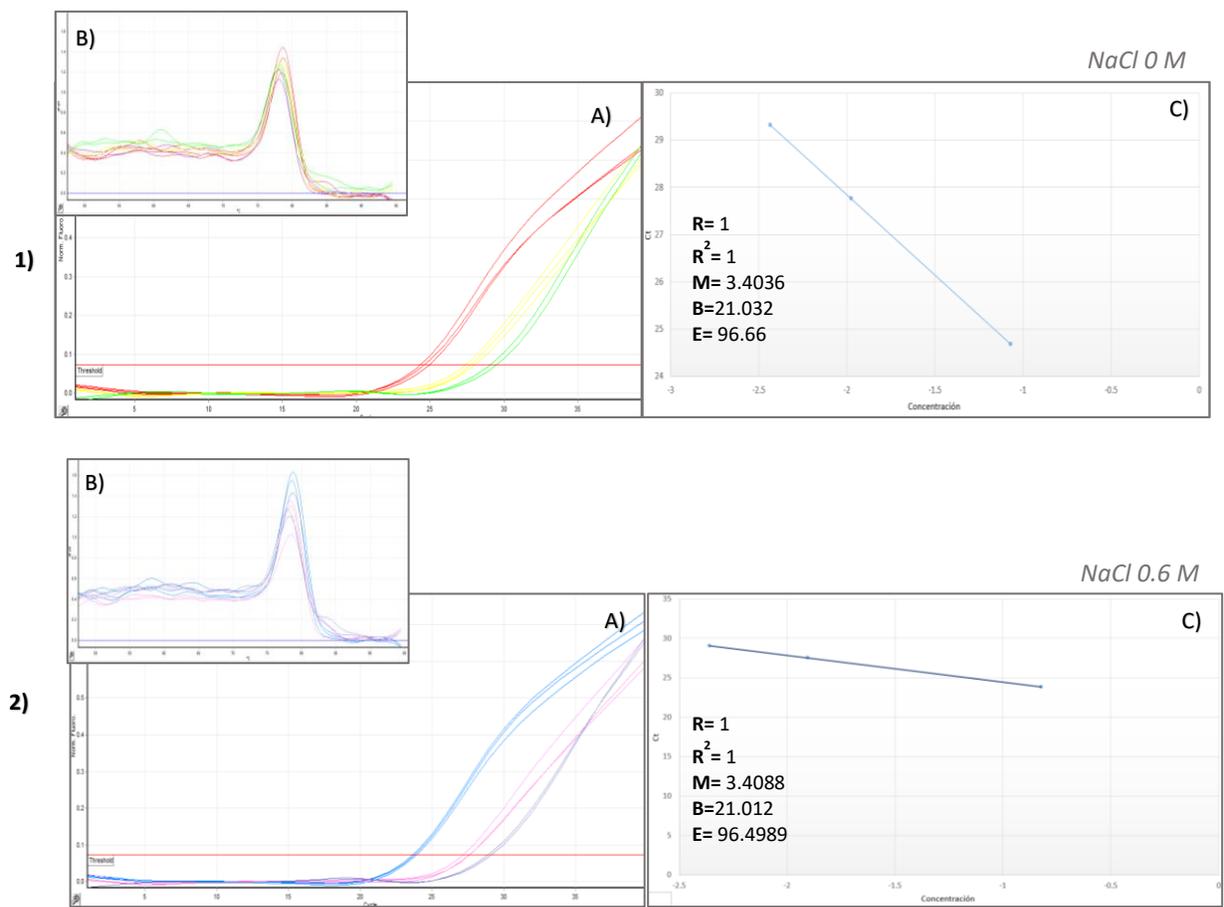


Figura 19. Diagrama de amplificación del gen *DhCTA* usando cDNA proveniente de mRNA extraído de células cultivadas en diferentes concentraciones de NaCl. 1) cDNA de la condición experimental 0 M; 2) cDNA de la condición experimental 0.6 M; 3) cDNA de la condición experimental 2 M; 4) cDNA de la condición experimental 2.5 M; A) Diagrama de amplificación del cDNA con diluciones seriales 1:3; B) Curva de disociación, muestras en todos los casos la formación de un solo producto de amplificación; C) Curva estándar, muestra los valores de pendiente (M), coeficiente de correlación (R^2), ordenada al origen (B) y eficiencia de la reacción de tiempo real (E).

DhCTT



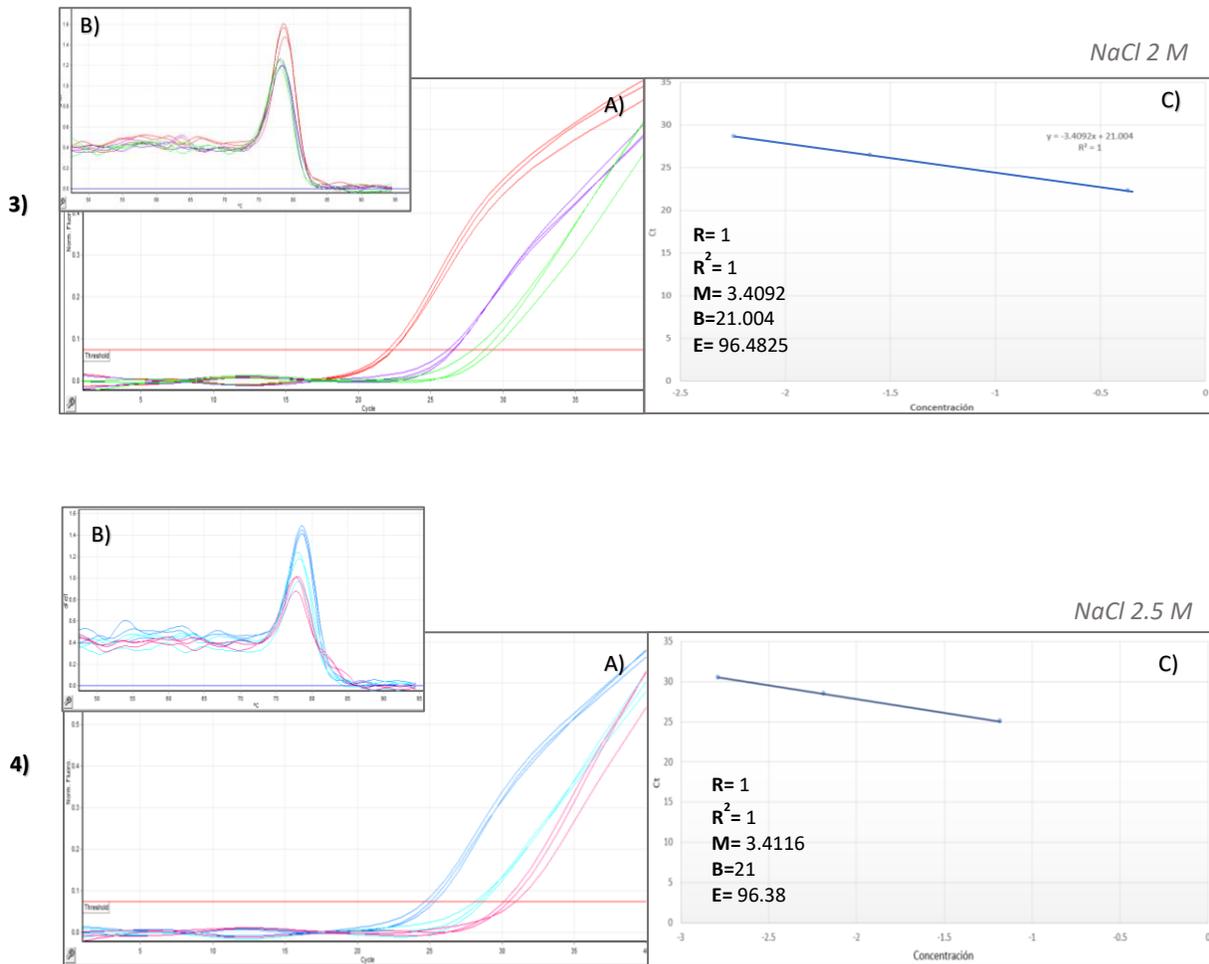


Figura 20. Diagrama de amplificación del gen *DhCTT* usando cDNA proveniente de mRNA extraído de células cultivadas en diferentes concentraciones de NaCl. 1) cDNA de la condición experimental 0 M; 2) cDNA de la condición experimental 0.6 M; 3) cDNA de la condición experimental 2 M; 4) cDNA de la condición experimental 2.5 M; A) Diagrama de amplificación del cDNA con diluciones seriales 1:3; B) Curva de disociación, muestras en todos los casos la formación de un solo producto de amplificación; C) Curva estándar, muestra los valores de pendiente (M), coeficiente de correlación (R^2), ordenada al origen (B) y eficiencia de la reacción de tiempo real (E).

Para la selección de los genes de referencia, se evaluó la estabilidad de su expresión utilizando los valores de C_t obtenidos tras los ensayos de PCR tiempo real de las diferentes muestras de cDNA provenientes de cada tratamiento experimental. Debido a que en todos los casos los valores de eficiencia en la curva estándar fueron superiores al 90%, los datos de los genes *DhSOD*, *DhrpS3*, *DhCTA* y *DhCTT* pudieron ser evaluados en dos plataformas bioinformáticas, *NormFinder* y *BestKeeper*.

NormFinder

Para el análisis de estabilidad de la expresión usando *NormFinder*, se obtuvieron los valores promedio del Ct de cada una de las diluciones seriales utilizadas para las curvas estándar construidas con cDNA de cada una de las condiciones. Uno de los criterios de exclusión para el uso de este método es la desviación estándar (SD), que entre los triplicados técnicos de cada una de las diluciones evaluadas no debe superar 0.3 unidades de SD. Bajo este criterio, los valores obtenidos pueden ser utilizados.

Un segundo requerimiento implica el establecimiento de al menos dos grupos a evaluar, en este caso, cada uno de los grupos está representado por una condición experimental, de manera que se establecieron 4 grupos (0, 0.6, 2 y 2.5M NaCl).

Se analizó la estabilidad de los genes de referencia candidatos de ambos experimentos biológicos (tabla 4), donde un alto valor de estabilidad indica una elevada varianza en la expresión génica y por lo tanto que la expresión no es constitutiva. Los valores más cercanos a cero representan una mayor estabilidad, es decir que la transcripción es constitutiva en las condiciones experimentales. El análisis en *NormFinder* postuló al gen *DhrpS3* como el más estable, con un valor promedio de estabilidad de 0.003. La mejor combinación de genes, según este algoritmo sería la pareja de *DhrpS3* y *DhCTT*, con una estabilidad promedio de 0.006.

Tabla 4. Análisis utilizando NormFinder de la estabilidad de los cuatro genes candidatos.

*Gen Ref.	Valor de estabilidad	**Gen Ref.	Valor de estabilidad
1. <i>DhSOD</i>	0.008	1. <i>DhSOD</i>	0.012
2. <i>DhrpS3</i>	0.004	2. <i>DhrpS3</i>	0.002
3. <i>DhCTA</i>	0.017	3. <i>DhCTA</i>	0.007
4. <i>DhCTT</i>	0.005	4. <i>DhCTT</i>	0.006

(*)Primer experimento biológico. (**) Segundo experimento biológico.

BestKeeper

Se realizó un análisis de la estabilidad de la expresión génica de los cuatro genes de referencia candidatos: *DhSOD*, *DhrpS3*, *DhCTA* y *DhCTT*. En este análisis se ocuparon los valores directos de C_t obtenidos de la dilución 1:9 de cada muestra de cDNA, con estos valores y sin discriminar de acuerdo a la condición experimental, el *software* arroja un análisis de estadística descriptiva (tabla 5).

La primera estimación de la estabilidad tomando en cuenta los valores de la desviación estándar (SD) y del coeficiente de variación (CV), indicaron que el gen *DhrpS3* tiene los niveles de expresión

más estables, al presentar los valores más bajos en ambos indicadores (SD=0.29 y CV=1.10), seguido de los genes *DhSOD* y *DhCTT*, cuyos valores de estabilidad son similares (SD=0.67, CV=3.02, y SD=0.62, CV=2.25, respectivamente). En contraste el gen para *CTA*, es descartado como gen candidato, debido a que sus valores de C_t tienen una desviación estándar superior a 1 (SD=1.81), que es el límite máximo permitido, razón por la cual es considerado inconsistente (Pfaffl, M., et al., 2004). Con estos resultados además podemos saber de manera inicial que *DhSOD* es el gen con un mayor número de copias en todas las muestras en comparación con el resto de los genes, al tener un valor medio de $C_t = 22.09$. En contraste, *DhCTT* es el transcrito que presenta el menor número de copias ($C_t=27.54$).

Tabla 5. Estadística descriptiva de la estabilidad en la expresión génica de *Debaryomyces hansenii*, usando *BestKeeper*.

Factor	Genes de referencia candidatos			
	<i>DhSOD</i>	<i>DhrpS3</i>	<i>DhCTA</i>	<i>DhCTT</i>
N	12	12	12	12
MG [C_t]	22.08	26.46	24.63	27.53
MA [C_t]	22.09	26.45	24.71	27.54
Min [C_t]	21.15	25.67	22.28	26.17
Máx [C_t]	23.06	27.01	27.12	28.72
SD [$\pm C_t$]	0.66	0.29	1.85	0.62
CV [% C_t]	3.00	1.10	7.47	2.25
R	0.898	0.789	-	0.880
Valor de p	0.001	0.002	-	0.001

N, número de muestras; MG, media geométrica de los valores de C_t ; MA, media aritmética de los valores de C_t ; Min y Máx, valores extremos de C_t : mínimo y máximo; SD, desviación estándar de los valores de C_t ; CV, coeficiente de variación expresado en porcentaje de los valores de C_t ; R, coeficiente de correlación; valor de $p=0.05$.

Una vez excluido el gen de *DhCTA*, se calculó el índice *BestKeeper*, el cual corresponde al promedio del C_p de los candidatos, además de determinar el coeficiente de correlación por pares (r) entre cada candidato a gen de referencia y el coeficiente de variación (CV) basado en los valores de C_p de todos los genes candidatos. Los valores más bajos de r y CV indican una mayor estabilidad en la transcripción y por lo tanto determinan al gen de referencia (Pfaffl, M., et al., 2004) (tabla 6).

Tabla 6. Determinación del índice *BestKeeper*.

	Genes de referencia candidatos		
	Candidato 1 <i>SOD</i>	Candidato 2 <i>DhrpS3</i>	Candidato 3 <i>CTT</i>
Candidato 2 <i>DhrpS3</i>	0.585	-	-
Valor de p	0.046	-	-
Candidato 3 <i>DhCTT</i>	0.632	0.629	-
Valor de p	0.027	0.028	-
<i>BestKeeper</i> vs coef. de corr. (r)	0.898	0.789	0.883
Valor de p	0.001	0.002	0.001
Coef. de determinación (R²)	0.81	0.62	0.77
Valor de p	0.001	0.002	0.001

Coeficiente de correlación de Pearson (r) y coeficiente de determinación (R²), entre los genes candidatos y el índice *BestKeeper*.

Los datos obtenidos con ambas herramientas indican que el gen *DhrpS3* es el más estable, es decir, que la expresión del transcrito no se ve modificada por las condiciones experimentales, en este caso por la variación en la concentración de NaCl, por lo que se puede considerar que su expresión es constitutiva y por lo tanto ser usado para llevar a cabo la cuantificación relativa de los genes de *DhCTA*, *DhCTT* y *DhSOD*. Pese a que el algoritmo *NormFinder* además indica que la mejor combinación de genes de referencia es con *DhCTT*, se decidió no utilizarlo debido a que en el análisis con *BestKeeper*, presenta valores similares de estabilidad con respecto al gen *DhSOD* (figura 21).

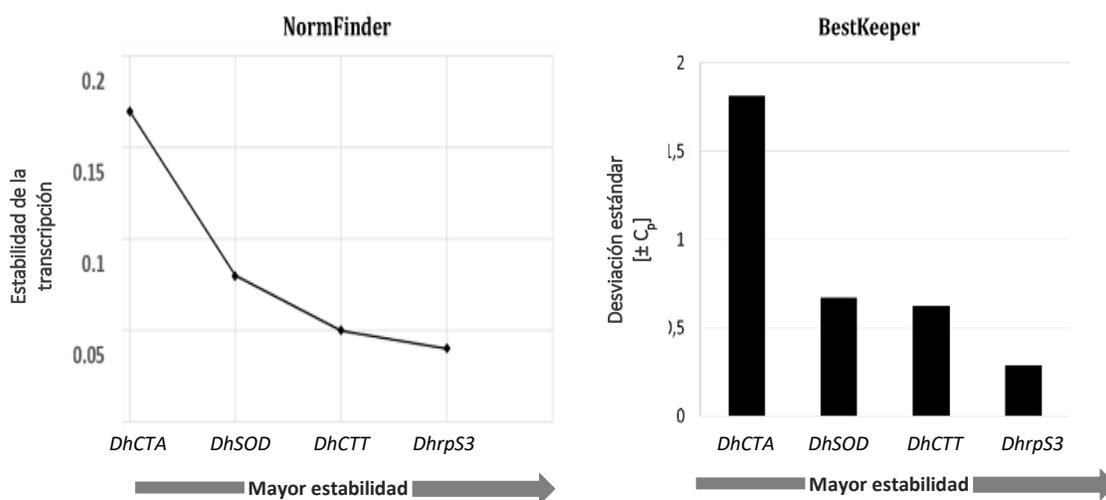
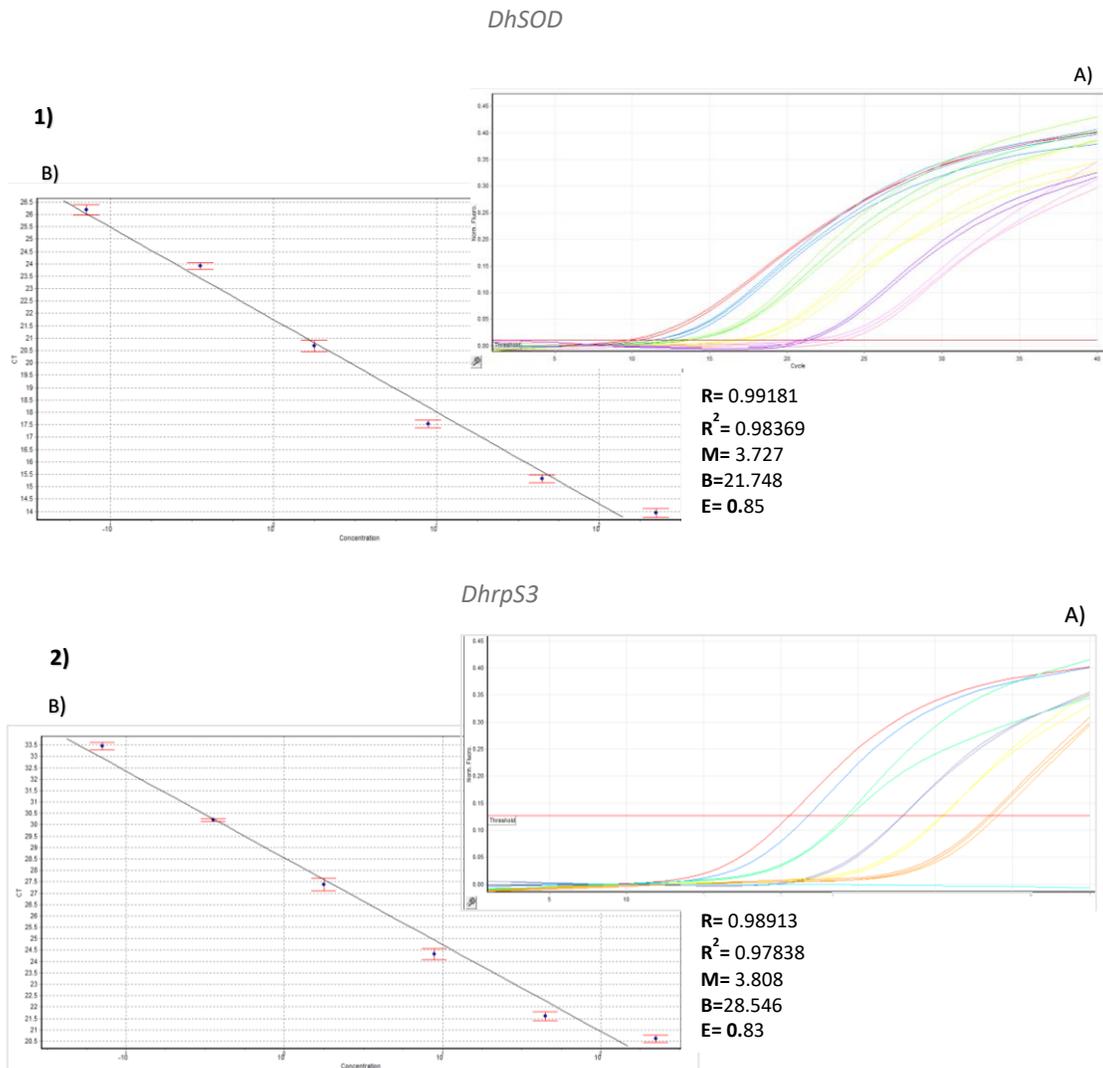


Figura 21. Análisis de la estabilidad en la expresión génica de *D. hansenii*, utilizando dos plataformas bioinformáticas: *NormFinder* y *BestKeeper*. El nivel de expresión transcripcional de los cuatro genes candidatos a referencia se evaluó en todas las condiciones experimentales. En ambas plataformas, *DhrpS3* es el transcrito que mostró una menor variación en su expresión en todas las condiciones de salinidad, por lo que es el más estable y puede usarse como un gen de referencia en estas condiciones experimentales. El transcrito *DhCTA* presenta variaciones en su expresión en respuesta a las diferentes concentraciones de sal, su nivel de estabilidad es muy bajo y no puede ser empleado como gen de referencia.

7.4 Cuantificación absoluta del mRNA de genes implicados en la respuesta antioxidante y biosíntesis de ribosomas en *D. hansenii*

Para efectuar los cálculos de cuantificación absoluta, se realizó una curva estándar para cada gen, usando como templado DNA genómico (gDNA) de *D. hansenii*. Los valores de pendiente (m), eficiencia (E) y coeficiente de correlación (R^2), se muestran en la figura 22. La curva de disociación indicó la presencia de un solo pico específico de amplificación en todos los casos.



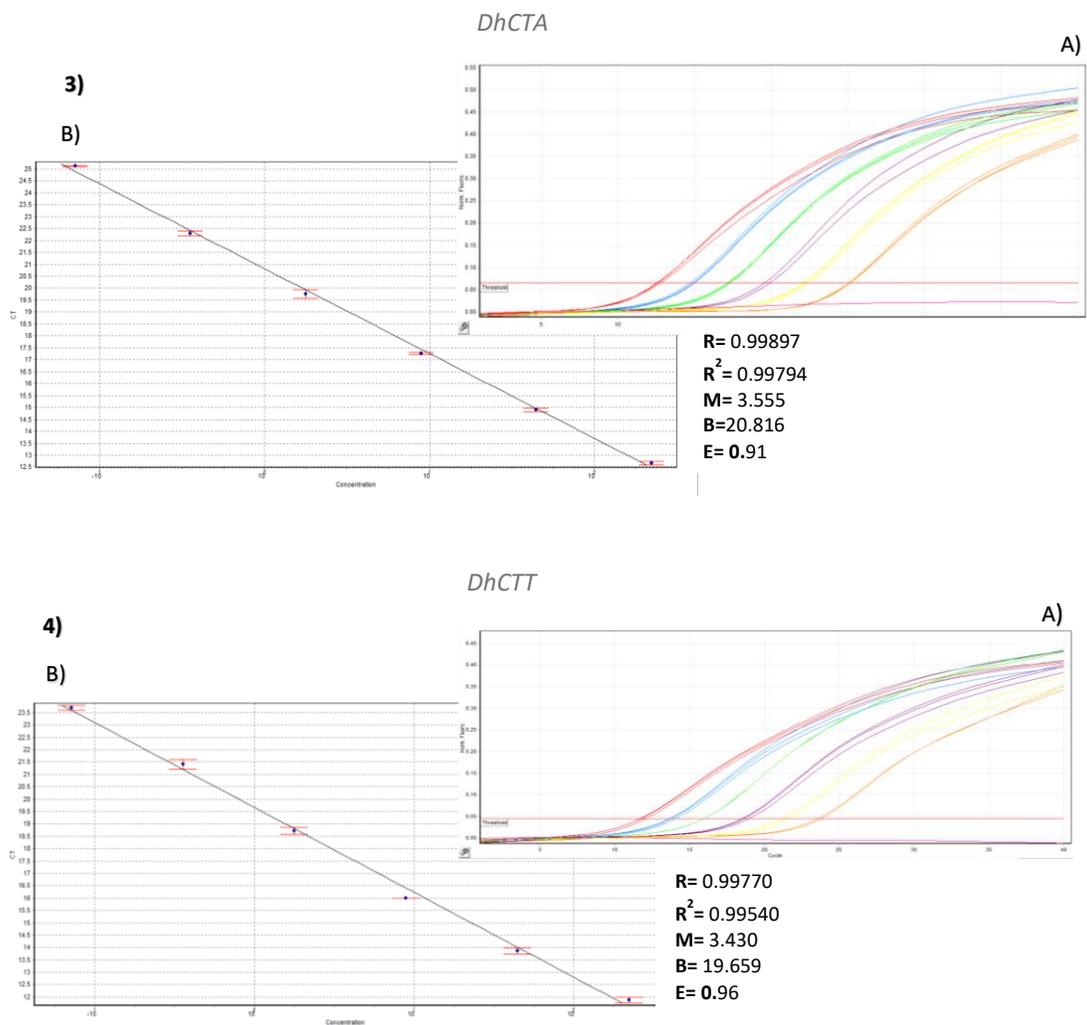


Figura 22. Diagrama de amplificación y curva estándar con DNA genómico. 1) *DhSOD*; 2) *DhrpS3*; 3) *DhCTA*; 4) *DhCTT*. A) Diagrama de amplificación del DNA genómico de *D. hansenii*, construida con diluciones seriales 1:5 a partir de una concentración inicial de 1114 ng/ μ L, el valor de umbral es 0.07322 en todas las condiciones; B) Curva estándar, muestra los valores de la pendiente (M), coeficiente de correlación (R^2), ordenada al origen (B) y eficiencia de la reacción de PCR tiempo real (E).

Todas las curvas construidas tuvieron valores aceptables de pendiente y eficiencia ($m = -3.32 \pm 10\%$ y $E = 100\% \pm 10\%$) (tabla 7).

Tabla 7. Parámetros evaluados para elegir la mejor curva estándar a utilizarse en la cuantificación absoluta.

	Pendiente (M)	Eficiencia (E)	Coef. de correlación (R^2)
<i>DhSOD</i>	-3.727	0.85	0.98
<i>DhrpS3</i>	-3.808	0.83	0.97
<i>DhCTA</i>	-3.55	0.91	0.99
<i>DhCTT</i>	-3.430	0.96	0.99

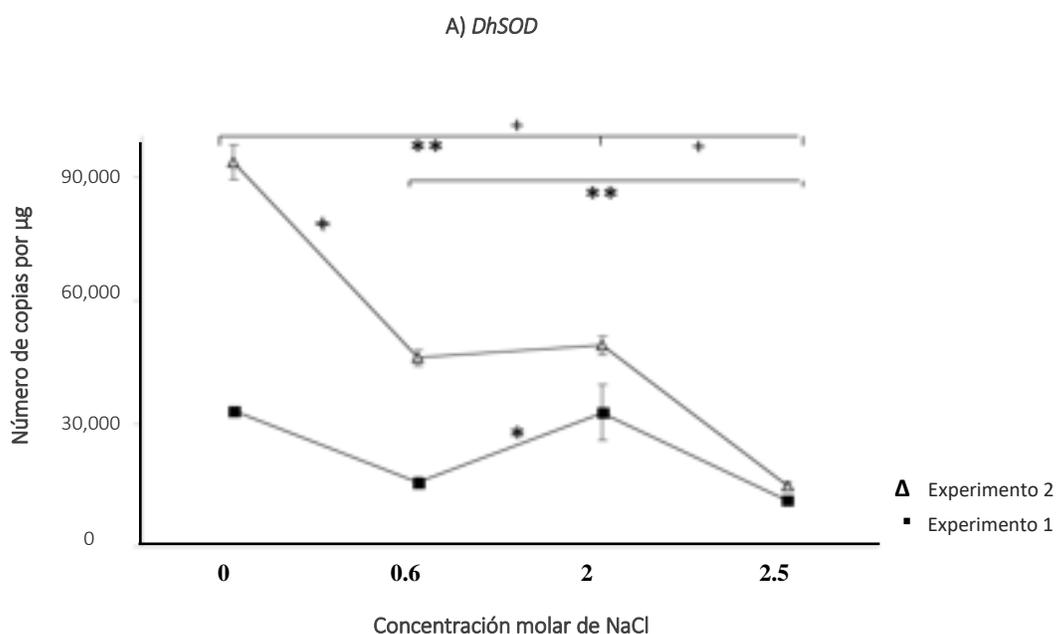
Pendiente $M = -3.32 \pm 10\%$; $E = 100\% \pm 10\%$; ($R^2 = 0.99$).

Se utilizaron los datos de las curvas estándar con cDNA, construidas para la selección y validación de genes de referencia. Los valores promedio del C_t para cada una de las diluciones de cada condición experimental y juego oligonucleótidos, fueron interpolados en la curva estándar con gDNA. La determinación de la concentración inicial en ng se calculó a través del programa Q-Rex integrado en el termociclador de PCR tiempo real Rotor-Gene Q de Qiagen, además de ser corroborado manualmente usando Excel 2010 utilizando los valores de la ecuación de la recta de la curva estándar (tabla 8).

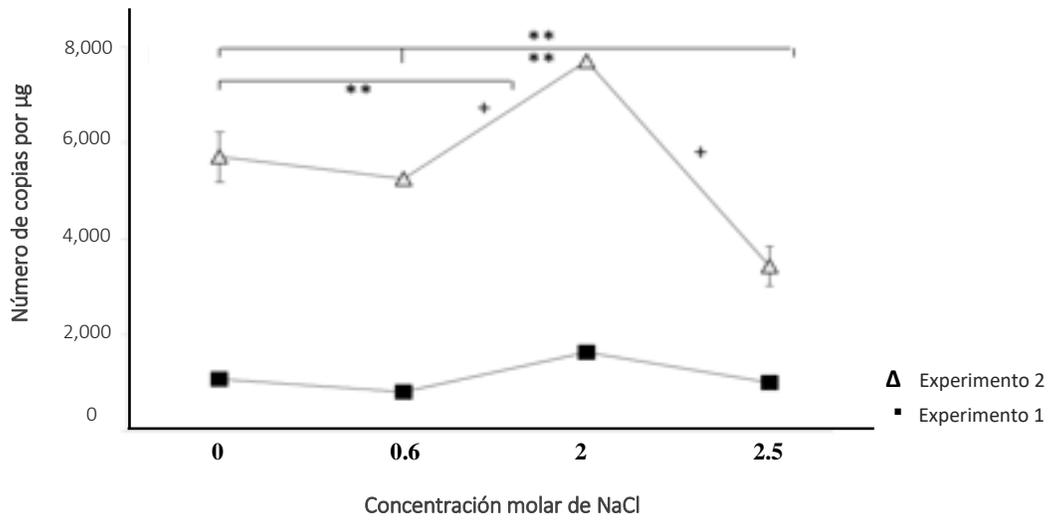
Tabla 8. Resultados de la cuantificación absoluta determinados con el método la curva estándar.				
Concentración de NaCl (M)	Promedio C_t	Concentración calculada 1	Concentración calculada 2	Número de copias por μ g
<i>DhsOD</i> (E=96%) Exp.1				
0	21.40±0.005	34.26±0.16	34.405±0.13	33,122
0.6	22.51±0.11	16.29±1.74	16.285±1.26	15,715
2	21.44±0.31	33.93±7.01	33.90±6.98	32,719
2.5	22.99±0.11	11.80±0.89	11.82±0.89	11,398
<i>DhsOD</i> (E=96%) Exp. 2				
0	18.26±0.07	98.09±4.4	95.975±4.43	93,610
0.6	19.31±0.06	48.20±2.06	47.314±2.03	46,072
2	19.21±0.07	51.28±2.34	50.401±2.39	49,050
2.5	20.97±0.07	15.61±0.72	15.34±0.66	14,933
<i>DhrpS3</i> (E=96%) Exp.1				
0	26.48±0.02	1.11±0.016	1.11±0.02	1,077
0.6	26.88±0.13	0.850±0.079	0.851±0.08	820
2	25.86±0.22	1.703±0.25	1.699±0.25	1614
2.5	26.56±0.07	1.051±0.052	1.05±0.05	1014
<i>DhrpS3</i> (E=96%) Exp. 2				
0	22.4±0.13	5.961±0.53	5.864±0.524	5,704
0.6	22.52±0.11	5.48±0.42	5.392±0.41	5,246
2	21.95±0.07	8.04±0.38	7.914±0.36	7,697
2.5	23.15±0.02	3.59±0.059	3.532±0.050	3435
<i>DhCTA</i> (E=96%) Exp.1				
0	26.98±0.15	0.798±0.08	0.798±0.086	769
0.6	26.12±0.31	1.43±0.28	1.437±0.27	1386
2	22.31±0.04	18.63±0.59	18.61±0.614	17,964
2.5	23.41±0.05	8.86±0.41	8.871±0.30	8,555
<i>DhCTA</i> (E=96%) Exp. 2				
0	24.67±0.015	1.27±0.018	1.259±0.013	1,221
0.6	24.09±0.18	1.56±0.18	1.876±0.22	1,826
2	22.83±0.15	4.44±0.65	4.380±0.94	4,257
2.5	23.72±0.15	2.44±0.35	2.406±0.243	2,341
<i>DhCTT</i> (E=97%) Exp.1				
0	27.75±0.32	0.478±0.10	0.479±0.105	461
0.6	27.5±0.24	0.563±0.096	0.565±0.097	544
2	26.45±0.24	1.15±0.19	1.150±0.195	1,109
2.5	28.46±0.28	0.296±0.057	0.297±0.057	286
<i>DhCTT</i> (E=97%) Exp. 2				
0	25.73±0.17	0.628±0.10	0.619±0.071	601
0.6	25.61±0.005	0.677±0.004	0.667±0.003	648
2	23.60±0.07	2.63±0.19	2.596±0.131	2,523
2.5	25.69±0.12	0.643±0.07	0.0633±0.053	615
1) Concentración calculada a través del programa Q-Rex de Qiagen. 2) Concentración calculada en Excel 2010, con los datos de la ecuación de la recta.				

Se analizaron los valores de C_t obtenidos en los dos experimentos biológicos, el primero utilizando el kit Luminaris Color HiGreen y el segundo con el kit Luminaris Color HiGreen Fluorescein ambos de Thermo Fisher Scientific. Los resultados de la cuantificación absoluta muestran que el segundo kit tiene mayor sensibilidad con respecto al primero, y esto se vio reflejado en la detección más temprana del C_t , y por lo tanto está directamente relacionado con concentraciones más elevadas del producto.

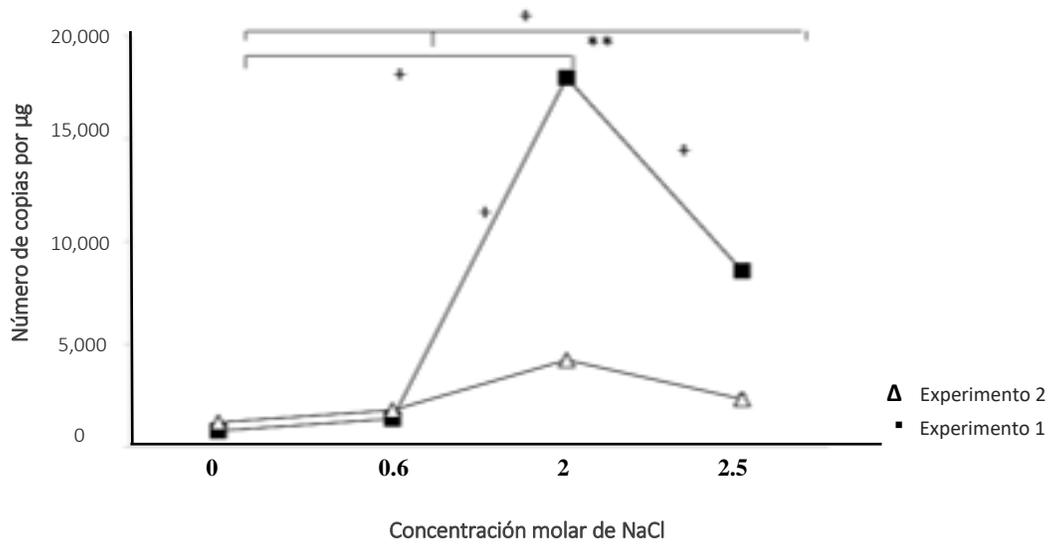
Para ver si los niveles de expresión absoluta de todos los genes variaban en las condiciones probadas, se realizaron pruebas de ANOVA utilizando los valores de cuantificación por número de copias. Además, se llevaron a cabo pruebas *post hoc* de Tukey, que mostraron las diferencias significativas de cada uno de los tratamientos vs cada tratamiento.



B) *DhrpS3*



C) *DhCTA*



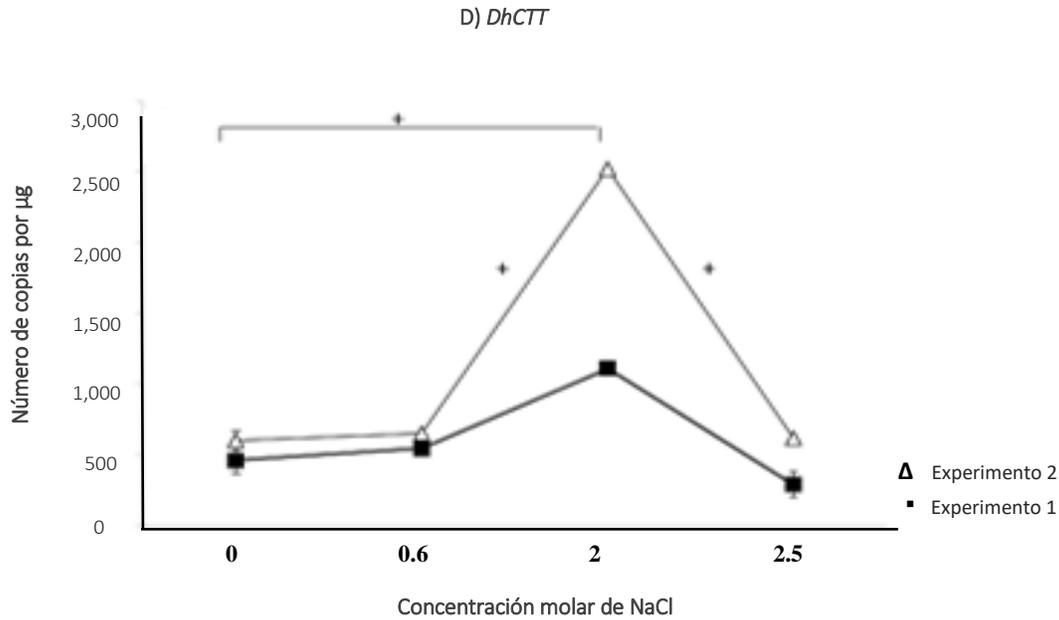


Figura 23. Expresión absoluta de los genes *DhSOD*, *DhrpS3*, *DhCTA* y *DhCTT*, evaluados en cuatro condiciones de crecimiento, durante la fase exponencial media ($DO_{600nm}=2.0$). **A)** Expresión del mRNA de *DhSOD*; **B)** Expresión del mRNA de *DhS3*; **C)** Expresión del mRNA de *DhCTA*; **D)** Expresión del mRNA de *DhCTT*. Análisis ANOVA con un factor $p < 0.05$ en los cuatro casos. Prueba de Tukey (*) diferencias significativas para el experimento biológico 1 (▪). (***) Diferencias significativas presentes únicamente en la réplica biológica usando un kit de amplificación diferente (Δ). (+) Diferencias significativas que coinciden en ambos experimentos biológicos.

Los resultados de la cuantificación absoluta revelan que el transcrito de *DhSOD* es el mayormente expresado en todas las condiciones experimentales en comparación con el resto de los genes evaluados. En la condición sin sal se presenta el pico máximo de su expresión, la cual disminuye considerablemente al aumentar levemente la concentración de NaCl a 0.6 M ($p=0.001$). El cambio comparativo de la expresión entre la condición intermedia a 2 M, presenta una elevación que sólo es significativa en el primer experimento biológico (* $p > 0.5$); en tanto que el cambio de 2 M a 2.5 M presenta una caída drástica del transcrito (* $p > 0.5$), alcanzando los niveles más bajos de su expresión (figura 23A).

El gen *DhrpS3* es el que presenta la mayor estabilidad en todas las condiciones experimentales en comparación con el resto de los genes. Sin embargo, su estabilidad se pierde en la condición 2 M, donde ocurre un incremento en los niveles de expresión en ambas réplicas con la misma magnitud de aumento (* $p > 0.5$). En la concentración con 2.5 M de NaCl en el experimento 1, la expresión del transcrito desciende a niveles cercanos a los de la condición sin sal, en tanto que en el experimento 2 los niveles son incluso más bajos que los que presentó en todos los tratamientos (figura 23B).

El gen *DhCTA* se comporta estable en las condiciones 0 M y 0.6 M, sin embargo, en la concentración 2 M sufre un cambio drástico al elevarse los niveles de expresión en más del 100% (*p>0.5); del mismo modo el cambio en la condición con 2.5 M, conlleva a la caída del transcrito en un 50% a las que presenta en 2 M, aunque los niveles del transcrito siguen siendo superiores a los presentados en las condiciones más bajas de sal (*p>0.5) (figura 23C).

El gen *DhCTT* es estable hasta la condición 0.6 M (*p=0.8), presenta un pico en sus niveles de expresión en la condición con 2 M (*p>0.5), mismos que recuperan los valores observados en las primeras dos condiciones al llegar a la concentración de 2.5 M (figura 23D).

Con estos resultados se demuestra además que los genes *DhCTA* y *DhCTT* presentan bajos niveles de expresión en la célula en comparación con el resto de los genes evaluados en todos los tratamientos, y que el transcrito *DhCTT* exhibe los niveles más bajos en número de copias.

7.5 Determinación de los cambios en la expresión transcripcional de genes vinculados en la defensa antioxidante en respuesta a diferentes concentraciones de sal usando el método C_t comparativo y REST.

Se llevó a cabo la cuantificación relativa de la expresión de los genes *DhSOD*, *DhCTA* y *DhCTT* en diferentes condiciones de crecimiento (0, 2 y 2.5 M de NaCl), utilizando como gen de referencia a *DhrpS3* y condición calibradora al crecimiento en 0.6 M de NaCl. Para ello se ocuparon dos métodos para calcular la expresión relativa: el método de C_t comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, K. y Schmittgen, T., 2001) y mediante el *software* REST (Pfaffl, M., et al., 2002).

La tabla 9 muestra los resultados de la cuantificación de todos los transcritos utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y en las tablas 10 A y 10 B se presenta el detalle de los cálculos de la cuantificación.

Tabla 9. Resultados de la cuantificación relativa siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para ambas réplicas biológicas. Se muestra el valor de desviación estándar.

Tratamiento Concentración de NaCl	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
	Exp. Biol.1	Exp. Biol.2
DhSOD		
0	1.63±0.14	1.92±0.42
2	1.08±0.37	0.73±0.15
2.5	0.57±0.02	0.49±0.05
DhCTA		
0	0.42±0.07	0.62±0.17
2	6.93±0.24	1.62±0.55
2.5	5.33±1.02	2.05±0.6
DhCTT		
0	0.66±0.27	0.86±0.22
2	1.04±0.21	2.74±0.46
2.5	0.41±0.01	1.47±0.22

Usando como referencia al gen *DhrpS3* en la condición calibradora con YPD 0.6 M de NaCl.

Tabla 10 B. Cuantificación relativa de la expresión génica en diferentes concentraciones de NaCl. Resultados usando el Kit 1

DhSOD	Valor Ct <i>DhSOD</i>	Valor Ct <i>DhrpS3</i>	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
ΔCt 0M	21.4	26.48	-5.08	-0.71	1.63580412
ΔCt 0.6 M	22.51	26.88	-4.37	0	1
ΔCt 2 M	21.44	25.86	-4.42	-0.05	1.03526492
ΔCt 2.5 M	22.99	26.56	-3.57	0.8	0.57434918
DhCTA	Valor Ct <i>DhCTA</i>	Valor Ct <i>DhrpS3</i>	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
ΔCt 0M	26.98	26.48	0.5	1.26	0.41754396
ΔCt 0.6 M	26.12	26.88	-0.76	0	1
ΔCt 2 M	22.31	25.86	-3.55	-2.79	6.91629785
ΔCt 2.5 M	23.41	26.56	-3.15	-2.39	5.24157362
DhCTT	Valor Ct <i>DhCTT</i>	Valor Ct <i>DhrpS3</i>	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
ΔCt 0M	27.75	26.48	1.27	0.65	0.63728031
ΔCt 0.6 M	27.5	26.88	0.62	0	1
ΔCt 2 M	26.45	25.86	0.59	-0.03	1.02101213
ΔCt 2.5 M	28.46	26.56	1.9	1.28	0.41179551

Experimento 1. Usando gen *DhRPS3* como normalizador y la condición en YPD + 0.6 M de NaCl como calibrador (valores promedio).

Tabla 10 B. Cuantificación relativa de la expresión génica en diferentes concentraciones de NaCl. Resultados usando el Kit 2.

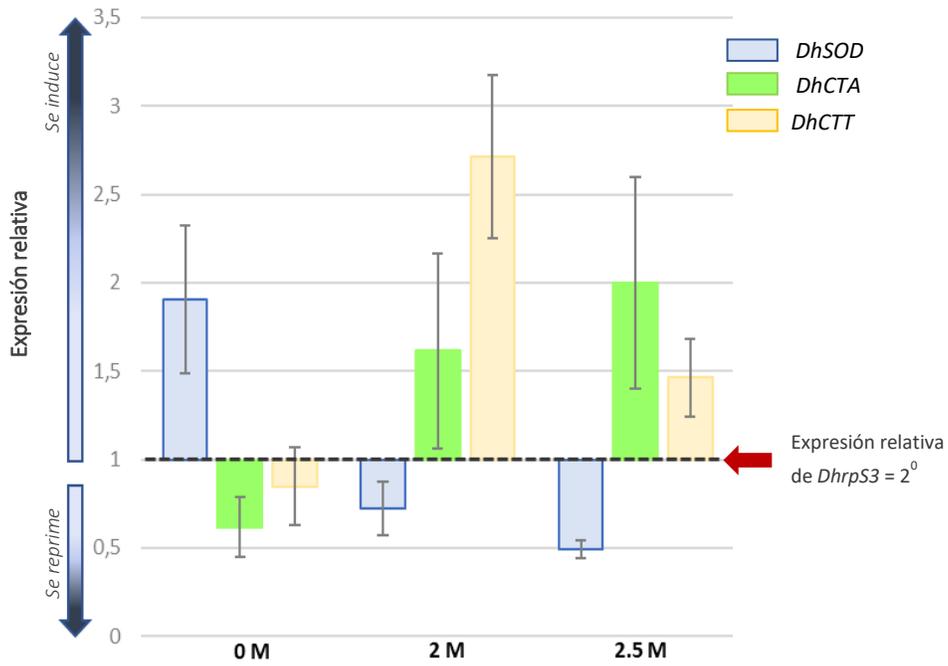
DhSOD	Valor Ct <i>DhSOD</i>	Valor Ct <i>DhrpS3</i>	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{\Delta\Delta}$ Ct
Δ Ct 0M	18.26	22.4	-4.14	-0.93	1.905276
Δ Ct 0.6 M	19.31	22.52	-3.21	0	1
Δ Ct 2 M	19.21	21.95	-2.74	0.47	0.7219646
Δ Ct 2.5 M	20.97	23.15	-2.18	1.03	0.48971015
DhCTA	Valor Ct <i>DhCTA</i>	Valor Ct <i>DhrpS3</i>	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{\Delta\Delta}$ Ct
Δ Ct 0M	24.67	22.4	2.27	0.7	0.61557221
Δ Ct 0.6 M	24.09	22.52	1.57	0	1
Δ Ct 2 M	22.83	21.95	0.88	-0.69	1.61328352
Δ Ct 2.5 M	23.72	23.15	0.57	-1	2
DhCTT	Valor Ct <i>DhCTT</i>	Valor Ct <i>DhrpS3</i>	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{\Delta\Delta}$ Ct
Δ Ct 0M	25.73	22.4	3.33	0.24	0.84674531
Δ Ct 0.6 M	25.61	22.52	3.09	0	1
Δ Ct 2 M	23.6	21.95	1.65	-1.44	2.71320865
Δ Ct 2.5 M	25.69	23.15	2.54	-0.55	1.4640857

Experimento 2. Usando gen *DhRPS3* como normalizador y la condición en YPD + 0.6 M de NaCl como calibrador (valores promedio).

En el primer experimento usando el kit sin fluoresceína, en la condición con 0 M de NaCl, se observa la inducción del transcrito *DhSOD* (expresión de 1.6) y a los genes *DhCTA* y *DhCTT* ligeramente reprimidos (expresiones de 0.4 y 0.6). En la condición con 2 M de NaCl solo el transcrito *DhCTA* se encuentra fuertemente inducido (expresión de 6.9), mientras que los transcritos *DhSOD* y *DhCTT* no presentan diferencias en comparación con el gen de referencia *DhrpS3*. En la condición con 2.5 M de NaCl tanto el transcrito *DhSOD* como *DhCTT* están reprimidos (expresiones de 0.57 y 0.41), mientras que *DhCTA* está inducido (expresión de 5.33) (figura 24 A).

En la réplica biológica usando el kit con fluoresceína se observa que en la condición sin NaCl añadida, el gen *DhSOD* se encuentra inducido (expresión=1.92), en tanto que los transcritos *DhCTA* y *DhCTT* están reprimidos (expresiones de 0.73 y 0.49). Cuando la concentración de sal incrementó a 2 M de NaCl, los genes de ambas catalasas se inducen, contrario a lo que se observó en el primer ensayo, la inducción en el transcrito *DhCTT* fue de 2. En la condición con 2.5 M de NaCl el gen *DhSOD* se reprime (expresión 1.47), los transcritos *DhCTA* y *DhCTT* están inducidos (expresiones de 2 y 1.47) (figura 24 B).

A) Primer ensayo usando Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix.



B) Segundo ensayo usando Luminaris Color HiGreen Fluorescein qPCR Master Mix.

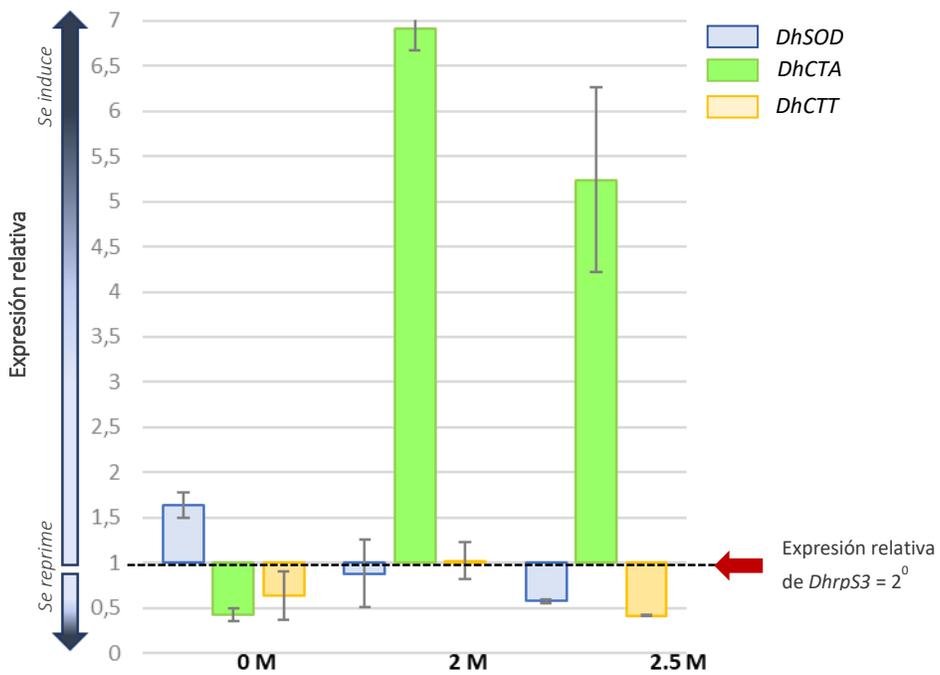


Figura 24. Valores de expresión relativa en los diferentes tratamientos utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Con los resultados del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ inicialmente confirmamos que el kit Luminaris Color HiGreen Fluorescein qPCR Master Mix (réplica biológica 2) tiene mayor sensibilidad en comparación con el kit Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix. Si bien los valores de cuantificación relativa de los genes varían con cada kit, pese a ello es posible identificar algunos patrones que se cumplen: i) el transcrito *DhSOD* desciende cuando incrementa la concentración de sal; ii) *DhCTA* esta reprimido en ausencia de sal y se induce al incrementar la concentración de NaCl; iii) *DhCTT* tiene se reprime en comparación con la referencia cuando no hay NaCl.

Se decidió hacer el análisis usando el promedio de la expresión relativa de los genes usando ambos kits debido a que los resultados ya están normalizados con respecto al control. Se efectuó el análisis de ANOVA de un factor para los tres genes evaluados, identificando la existencia de diferencias significativas entre los tres tratamientos (* $p < 0.05$ en todos los casos). Para determinar las diferencias específicas entre las condiciones experimentales en cada gen, se hizo el análisis estadístico de comparación múltiple de Tukey (figura 25).

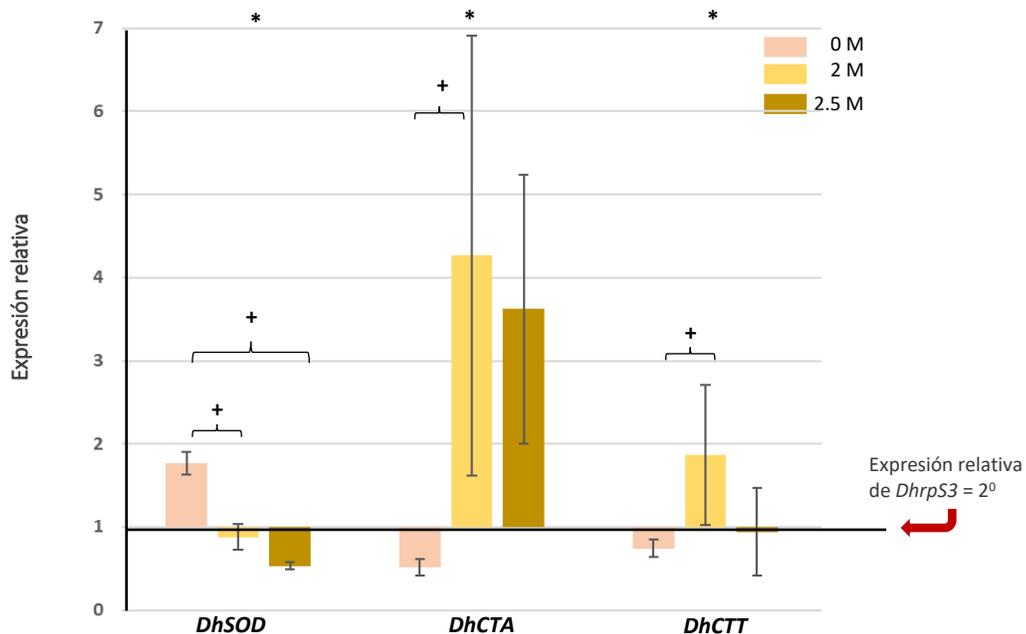


Figura 24. Valores de expresión relativa en los diferentes tratamientos utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. **Expresión relativa del gen *DhSOD*:** se observa que la expresión desciende conforme aumenta la concentración de NaCl (ANOVA de un factor, * $p < 0.05$). Las diferencias específicas entre los distintos tratamientos fueron detectadas mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey, donde las diferencias de expresión del transcrito son significativas entre 0 vs 2 M (* $p < 0.05$) y 0 M y 2.5 M (* $p < 0.05$). **Expresión relativa del gen *DhCTA*:** existe una sobreexpresión del transcrito en la condición 2 M con respecto a la condición sin sal (* $p < 0.05$). **Expresión relativa del gen *DhCTT*:** al igual que el *DhCTA*, presenta un pico de expresión en la condición 2 M, con un cambio significativo sólo en comparación con la del tratamiento 0 M (* $p = 0.03$). *Indica diferencias significativas de la expresión de los genes evaluados en diferentes tratamientos por ANOVA un factor con 95% de significancia. La expresión relativa del gen de referencia *DhRpS3* en la condición calibradora con 0.6 M de NaCl, tiene una expresión relativa de 2^0 que es igual a 1.

Los resultados demostraron que la expresión del gen *DhSOD* disminuye significativamente conforme se incrementa la concentración de sal (* $p=0.005$). La diferencia de expresión existente entre las condiciones extremas también es significativa, es decir entre 0 M vs 2 M, y entre 0 M vs 2.5 M de NaCl ($^+p<0.05$ en ambos casos). Sin embargo, no existen cambios de expresión considerables en 2 M vs 2.5 M, $p<0.5$) (figura 25).

El gen *DhCTA* tiene un máximo de expresión en las condiciones de alta salinidad, con un promedio de expresión de 4.26 y 3.62, en 2 M y 2.5 M de NaCl respectivamente. En contraste, las células que estuvieron sometidas con un crecimiento sin sal presentan este gen con baja expresión (expresión promedio de 0.51). Las diferencias de expresión de la condición 0 M con respecto a la condición experimental 2 M y 2.5 M de NaCl, son significativas ($^+p=0.022$ y $^+p=0.003$) (figura 25).

La expresión del gen *DhCTT* se eleva en la condición 2 M de NaCl, alcanzando un máximo de expresión de 1.86, para luego descender en 2.5 M a 0.941 ($^+p=0.07$). El cambio en el nivel de expresión del gen solo es significativo cuando pasa de 0 M a 2 M ($^+p=0.030$). No existe un cambio considerable en los niveles de expresión entre el tratamiento 0 M vs 2.5 M ($^+p=0.896$) (figura 25).

En el análisis en el *software* REST se emplearon los resultados de C_t de cada experimento biológico, usando también al gen *DhrpS3* como normalizador y a la condición con 0.6 M de NaCl como calibradora. Los datos muestran resultados similares a los obtenidos por el método que en la C_t comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (tabla 9). En ambos experimentos para la condición 0 M se observa el siguiente patrón: i) el gen *DhSOD* se induce presentando una expresión media de 1.605 y 1.86 con respecto al control ($p=0.038$ y $p=0.005$, primer y segundo experimento biológico respectivamente); ii) los genes *DhCTA* y *DhCTT* se encuentran reprimidos en el primer ensayo ($p=0.000$) con una expresión media de 0.422 y 0.717 respectivamente (figura 26A); en tanto que en la réplica solo el gen *DhCTA* se encuentra reprimido con una expresión de 0.622 ($p=0.00$), mientras que el gen *DhCTT*, por su parte, no presenta diferencias de expresión con respecto al control ($p=1.85$) (figura 26B).

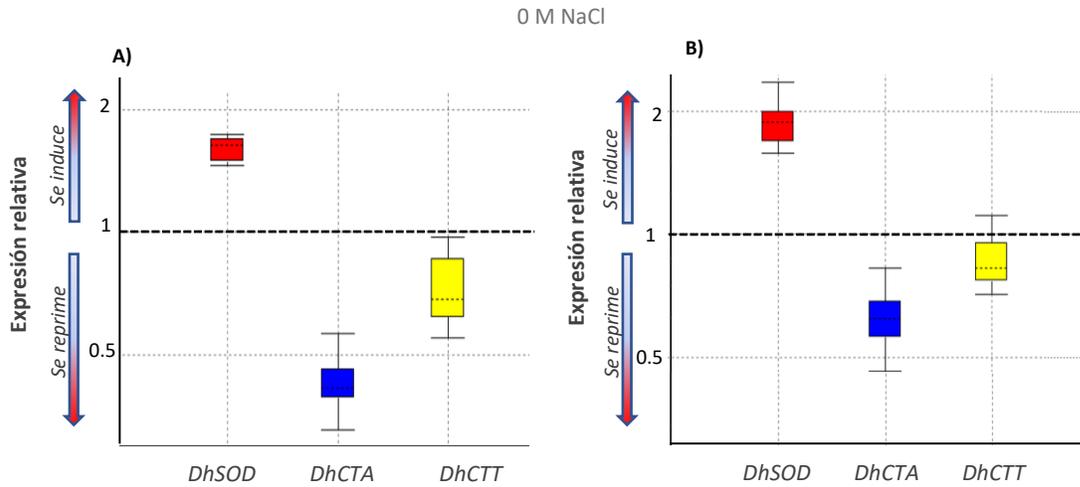


Figura 26. Diagrama *boxplot* de la expresión génica diferencial de los transcritos *DhSOD*, *DhCTA* y *DhCTT* en la condición experimental 0 M de NaCl, en comparación con el control (Gen *DhrpS3* como normalizador, condición en YPD + 0.6 M de NaCl como calibradora). **A)** Primer experimento biológico. El gen *DhSOD* se encuentra sobreexpresado y los genes *DhCTA* y *DhCTT* reprimidos. **B)** Réplica biológica, gen *DhSOD* sobreexpresado; el gen *DhCTA* se encuentra reprimido y el gen *DhCTT* no presenta diferencias de expresión con respecto al control. Por definición el transcrito *DhrpS3* en la condición 0.6 M de NaCl tienen un valor de 1.

En el tratamiento con 2 M de NaCl, tanto para el primer experimento biológico como para su réplica, el gen *DhCTA* se encuentra sobreexpresado con niveles medios de 6.52 y 1.58, respectivamente ($p=0.031$ y 0.00). *DhSOD* solo en el segundo experimento, se encuentra ligeramente reprimido con una expresión de 0.726 ($p=0.00$). El gen *DhCTT* con el primer kit parece no tener diferencias significativas con respecto al control, sin embargo, en el segundo experimento aparece altamente sobreexpresado con 2.663 ($p=0.00$) (figura 27).

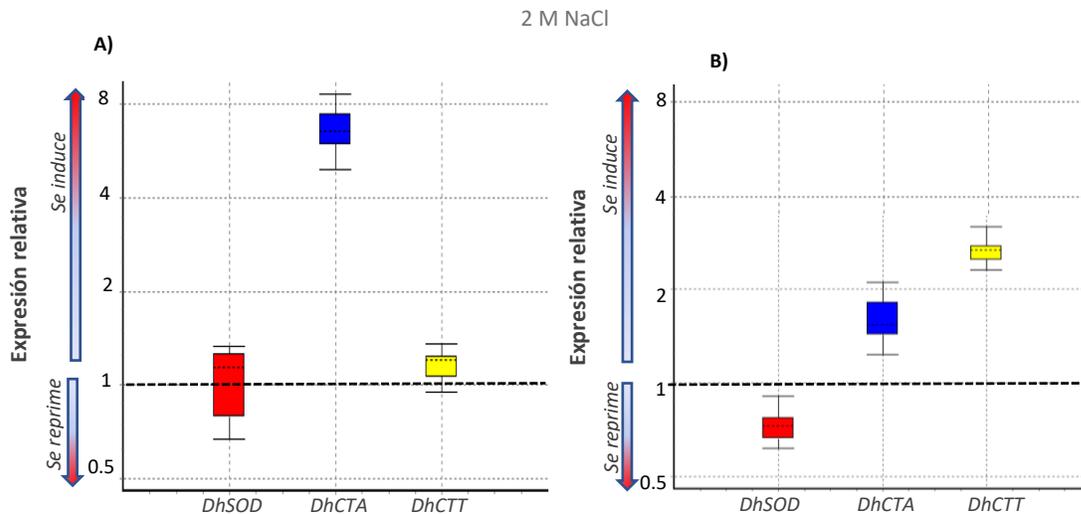


Figura 27. Diagrama *boxplot* de la expresión génica diferencial de los transcritos *DhSOD*, *DhCTA* y *DhCTT* en la condición experimental 2 M, en comparación con el control. **A)** Primer experimento biológico. El gen *DhSOD* no presenta diferencias con respecto al control; *DhCTA* está sobreexpresado ($p=0.031$) y una expresión media de 6.93 veces; el gen *DhCTT* mantiene niveles de expresión estable con respecto al control. **B)** Réplica biológica. El gen *DhSOD* se encuentra reprimido ($p=0.00$); el gen *DhCTA* es sobreexpresado con 2.5 veces y, en contraste con el primer experimento, el gen *DhCTT* se presenta altamente sobreexpresado con respecto al control con una media de 2.66 veces. Por definición el transcrito *DhrpS3* en la condición 0.6 M de NaCl tienen un valor de 1.

En la tercera condición evaluada, 2.5 M, los genes *DhSOD* y *DhCTT* con el primer kit aparecen como reprimidos, con expresiones de 0.568 y 0.43, respectivamente ($p=0.042$ y 0.023). En tanto, *DhCTA* está fuertemente inducido en comparación con el control. En el segundo experimento biológico, podemos observar que *DhCTA* y *DhCTT* se encuentran sobreexpresados en comparación con el control ($p=0.048$ y $p=0.000$ respectivamente). El gen *DhSOD*, por otro lado, está reprimido con respecto a la situación control ($p=0.053$) (figura 27).

2.5 M NaCl

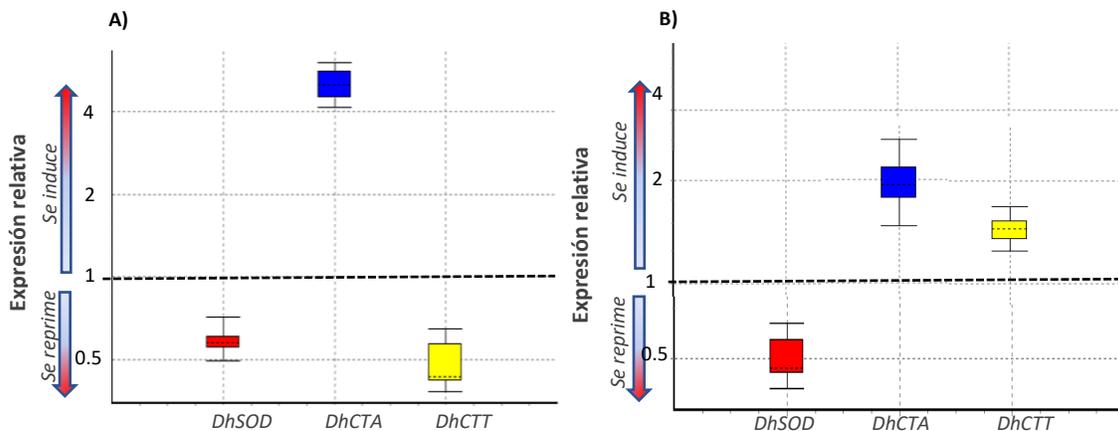


Figura 27. Diagrama *boxplot* de la expresión génica diferencial de los transcritos *DhSOD*, *DhCTA* y *DhCTT* en la condición experimental 2.5 M de NaCl, en comparación con el control. **A)** Primer experimento biológico. El gen *DhSOD* está reprimido con una media de expresión de 0.588 ($p=0.042$); *DhCTA* está inducido respecto el control; el gen *DhCTT* se encuentra reprimido con una expresión de 0.473 veces ($p=0.023$). **B)** Réplica biológica. El gen *DhSOD* presenta una expresión reprimida con respecto al control ($p=0.053$); el gen *DhCTA* es sobreexpresado con una expresión media de 1.951 veces ($p=0.048$), del mismo modo el gen *DhCTT* se sobreexpresa con respecto al control con una media de 1.44 veces ($p<0.05$). Por definición el transcrito *DhrpS3* en la condición 0.6 M de NaCl tienen un valor de 1.

7.6 Actividad específica de catalasa en *D. hansenii* durante la etapa de crecimiento estacionario en respuesta a la osmolaridad del medio

La actividad de catalasa está vinculada con la defensa antioxidante, al llevar a cabo la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. En *D. hansenii* se ha podido identificar a los genes *DhCTA* y *DhCTT*, homólogos a los de *S. cerevisiae*, que codifican para las enzimas catalasa A y T, respectivamente. En este trabajo determinamos la actividad específica de catalasa en la fase de crecimiento estacionario cuando *D. hansenii* crece en medio rico YPD con concentraciones crecientes de NaCl (0, 0.6, 2 y 2.5M). Los experimentos se hicieron por triplicado técnico y cuentan con 3 réplicas biológicas (figura 28).

Los resultados muestran que existe una mayor actividad en la condición experimental 0 M y que la actividad específica de catalasa desciende a medida que se incrementa la concentración de sal en el medio.

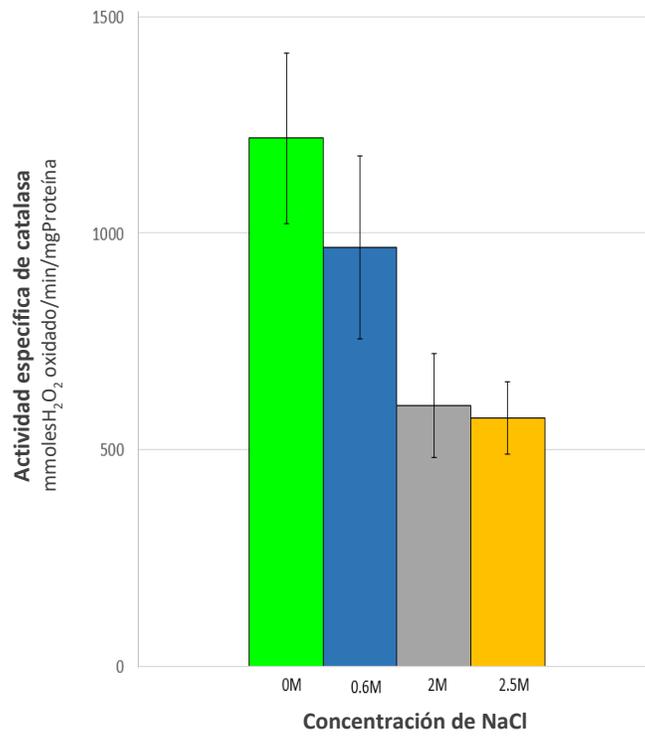


Figura 28. Actividad específica de las catalasas de *D. hansenii* evaluada en diferentes concentraciones de NaCl en la fase de crecimiento estacionaria.

8. DISCUSIÓN

8.1 El aumento de NaCl en el medio ocasiona el descenso en la velocidad de crecimiento a partir de 2 M.

En estudios previos se ha demostrado la capacidad halotolerante de la levadura *D. hansenii*, y se ha comprobado que al ser expuesta a un choque osmótico con 2 M de NaCl, conserva una supervivencia cercana al 40% que le permite reanudar su proliferación (Arroyo-González, N., et al., 2009); esta observación empata con la información señalada por Hohmann (2009), quien señala la capacidad que tienen las células adaptadas a las condiciones de vida con extrema salinidad, para reanudar su proliferación mediante ajustes en sus vías metabólicas, energéticas y de los sistemas de óxido-reducción, el mantenimiento de niveles elevados de glicerol intracelular y el cambio en las propiedades de su membrana celular, principalmente, a través de la alteración de sus niveles de ergosterol (Hohmann, S., 2009).

El crecimiento de esta levadura en ambientes salinos destaca por su amplio rango de tolerancia, que va desde condiciones sin sal añadida hasta concentraciones extremas como 2.5M de NaCl (Prista, C., et al., 2005). En este trabajo se evaluó el crecimiento de la levadura en diferentes concentraciones de sal, en donde se pudo corroborar que el tiempo de duplicación se eleva concomitantemente con el incremento en la concentración de NaCl. No encontramos diferencias significativas entre las condiciones 0 M y 0.6 M de NaCl, aunque sí una clara disminución en la velocidad de crecimiento a partir de la concentración 2 M, cuyo tiempo de duplicación es cercano al doble de la condición sin sal añadida (figuras 13 y 14). Investigaciones previas en nuestro laboratorio ya indicaban que no hay diferencias significativas en el crecimiento entre 0 y 1 M de NaCl. En este trabajo se decidió evaluar el crecimiento en concentraciones superiores, usando como referencia el crecimiento con 0.6 M de NaCl, al ser esta la concentración de NaCl del agua de mar, nicho del que se extrajo por primera vez a la levadura y donde presenta su óptimo fisiológico, es decir que tiene la capacidad de sobrevivir, crecer y reproducirse. De este modo, las fluctuaciones en los parámetros aquí evaluados con respecto a la condición de crecimiento estándar con 0.6 M de NaCl, podrían indicarnos cuál es la concentración de sal en la que se dispara la respuesta a estrés.

El crecimiento de 2.6 M a 3 M de NaCl se caracterizó en todos los casos por un incremento en los tiempos de duplicación. Únicamente la condición con 2.6 M de sal, presentó crecimiento transcurridas las primeras 20 h, mientras que el resto de las condiciones comenzaron a crecer

después de las 50 h. Debido a que no fue posible determinar las fases exponencial y estacionaria en la curva de crecimiento, no se pudo estimar el tiempo de duplicación en estas condiciones (figura 13B). Al respecto, algunos autores han propuesto que en respuesta a condiciones de crecimiento con elevada salinidad en *S. cerevisiae*, la regulación del ciclo celular está modulada a través de un *osmocheckpoint*, que es controlado a través de proteínas cinasas activadas por estrés (SAPKs), que intervienen en diferentes fases del ciclo celular, permitiendo de este modo la adaptación a los cambios de osmolaridad externa (Clotet, J. y Posas, F., 2007). Consideramos que el comportamiento a partir de 2.5 M puede responder al arresto transitorio del ciclo celular, que tras una fase de adaptación a las condiciones, puede retomar su crecimiento, aunque no con la misma velocidad que en las condiciones con menos sal. Cabe destacar que en apariencia esta fase adaptativa, que precede al aumento de la velocidad de crecimiento es de duración variable, esto se hace evidente al comparar el tiempo que toma para entrar en fase de crecimiento exponencial.

8.2 Expresión del mRNA en respuesta a cambios en la osmolaridad del medio de los genes de defensa antioxidante (*DhSOD*, *DhCTA* y *DhCTT*) y biosíntesis de ribosomas (*DhrpS3*)

Retomando los datos obtenidos en la curva de crecimiento, se observa que no existen diferencias en los tiempos de duplicación cuando la levadura crece en ausencia de NaCl añadida o en presencia de 0.6 M, esto sugiere que el óptimo fisiológico de *D. hansenii* no se ve afectado en estas concentraciones. Esto es muy importante puesto que en comparación con *S. cerevisiae*, esta levadura es mucho más tolerante a la sal. Los resultados obtenidos sustentan parcialmente esta premisa al no detectar cambios significativos en la expresión de los transcritos que codifican para *DhrpS3*, ni en los de respuesta a estrés: *DhCTA* y *DhCTT* en ambas condiciones de crecimiento.

Los resultados de cuantificación absoluta, muestran un claro aumento en la expresión de todos los genes evaluados *DhSOD*, *DhrpS3*, *DhCTT* y *DhCTA*, en la condición con 2 M de NaCl, en contraste con su descenso significativo en el cambio de 2 M a 2.5 M.

Si la condición con 2 M de NaCl representa una concentración en la cual *D. hansenii* se aproxima a los límites de su capacidad fisiológica y resiente los efectos como un estrés hiperosmótico, este hecho podría verse correlacionado también con el aumento en la activación de los mecanismos de osmorregulación tales como expresión exacerbada de algunos genes como *DhGPD1*, *DhGPD2*, *DhENA1* y *DhENA2*, los dos primeros para la biosíntesis y acumulación de glicerol intracelular y los últimos para la homeostasis iónica, tal como ha sido propuesto por Thomé (1999) y Gori (2005), que

señalaron el aumento tanto del nivel de expresión de *DhGPD1* y *DhGPP2*, como de la actividad enzimática de Na⁺-GPD en *D. hansenii* cuando crece en 1.5 M de NaCl vs una condición estándar con 0.6 M, en contraste con la caída significativa de ambos valores en condiciones de elevada salinidad, 2.7 M (Thomé, P. y Trench, R., 1999; Gori, K., et al., 2005). Si bien nosotros hemos analizado genes diferentes, creemos que es posible la correlación directa con el descenso en el nivel de expresión de los genes aquí evaluados en 2.5 M y el estrés, caracterizado presumiblemente por una pausa transitoria del ciclo celular y poca eficiencia o reducción en la traducción y transcripción, de un modo similar a lo que se ha reportado para *S. cerevisiae* en las condiciones en las que esta levadura comienza a tener un estrés hiperosmótico.

Los resultados de la cuantificación absoluta de los transcritos de los genes analizados hechos con dos kits diferentes para PCR en tiempo real, aunque arrojaron concentraciones del transcrito que variaban para un mismo gen, derivado de las diferencias en el grado de sensibilidad y detección de cada kit usado, mostraron patrones similares:

- i) En comparación con el resto de los genes evaluados, *DhSOD* presenta una mayor cantidad en número de copias en todas las condiciones probadas.
- ii) *DhSOD* tiene su mayor nivel de expresión en la condición sin sal añadida y en 2 M.
- iii) *DhCTT* es el transcrito menos expresado en todas las condiciones evaluadas.
- iv) Los genes para ambas catalasas y *DhrpS3* tienen el mismo patrón de expresión, esto es, estabilidad entre 0 y 0.6 M, seguido de un aumento en 2 M y descenso en 2.5 M.
- v) Todos los genes presentan el menor nivel de expresión en la condición con 2.5 M de sal excepto el transcrito *DhCTA*, cuya expresión en 2.5 M es superior solo a los niveles que presentó en 0 y 0.6 M, pero inferior al pico en 2 M (tabla 8, figura 23).

8.2.1 Proteína ribosomal S3

Mediante los algoritmos *NormFinder* y *BestKeeper*, se determinó el uso del gen *DhrpS3* como el más estable, sin embargo, la cuantificación absoluta indicó que este gen se expresa de manera estable solo en las condiciones con 0 y 0.6 M de NaCl, mientras que en la condición 2 M presenta una

elevación en su transcripción. Aunque en 2.5 M de NaCl exhibe niveles muy similares a los que presenta en condiciones con menos sal, no podemos atribuirlo a que dicha condición presuponga una condición sin estrés celular, sino a una respuesta que es consecuencia del estrés, en el cual proponemos que podría estarse presentando una síntesis de proteínas atenuada o reducida provocada por el crecimiento en condiciones de hipersalinidad, muy similar al que se ha reportado en *S. cerevisiae* (figura 23B).

En relación a esta observación y considerando las funciones celulares de la proteína ribosomal S3 en el ensamblaje de la subunidad 40S y en el inicio de la traducción, se ha reportado que en *S. cerevisiae* el gen se induce tan solo 10 min después de un choque osmótico con 0.4 M de NaCl (Posas, F., *et al.*, 2000), mientras que en un análisis global de expresión tras un choque con 2 M de NaCl en *D. hansenii* se encontró que hay una inducción de varias proteínas ribosomales y que la duración de la respuesta se incrementa conforme el tiempo de exposición como un mecanismo de regulación de la traducción (Arroyo-González, N., *et al.*, 2009). Esto coincide con los resultados aquí obtenidos, en donde en la condición con 2 M de sal la expresión de *DhrpS3* se eleva aun cuando la célula se encuentra en plena fase de crecimiento exponencial. De acuerdo a Molin y cols., en la respuesta de osmorregulación que ocurre bajo condiciones de hiperosmolaridad, suceden cambios morfológicos, estructurales y moleculares que requieren de una tasa de transcripción diferencial y la redirección de la síntesis de proteínas (Molin, C., *et al.*, 2009), por ejemplo, para la operación de las enzimas vinculadas a la biosíntesis del glicerol, los transportadores iónicos, las proteínas de membrana y pared celular, proteínas de la maquinaria transcripcional, entre otras.

A nivel postraduccional, en 2006, Schäfer y sus colaboradores, hicieron importantes hallazgos respecto al papel de rpS3 en la biogénesis de la subunidad 40S, proponiendo que en altas concentraciones de MgCl₂ (100 mM), rpS3 libera pre- subunidades 40S inmaduras. Aunque esto solo ha sido estudiado en *S. cerevisiae* es posible que en *D. hansenii* opere un mecanismo similar en el cual la concentración de sal 2.5 M sea una condición en la cual el comportamiento de la proteína se altere y por lo tanto pudiera suceder la liberación de ribosomas inmaduros, relacionando este hecho con un déficit en la síntesis de proteínas y por lo tanto afectando también la maquinaria transcripcional (Schäfer, T., *et al.*, 2006).

8.2.2 Superóxido dismutasa

El gen *DhSOD* presenta una mayor expresión en la condición sin sal añadida en comparación a todas las condiciones de crecimiento. Esto concuerda con observaciones previas realizadas en *D. hansenii*, en la que ya que se había observado que tanto el transcrito como la actividad enzimática se encontraban inducidos en condiciones sin estrés (Ramírez-Hernández, M., 2017). Sin embargo, en *S. cerevisiae* la mayor expresión y relevancia fisiológica de esta enzima ocurren durante la hiperósmosis, donde la SOD juega un papel en la adaptación que se ha vinculado con la protección contra la oxidación de proteínas ocasionado por la acumulación de grupos carbonilo en sus estructuras, que se incrementa con el aumento en la concentración de NaCl (Garay-Arroyo, A., 2003).

La elevada expresión de *DhSOD* en ausencia de NaCl implicaría que bajo esta condición estaría también elevada la generación de H₂O₂ como producto de la actividad de la superóxido dismutasa, que tendría que ser contenido, por ejemplo, por las catalasas o por alguna otra peroxidasa. En este sentido, nosotros no encontramos que los genes que codifican a las catalasas *DhCTA* y *DhCTT* en el tratamiento sin sal estuvieran expresados al alza.

En relación a ello, en ensayos donde se ha medido la actividad específica de SOD se determinó que no existen diferencias significativas para condiciones de crecimiento con 0, 0.6 y 1.2 M de NaCl, pero que el contenido de grupos carbonilo sí se incrementa conforme aumenta la concentración de sal (Ramírez-Hernández, M., 2017). Adicionalmente la actividad de catalasa no presentó diferencias significativas. Este hecho sugiere que la eficiencia y actividad de la enzima catalasa es tan elevada, que aun cuando el transcrito sea escaso, su actividad es suficiente para contender con las ERO generadas y/o que existe un control postraducciona, regulando la actividad enzimática de SOD. Sin embargo aún no podemos explicar por qué la condición sin sal añadida muestra los valores más altos de este transcrito.

8.2.3 Catalasas A y T

La expresión de los genes para las enzimas que participan en la defensa antioxidante, mostró una inducción asociada con el incremento en la concentración de sal, tanto en la catalasa A como en la T. Hay un patrón de expresión similar en los genes *DhCTA* y *DhCTT*, esto es, estabilidad en sus

transcritos en 0 M y 0.6 M de NaCl, seguida de una marcada elevación transcripcional en 2 M y un descenso de su expresión en 2.5 M (figura 23C y D).

El mRNA para *DhCTA*, en las condiciones con 0 y 0.6 M está presente con niveles muy bajos (alrededor de 1,000 copias); en la condición con 2 M de sal su expresión se eleva dramáticamente con ~18,000 y 5,000 copias (en la primera y segunda replica biológica respectivamente); en contraste con la reducción cercana al 50% en 2.5 M de sal (resultados para ambas muestras biológicas), (figura 23C).

Encontramos que en la condición con 2 M de NaCl la expresión de los genes *DhSOD* y *DhCTA* se eleva, lo que permite proponer que en dicha condición *D. hansenii* podría comenzar a resentir los efectos de la sal, activando la respuesta a estrés y los mecanismos de osmorregulación, por ejemplo para la síntesis de glicerol. Para suplir las necesidades energéticas que estas respuestas requieren, ocurriría el incremento de la respiración mitocondrial con la finalidad de producir más ATP y por tanto, el aumento de ERO. Si el alza en la transcripción del gen *DhSOD* está relacionado con el incremento en la actividad enzimática de SOD, entonces indicaría una producción elevada de H₂O₂ y por lo tanto se esperaría encontrar también altos niveles de enzimas como la catalasa A que contengan a estos productos dañinos. Cabe mencionar que el gen ortólogo a la catalasa A de *S. cerevisiae* en *D. hansenii* parece tener el mismo papel en la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno en las mitocondrias producto de la actividad de la superóxido dismutasa.

La expresión del transcrito *DhCTT* se presenta en todos los casos con un bajo número de copias (tabla 8), con un incremento en 2 M de sal, aunque inferior al de *DhCTA*, pero el cambio sí es significativo. Esto contrasta con lo reportado para la catalasa T de *S. cerevisiae*, enzima que sí juega un claro papel en la respuesta de esta levadura al estrés salino y a otros tipos de estrés. Análisis realizados en nuestro laboratorio, han mostrado que la diferencia principal entre los promotores de ambos genes ortólogos es la presencia de elementos STRE que regulan la expresión del gen *CTT1* de *S. cerevisiae* que no están presentes en el de la levadura eurihalina.

8.3 Estabilidad de los transcritos *DhrpS3*, *DhSOD*, *DhCTA* y *DhCTT* como posibles candidatos a genes de referencia para medir los cambios en expresión génica en respuesta a la osmolaridad del medio

Pese a que por definición los genes de referencia se caracterizan por poseer una expresión estable y constitutiva en todos los experimentos o pruebas a realizar, no existen genes endógenos universales. Incluso genes, como el de la β -actina, de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), de la tubulina, de la ciclofilina, del factor de elongación 1- α , de la ubiquitina y el 18S, (Ruan, W. y Lai, M., 2007), están sujetos a modificaciones en su expresión en diferentes condiciones experimentales, estirpes celulares y por supuesto entre especies (Pfaffl, M., 2004). Nosotros evaluamos los genes candidatos *DhrpS3*, *DhPEMT* y *DhRNR* como posibles endógenos, derivado de su papel indispensable en la progresión del ciclo celular y el mantenimiento de la propia célula y que ello derivará en una tasa de transcripción estable incluso en situaciones de estrés. Sin embargo, los transcritos *DhPEMT* y *DhRNR* fueron descartados debido a que no logramos establecer las condiciones idóneas para obtener una buena eficiencia en la reacción, posiblemente por la presencia de inhibidores en los oligonucleótidos o la degradación de los mismos como producto de múltiples ciclos de congelación y descongelación, o cambios en la pH de la solución amortiguadora con la que se elaboran las alícuotas, otras causas podrían implicar una contaminación cruzada con DNA procedente de otras muestras que estén implicadas en la formación de estructuras secundarias y la competencia por de los reactivos que repercutan en la baja eficiencia de la reacción. En consecuencia, el resto de la evaluación a través de los algoritmos *NormFinder* y *BestKeeper* se hicieron utilizando al gen *DhrpS3* y los genes de respuesta a estrés, *DhSOD*, *DhCTA* y *DhCTT*. En estos análisis se determinó el uso de *DhrpS3* como gen de referencia para los cálculos de cuantificación relativa, aunque como se mencionó anteriormente, la cuantificación absoluta reveló que su estabilidad se mantiene solo en las condiciones 0 y 0.6 M (figura 23B), y considerando que los resultados de la cuantificación de la expresión génica son influenciados por dos fuentes de variación, esto es, la variación inherente de la técnica o experimentalmente inducida, y de la variación biológica subyacente (Derveaux, S. et al., 2010), los resultados de los cambios diferenciales en la expresión relativa en concentraciones de sal superiores a 2 M de NaCl deben ser reevaluados con la finalidad de tener certeza de su precisión.

En la literatura, el análisis de los cambios de expresión de genes usando PCR en tiempo real en *D. hansenii* en respuesta a su crecimiento en 2 M de NaCl, ha sido evaluada por Arroyo-González y sus

colaboradores, quienes determinaron el cambio en la expresión de los genes *ENA1* y *HWP1*, usando como referencia al gen de actina (*ACT1*) (Arroyo-González, N., et al., 2009). Nosotros sin embargo decidimos no utilizar el gen de actina como referencia al suponer que los cambios morfoestructurales de la célula que pudieran estar presentes si las condiciones de salinidad que probamos desencadenaran una respuesta de estrés, podrían inducir una reorganización en los filamentos de actina y con ello alterar el patrón de expresión del gen. En este sentido, aunque el gen de *ACT1*, es uno de los genes de referencia más usados para medir los cambios transcripcionales en *S. cerevisiae*, existen investigaciones donde se ha descrito como la estabilidad del gen se ve afectada, por ejemplo por la fuente de carbono o por el cambio de la fase de crecimiento logarítmico a estacionario donde el transcrito se reprime (Teste, M., et al., 2009; Wenzel, T., et al., 1995). Sin duda, la estabilidad de la transcripción del gen de actina en *D. hansenii* sujeta al crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl debe ser evaluada, especialmente en concentraciones menores a 2 M, donde si llegara a presentar estabilidad, podría ocuparse con *DhrpS3* para la normalización y con ello conseguir resultados más precisos.

Aun cuando los resultados de búsqueda y validación de genes de referencia son parciales, permiten proponer la utilización del gen *DhrpS3* cuando la condición de salinidad sea menor que 2 M. De hecho, resultados posteriores a este trabajo en nuestro laboratorio, han mostrado que la expresión de este gen es estable en diferentes condiciones de salinidad (inferiores a 2M), condiciones de pH, diferentes fuentes de carbono y respuesta a choque con H₂O₂. Asimismo, mi trabajo permite proponer que se explore la expresión de los genes *DhPEMT* y *DhRNR* para ser usados como genes de expresión constitutiva en experimentos de qRT-PCR de la levadura *D. hansenii* en concentraciones elevadas de NaCl.

8.4 Cambios diferenciales en la expresión relativa de los transcritos usando al gen *DhrpS3* como referencia

Los ensayos de cuantificación relativa usando el método de doble delta C_t y el *software* REST, mostraron patrones de expresión similares siguiendo cualquiera de las metodologías. Como se mencionó anteriormente, en la realización de este trabajo se emplearon dos kits diferentes para la amplificación en PCR tiempo real; aunque las condiciones de corrida y mezcla maestra fueron las mismas para ambas experimentos, obtuvimos diferencias en la sensibilidad, de tal manera que el segundo kit fue más sensible (Luminaris Color HiGreen Fluorescein, Thermo Fisher Scientific contra la misma versión sin fluoresceína), al detectar más temprano los valores de C_t , incluso en las

muestras con poco transcrito como es el caso de *DhCTT*, debido a estas variaciones se obtuvieron diferencias en la cuantificación relativa de los transcritos para cada replica. El uso de fluorocromos como la fluoresceína, incluido en la mezcla maestra el segundo kit, es utilizado en los ensayos de PCR tiempo real como un normalizador del ruido de fondo de tal manera que se usa en la detección de la fluorescencia basal sin afectar la eficiencia de la reacción (Wittwer, C., et al., 1997). El uso de sistemas de detección duales, es decir que emplean detección de colorantes múltiples o de referencia pasiva (por ej. FAM-fluoresceína, ROX-rodaminas) es sobre todo, empleado cuando se usan termocicladores de placa como los ABI (Thermo Fisher), no así en el Rotor Gene-Q de Qiagen. De acuerdo con ello no podríamos atribuir las variaciones de los resultados a la presencia o ausencia de la fluoresceína en la mezcla maestra, por lo que deberían evaluarse otros factores de variación como la estabilidad y vigencia de los reactivos del kit.

Para todos los análisis usamos al gen *DhrpS3* como gen de referencia y a la condición de crecimiento con 0.6 M de NaCl como calibradora, al ser esta la concentración del agua en el mar. Se debe considerar que gen *DhrpS3* no funciona como referencia en las concentraciones 2 y 2.5 M, ya que su estabilidad se pierde a partir de la condición con 2 M de sal (figura 23B). Sin embargo se decidió continuar con la cuantificación con la finalidad de probar los métodos y presentar posibles variaciones en estas condiciones de salinidad.

En la condición sin NaCl añadido, *DhSOD* se indujo con respecto al gen de referencia, en tanto que los transcritos para ambas catalasas se reprimieron (figura 24A).

En la condición con 2 M de sal los transcritos de ambas catalasas son inducidos, en tanto que en 2.5 M de NaCl solo *DhCTA* es inducido, en tanto que *DhSOD* y *DhCTT* mantiene una baja expresión (figura 24B y C).

8.5 El incremento en la concentración de NaCl favorece la disminución de la actividad específica de catalasa en la etapa de crecimiento estacionario

Los resultados indican que la actividad específica de catalasa en etapa de crecimiento estacionario desciende conforme se incrementa la concentración de sal, donde la mayor actividad se encuentra en los medios con 0 y 0.6 M de NaCl, sin diferencias significativas entre ellos, mientras que en las condiciones con 2 y 2.5 M de sal presentaron la menor actividad reportada (figura 28).

Estos resultados son similares a los que obtuvieron Segal-Kischinevsky y sus colaboradores en 2011, quienes compararon la tasa de crecimiento de *D. hansenii* cultivada en etanol y glucosa tanto en etapa exponencial como estacionaria, con dos concentraciones de sal, 0 y 0.6 M. Reportaron también la disminución de la actividad enzimática de catalasa concomitante con el incremento en las concentraciones de NaCl, es decir que la actividad enzimática es mayor cuando el medio no contiene sal añadida, lo que se relacionó con la reducción del estrés oxidante en estas condiciones producto del papel protector que podría estar ejerciendo la sal. Utilizando glucosa como fuente de carbono encontraron que el mensajero de *DhCTA* se expresa más en la condición sin sal añadida, en tanto que la expresión de *DhCTT* no se ve modificada por la presencia o ausencia de sal.

De acuerdo con los resultados de expresión absoluta y relativa de los transcritos de ambas catalasas, hemos detectado que en las condiciones con 0 y 0.6 M existe estabilidad en la cantidad de transcrito, donde ambos genes se encuentran tiene una baja expresión respecto al gen de referencia *DhrpS3*. En la condición con 2 M existe un claro incremento en la expresión de los transcritos, mientras que en 2.5 M los niveles vuelven a descender.

Es difícil hacer una correlación entre los resultados en la expresión transcripcional y la actividad enzimática, debido a que los primeros se tomaron en la fase de crecimiento exponencial, mientras que la actividad específica de catalasa corresponde a la fase estacionaria. Aun tratándose de una misma célula, el análisis de diferentes fases de crecimiento podría relacionarse con la tasa de respiración diferencial en la cual se produzca una mayor proporción de ERO en alguna de las dos etapas y que por lo tanto requiera de una mayor cantidad de enzimas antioxidantes.

Si la cantidad en la que se están expresando los transcritos se mantuviera incluso hasta la etapa estacionaria, tendría que existir un mecanismo de regulación postraducciona que opere en 2 M, en donde existe una inducción en ambos transcritos, pero una baja actividad enzimática.

Los resultados de este trabajo permiten sugerir dos posibles escenarios para explicar la reducción en la actividad específica de catalasa en las condiciones de alta salinidad (2 y 2.5 M): puede ser que bajo estas condiciones haya una menor producción de ERO, ya que se ha demostrado que el NaCl provoca protección cruzada a otros tipos de estrés, o bien que la disminución de la transcripción de los genes evaluados se deba a una baja eficiencia en el número de proteínas que se traducen y que ello se correlacione con el descenso en la actividad específica de la enzima, implicando que bajo estas condiciones de salinidad, *D. hansenii* sí se encuentra en estrés.

9. CONCLUSIONES

El tiempo de duplicación de *Debaryomyces hansenii* se eleva a partir de la concentración con 2 M de NaCl. En las concentraciones superiores a 2.5M de NaCl no es posible estimar el tiempo de duplicación debido a que no hay una fase de crecimiento exponencial evidente.

Después del análisis de la estabilidad transcripcional de los genes en respuesta a los cambios de osmolaridad del medio a través de las plataformas bioinformáticas *NormFinder* y *BestKeeper*, proponemos al gen *Dhrp53* como gen de referencia para utilizarse en la estimación de los cambios de expresión transcripcional en experimentos con menos de 2 M de NaCl.

Los genes analizados en este trabajo tuvieron su mayor expresión en células cultivadas con 2 M de NaCl en la fase de crecimiento exponencial. La condición con 2.5 M se caracterizó por una disminución de la expresión transcripcional en paralelo con la caída de la velocidad de crecimiento, lo cual podría ser ocasionado por una síntesis de proteínas atenuada, derivado por el estrés osmótico en esta condición.

La actividad específica de catalasa disminuyó concomitantemente con el incremento en la concentración de NaCl en el medio, lo que podría atribuirse al papel que la sal confiere en un fenómeno de protección cruzada contra diferentes condiciones de estrés. Sin embargo, la baja actividad en 2.5 M podría relacionarse con la disminución en la expresión de ambas catalasas debida a la atenuación en la síntesis de proteínas.

Estos resultados permiten proponer que concentraciones superiores a 2 M de NaCl en el medio de cultivo disparan una respuesta fisiológica que define a esta concentración como a partir de la cual la salinidad en el medio constituye una condición de estrés.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados apuntan a que el crecimiento en medio rico con una concentración de 2 M de NaCl estimula el incremento en los niveles de transcripción de todos los genes aquí evaluados, simultáneo al descenso de la velocidad de crecimiento, posiblemente como una respuesta al estrés osmótico en esta condición. Para poder determinar el comienzo de la respuesta, se podrían evaluar los cambios en el crecimiento, en los niveles de transcripción y en la actividad enzimática entre 1 y 2.5 M.

Aunado a lo anterior, y considerando que tanto los resultados aquí presentados como otras investigaciones, han demostrado que la actividad específica de catalasas y de superóxido dismutasa es menor cuando la concentración de NaCl aumenta, se ha propuesto como posible explicación de esta respuesta la existencia de una protección cruzada; esto podría probarse determinando la tasa de respiración en la fase de crecimiento exponencial y estacionario, así como la presencia de ERO, lo que permitiría trazar una correlación, ya que si la tasa de respiración se eleva para incrementar la cantidad de ATP necesario en la respuesta osmoadaptativa, entonces posiblemente tendría sentido que también incrementara la proporción de ERO en la célula y en consecuencia los mensajeros y las enzimas para las que que codifican implicadas en los procesos redox.

Para determinar la viabilidad de las células en la medida en que aparece la respuesta a estrés, así como en células con un crecimiento atenuado (por ejemplo, en crecimientos con concentraciones superiores a 2 M de NaCl), podría evaluarse también las características estructurales a través de técnicas microscópicas y citométricas.

Adicionalmente se propone volver a diseñar y sintetizar los oligonucleótidos para amplificar los genes *DhRNR* y *DhPEMT*, así como la búsqueda de más genes candidatos a referencia para ser usados en ensayos con PCR en tiempo real, que en conjunto con el gen *DhrpS3* puedan usarse y mejorar la precisión de la cuantificación de los cambios en el nivel de transcripción en las diferentes condiciones experimentales, ya que se ha reportado que el uso simultáneo de varios genes de referencia proporciona confiabilidad para este tipo de análisis.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J., Prior, B. (1994). GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 14.
- Almagro, A., Prista, C., Benito, B., Loureiro-Dias, M., Ramos, J. (2001). Cloning and Expression of Two Genes Coding for Sodium Pumps in the Salt-Tolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology*, 183.
- Andersen, C., Jensen, J., Orntoft, T. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, Applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64.
- André, L., Nilsson, A., Adler, L. (1988). The Role of Glycerol in Osmotolerance of the Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of General Microbiology*, 134.
- Arroyo-González, N., Vásquez, A., Ortiz-Zuazaga, H., Sen, A., Lugo-Olvera, H., Peña de Ortiz, S., Govind, N. (2009). Genome-wide expression profiling of the osmoadaptation response of *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 26.
- Bañuelos, M., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J., Potier, S. (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology*, 144 .
- Bedoya-Pérez, L.,P., Cancino-Rodezno, A., Flores-Escobar, B., Soberón, M., Bravo, A. (2013). Role of UPR pathway in defense response of *Aedes aegypti* against Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14.
- Bellí, G., Garí, E., Aldea, M., Herrero, E. (2001). Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 39.
- Benito, B., Quintero, F., Rodríguez-Navarro, A. (1997). Overexpression of the sodium ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: conditions for phosphorylation from ATP and Pi. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1328.
- Borges, P., Reazao, C., Miranda, C., Carrondo, M., Romao, C. (2014). Structure of the monofunctional heme catalase DR1998 from *Deinococcus radiodurans*. *FEBS Journal*, 281.
- Boumann, H.C. (2004). The yeast phospholipid N-methyltransferases catalyzing the synthesis of phosphatidylcholine preferentially convert di-C16:1 substrates both in vivo and in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 279.
- Breuer, U. H. (2006). *Debaryomyces hansenii* an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6).

- Bustin, S.A. (2010). Why the need for qPCR publication guidelines? - The case for MIQE. *Methods*, 50.
- Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A., Gunde-Cimerman, N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, 244.
- Carcía-Salcedo, R., Montiel, V., Calero, F., Ramos, J. (2007). Characterization of *DhKHA1*, a gene coding for a putative Na⁺ transporter from *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 7.
- Carman, G., Henry, S. (1999). Phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and interrelationship with other metabolic processes. *Progress in Lipid Research*, 38.
- Causton, H., Ren, B., Seok Koh, S., Harbison, C., Kanin, E., Jennings, E., Young, R. (2001). Remodeling of Yeast Genome Expression in Response to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell*, 12.
- Chabes, A. (2003). Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell*, 112.
- Chen, R., Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773.
- Clotet, J., Posas, F. (2007). Control of Cell Cycle in Response to Osmostress: Lessons from Yeast. *Methods in Enzymology*, 428.
- Cole, L.K., Vance, J.E., Vance, D.E. (2012). Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821.
- Cyert, M., Philpott, C. (2013). Regulation of Cation Balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 193(3).
- Costamagno, S., Barchay-Szmidt, C., Kuntz, D., Laroulandie, V., Pétilion, J.M., Boudada-Maligne, M., Langlais, M., Mallye, J.B., Chevallier, A. (2016). Reexamining the timing of reindeer disappearance in southwestern France in the larger context of late glacial faunal turnover. *Quaternary International*, 414.
- Das, A.B., Sadowaska, Bartosz, I., Königstorfer, A., Kettle, A., Winterbourn, C.C. (2018). Superoxide dismutase protects ribonucleotide reductase from inactivation in yeast. *Free Radical Biology and Medicine*, 116.
- De Lima Rebouças, E., Do Nascimento Costa, J.J., Passos, M.J., de Sousa Passos, J.R., van den Hurk, R., Viana Silva, J.R. (2013). Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 56.
- Derveaux, S., Vandesompele, J., Hellemans, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50.
- Díaz, A., Loewen, P., Fita, I., y Carpena, X. (2011). Thirty years of heme catalases structural biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525.

- Dunayevich, P., Baltanás, R., Clemente, J., Couto, A., Sapochnik, D., Vasen, G., Colman-Lerner, A. (2018). Heat-stress triggers MAPK crosstalk to turn on the hyperosmotic response pathway. *Scientific Reports*, 8.
- Duskova, M., Borovikova, D., Herynkova, P., Rapoport, A., Sychrova, H. (2015). The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 362.
- Dziadkowiec, D. K. (2007). Protective role of mitochondrial superoxide dismutase against high osmolarity, heat and metalloid stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.*, 52.
- Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 24.
- Finken-Eigen, M. D. (1996). The Ribosomal Protein Gene RPS3 Is an Essential Single Copy Gene of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 223(2).
- Fleige, S., Pfaffl, M.W. (2006). RNA integrity and effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27.
- Foyer, C., Noctor, G. (2000). Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol.*, 146.
- Garay-Arroyo, A. L. (2003). Cu,Zn-superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to hyperosmosis. *FEBS Letters*, 539(1-3).
- Garrington, T., Johnson, G. (1991). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 11.
- Gasch, A. P., Spellman, P., Kao, C., Carmel-Harel, O., Eisen, M., Storz, G., Brown, P. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11.
- Ginzinger, D. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30(6).
- González-Hernández, J., Peña, A. (2002). Strategies for adaptation of halophile microorganisms and *Debaryomyces hansenii* (Halophile yeast). *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44.
- González-Hernández, J.C., Jiménez-Estrada, M. (2005). Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles*, 9.
- Gori, K., Mortensen, H., Arneborg, N., Jespersen, L. (2005). Expression of the GPD1 and GPP2 orthologues and glycerol retention during growth of *Debaryomyces hansenii* at high NaCl concentrations. *Yeast*, 22.
- Graifer, D., Malygin, A., Zharkov, D.O., Karpova, G. (2014). Eukaryotic ribosomal protein S3: A constituent of translational machinery and an extraribosomal player in various cellular processes. *Biochimie*, 99.

- Grant, W. (2004). Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the The Royal Society Lond Biological Sciences*, 359.
- Guarino, E. S. (2014). Cellular regulation of ribonucleotide reductase in eukaryotes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 30.
- Gunde-Cimerman, N. R. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, 113.
- Gustin, M., Albertin, M., Davenport, K. (1998). MAP kinase pathways in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 62.
- Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*, 141.
- Hansberg, W., Salas-Lizana, R., Domínguez, L. (2012). Fungal catalases: Function, phylogenetic origin and structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525.
- Hernández, A., Vassallo, M., Torres, A., Salido, E. (1995). Análisis del RNA: Estudio de la expresión. *Nefrología*, 15.
- Hernández-Saavedra, N. O. (1999). Copper-zinc superoxide dismutase from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 15.
- Herrera, R., Salazar, A., Ramos-Moreno, L., Ruiz-Roldan, C., Ramos, J. (2017). Vacuolar control of subcellular cation distribution is a key parameter in the adaptation of *Debaryomyces hansenii* to high salt concentrations. *Fungal Genetics and Biology*, 100.
- Hsiao, L.L, Dangond, F., Yoshida, T., Hong, R., Jensen, R.V., Misra, J., Dillon, W., Lee, K.F., Clarck, K.E., Haverly, P., Weng, Z., Mutter, G.L., Frosch, M.P., MacDonald, M.E., Milford, E.L., Crum, C.P., Bueno, R., Pratt, R.P., Mahadevappa, M., Warrington, J.A., Stephanopoulos, G., Stephanopoulos, G., Gullans, S.R. (2001). A compedium of gene expression in normal human tissues. *Physiological Genomics*, 7.
- Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 583.
- Jovall, P., Tunblad-Johansson, I., Adler, L. (1990). ¹³C NMR analysis of production and accumulation of osmoregulatory metabolites in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology*, 154.
- Kapahi, P.; Boulton, M.E., Kirkwood, B.L. (1999). Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 26.
- Kiewietdejonge, A., Pitts, M., Cabuhat, L., Sherman, C., Kladwang, W., Miramontes, G., Ramirez, R. (2006). Hypersaline stress induces the turnover of phosphatidylcholine and results in the synthesis of the renal osmoprotectant glycerophosphocholine in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 6.
- Kim, J., Chubatsu, L., Admon, A., Stahl, J., Fellous, R., Linn, S. (1995). Implication of Mammalian Ribosomal Protein S3 in the Processing of DNA Damage. *Journal of Biological Chemistry*, 270.

- Kim, J., Oh, J., Sung, G. (2016). Regulation of MAP kinase Hog1 by calmodulin during hyperosmotic stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863.
- Kim, Y., kim, H.D., Kim, J. (2013). Cytoplasmic ribosomal protein S3 (rpS3) plays a pivotal role in mitochondrial DNA damage surveillance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833.
- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medicine*, 8.
- Kolberg, M. S. (2004). Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1699.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27.
- Ladror, D. F. (2014). Methylation of yeast ribosomal protein S2 is elevated during stationary phase growth conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(3).
- Li, X., Huang, X., Zhao, J., Wei, Y., Jiang, L. (2008). The MAP kinase-activated protein kinase Rck2p plays a role in rapamycin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 8.
- Ling, D., Salvaterra, P. (2011). Robust RT-qPCR Data Normalization: Validation and Selection of Internal Reference Genes during Post-Experimental Data Analysis. *PLoS One*, 6.
- Livak, K., Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ *Methods*, 25.
- Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L. (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 1.
- Longo, V.D., Butler-Gralla, E., Selverstone-Valentine, J. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271.
- Lu, F.W. (2005). Adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to hyperosmotic and oxidative stress. *Process Biochemistry*, 40.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W., Prior, B., Ramos, J., Thevelin, J., Hohmann, S. (1995). Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.*, 14.
- Mader, R.M., Schmidt, W.M., Sedivy, R., Rizovski, B., Braun, J., Kalipciyan, M., Exner, M., Steger, S., Mueller, M.W. (2001). Reverse transcriptase template switching during reverse transcriptase-polymerase chain reaction: Artificial generation of deletions in ribonucleotide reductase mRNA. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 137.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Letters to nature*, 369.

- Mager, W., Siderius, M. (2002). Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Research*, 2.
- Mager, W., De Boer, A., Siderius, M., Voss, H. (2000). Cellular responses to oxidative and osmotic stress. *Cell Stress & Chaperones*, 5.
- Márquez, J., Serrano, R. (1996). Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene PMR2/ENA1 during salt stress in yeast. *FEBS Lett.*, 382.
- McPherson, M.J., Hames, B.D., Taylor, G.R. (2009). PCR a practical approach. *Oxford University Press*. First Edition.
- Miller, A. (2012). Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters*, 586..
- Molin, C., Jauhiainen, A., Warringer, J., Nerman, O., Sunnerhagen, P. (2009). mRNA stability changes precede changes in steady-state mRNA amounts during hyperosmotic stress. *RNA*, 4.
- Montiel, V., Ramos, J. (2007). Intracellular Na⁺ and K⁺ distribution in *Debaryomyces hansenii*. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of DhNHX1. *FEMS Yeast Research*, 7.
- Moradas-Ferreira, P. C. (2000). Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Report*, 5.
- Murphy, M. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417.
- Musa, H. K. (2018). Salt-adapted moulds and yeasts: Potentials in industrial and environmental. *Process Biochemistry*, 69.
- Nass, R., Cunningham, K., Rao, R. (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 272.
- Navarrete, C., Siles, A., Martínez, J., Calero, F., Ramos, J. (2009). Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 9.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M., Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439.
- Nicholls, P., Fita, I., Loewen, P. (2000). Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry*, 51.
- Niu, L. N. (2017). Petit-High Pressure Carbon Dioxide stress increases synthesis of S-Adenosylmethionine and phosphatidylcholine in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biophysical Chemistry*, 231.
- Norbeck, J. (1998). Amino acid uptake is strongly affected during exponential growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 0.7 M NaCl medium. *FEMS Microbiology Letters*, 158.
- Nordlund, P., Reichard, P. (2006). Ribonucleotide reductase. *Annual Reviews of Biochemistry*, 75.
- Norkrans, B. (1966). Studies on marine occurring yeast: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archives of Microbiology*, 54.

- Norkrans, B., Kylin, A. (1969). Regulation of potassium to sodium ratio and osmotic potential in relation to salt tolerance in yeast. *Journal of Bacteriology*, 100.
- Palma, M., Goffeau, A., Spencer-Martins, I., Baret, P.V. (2007). A phylogenetic analysis of the sugar porters in hemiascomycetous yeast. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 12.
- Pereira, I., Madeira, A., Prista, C., Loureiro-Dias, M., Leandro, M. (2014). Characterization of New Polyol/H⁺ Symporters in *Debaryomyces hansenii*. *PLoS One*, 9.
- Petrova, V., Drescher, D., Kajumdzieva, A., Schmithh, M. (2014). Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochemical Journal*, 380.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30.
- Pfaffl, M.W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. En S. Bustin (Ed.), *A-Z of quantitative PCR*. CA, USA: International University Line (IUL).
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes, and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26.
- Plemenitas, A., Gunde-Cimerman, N. (2005). Cellular Responses in the Halophilic Black Yeast *Hortaea werneckii* to High Environmental Salinity. En *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Netherlands: Springer.
- Petersen, A. T., Soberón, J., Pearson, R.G., Anderson, R.P., Martínez-Meyer, E., Nakamura, M., Araújo, M.B. (2011). Ecological Niches and Geographic Distributions. *Princeton University Press*.
- Posas, F., Chambers, J., Heyman, J., Hoeffler, J. (2000). The Transcriptional Response of Yeast to Saline Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 275.
- Polechová, J., Storch, D. (2019). Ecological Niche. *Encyclopedia of Ecology*. (Second edition).
- Prista, C., Loureiro-Dias, M., Montiel, V., García, R., Ramos, J. (2005). Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 5.
- Prista, C., Almagro, A., Loureiro-Dias, M., Ramos, J. (1997). Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63.
- Prista, C., González-Hernández, J., Ramos, J., Loureiro-Dias, M. (2007). Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*, 153.
- Prista, C., Michán, C., Miranda, I., Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast*, 33.

- Qi, M., Elion, E. (2005). MAP Kinase pathways. *Journal of Cell Science*, 118.
- Qiagen. (2010). *Critical factors for succesful real-time PCR*.
- Radmaneshfar, E., Kaloriti, D., Gustin, M.C., Gow, M.A.R., Brown, A.J.P., Grebogi, C., Romano, M.C., Thiel, M. (2013). From START to FINISH: The influence of osmotic stress on the cell cycle. *PLoS One*, 8.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313.
- Ramírez-Hernández, M. (2012). *Análisis de la actividad de catalasas en distintas condiciones de cultivo de Debaryomyces hansenii*. Tesis de licenciatura. Ciudad de México: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ramírez-Hernández, M. (2017). *Análisis de la toxicidad y detoxificación de las especies reactivas del oxígeno en Debaryomyces hansenii*. Tesis de Maestría . Ciudad de México: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México .
- Reichard, P. (1993). From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science*, 260.
- Ririe, K., Rasmussen, R., Wittwer, C. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 245.
- Ruan, W., Lai, M. (2007). Actin, a reliable marker of internal control? *Clinica Chimica Acta*, 385(1-2).
- Saito, H. (2010). Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways. *Current Opinion in Microbiology*, 13.
- Sánchez, N.S., Arreguín, R., Calahorra, M., Peña, A. (2008). Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 8.
- Sánchez, N.S., Calahorra, M., Ramírez, J., Peña, A. (2018). Salinity and high pH affect energy pathways and growth in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Biology*, 122.
- Sanvisens, N. D. (2013). Function and Regulation of Yeast Ribonucleotide Reductase: Cell Cycle, Genotoxic Stress, and Iron Bioavailability. *Biomedical Journal*, 36(2).
- Schaber, J., Androver, M., Eriksson, S., Petelenz-Kurdziel, E., Klein, D., Posas, F., Klipp, E. (2010). Biophysical properties of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship with HOG pathway activation. *European Biophysics Journal*, 39.
- Schäfer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervey, D., Böttcher, B., Aebi, U., Hurt, E. (2006). Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature, Letters*, 441.
- Schmitt, ME., Brown, T.A., Trumpower, B.L. (1990). A rapid and simple method for preparation on RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 18.

- Schüller, C., Brewster, J., Alexander, M., Gustin, M., Ruis, H. (1994). The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO Journal*, 13.
- Segal-Kischinevzky, C., Rodarte-Murguía, B., Valdés-López, V., Mendoza-Hernández, G., González, A., Alba-Lois, L. (2011). The Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii* has Two Catalases. *Current Microbiology*, 62.
- Smiatek, J., Harishchandra, R.K., Rubner, O., Galla, H.J., Heuer, A. (2012). Properties of compatible solutes in aqueous solution. *Biophysical Chemistry*, 160.
- Sooch, S., Kauldhar, B., Puri, M. (2014). Recent insights into microbial catalases: Isolation, production. *Biotechnology Advances*, 32.
- Stahlberg, A., Elbing, K., Andrade-Garda, J., Sjögren, B., Forootan, A., Kubista, M. (2008). Multiway real-time PCR gene expression profiling in yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals altered transcriptional response of ADH-genes to glucose stimuli. *BMC Genomics.*, 9.
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3.
- Tamás, M., Luyten, K., Sutherland, F., Hernández, A., Albertyn, J., Valadi, H., Hohmann, S. (1999). Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Molecular Microbiology*, 31.
- Tasseva, G. V. (2016). Lack of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase in mice does not promote fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861.
- Teige, M., Scheoikl, E., Reiser, V., Ruis, H., Ammerer, G. (2001). Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98.
- Teste, M.A., Duquenne, M., François, J.M., Parrou, J.L. (2009). Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Molecular Biology*, 10.
- Thomé, P. (2004). Isolation of a GPD gene from *Debaryomyces hansenii* encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase(NAD⁺). *Yeast*, 21.
- Thomé, P.E. (2005). Heterologous expression of glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene [DhGPD1] from the osmotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Microbiology*, 51.
- Thomé, P.E., Trench, R. (1999). Osmoregulation and the Genetic Induction of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase by NaCl in the Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Marine Biotechnology*, 1.

- Thomé-Ortiz, P.E, Peña, A., Ramírez, J. (1998). Monovalent Cation Fluxes and Physiological Changes of *Debaryomyces hansenii* Grown at High Concentrations of KCl and NaCl. *Yeast*, 14.
- Thorrez, L., Van Deun, K., Tranchevent, L.C., Van Lommel, L., Engelen, K., Marchal, K., Moreau, Y., Mechelen, I.V., Schuit, F. (2008). Using ribosomal protein genes as reference: A tale of caution. *PLoS One*, 3.
- Toh, T., Kayingo, G., Van der Merwe, M., Kilian, S., Hallsworth, J., Hohmann, S., Prior, B. (2001). Implications of FPS1 deletion and membrane ergosterol content for glycerol efflux from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 11.
- Turk, M., Montiel, V., Zigon, D., Plemenitas, A., Ramos, J. (2007). Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiology*, 153.
- Turk, M., Plemenitas, A., Gunde-Cimerman, N. (2011). Extremophilic yeasts: plasma-membrane fluidity as determinant of stress tolerance. *Fungal Biology*, 115.
- Van Meer, G. V. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9.
- Velkova, J., Sychrova, H. (2006). The *Debaryomyces hansenii* NHA1 gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene*, 369.
- Wan, H., Yuan, W., Ruan, M., Ye, Q., Wang, R., Li, Z., Zhou, G., Yao, Z., Zhao, G., Liu, S., Yang, Y. (2011). Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 416.
- Warner, J. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*, 24.
- Warringer, J., Hult, M., Regot, S., Posas, F., Sunnerhagen, P. (2010). The HOG Pathway Dictates the Short-Term Translational Response after Hyperosmotic Shock. *Molecular Biology of the Cell*, 21.
- Wenzel, T.J., Teunissen, A.W., Steensma, H.Y. (1995). *PDA1* mRNA: a standard for quantitation of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* superior to *ACT1* mRNA. *Nucleic Acids Research*, 23.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, 22.
- Whittaker, J. (2012). Non-heme manganese catalase – The other catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525.
- Wood, J. (2011). Bacterial Osmoregulation: A paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annual Reviews of Microbiology*, 65.
- Wooldorf, J.J.L., Baserga, S.J. (2013). Ribosome biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 195.

Zamocky, M., Furtmüller, P., Obinger, C. (2008). Evolution of Catalases from Bacteria to Humans. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10.

Zhang, J., Byrne, C. (1999). Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochemical Journal*, 337.