



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Sistema enzimático antioxidante de la levadura
antártica *Rhodotorula mucilaginosa* M94C9 y adaptación
al frío en levaduras; un estudio bioquímico y
bioinformático-comparativo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O
P R E S E N T A:**

Jorge Brito Sánchez



**DIRECTORA DE TESIS:
M. en C. Ana Paulina Mendoza von der
Borch
CIUDAD DE MÉXICO, 2019**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Brito
Sánchez
Jorge
5526898256
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
No. de cuenta 312109576

2. Datos del tutor

M. en C.
Ana Paulina
Mendoza
von der Borch

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Claudia Andrea
Segal
Kischinevzky

4. Datos del sinodal 2

Dr.
James Enrique
González
Flores

5. Datos del sinodal 3

Dra.
María de Lourdes
Barbosa
Saldaña

6. Datos del sinodal 4

Q. F. B.
Juan Manuel
Sánchez
Contreras

7. Datos del trabajo escrito

Sistema enzimático antioxidante de la levadura antártica *Rhodotorula mucilaginosa* M94C9 y adaptación al frío en levaduras; un estudio bioquímico y bioinformático-comparativo
86 p
2020

Agradecimientos

A mis padres y hermano, por su amor y apoyo incondicional durante toda mi formación académica, los amo. Pero particularmente a mi madre, por todas las desveladas, las desmañadas, por cuidarme, por escucharme, por amarme y por estar ahí en los momentos más difíciles. Te amo mamá, eres la mejor.

A Ana Paulina Mendoza von der Borch, por todo su apoyo técnico para la elaboración de esta tesis. Por el apoyo incondicional que me ha brindado durante casi todo este camino de formación profesional, por su amistad y bondad, por sus consejos sensatos y acertados, por introducirme y guiarme en este nuevo mundo académico. Eres una tutora excelente y una gran persona.

A Lichi, por recibirme con los brazos abiertos en su laboratorio cuando era solo un novato ingenuo hambriento de aprender, por sus sabios consejos, por su bondad y por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo.

A Claudia Peña Segura, por todo su apoyo técnico para la elaboración de esta tesis. También por todo el apoyo moral y académico, por su amistad, por su bondad, por sus sabios consejos y por todos los momentos compartidos. Muchas gracias.

A Emy, por su apoyo incondicional durante el desarrollo de esta tesis, por su cariño, por sus consejos, por todas las risas y momentos gratos que compartimos a lo largo de la carrera y que hicieron de esta trayectoria académica una de las mejores experiencias de mi vida. Te quiero.

A Andrés, por su amistad, por su apoyo incondicional, por sus consejos sensatos y acertados, por todas las risas y momentos gratos a lo largo de prácticamente toda la carrera. Gracias por todo, mejor amigo, te quiero.

A todos esos amigos que han sido parte de mi vida durante esta bella etapa académica, con los que he compartido grandes momentos y que de una u otra manera me han apoyado e influenciado de manera positiva. Gracias Manuel, Angie, Llaca y Escalante y gracias a mis amigos de Universum: Lety, Midori, Quique, Aura, Mariana, Lalo, Edgar, Esme, Ale, Fede, Ericka y Gret.

A mis sinodales, por tomarse el tiempo de revisar esta tesis, por las críticas constructivas y por sus consejos sensatos y acertados. Gracias Dra. Claudia Segal, Dr. James Gonzales, Dra. Lourdes Barbosa y Q. F. B. Manuel Sánchez.

A los integrantes del grupo de trabajo (actuales y retirados) del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica: Claudia, Viviana, Victor, Alfonso V., James, Ile y Poncho, por su apoyo, por su asesoría, por sus consejos, por su confianza y por las facilidades brindadas durante la realización de este trabajo de tesis. Muchas gracias.

A la UNAM, por facilitar el acceso a la educación pública y gratuita a la población, por su compromiso permanente en la generación de profesionistas capaces, críticos y proactivos en las diferentes áreas del conocimiento y por su interés en la divulgación del conocimiento a todos los sectores de la población.

Resumen

El estrés oxidante es un fenómeno que afecta a organismos de los tres dominios del árbol de la vida, definido como un desbalance entre la cantidad de especies reactivas del oxígeno (ROS) y el sistema antioxidante que las neutraliza, de tal manera que se favorecen las ROS. El sistema antioxidante celular (SAC) puede ser dividido en mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Algunos de los mecanismos no enzimáticos son el glutatión y los carotenoides, mientras que los mecanismos enzimáticos principales son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, y la glutatión peroxidasa (GPx). Diferentes factores endógenos y exógenos promueven un estado de estrés oxidante, entre ellos se encuentran la luz UV y las bajas temperaturas; en *Penicillium sp.* 161 (psicrotolerante) y *A. glaucus* 363 (mesófilo) se ha observado un aumento en la producción de ROS y el incremento en la actividad de SOD y catalasa tras disminuir la temperatura en la que se cultivan.

Rhodotorula mucilaginosa M94C9 es un basidiomiceto carotenogénico aislado de muestras de suelo de la Antártica, un continente caracterizado por presentar bajas temperaturas, alta radiación UV y poca disponibilidad de nutrientes, por lo que resulta importante estudiar los mecanismos de respuesta a estrés oxidante en organismos como este, que están adaptados a vivir en condiciones adversas. Se sabe que organismos adaptados al frío cuentan con diversas modificaciones adaptativas para sobrevivir en bajas temperaturas. En el caso particular de las proteínas, se ha observado que arqueobacterias adaptadas al frío tienen un mayor contenido de aminoácidos polares no cargados y menor contenido de aminoácidos hidrofóbicos, mientras en proteínas de γ – proteobacterias psicrófilas y psicrotolerantes hay un mayor contenido de Asp, Asn, Ile, Lys y Ser y menor contenido de Ala, Pro, Arg, Gly y Leu que en especies con temperaturas óptimas de crecimiento mayores. En levaduras no se ha reportado ningún estudio de este tipo.

En el presente trabajo se busca estudiar el SAC enzimático de *R. mucilaginosa* M94C9, particularmente la actividad de la SOD, catalasa y GPx en diferentes fases de crecimiento de cultivos crecidos a 4 °C y 28 °C, así como establecer el porcentaje de aminoácidos que caracteriza a un conjunto de proteínas de levaduras adaptadas al frío (psicrófilas y psicrotolerantes) en

comparación con proteínas de levaduras mesófilas y determinar si existen diferencias cepa-dependientes en el porcentaje de aminoácidos en proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas, utilizando a *R. mucilaginosa* como modelo.

Los resultados muestran que la actividad de casi todas las enzimas en ambas temperaturas de crecimiento tienen un nivel máximo durante la fase exponencial y éste decrece en las fases pre-estacionaria y estacionaria, además, no hubo diferencias significativas de actividad entre enzimas de cultivos crecidos a 4 °C y 28 °C; la única excepción fue la actividad específica de catalasa de los cultivos crecidos a 28 °C, donde el patrón se invirtió: la actividad máxima ocurrió en la fase estacionaria de crecimiento y fue significativamente mayor que la de cultivos crecidos a 4 °C. Cabe mencionar que se observó una mayor producción de carotenoides en todas las etapas de crecimiento de los cultivos crecidos a 4 °C. Se sugiere que la sobreproducción de carotenoides en los cultivos crecidos a 4 °C es un mecanismo alternativo en *R. mucilaginosa* M94C9 para contrarrestar el estrés oxidante inducido por bajas temperaturas. La parte bioinformática reveló que existen diferencias de composición entre proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas, además, la mitad de estas diferencias fueron phylum-dependientes. Sin embargo, se considera conveniente complementar estos datos con información de la estructura tridimensional. También existen diferencias cepa-dependientes en el porcentaje de aminoácidos en proteínas de levaduras, sin embargo, hay pocas secuencias proteicas reportadas de *R. mucilaginosa*; sólo 7 de una cepa adaptada al frío y 31 de una cepa mesófila, por lo que el análisis estadístico es poco concluyente y los resultados se consideran un artefacto que no necesariamente representa la realidad. Es necesario obtener más datos en cepas de *R. mucilaginosa*, tanto mesófilas como adaptadas al frío.

Abreviaturas

AP1: factor de transcripción de respuesta a estímulos diversos

BSA: albúmina sérica bovina

CAT: catalasa

CoQ: coenzima Q

CoQH₂: coenzima Q reducida

Cu/Zn-SOD: SOD de unión a cobre y zinc

D. O.: densidad óptica

DsCS: citrato sintasa de la cepa bacteriana antártica DS2-3R

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

Fe-SOD: SOD de unión a hierro

FMN: flavin mononucleótido

GaFucA: fuculosa aldolasa de *Glaciozyma antarctica* PI12

GPx: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

GROMACS: *GROning MACHine for Chemical Simulations*

GS: glutatión sintetasa

GSH: glutatión reducido

GST: glutatión S transferasas

GSSG: glutatión oxidado

G-6-PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

HIF-1: factor inducible por hipoxia-1

H₂O: agua

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

IκB-α, Inhibidor del factor nuclear del potenciador del gen del polipéptido ligero kappa en células B (NK-κB)

JNK: quinasa Jun N-terminal

MDA: malondialdehído

Mn-SOD: SOD de unión a manganeso

MEK: MAPKK (quinasa de la MAP quinasa) que activa a ERK

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NBT: nitroazul de tetrazolio

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica

NFAT: factor nuclear de células T activadas

Ni-SOD: SOD de unión a níquel

NK-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

Nox: NADPH oxidasa

•OH: radical hidroxilo

O₂: oxígeno molecular

O₂⁻: anión superóxido

O₂¹: oxígeno singulete

PfCS: citrato sintasa de *Pyrococcus furiosus*

PRx: peroxirredoxinas

PRXs: peroxidases de tiorredoxinas

PsFucA: fuculosa aldolasa de *Pseudomonas syringae*

p38: familia de proteínas MAPK

p50: subunidad p65 del factor de transcripción NF-κB

p65: subunidad p65 del factor de transcripción NF-κB

RET: transporte reverso de electrones

ROO•: radicales peroxil

ROS: especies reactivas del oxígeno

SAC: sistema antioxidante celular

SOD: superóxido dismutasa

TA: temperatura ambiente

TD: tiempo de duplicación

TOC: temperatura óptima de crecimiento

TRRs: tiorredoxin reductasas

TRX: tiorredoxinas

TtFucA: fuculosa aldolasa de *Thermus thermophilus*

U_{SOD}: unidad de actividad de SOD

UVA: luz ultravioleta A

XO: xantina oxidasa

YM: medio de cultivo *Yeast Maltose*

4NQO: 4-nitroquinolina 1-óxido

8-oxo-G: 8-Oxo-7,8-dihidroguanina o también llamada 8-hidroxiguanina

γ-GCS: γ-glutamil cisteína

Δp: fuerza protón-motriz

Índice de figuras

Figura 1. Estrés y daño oxidante.....	2
Figura 2. ROS y cascadas de señalización celular.....	3
Figura 3. Estructura electrónica de ROS.....	4
Figura 4. Reacciones de Haber-Weiss y Fenton.....	4
Figura 5. Producción de O ₂ ⁻ por el complejo I.....	7
Figura 6. Formación de la 8-hidroxi guanina.....	9
Figura 7. Estructura química del glutatión.....	10
Figura 8. Estructura química del β-caroteno.....	11
Figura 9. Sistema enzimático celular.....	12
Figura 10. Reacciones catalizadas por Cu/Zn SOD, catalasa y GPx.....	12
Figura 11. Estrés oxidante inducido por bajas temperaturas.....	20
Figura 12. Mapa y ubicación de la zona de aislamiento de <i>R. mucilaginosa</i> M94C9.....	21
Figura 13. Diseño experimental para la comparación de actividad enzimática.....	27
Figura 14. Hipótesis filogenética del reino Fungi.....	39
Figura 15. Crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> a 4 °C y 28 °C.....	42
Figura 16. Coloración de los cultivos de <i>R. mucilaginosa</i> a 4 °C y 28 °C.....	43
Figura 17. Actividad específica de SOD.....	44
Figura 18. Actividad específica de catalasa.....	46
Figura 19. Actividad específica de GPx.....	47
Figura 20. Porcentaje de actividad de cada enzima a 4 °C y 28 °C.....	49
Figura 21. Porcentaje de cada aminoácido en proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas.....	52
Figura 22. Gráficas de interacción de los 9 aminoácidos en los que su porcentaje aumenta o disminuye simultáneamente en las proteínas de levaduras adaptadas al frío de ambos phyla.....	55
Figura 23. Gráficas de interacción de los 9 aminoácidos en los que su porcentaje aumenta o disminuye inversamente en los dos phyla.....	56
Figura 24. Aminoácidos en los que el porcentaje es similar entre proteínas de <i>R. mucilaginosa</i> AN5, basidiomicetos adaptados al frío y basidiomicetos mesófilos.....	58
Figura 25. Aminoácidos en los que el porcentaje en proteínas de <i>R. mucilaginosa</i> AN5 y <i>R. mucilaginosa</i> RIT389 es similar y, a su vez, es similar al porcentaje en basidiomicetos adaptados al frío y basidiomicetos mesófilos.....	59
Figura 26. Aminoácidos en los que hay diferencias significativas entre proteínas de basidiomicetos adaptados al frío y basidiomicetos mesófilos, en <i>R. mucilaginosa</i> AN5 el porcentaje es similar al de estos dos grupos de levaduras y al de <i>R. mucilaginosa</i> RIT38.....	60
Figura 27. Aminoácidos que presentan un comportamiento particular entre <i>R. mucilaginosa</i> AN5, <i>R. mucilaginosa</i> RIT38, basidiomicetos adaptados al frío, basidiomicetos mesófilos.....	61

Índice general

1.	Introducción.....	1
1.1	Estrés oxidante.....	1
1.2	Especies reactivas del oxígeno (ROS).....	3
1.2.1	ROS endógenas.....	5
1.2.2	ROS exógenas.....	8
1.3	Sistema antioxidante celular (SAC).....	9
1.3.1	SAC no enzimático.....	9
1.3.2	SAC enzimático.....	11
1.4	Antártica y estrés oxidante.....	18
1.5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> M94C9.....	20
1.6	Adaptación al frío en proteínas.....	22
2.	Justificación.....	25
3.	Objetivos.....	26
4.	Diseño experimental.....	27
5.	Metodología.....	28
5.1	<i>R. mucilaginosa</i> M94C9.....	28
5.2	Preservación de la cepa.....	28
5.3	Cultivos de <i>R. mucilaginosa</i> M94C9 y determinación del crecimiento.....	28
5.4	Obtención de extractos celulares.....	29
5.5	Cuantificación de proteínas.....	30
5.6	Actividad enzimática.....	30
5.6.1	Superóxido dismutasa (SOD).....	30
5.6.2	Catalasa.....	32
5.6.3	Glutación peroxidasa (GPx).....	33
5.7	Bioinformática.....	34
5.7.1	Establecimiento de la muestra y descarga de secuencias.....	34
5.7.2	Determinación del porcentaje de aminoácidos.....	40
5.7.3	Análisis estadístico.....	40
6.	Resultados.....	42
6.1	Bioquímica.....	42
6.1.1	<i>R. mucilaginosa</i> alcanza una densidad óptica mayor al crecer a 4 °C que a 28 °C, pero crece 8 veces más rápido a 28 °C.....	42
6.1.2	Actividad de enzimas antioxidantes (SOD, catalasa y GPx).....	43
6.1.2.1	Actividad de SOD; la actividad de SOD es máxima en la fase exponencial de cultivos crecidos a 4 °C y 28 °C.....	43
6.1.2.2	Actividad de catalasa; la actividad de catalasa es máxima en la fase exponencial de cultivos crecidos a 4 °C, en cultivos crecidos a 28 °C es máxima durante la fase estacionaria....	44
6.1.2.3	Actividad de GPx; la actividad de GPx es máxima en la fase exponencial de cultivos crecidos a 4 °C y 28 °C.....	46

6.1.2.4 SOD vs catalasa vs GPx; la catalasa de cultivos crecidos a 28 °C fue la única con una actividad máxima en la fase estacionaria.....	48
6.2 Bioinformática.....	49
6.2.1 Porcentaje de aminoácidos en proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas y en <i>R. mucilaginosa</i> AN5 (adaptada al frío) y <i>R. mucilaginosa</i> RIT398 (mesófila).....	49
6.2.2 Análisis factorial; 18 de los 20 aminoácidos muestran diferencias significativas entre proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas.....	52
6.2.3 Gráficas de interacción; las diferencias en el porcentaje de aminoácidos en proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas dependen también del phylum.....	54
6.2.4 Comparaciones múltiples: basidiomicetos adaptados al frío vs basidiomicetos mesófilos vs <i>R. mucilaginosa</i> AN5 vs <i>R. mucilaginosa</i> RIT399.....	57
7. Discusión.....	62
7.1 Efecto general de la temperatura sobre la actividad de enzimas antioxidantes.....	62
7.2 Efecto de la fase de crecimiento.....	62
7.3 Efecto de las fases de crecimiento y la temperatura.....	66
7.4 Comparación interespecífica de los niveles de actividad enzimática.....	67
7.5 Estudio bioinformático-comparativo.....	69
8. Conclusiones.....	73
9. Perspectivas.....	74
10. Anexos.....	76
10.1 Anexo 1: tabla de porcentajes de aminoácidos y valores de <i>p</i> de la comparación por ANOVA entre basidiomicetos adaptados al frío vs basidiomicetos mesófilos vs <i>R. mucilaginosa</i> AN5 vs <i>R. mucilaginosa</i> RIT399.....	76
10.1 Anexo 2: tabla de valores de <i>p</i> de la prueba de Tukey HSD entre basidiomicetos adaptados al frío vs basidiomicetos mesófilos vs <i>R. mucilaginosa</i> AN5 vs <i>R. mucilaginosa</i> RIT399.....	77
10. Referencias.....	78

1. Introducción

1.1 Estrés oxidante

El estrés oxidante es un estado fisiológico involucrado en el proceso de envejecimiento y en diferentes condiciones patológicas: carcinogénesis, aterosclerosis, diabetes, desórdenes neurodegenerativos, asma, síndrome de dificultad respiratoria aguda entre otras. Los principales responsables de este tipo de estrés son las especies reactivas del oxígeno (ROS) y el sistema antioxidante celular y se genera cuando hay un desbalance entre ambos componentes a favor de las ROS (fig. 1) (Birben *et al.*, 2012; Ray *et al.*, 2012). Este tipo de estrés puede generar daño oxidante mediante la modificación e inactivación de moléculas blanco de las ROS, como lípidos (principalmente polinsaturados), proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos. Si las reacciones oxidantes son numerosas, el daño celular producido puede ser significativo, conduciendo a daño tisular y la activación de respuestas inflamatorias (Kelly, 2003), muerte celular, mutaciones, aberraciones cromosómicas, etc. Sin embargo, niveles relativamente bajos de ROS son necesarios para la regulación de procesos fisiológicos clave, como diferenciación celular, proliferación, apoptosis y regulación de vías de transducción de señales redox-sensibles (Weydert y Cullen, 2009).

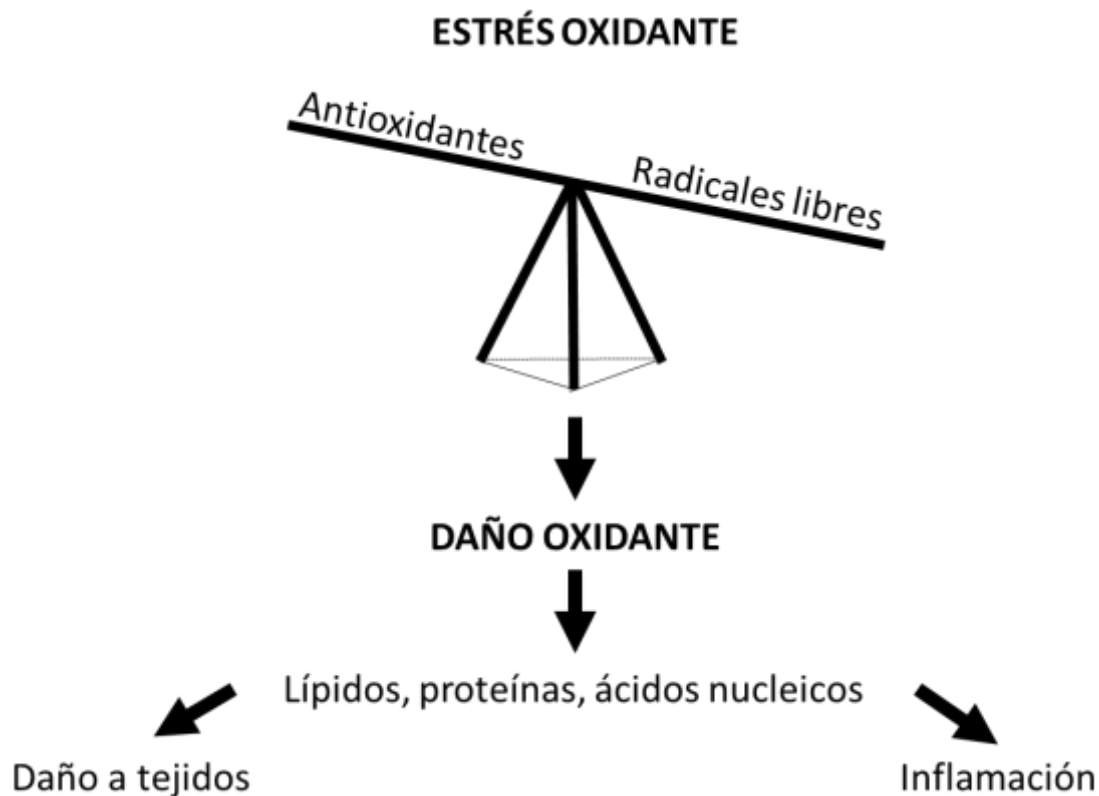


Figura 1. El estrés oxidante ocurre cuando hay un desbalance entre el sistema antioxidante celular y las ROS, favoreciendo a este último componente. Este tipo de estrés puede conducir a daño oxidante en lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, teniendo consecuencias citotóxicas (modificada de Kelly, 2003).

La activación de los factores de transcripción redox-sensibles NF- κ B, AP-1, factor nuclear de células T activadas (NFAT) y factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1), todos involucrados en la respuesta inflamatoria, ocurre tras la disrupción de la proporción intracelular de glutatión reducido (GSH)/glutatión oxidado (GSSG). Una alta proporción GSH/GSSG es clave para la protección celular contra daño oxidante. Esta activación ocurre a través de cascadas de transducción de señales cuyos receptores son sensibles a ROS: receptores de tirosina quinasa, la mayoría de receptores de factores de crecimiento, proteína tirosina fosfatasas y quinasas de serina/treonina. JNK y p38 son proteínas de la familia de las MAP quinasas reguladas por agentes oxidantes e involucradas en muchos procesos celulares, entre ellos diferenciación, proliferación celular y apoptosis (fig. 2) (Birben *et al.*, 2012).

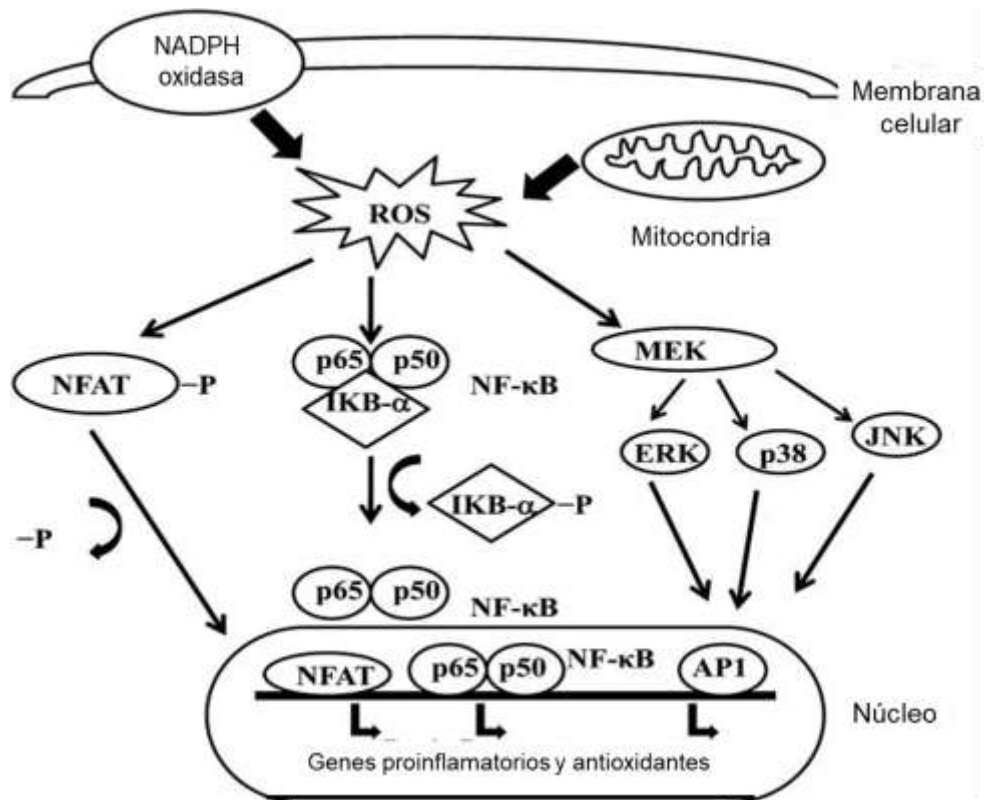


Figura 2. Efecto de las ROS sobre la activación de diferentes factores de transcripción a través de cascadas de señalización celular. ROS, especies reactivas del oxígeno; NFAT, factor nuclear de células T activadas; p65, subunidad p65 del factor de transcripción NF-κB; p50, subunidad p50 del factor de transcripción NF-κB; NK-κB, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; MEK, MAPKK (quinasa de la MAP quinasa) que activa a ERK; IκB-α, Inhibidor del factor nuclear del potenciador del gen del polipéptido ligero kappa en células B (NK-κB); ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; p38, familia de proteínas MAPK; JNK, quinasa Jun N-terminal; AP1, factor de transcripción de respuesta a estímulos diversos, p. ej., estrés (modificada de Birben *et al.*, 2012).

1.2 Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Hace unos ~2,700 millones de años el oxígeno molecular (O_2) incrementó notablemente su concentración en la atmósfera terrestre gracias a la actividad metabólica de los organismos fotosintéticos productores de oxígeno y las ROS fueron los acompañantes asociados no solicitados (Gill y Tuteja, 2010). Las ROS se forman por la reducción parcial del O_2 a través de diversos mecanismos, generalmente por la transferencia directa de electrones o por la excitación del O_2 a oxígeno singulete (O_2^1) (Mittler, 2002). La reducción secuencial del oxígeno por la adición de electrones conduce a la formación de diferentes tipos de ROS (fig. 3) (Held, 2015). Uno de los mecanismos de reducción es la secuencia de

reacciones de Haber-Weiss y Fenton, en la que se forma radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) tras la interacción, catalizada por hierro, entre anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (fig. 4) (Birben *et al.*, 2012).

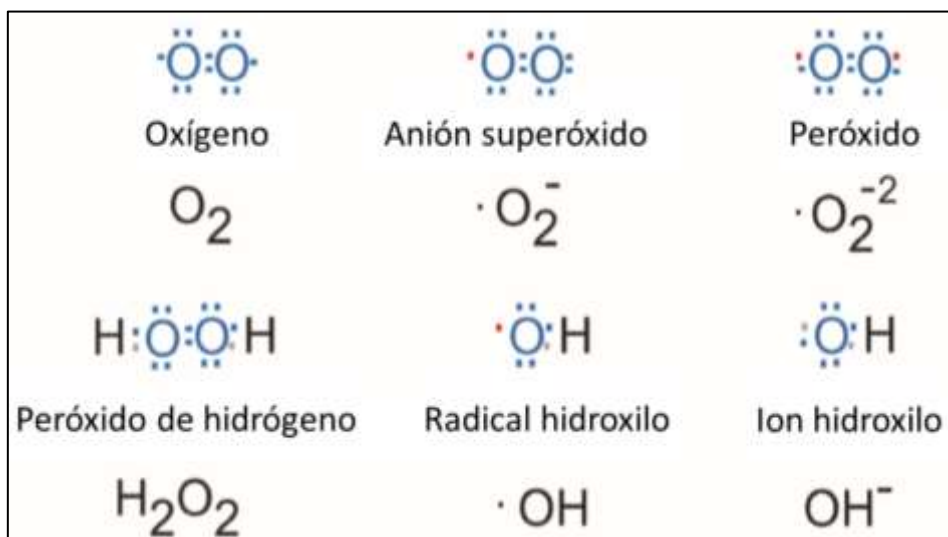


Figura 3. Estructura electrónica de las ROS más comunes (modificada de Held, 2015).

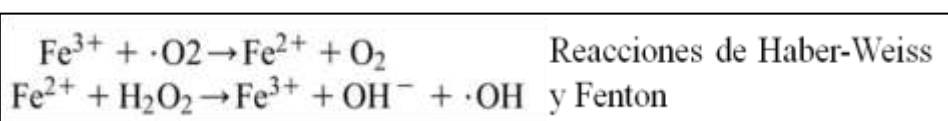


Figura 4. Reacciones de Haber-Weiss y Fenton. La formación de $\cdot\text{OH}$ a partir de O_2^- y H_2O_2 es termodinámicamente desfavorable en solución acuosa, pero puede proceder con la ayuda de un ion metálico, por ejemplo, el Fe^{3+} . Otros metales de transición pueden fungir como catalizadores, pero esta reacción catalizada por hierro es considerada la fuente principal de $\cdot\text{OH}$ en sistemas biológicos (modificada de Birben *et al.*, 2012).

Las ROS son clasificadas en radicales libres, que cuentan con uno o más electrones desapareados, y en moléculas no radicales, las cuales se pueden formar por la unión de dos o más radicales. El O_2^- , H_2O_2 y radical $\cdot\text{OH}$ son las ROS de mayor importancia fisiológica (Birben *et al.*, 2012). El O_2^- y radical $\cdot\text{OH}$ son extremadamente inestables (Finkel y Holbrook, 2000), este último con una vida media menor a 1 ns (Valko *et al.*, 2006), mientras que el H_2O_2 tiene una vida media más duradera y difunde libremente (Finkel y Holbrook, 2000). Sin embargo, el radical $\cdot\text{OH}$ es particularmente reactivo y se considera la ROS más dañina, puede reaccionar indiscriminadamente con cualquier componente

celular, provocando pérdida de la integridad celular, funciones enzimáticas y de estabilidad genómica (Hensley *et al.*, 2000).

La peroxidación de lípidos es iniciada por el radical $\bullet\text{OH}$, el cual reacciona principalmente con los dobles enlaces de los fosfolípidos y con el enlace éster entre el glicerol y el ácido graso. Esta oxidación lipídica puede ocurrir en la membrana plasmática y en la membrana de organelos y conduce a la inactivación de receptores de membrana y enzimas. El malondialdehído (MDA), un producto de la peroxidación de ácidos grasos insaturados daña la membrana celular e inactiva a muchas proteínas formando uniones cruzadas. El daño oxidante puede agravarse por la producción de radicales lipídicos capaces de interactuar con DNA y proteínas (Ghosh *et al.*, 2018).

El radical $\bullet\text{OH}$ es responsable de la carbonilación de proteínas, una modificación post-traducciona, irreversible y que produce la formación de un grupo carbonilo reactivo (aldehído, cetona o lactama) en las proteínas. Esta carbonilación también puede producirse por la interacción con productos de la peroxidación de lípidos (Fedorova *et al.*, 2013) y consecuentemente generar proteínas desnaturalizadas, mal plegadas, en unión cruzada o fragmentadas por la oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos o el esqueleto proteico. La carbonilación de proteínas es usada como marcador de la oxidación de proteínas y han sido observados altos niveles de proteínas carboniladas en casos de artritis reumatoide, Alzheimer, diabetes, sepsis y falla renal crónica (Ghosh *et al.*, 2018).

El DNA también es blanco del radical $\bullet\text{OH}$, éste puede extraer hidrógenos de la desoxirribosa u oxidar las bases nitrogenadas uniéndose a los dobles enlaces, dando como resultado el rompimiento de cadenas, unión cruzada DNA-proteínas, modificaciones nucleotídicas y mutaciones asociadas. El daño a DNA puede causar alteraciones en las proteínas que codifica. Si la replicación o transcripción ocurre antes de que el sistema de reparación actúe, la unión cruzada con proteínas puede ser letal (Ghosh *et al.*, 2018).

1.2.1 ROS endógenas

Se sugiere que la mayor parte de las ROS endógenas provienen del metabolismo oxidante de la mitocondria; del 1-3 % del oxígeno consumido en este organelo

es transformado a O_2^- por electrones que salen de la cadena respiratoria (Finkel y Holbrook, 2000). Los complejos I y III de la cadena respiratoria son los principales sitios productores de ROS, particularmente O_2^- . Sin embargo, se ha mostrado que el complejo II también es capaz de producir ROS en una serie de reacciones dependientes de succinato y glicerol-3-fosfato (Ghosh *et al.*, 2018).

El complejo I es la entrada de los electrones provenientes del NADH a la cadena respiratoria. Los electrones son transportados por el cofactor flavin mononucleótido (FMN) a través de una cadena de siete centros hierro-azufre (FeS) hasta el sitio de reducción de la coenzima Q (CoQ). La estructura tridimensional del complejo I de *Thermus thermophilus* (similar a la de mamíferos) muestra que los siete centros FeS del brazo hidrofílico están protegidos contra la entrada de O_2 (fig. 5). Se sabe que el complejo I produce O_2^- en el sitio de unión a FMN mediante la reacción del O_2 con el FMN completamente reducido, además, la cantidad de FMN reducido es establecida por la proporción NADH/NAD⁺. Una alta proporción NADH/NAD⁺ conduce a niveles altos de FMN reducido y O_2^- . El transporte reverso de electrones (RET) es otro mecanismo por el cual el complejo I produce O_2^- . RET ocurre cuando la poza de CoQ ha sido reducida y, en presencia de una alta fuerza protón-motriz (Δp), provoca que los electrones regresen de la CoQH₂ al complejo I y reduzcan el NAD⁺ a NADH en el sitio de unión a FMN. El sitio de producción de O_2^- por RET no está bien definido, pero se piensa que es el mismo que en la producción de O_2^- por FMN reducido en condiciones de proporciones elevadas de NADH/NAD⁺ (Murphy, 2009).

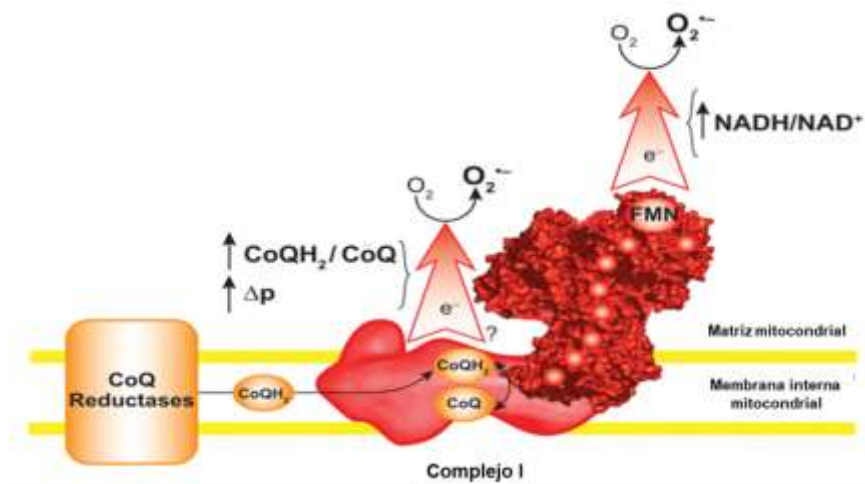


Figura 5. Producción de O_2^- por el complejo I. La representación estructural del complejo I es un modelo híbrido; el brazo hidrofóbico pertenece a *Yarrowia lipolytica* y el brazo hidrofílico (con los siete centros FeS) a *T. thermophilus*. Se muestran los dos mecanismos de producción de O_2^- , por niveles altos de FMN y por RET (modificada de Murphy, 2009).

La producción de O_2^- en el complejo III es insignificante en condiciones fisiológicas comparada con la producción en el complejo I. Cuando se administra $CoQH_2$ y el sitio Q_i del complejo es inhibido por antimicina, hay una alta producción de O_2^- en el sitio Q_o por la reacción de una ubisemiquinona con O_2 . En ausencia de antimicina la producción de O_2^- por el complejo III es baja (Murphy, 2009).

Otras fuentes endógenas de ROS son la actividad de NADPH oxidasa (Nox), xantina oxidasa (XO), mieloperoxidasa y aminoácido oxidasas (Birben *et al.*, 2012). Las Nox citosólicas son sistemas generadores de O_2^- (descritos inicialmente en neutrófilos) que, en función de la Nox específica, pueden desencadenar senescencia replicativa o transformación celular (Finkel y Holbrook., 2000). En hongos se conocen tres subfamilias de Nox: NoxA, NoxB y NoxC, esta última con un motivo de unión a Ca^{2+} como la Nox5 de humanos. Isoformas específicas de Nox son requeridas para varios procesos fisiológicos y diferenciación celular, crecimiento y defensa de hifas, desarrollo del cuerpo fructífero y germinación de ascosporas (Takemoto *et al.*, 2007). La familia de las Nox ilustra la aparente producción deliberada de agentes oxidantes para la correcta señalización celular y el mantenimiento de la homeostasis (Finkel y Holbrook, 2000). La XO tiene un papel crucial en el catabolismo de purinas en ciertas especies, entre ellas el humano (Ghosh *et al.*, 2018), sin embargo, su

presencia está ampliamente distribuida en el árbol de la vida, desde bacterias hasta vertebrados (Valko *et al.*, 2006). XO cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina y de la xantina a ácido úrico, produciendo H_2O_2 y O_2^- en el proceso (Ghosh *et al.*, 2018). Los microsomas y peroxisomas también son fuentes de ROS, principalmente H_2O_2 (Valko *et al.*, 2006). Durante los procesos metabólicos que ocurren normalmente en los peroxisomas (α -oxidación, β -oxidación, ω -oxidación, biosíntesis de compuestos lipídicos y metabolismo de aminoácidos y del glioxilato) se genera H_2O_2 que difunde a través de la membrana del peroxisoma al citosol. El peroxisoma cuenta con altas concentraciones de catalasa, sin embargo, esta no es suficiente para impedir la salida del H_2O_2 . La XO está presente en los peroxisomas, lo que contribuye a la producción adicional de O_2^- y H_2O_2 , los cuales pueden generar radicales $\bullet\text{OH}$ en presencia de iones metálicos, como Fe y Cu, mediante la secuencia de reacciones Haber-Weiss (Ghosh *et al.*, 2018).

1.2.2 ROS exógenas

El humo de tabaco, radiación ionizante, metales pesados, exposición a ozono, hiperoxia, radiación ionizante, cambios de temperatura, herbicidas, xenobióticos y escasos de nutrientes son factores ambientales que pueden aportar ROS exógenas o favorecer su formación en mayor o menor grado dentro de las células (Birben *et al.*, 2012; Farrugia y Balzan, 2012). El humo de tabaco contiene agentes oxidantes y radicales libres, como óxido nítrico y O_2^- , mientras que la luz ultravioleta A (UVA) desencadena reacciones oxidantes mediante la excitación de fotosensores endógenos como porfirinas, Nox y riboflavinas. La 8-oxo-G (8-Oxo-7,8-dihidroguanina o también llamada 8-hidroxiguanina) es el principal producto de la oxidación de DNA-mediada por UVA y radical $\bullet\text{OH}$ u $\text{O}_2^{\cdot 1}$ (fig. 6) (Birben *et al.*, 2012). La 8-hidroxiguanina es mutagénica y carcinogénica, capaz de generar transversiones G:C \rightarrow T:A, por lo que es considerado un buen marcador de estrés oxidante y potencial marcador para carcinogénesis. Se ha estimado a partir del contenido de 8-hidroxiguanina en la orina que el humo de tabaco aumenta el daño oxidante en un 35-50%, mientras que en leucocitos los niveles de 8-hidroxiguanina aumentan en un 20-50% (Valko *et al.*, 2006). La deficiencia de nutrientes que actúan como antioxidantes y ayudan a regular el balance de ROS: glutatión, carotenoides, vitamina C y E, flavonoides y ciertos

minerales como Cu, Mn y Zn, puede causar acumulación de radicales libres (Krumova y Cosa, 2016). Metales pesados como Fe, Cu, Cd, Hg, Ni, Pb y As pueden producir ROS mediante la secuencia de reacciones Haber-Weiss, uno de los mecanismos más importantes en la generación de ROS-mediada por metales (Birben *et al.*, 2012).



Figura 6. Formación de la 8-hidroxiguanina por la reacción con radical $\bullet\text{OH}$. Ésta se ve favorecida por factores exógenos como luz UVA y humo de tabaco (modificada de Valko *et al.*, 2006).

1.3 Sistema antioxidante celular (SAC)

La reducción del H_2O_2 por el O_2^- conduce a la formación del radical $\bullet\text{OH}$, que es altamente reactivo. Los mecanismos de eliminación del radical $\bullet\text{OH}$ son escasos, por lo que una manera de evitar el daño oxidante que genera es controlando su producción (Apel y Hirt, 2004). La producción del radical $\bullet\text{OH}$ y el daño celular a causa del exceso de ROS es evitado mediante el sistema antioxidante celular (SAC), un conjunto de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que neutralizan la reactividad de estas moléculas y mantienen la homeostasis celular (Finkel y Holbrook, 2000).

1.3.1 SAC no enzimático

El ascorbato, piruvato, flavonoides, carotenoides y glutatión (GSH) son moléculas orgánicas de bajo peso molecular, presentes en concentraciones milimolares en las células y encargadas de la captura de ROS (Finkel y Holbrook, 2000).

El GSH es un tripéptido formado por cisteína, glicina y ácido glutámico (fig. 7) que se encuentra en altas concentraciones en la mayoría de células, ~ 5 mM, tal como la glucosa, el colesterol y el potasio. Una alta proporción

GSH/GSSG (>100) es característica de células en un estado redox homeostático, mientras que proporciones entre 1 y 10 indican que las células están bajo estrés oxidante (Pizzorno, 2014). El GSH tiene diferentes mecanismos antioxidantes: dona electrones a los lípidos de membrana, protegiéndolos de ataques por ROS, además, participa en el proceso de conversión de la vitamina E y C (también con actividad antioxidante) a sus formas activas (Birben *et al.*, 2012).

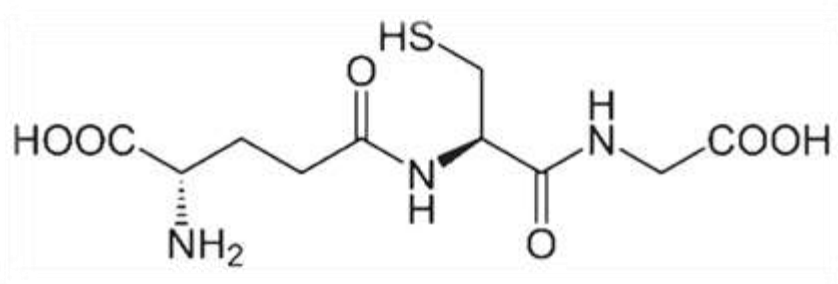


Figura 7. Estructura de la molécula del glutati6n (GSH) (tomada de Birben *et al.*, 2012).

Los carotenoides son un grupo grande de pigmentos (m1s de 600 descritos) ampliamente distribuido en la naturaleza, se han encontrado en microorganismos, plantas y animales. Estructuralmente se caracterizan por presentar un esqueleto de polieno que consiste en una serie de enlaces conjugados C=C. Esta característica les da la pigmentaci6n y reactividad qu1mica para interactuar con ROS, funcionando as1 como antioxidantes (Young y Lowe, 2018). El β -caroteno (fig. 8) tiene la capacidad de interactuar con los radicales peroxil (ROO \cdot), \cdot OH y con O $_2^-$. Sin embargo, el efecto antioxidante de los carotenoides ocurre a una baja presi6n parcial de ox1geno, a mayores concentraciones de ox1geno los carotenoides tienen actividad pro-oxidante (Birben *et al.*, 2012). Se ha observado que el licopeno protege totalmente a las c1lulas de dosis altas de radiaci6n y cuando hay un 0% de ox1geno, pero esta protecci6n se pierde al aumentar el ox1geno al 100% (Edge y Truscott, 2018). El β -caroteno tambi1n inhibe la activaci6n-inducida por agentes oxidantes de NF- κ B, IL-6 y factor de necrosis tumoral- α (Birben *et al.*, 2012). Diferentes estudios en cepas carotenog1nicas y mutantes albinas apuntan a que la funci6n principal de los carotenoides en hongos es proteger contra estr1s oxidante, luz visible y luz UV y que su ausencia no tiene efecto sobre el fenotipo ni crecimiento en

condiciones óptimas, pero puede ser determinante en condiciones adversas (Avalos y Limón, 2014). En células de *Rhodotorula mucilaginosa* suplementadas con H_2O_2 se observó un aumento en la producción de torularrodina, toruleno, β -caroteno y γ -caroteno, este último caroteno detectable sólo bajo condiciones de estrés oxidante (Irazusta *et al.*, 2013), en *Xanthophyllomyces dendrorhous* hubo un incremento significativo en la producción de astaxantina tras el tratamiento con H_2O_2 durante la fase exponencial de crecimiento (Liu y Wu, 2006), mientras que en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada para producir astaxantina se detectó menor sensibilidad a 1.7 mM de H_2O_2 que en la cepa silvestre (Ukibe, *et al.*, 2009).

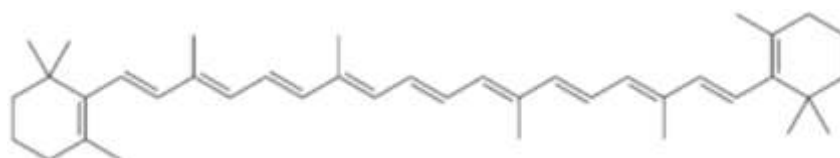


Figura 8. Estructura química de la molécula del β -caroteno (tomada de Birben *et al.*, 2012).

1.3.2 SAC enzimático

La superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx) son las tres enzimas antioxidantes principales, se piensa que su función es de gran importancia para la vida en todas las células dependientes de oxígeno (fig. 9) (Weydert y Cullen, 2009). En la figura 10 se muestra la estequiometría de las reacciones catalizadas por estas tres enzimas.

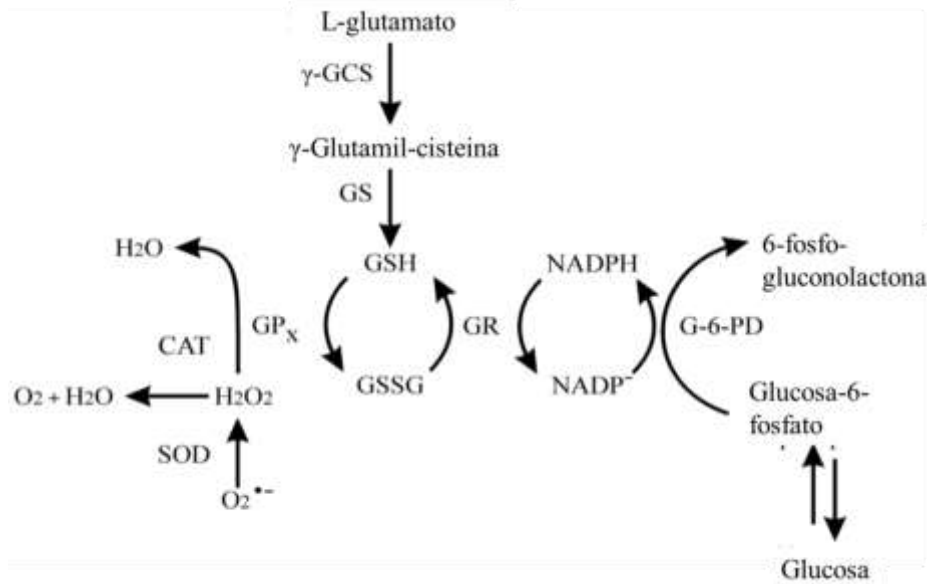


Figura 9. Sistema enzimático celular. Se muestra la interrelación productos – sustratos que mantienen los principales enzimas antioxidantes, SOD, catalasa y GPx. γ -GCS, γ -glutamyl cisteine synthetase; GS, glutathione synthetase; GSH, glutathione reduced; GSSG, glutathione oxidized; GR, glutathione reductase; CAT, catalase; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced; NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized; G-6-PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase (modificada de Weydert y Cullen, 2009).

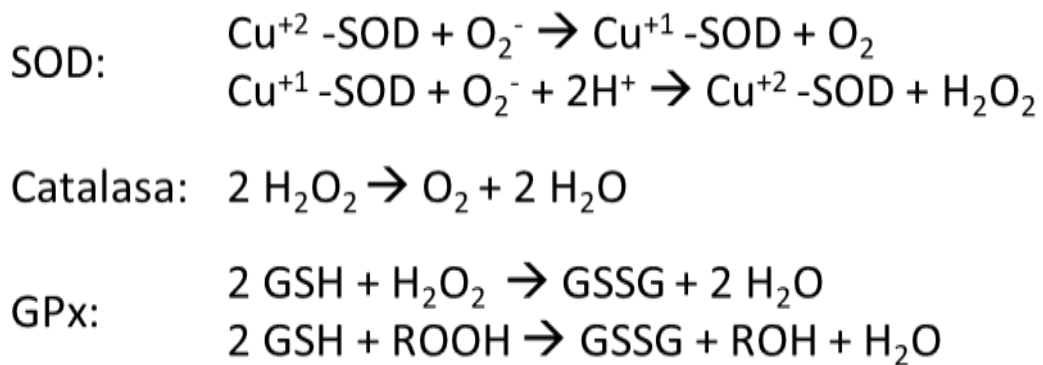


Figura 10. Reacciones catalizadas por las tres enzimas antioxidantes principales, Cu/Zn SOD, catalasa y GPx (modificada de Birben *et al.*, 2012).

La SOD cataliza la dismutación del O_2^- en H_2O_2 y O_2 (Weydert y Cullen, 2009). Se conocen cuatro tipos de SOD en función del cofactor metálico presente en el sitio activo: I) SOD de unión a manganeso (Mn-SOD), presente en procariontes y en la mitocondria de eucariontes, II) SOD de unión a cobre y zinc (Cu/Zn-SOD), la cual se encuentra principalmente en el citoplasma de

eucariontes (sólo un 2% está en el espacio intermembranal de la mitocondria) y da cuenta para el 90% de la actividad total de SOD en eucariontes (Kan *et al.*, 2017; Weydert y Cullen, 2009), III) SOD de unión a hierro (Fe-SOD), descrita únicamente en algunos procariontes, protistas, algas y plantas, IV) SOD de unión a níquel (Ni-SOD), presente sólo en cianobacterias y *Streptomyces* (Kan *et al.*, 2017). La Cu/Zn-SOD funcional es un homodímero de unos 32 kDa y cada subunidad cuenta con un ion Cu(II) y un ion Zn(II). Su estructura tridimensional está altamente conservada entre eucariontes: cada subunidad consta de un barril- β de 8 cadenas antiparalelas unidas por 3 regiones en asa (Hough *et al.*, 2000). En levaduras la Cu/Zn-SOD citoplasmática está codificada en el gen *SOD1* y es homóloga a la *SOD1* de humanos (Pereira *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha demostrado su presencia en el espacio intermembranal mitocondrial de *S. cerevisiae*, donde tiene un papel importante en la protección de las proteínas contra daño oxidante (Nedeva *et al.*, 2004).

Los niveles de actividad de SOD presentan mucha variación interespecífica. Una búsqueda de reportes de actividad en cepas fúngicas reveló que el rango global de valores de actividad en extracto crudo se encuentra entre las 9 U/mg de proteína (obtenidas en *R. mucilaginosa* M94C9) y las 156 U/mg (obtenidas en *Debaryomyces hansenii* C-11). Estas diferencias son menores al comparar los niveles de actividad en cada una de las fases de crecimiento, exponencial y estacionaria (a falta de reportes para la fase pre – estacionaria de crecimiento). Cabe mencionar que existen diferencias en los niveles de actividad entre cepas de la misma especie crecidas hasta la misma etapa de crecimiento, como el caso de *D. hansenii* C-11 (100 U/mg) y *D. hansenii* PYCC2968 (76.4 U/mg), y entre la misma cepa cuya actividad fue determinada por diferentes autores, como en el caso de los ensayos en *D. hansenii* C-11 realizados por Ramírez y colaboradores (1998) y los ensayos en esta misma cepa realizados por Hernández – Saavedra y Ochoa (1999), con valores de 100 U/mg y 146 U/mg de proteína, respectivamente. Sin embargo, es difícil determinar a qué se deben estas diferencias, ya que hay mucha variabilidad entre condiciones de cultivo entre los diferentes estudios. *D. hansenii* C-11 es la levadura con los valores de actividad más altos para esta enzima, con 146 U/mg de proteína en extracto crudo y 4660 U/mg de proteína para la SOD pura, mientras que *S. cerevisiae*

W303 tuvo una actividad de 101.1 U/mg de proteína en la fase exponencial de crecimiento (tabla 1).

Tabla 1. Comparación de los niveles de actividad de SOD en diferentes cepas fúngicas.

Cepa	Fase de crecimiento	Condiciones de cultivo (Medio/ temperatura/ agitación)	Método de ensayo de actividad	pH/temperatura del ensayo	Actividad de cultivos crecidos a su temperatura óptima (U/mg)	Actividad de cultivos crecidos por debajo de su temperatura óptima (U/mg)	Referencia
<i>Penicillium</i> sp. 161	Exponencial	Glucosa 4%/20 °C y 4 °C/400 rpm	Reducción del NBT	7.8/ND	2.2	2.2	Kostadinova <i>et al.</i> , 2014
<i>A. glaucus</i> 363	Exponencial	Glucosa 4%/25 °C y 4 °C/400 rpm	Reducción del NBT	7.8/ND	15	15	Kostadinova <i>et al.</i> , 2014
<i>D. hansenii</i> C-11	Exponencial	YPD 2% glucosa/30 °C/500 rpm	Reducción del NBT	7.8/TA	100	-----	Ramírez <i>et al.</i> , 1998
<i>D. hansenii</i> PYCC2968	Exponencial	YNB 2% glucosa/28°C/200 rpm	Reducción del citocromo C	7.8/ND	76.4	-----	Navarrete <i>et al.</i> , 2009
<i>S. cerevisiae</i> W303	Exponencial	YNB 2% glucosa/28°C/200 rpm	Reducción del citocromo C	7.8/ND	101.1	-----	Navarrete <i>et al.</i> , 2009
<i>Penicillium</i> sp. 161	Estacionaria	Glucosa 4%/20 °C y 4°C/400 rpm	Reducción del NBT	7.8/ND	3	4.5	Kostadinova <i>et al.</i> , 2014
<i>A. glaucus</i> 363	Estacionaria	Glucosa 4%/25 °C y 4 °C/400 rpm	Reducción del NBT	7.8/ND	30	40	Kostadinova <i>et al.</i> , 2014
<i>D. hansenii</i> C-11	Estacionaria	YPD glucosa 2%/30 °C/500 rpm	Reducción del NBT	7.8/TA	40	-----	Ramírez <i>et al.</i> , 1998
<i>D. hansenii</i> C-11	No definida	YPD con agua de mar glucosa 2%/ND/ND	Reducción del NBT	7.8/ND	Extracto crudo: 146	-----	Hernández-Saavedra y Ochoa, 1999
<i>D. hansenii</i> C-11	No definida	YPD con agua de mar glucosa 2%/ND/ND	Reducción del NBT	7.8/ND	Extracción con solvente: 4162	-----	Hernández-Saavedra y Ochoa, 1999
<i>D. hansenii</i> C-11	No definida	YPD con agua de mar glucosa 2%/ND/ND	Reducción del NBT	7.8/ND	Cromatografía: 4660	-----	Hernández-Saavedra y Ochoa, 1999

TA: temperatura ambiente
ND: no definido

La familia de las catalasas consta de enzimas homotetraméricas, con grupos hemo en cada subunidad y ampliamente distribuidas entre eucariontes (Maté *et al.*, 1999). La catalasa homotetramérica tiene un peso de ~240 kDa y cataliza la reducción del H₂O₂ a H₂O y O₂ sin la necesidad de donadores de electrones adicionales (Ścibior y Czczot, 2006; Martins y English, 2014). En *S. cerevisiae*, la isoforma Cta1 está localizada en peroxisomas y mitocondria, mientras que la Ctt1 se encuentra en el citoplasma celular (Martins y English, 2014).

Esta enzima también es altamente variable entre cepas fúngicas, tiene un mínimo de actividad de 0.01 $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (obtenidos en *R. mucilaginosa* M94C9) y un máximo de 220 $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ (obtenidos en *D. hansenii* CBS767). Al igual que con SOD, esta variabilidad es menor al considerar sólo los valores para cada etapa de crecimiento, exponencial y estacionaria. Un fenómeno interesante ocurre en *D. hansenii* y *Debaryomyces fabryi*, se observa que la actividad de catalasa es cepa dependiente, ya que las tres cepas ensayadas de esta primera levadura (CBS767, D18335 y PYCC2968) y las dos cepas de la segunda (CBS789 y CBS1793) muestran niveles de actividad variables (todos los cultivos fueron crecidos bajo las mismas condiciones y los ensayos de actividad se realizaron con el mismo método y por los mismos autores). El valor máximo de actividad de catalasa es de 220 $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína y se obtuvo en cultivos de *D. hansenii* CBS767 crecidos a su temperatura óptima y durante la fase exponencial de crecimiento. *S. cerevisiae* YPH250 tiene una actividad de 1.32 $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína en esta fase de crecimiento y 32.31 $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ en la fase estacionaria (tabla 2).

Tabla 2. Comparación de los niveles de actividad de catalasa en diferentes cepas fúngicas.

Cepa	Fase de crecimiento	Condiciones de cultivo	Método	pH/temperatura	Actividad de cultivos crecidos a su temperatura óptima (µmoles H ₂ O ₂ /min/mg)	Actividad de cultivos crecidos por debajo de su temperatura óptima (µmoles H ₂ O ₂ /min/mg)	Referencia
<i>R. glutinis</i> DSM 70398	Exponencial	UYM glucosa 1%/30 °C y 10 °C/150 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	8	22.6	Ezgi y Takac, 2012
<i>S. cerevisiae</i> YPH250	Exponencial	YPD glucosa 2%/28 °C/350 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	1.32	-----	Izawa <i>et al.</i> , 1996
<i>Penicillium</i> sp. 161	Exponencial	Glucosa 4%/20 °C y 4°C/400 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	4.8	5.5	Kostadinova <i>et al.</i> , 2014
<i>A. glaucus</i> 363	Exponencial	Glucosa 4%/20 °C y 4°C/400 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	3	3	Kostadinova <i>et al.</i> , 2014
<i>D. hansenii</i> CBS767	Exponencial	YPD/25 °C/200 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	220	-----	Michan <i>et al.</i> , 2012
<i>D. hansenii</i> D18335	Exponencial	YPD/25 °C/200 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	100	-----	Michan <i>et al.</i> , 2012
<i>D. hansenii</i> PYCC2968	Exponencial	YPD/25 °C/200 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	125	-----	Michan <i>et al.</i> , 2012
<i>D. fabryi</i> CBS789	Exponencial	YPD/25 °C/200 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	25	-----	Michan <i>et al.</i> , 2012
<i>D. fabryi</i> CBS1793	Exponencial	YPD/25 °C/200 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	10	-----	Michan <i>et al.</i> , 2012
<i>S. cerevisiae</i> YPH250	Estacionaria	YPD glucosa 2% / 28 °C/350 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	32.21	-----	Izawa <i>et al.</i> , 1996
<i>S. cerevisiae</i> EG103	Estacionaria	YPD glucosa 2% / 30 °C/200 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	ND/ND	31	-----	Manfredini <i>et al.</i> , 2004
<i>Penicillium</i> sp. 161	Estacionaria	Glucosa 4%/20 °C --> 4°C/400 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	6	9	Kostadinova <i>et al.</i> , 2014
<i>A. glaucus</i> 363	Estacionaria	Glucosa 4%/25 °C --> 4°C/400 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	3.5	5	Kostadinova <i>et al.</i> , 2014
<i>R. glutinis</i> DSM 70398	Estacionaria	UYM glucosa 1%/30 °C-->10 °C/150 rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	15	1	Ezgi y Takac, 2012
<i>R. mucilaginosa</i> RCL-11	Estacionaria	YNB/30°C/250rpm	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7,4/TA	9	-----	Irazusta <i>et al.</i> , 2013
<i>Hansenula mrakii</i>	No definida	MM glucosa 2%/28 °C/ND	Descomposición del H ₂ O ₂ a 240 nm	7/TA	0.073	-----	Inoue <i>et al.</i> , 1995

En mamíferos se han encontrado cinco isoenzimas de la GPx presentes en diferentes compartimentos celulares (entre ellos la mitocondria y el núcleo). Estas enzimas son selenoproteínas (contienen una selenocisteína en el sitio activo) que catalizan la reducción de H₂O₂ a H₂O y de peróxidos de lípidos a sus

respectivos alcoholes. Para su actividad requieren de NADPH, GSH (que funciona como donador de electrones), glucosa-6-fosfato, glutatión reductasa (GR) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD). GPx1 es citosólica y se considera la principal GPx responsable en la eliminación de H₂O₂ en mamíferos (Weydert y Cullen, 2009). En *S. cerevisiae* se han encontrado tres GPxs, GPx1p, GPx2p y GPx3p. Gpx1p es inducida en condiciones de deficiencia de glucosa, GPx2p en condiciones de estrés oxidante, aunque no tiene un papel aparentemente significativo contra H₂O₂ y *t*-butil hidroperóxido y GPx3p es la GPx principal en la eliminación de peróxidos en levaduras (Penninckx, 2002), particularmente contra hidroperóxidos de fosfolípidos (Kannan *et al.*, 2014). El gen *GPX3* se expresa constitutivamente (Penninckx, 2002).

Se encontraron pocos reportes de ensayos de actividad de GPx de hongos. Sin embargo, la mayoría de los valores reportados se encuentran por debajo de la unidad, la única excepción es *S. cerevisiae* EG103 cuya actividad es de 28 μ moles H₂O₂/min/mg de proteína, el valor más alto de todos. De igual manera que en el caso de la SOD y catalasa, los niveles de actividad son altamente variables, con un valor mínimo de 0.0016 μ moles H₂O₂/min/mg de proteína obtenido en cultivos de *S. cerevisiae* YPH250 durante la fase exponencial de crecimiento (tabla 3).

Tabla 3. Comparación de los niveles de actividad de GPx en diferentes cepas fúngicas.

Cepa	Fase de crecimiento	Medio de cultivo	Método	pH/temperatura	Actividad de cultivos crecidos a su temperatura óptima (μ moles H ₂ O ₂ /min/mg)	Actividad de cultivos crecidos por debajo de su temperatura óptima (μ moles H ₂ O ₂ /min/mg)	Referencia
<i>Cryptococcus neoformans</i> H99	Exponencial	YPD glucosa 1%	Ensayo colimétrico de BIOXYTECH (GPx-340)	ND/TA	0.45	-----	Missall <i>et al.</i> , 2005
<i>S. cerevisiae</i> YPH250	Exponencial	YPD	Descomposición del NADPH a 340 nm	7/TA	0.0016	-----	Inoue <i>et al.</i> , 1999
<i>S. cerevisiae</i> EG103	Estacionaria	YPD glucosa 2% / 30 °C/200 rpm	Descomposición del NADPH a 340 nm	7.4/30 °C	28	-----	Manfredini <i>et al.</i> , 2004
<i>H mrakii</i>	No definida	MM glucosa 2%/28 °C/ND	Descomposición del NADPH a 340 nm	ND/ND	0.054	-----	Inoue <i>et al.</i> , 1995

Sin embargo, también existen otras enzimas antioxidantes: las peroxirredoxinas (PRx), una familia conservada de peroxidasa que reducen la

concentración de H₂O₂, responden a toxicidad por metales pesados y catalizan la reducción de hidroperóxidos usando grupos tiol de cisteínas donadoras de electrones como sitio activo (Farrugia y Balzan, 2012). Las glutatión S transferasas (GST, también conocidas como peroxidasa independiente de selenio) inactivan xenobióticos y metabolitos secundarios como aldehídos insaturados, epóxidos e hidroperóxidos conjugando GSH a estas moléculas. Las tiorredoxinas (TRX), tiorredoxin reductasas (TRRs) y peroxidasa de tiorredoxinas (PRXs) son enzimas que tienen grupos tiol en su estructura y que están asociadas a la disposición del H₂O₂, además, reducen a otras proteínas usando sus grupos tiol como donadores de electrones (Birben *et al.*, 2012).

1.4 Antártica y estrés oxidante

La Antártica es el continente más frío, seco, ventoso y de mayor altitud del planeta Tierra; la costa continental registra temperaturas < 15 °C en verano y menores a -40 °C en invierno; al interior del continente se registró una mínima histórica de -89.6 °C y cuenta con una superficie de 14,000,000 km² (Phillipot, 1985). Una combinación particular de factores generadores de estrés ocurre en esta continente: I) poca disponibilidad de nutrientes inherente a las temperaturas congelantes (Buzzini *et al.*, 2012), II) ciclos de congelación-descongelación comunes en los suelos antárticos (Yergeau y Kowalchuk, 2008), se sabe que estos pueden ocurrir durante todo el verano austral en la región de los Valles Secos de McMurdo (Knox, *et al.*, 2016), III) alta incidencia de radiación UV (de hasta 70 dosis eritemáticas estándar) debido a la larga duración de los días, gran superficie de albedo (la proporción de luz reflejada con respecto a la que incide) y agotamiento de la capa de ozono (McKenzie *et al.*, 2011).

Kostadinova y colaboradores (2014) mostraron un aumento en diferentes marcadores de estrés oxidante tras disminuir la temperatura de incubación en dos cepas de hongos filamentosos aislados de la Antártica, *Penicillium sp.* 161 (psicrotolerante, temperatura óptima de crecimiento [TOC] = 20 °C) y *Aspergillus glaucus* 363 (mesófilo, TOC = 25 °C). En su trabajo crecieron a las dos cepas en su TOC hasta la mitad de la fase exponencial, entonces disminuyeron la temperatura a 10 y 4 °C y continuaron incubando bajo estas condiciones por 6 horas, los controles se mantuvieron creciendo en su TOC. Transcurrido ese tiempo, regresaron los cultivos a su TOC y midieron actividad de catalasa,

actividad de SOD, carbonilación de proteínas y producción de H₂O₂ y O₂⁻ en células intactas y en la fracción mitocondrial.

Observaron que durante las 6 horas de crecimiento a bajas temperaturas hubo una disminución significativa en el crecimiento de ambas cepas al compararlo con su respectivo control (crecido a TOC) (fig. 11A). Esta diferencia fue mayor en *A. glaucus* 363 (mesófilo).

Penicillium sp. 161 sometida al cambio a 10 °C mostró un aumento en los niveles de O₂⁻ del 116% y 124% en células intactas y la fracción mitocondrial, respectivamente, mientras que el cambio a 4 °C generó un aumento del 196% en células intactas y del 143% en la fracción mitocondrial. *A. glaucus* 363 tuvo un aumento más radical en 10 °C y 4 °C, particularmente en la fracción mitocondrial: 410% y 660% del control, respectivamente. La producción de H₂O₂ fue mayor en 10 °C y 4 °C en ambas cepas (células intactas y fracción mitocondrial). Este aumento fue más marcado en el cambio a 4 °C.

Tras la disminución de la temperatura se produjo un aumento en los niveles de carbonilación de proteínas en ambas cepas (fig. 11B). Este aumento cambió en función del tiempo de exposición a 10 °C y 4 °C y fue mayor en esta última temperatura. *Penicillium sp.* 161 fue menos sensible al tratamiento de frío, mostró un aumento máximo en los niveles de carbonilación de 1.3x a 4 °C (*A. glaucus* 363 de 1.6x a 4 °C) y tuvo una mayor recuperación al restablecer la TOC.

La actividad de SOD mostró un aumento en ambas cepas tras disminuir la temperatura de crecimiento (fig. 11C). Este aumento fue tiempo y dosis-dependiente; fue mayor a 4 °C en horas de cultivo superiores. SOD tuvo ~ 1.4 y 1.2 más actividad en *Penicillium sp.* 161 a 4 °C y 10 °C, respectivamente. *A. glaucus* 363 mostró un aumento máximo en la actividad de SOD de 1.6x en 4 °C y 1.3x en 10 °C. Una tendencia similar fue observada en la actividad de catalasa de ambas cepas (fig. 11D). El incremento máximo de actividad de catalasa observado fue ~ 2x y ocurrió en *Penicillium sp.* 161 tras la disminución a 4 °C. El análisis de actividad en gel muestra un aumento en la expresión de catalasa en ambas cepas tras la disminución de la temperatura.

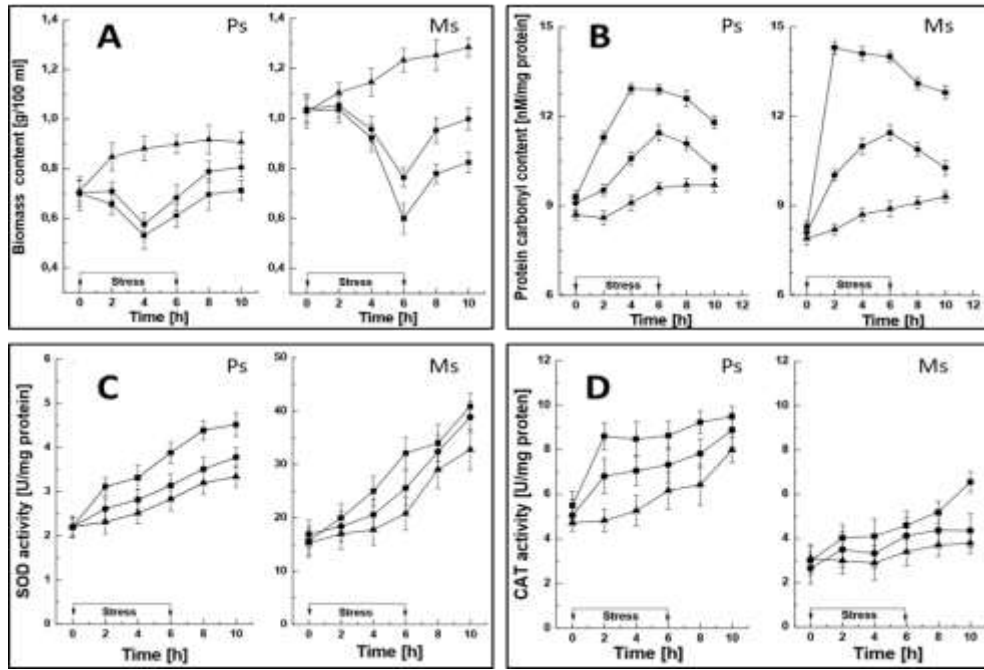


Figura 11. Resultados del trabajo de Kostadinova y colaboradores (2014). A, crecimiento de *Penicillium* sp. 161 (Ps) y *Aspergillus glaucus* 363 (Ms) a su TOC (▲), tras la disminución a 10 °C (●) y al disminuir la temperatura a 4 °C (□); B, niveles de carbonilación de proteínas; C, actividad de SOD y D, actividad de catalasa (modificada de Kostadinova *et al.*, 2014).

1.5 *Rhodotorula mucilaginosa* M94C9

R. mucilaginosa es un basidiomiceto carotenogénico de la familia Sporidiobolaceae (Fell *et al.*, 2000), produce cuatro pigmentos principales en proporciones cepa-dependientes: torularrodina, toruleno, β -caroteno y γ -caroteno, por lo que sus colonias son de color naranja salmón. Esta especie es altamente heterogénea, ya que muestra gran variabilidad genotípica y fenotípica entre cepas (Moliné *et al.*, 2010).

La cepa M94C9 es piscrotolerante (TOC = 30 °C) (Troncoso *et al.*, 2016), como la mayoría de los microorganismos presentes en los suelos y rocas antárticas. Estos organismos han evolucionado para tolerar el frío y son capaces de crecer a temperaturas cercanas a 0 °C, pero su temperatura óptima está entre los 20 °C y 30 °C (Buzzini *et al.*, 2012). En contraste, los organismos psicrófilos están fisiológicamente más especializados a hábitats permanentemente glaciales y pueden crecer a 0 °C o menos, su temperatura óptima está alrededor de los 15 °C y la máxima \leq 20 °C (Morita, 1975). Sin embargo, no existe un

consenso universal para los rangos de temperatura de crecimiento que definen a microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes. Éstos varían de autor en autor, si bien Morita (1975) fue el primero en sugerir un rango, otros autores, como Goordial y colaboradores (2016) que consideran psicrófilas a levaduras capaces de crecer a temperaturas entre $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo han ido modificando. Los microorganismos mesófilos crecen en un rango de temperatura entre los $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una óptima entre los $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Schiraldi y De Rosa, 2014).

A partir de una de las expediciones a la Antártica del grupo de trabajo coordinado por el Dr. Marcelo Baeza Cancino, particularmente la de enero de 2014 a las islas Shetland del Sur, se aislaron, identificaron y caracterizaron 16 cepas de levaduras adaptadas al frío, entre ellas *Rhodotorula mucilaginosa* M94C9. Ésta fue encontrada en muestras de suelo de la isla Nevada (fig. 12) (Troncoso *et al.*, 2016) y el Dr. Marcelo la donó al Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias de la UNAM, donde se realizaría investigación relacionada con el estrés oxidante.

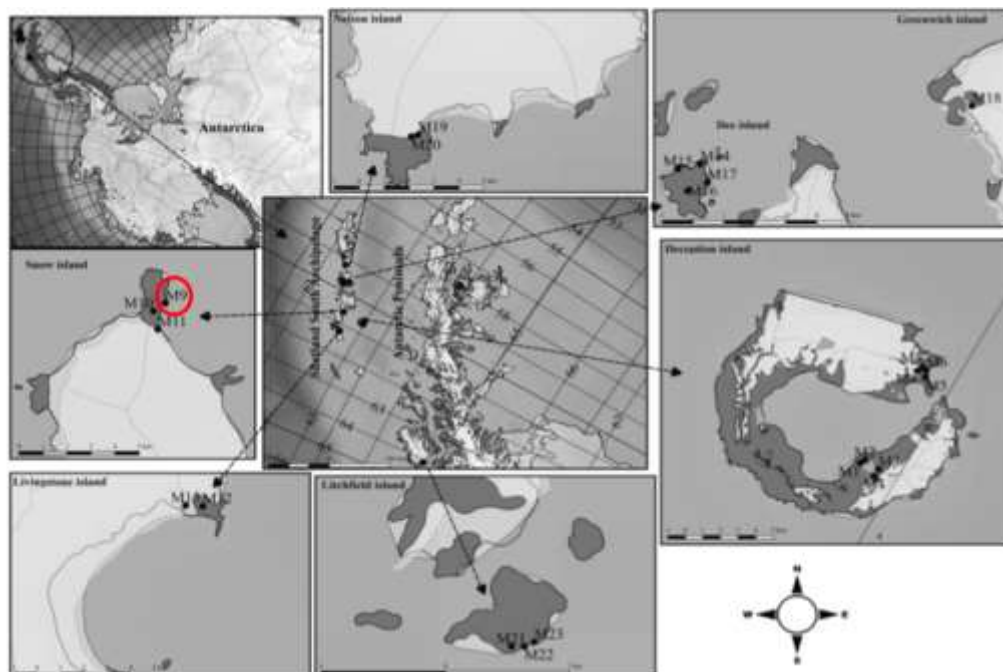


Figura 12. Mapa de las Islas Shetland del Sur y la Península Antártica. Se presentan las zonas de muestreo del equipo de trabajo de Marcelo Baeza en la expedición realizada en enero del 2014 (Troncoso *et al.*, 2016). El círculo rojo encierra la zona donde se encontró *R. mucilaginosa* M94C9 en la Isla Nevada (modificada de 2014 (Troncoso *et al.*, 2016).

1.6 Adaptación al frío en proteínas

Las enzimas de organismos adaptados al frío deben contar con mecanismos para mantener tasas catalíticas dentro de los límites necesarios para la vida. Según la ley de Arrhenius, la velocidad de las reacciones químicas depende de la temperatura absoluta; descensos en la temperatura provocan una reducción en la velocidad. Algunas características generales descritas en enzimas de organismos adaptados al frío son: mayor flexibilidad estructural (la cual puede ser global o local; restringida a sitios catalíticos), mayor actividad específica a bajas temperaturas y menor termoestabilidad que sus contrapartes mesófilas. Además, múltiples estudios genómicos y proteicos comparativos entre proteínas homólogas de organismos con diferentes preferencias térmicas han revelado diferencias en la composición de aminoácidos y estructura (Maayer *et al.*, 2014).

Dentro de las diferencias en composición proteica, análisis genómicos de las arqueobacterias antárticas *Methanogenium frigidum* y *Methanococcoides burtonii* han mostrado un mayor contenido de aminoácidos polares no cargados, especialmente Gln y Thr, y menor contenido de aminoácidos hidrofóbicos, principalmente Leu, que arqueas metanogénicas mesófilas y termófilas (Saunders *et al.*, 2003). En γ -proteobacterias se ha observado que especies psicrófilas y cepas adaptadas al frío presentan proteínas con mayor contenido de Asp, Asn, Ile, Lys y Ser y menor contenido de Ala, Pro, Arg, Gly y Leu que especies con temperaturas óptimas de crecimiento mayores (Zhao *et al.*, 2010). En levaduras no se ha reportado ningún trabajo de este tipo.

Estudios estructurales en proteínas de organismos adaptados al frío, principalmente bacterias, han mostrado diversos mecanismos para obtener una mayor flexibilidad, mayor actividad a bajas temperaturas y menor termoestabilidad, entre estos se encuentran:

- Reducir la cantidad de Arg y Pro, ya que ambos aminoácidos son capaces de formar múltiples puentes salinos y de hidrógeno y su disminución favorece un incremento en la flexibilidad estructural. Aumentar la proporción Lys:Arg también disminuye la cantidad de puentes salinos y de hidrógeno.

- Formar *clusters* de Gly en sitios catalíticos, aumentando así la movilidad local. Esto puede favorecer una mayor accesibilidad del sustrato al sitio activo. También se ha observado un aumento en la flexibilidad y movilidad de estructuras adyacentes al sitio activo.
- Disminuir las interacciones interdominio, electrostáticas y aromáticas.
- Aumentar el número y tamaño de cavidades caracterizadas por poseer un gran número de grupos hidrofílicos, capaces de unir moléculas de agua, favoreciendo una mayor flexibilidad estructural a través de un incremento en la solvatación interna.
- Asas superficiales más largas, con predominancia de aminoácidos neutros y disminución en el contenido de Pro, generando proteínas menos compactas y más inestables.
- Aumentar la cantidad de aminoácidos hidrofóbicos en la superficie expuesta al solvente y disminuir su proporción al interior de la proteína.

La mayor flexibilidad estructural provoca que las proteínas existan en un estado basal más desordenado, el cual compensa el efecto congelante y de baja energía cinética inherente a ambientes fríos (Maayer *et al.*, 2014). Se sugiere que esto favorece un mayor grado de complementariedad entre el sustrato y el sitio activo, reduciendo así la energía de activación (Rodrigues y Tiedje, 2008; D'Amico *et al.*, 2003). Cabe mencionar que cada proteína adaptada al frío es diferente y sólo presenta uno o algunos de los mecanismos aquí descritos e incluso puede ser activa a bajas temperaturas gracias a otro tipo de adaptaciones (Maayer *et al.*, 2014).

La citrato sintasa de la cepa bacteriana antártica DS2-3R (DsCS) tiene 29 veces más actividad a 6 °C que la citrato sintasa de *Pyrococcus furiosus* (PfCS), una arqueobacteria hipertermófila. Cristales de estas dos enzimas han revelado que los residuos catalíticos y de unión a ligando están conservados, sin embargo, se observó un número de variaciones estructurales que podrían explicar la diferencia de actividad: DsCS presenta dos asas significativamente más largas y una más corta. El asa más corta forma parte de la entrada al sitio catalítico, lo que favorece un mayor acceso del sustrato a esta zona crítica de la enzima. DsCS tiene una carga neta de -28 a pH 7 y PfCS de 0, además, ambas son básicas en el sitio activo, pero DsCS presenta una distribución peculiar del

potencial electrostático fuera de esta zona; DsCS es altamente negativa en la mayor parte de su superficie. Se desconoce si esta distribución de potencial redirecciona favorablemente al oxaloacetato hacia el sitio activo o si favorece interacciones desestabilizantes con otras especies negativas. DsCS presenta una superficie hidrofóbica de 7854 Å y PfCS 4929 Å, lo que corresponde al 29 % y 18 % de su área total, respectivamente. Se sabe que la exposición de residuos hidrofóbicos al solvente tiene un efecto desestabilizante debido al ordenamiento de moléculas de agua (Russell, *et al.*, 1998).

En levaduras solo se ha reportado un trabajo estructural-comparativo entre proteínas cristalizadas de organismos con diferentes preferencias térmicas, particularmente con la fuculosa aldolasa (GaFucA) de *Glaciozyma antarctica* PI12, un basidiomiceto obligadamente psicrófilo. En GaFucA la triada catalítica de His está conservada con respecto a todas las aldolasas descritas de este tipo. Sin embargo, un número de diferencias fueron observadas con respecto a la fuculosa aldolasa de *Pseudomonas syringae* (PsFucA), una bacteria mesófila, y a la de *Thermus thermophilus* (TtFucA). GaFucA presentó un menor contenido de Arg que PsFucA y TtFucA, con un 3.5 %, 6.2 % y 8.0 %, respectivamente, todas las enzimas presentaron un contenido similar de Gly y Pro. GaFucA presentó una superficie hidrofóbica 33 % mayor que TtFucA, lo que sugiere que GaFucA tiene características de enzimas adaptadas al frío (Jaafar *et al.*, 2016).

2. Justificación

El estrés oxidante es un fenómeno que afecta a organismos de los tres dominios del árbol de la vida, desde arqueobacterias extremófilas, levaduras y algas unicelulares hasta organismos multicelulares como nosotros, el ser humano. La levadura antártica *Rhodotorula mucilaginosa* M94C9 se enfrenta a una combinación particular de factores ambientales de estrés que favorecen este fenómeno, directa o indirectamente: altos niveles de radiación solar y bajas temperaturas, por lo cual es importante entender los sistemas enzimáticos antioxidantes con los que *R. mucilaginosa* M94C9 sobrelleva este tipo de estrés. Además, la adaptación al frío en proteínas ha sido ampliamente estudiada en bacterias, sin embargo, en levaduras este fenómeno está poco caracterizado, por lo que el trabajo bioinformático-comparativo realizado en esta tesis representa el primer estudio a gran escala en levaduras adaptadas al frío y levaduras mesófilas, lo que abre un nuevo panorama en el estudio de las levaduras.

3. Objetivos

Generales:

- Estudiar el sistema enzimático contra estrés oxidante en la levadura antártica *R. mucilaginosa* M94C9.
- Estudiar las adaptaciones a nivel de proteínas que permiten a las levaduras psicrófilas y psicrotolerantes habitar ambientes fríos.

Particulares:

- Determinar la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y GPx en diferentes etapas del crecimiento de *R. mucilaginosa* M94C9.
- Comparar la actividad de la SOD, catalasa y GPx de *R. mucilaginosa* M94C9 crecida a 28 °C y 4 °C.
- Establecer el porcentaje de aminoácidos que caracteriza a un conjunto de proteínas de levaduras adaptadas al frío (psicrófilas y psicrotolerantes) en comparación con proteínas de levaduras mesófilas.
- Determinar si existen diferencias cepa-dependientes en el porcentaje de aminoácidos en proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas, utilizando a *R. mucilaginosa* como modelo.

4. Diseño experimental

La figura 13 resume el diseño experimental de este trabajo, posteriormente se detalla cada uno de los procedimientos.

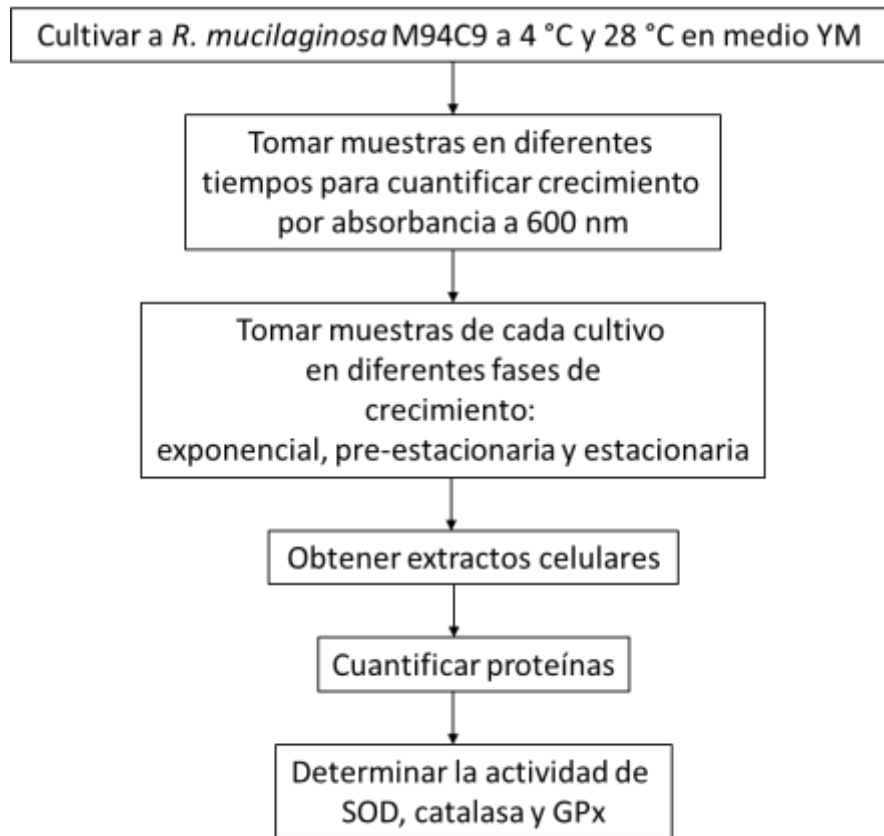


Figura 13. Diseño experimental para la comparación de actividad enzimática en diferentes fases de crecimiento de *R. mucilaginosa* M94C9 y en diferentes temperaturas de crecimiento.

5. Metodología

5.1 *R. mucilaginosa* M94C9

Para este estudio se utilizó la cepa M94C9 de la levadura *R. mucilaginosa*. Esta levadura fue aislada de muestras de suelo de la Isla Nevada del Archipiélago Shetland del Sur, Antártica, por el grupo de trabajo coordinado por el Dr. Marcelo Baeza Cancino, de la Universidad de Chile, quienes también establecieron sus condiciones óptimas de crecimiento (Troncoso *et al.*, 2016).

5.2 Preservación de la cepa

Durante la realización de los experimentos *R. mucilaginosa* M94C9 fue crecida a 28 °C en medio sólido YM (extracto de levadura 0.3% m/v, peptona de caseína 0.5% m/v, glucosa 1% m/v, extracto de malta 0.3% m/v, agar 2% m/v), almacenada a 4 °C y resembrada cada mes. En caso de tener cultivos de más de un mes de almacenaje, estos se desechaban y se sembraban nuevos a partir de una reserva criopreservada en glicerol (30%) a -70 °C.

5.3 Cultivos de *R. mucilaginosa* M94C9 y determinación del crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento a 28 °C y 4 °C en YM líquido (extracto de levadura 0.3 %, peptona de caseína 0.5%, glucosa 1%, extracto de malta 0.3 %): se cultivó un pre-inóculo *over weekend* (~72 hrs de crecimiento) en un matraz Erlenmeyer de 150 mL con 60 mL de YM a 28 °C y 180 rpm y otro de una semana y media (~240 hrs de crecimiento) a 4 °C y 180 rpm. Las células fueron lavadas; se transfirieron los cultivos a tubos cónicos de 50 mL, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en agua miliQ estéril, se realizó una segunda centrifugación a 3000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 mL de agua miliQ estéril. Se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU – 640.

A partir del pre-inóculo crecido a 28 °C se inocularon 300 mL de YM (repartidos equitativamente en 3 matraces Erlenmeyer de 250 mL) a una densidad óptica (D. O.) de 0.05 – 0.06 y cultivaron a 28 °C y 180 rpm y con el pre-inóculo crecido a 4 °C se inocularon otros 3 matraces de estas mismas

características pero estos fueron cultivados a 4 °C y 180 rpm. En los 6 cultivos se midió el crecimiento por absorbancia a 600 nm en diferentes horas hasta que ya no hubo aumento. Los datos fueron graficados utilizando una escala y logarítmica. Las curvas de crecimiento permitieron establecer la D. O. y tiempo aproximados en el que las células se encontraban en la fase exponencial (D. O. ~ 1), pre-estacionaria (D. O. ~ 8) y estacionaria de crecimiento (D. O. ~11 y ~16 para 28 °C y 4 °C, respectivamente).

5.4 Obtención de extractos celulares

En matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de YM y a partir de un pre-inóculo crecido a 28 °C, se crecieron a esta temperatura y 180 rpm 3 cultivos hasta la fase exponencial, 3 hasta la pre-estacionaria y 3 hasta la estacionaria. Se midió el crecimiento por absorbancia a 600 nm y una vez alcanzada la fase deseada, cada cultivo fue transferido a tubos cónicos de 50 mL, centrifugado a 3000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y las células se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Otros 9 cultivos fueron tratados de la misma forma, pero éstos fueron inoculados a partir de un pre-inóculo crecido a 4 °C e incubados en esta temperatura a 180 rpm.

Los extractos se obtuvieron por disrupción celular con perlas de vidrio y amortiguador de lisis (amortiguador fosfatos de potasio 100 mM, pH 7.4, DTT 1mM y EDTA 1mM). Las células de cada cultivo (previamente almacenadas a -70 °C) fueron descongeladas y lavadas con agua miliQ como se describió anteriormente. Sin embargo, la pastilla ahora fue resuspendida en 1 mL de amortiguador de lisis y se transfirió a un tubo de ensayo de vidrio, donde se añadió un volumen de perlas de vidrio equivalente a 1/3 – 1/2 del volumen de la pastilla resuspendida. Las células fueron sometidas a agitación en vórtex por 1 min y, enseguida, se incubaron 1 min en hielo, cada muestra pasó por 5 ciclos de agitación/incubación en hielo. El lisado celular fue transferido a tubos de polipropileno de 1.5 mL y centrifugado a 14,000 rpm y 4° C durante 15 min, la pastilla se desechó y el sobrenadante (extracto) fue colocado en tubos nuevos para cuantificación de proteína y ensayos de actividad enzimática.

5.5 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el reactivo de Bradford de la marca Sigma-Aldrich y albúmina sérica bovina (BSA) a 1 mg/mL. La cuantificación se llevó a cabo por el método de Bradford (1976); se realizaron por lo menos tres curvas de calibración en cada sesión experimental. Las curvas de calibración se hicieron en tubos de ensayo de vidrio con 0 μ L, 1 μ L, 2.5 μ L, 5 μ L, 7.5 μ L, 10 μ L, 12.5 μ L y 15 μ L de BSA, más el volumen de agua mili Q necesario para llegar a 20 μ L, más 1 mL de reactivo de Bradford. Cada tubo se agitó e incubó a temperatura ambiente (TA) durante 5 min y se midió la A_{595} nm. Se obtuvo el promedio de A_{595} nm para cada concentración de BSA, se graficó la curva promedio y la ecuación de la recta fue obtenida. Se prepararon los extractos celulares de las muestras para cuantificación de proteína; el volumen de extracto utilizado fue variable en función de la fase y temperatura de crecimiento. Sin embargo, todas se aforaron a 20 μ L con agua miliQ y se incubaron por 5 min a TA tras añadir 1 mL de reactivo de Bradford. La A_{595} nm fue determinada y la concentración de proteína se obtuvo con la ecuación de la recta de la curva promedio de calibración.

5.6 Actividad enzimática

Todos los ensayos de actividad enzimática fueron realizados en extractos celulares crudos. Los extractos y reactivos utilizados se mantuvieron en hielo durante los experimentos y los ensayos de las tres enzimas, SOD, catalasa y GPx, se llevaron a cabo a temperatura ambiente. El análisis de los datos de actividad de cada enzima se hizo en R (versión 3.5.1) mediante un análisis de ANOVA de una vía (nivel de significancia, α , de 0.05) y una prueba de comparaciones múltiples Tukey HSD ($\alpha = 0.05$).

5.6.1 Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad total de SOD (Cu/Zn-SOD y Mn-SOD) se determinó por el método de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) a formazán, adaptado de Spitz y Oberley (1989). Para este ensayo se utilizó mezcla de reacción (NBT 30.6 μ M, xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM y Na_2CO_3 0.122 mM), amortiguador de actividad (amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.4) y xantina oxidasa (XO, 0.168 unidades/mL diluida en sulfato de amonio 2 M).

Este método se basa en la reducción del NBT a formazán mediante O_2^- libre, generado enzimáticamente por la XO al oxidar a la xantina. SOD compite con el NBT por el O_2^- producido, de tal manera que la cantidad de formazán generado es inversamente proporcional a la actividad de SOD. La reducción del NBT a formazán se sigue espectrofotométricamente a una longitud de onda de 560 nm durante 15 min. Una unidad de actividad de SOD (U_{SOD}) es la cantidad de proteína que inhibe en un 50% la producción de formazán. A continuación se describe el procedimiento general del ensayo:

- (1) Se preparó un blanco de absorbancia (830 μ L de mezcla de reacción + 165 μ L de amortiguador de actividad) en celda de plástico de 1.5 mL y el espectrofotómetro se calibró a 0 en 560 nm.
- (2) Un 100% de reducción del NBT (celda 100%; 830 μ L de mezcla de reacción + 165 μ L de amortiguador de actividad + 16.5 μ L de XO) fue preparado y se leyó a 560 nm durante 15 min. Si la pendiente ($m_{100\%}$) cumplía con $0.015/\text{min} \geq m_{100\%} \geq 0.010/\text{min}$ se realizaba un triplicado de la celda 100% y se obtenía la $m_{100\%}$ promedio, si no cumplía con estas condiciones, se agregaba más o menos XO según el caso y se aforaba con amortiguador de actividad. Se determinó el 50% de reducción del NBT con: $m_{100\%}/2$.
- (3) A cada muestra se le midió la absorbancia a 560 nm durante 15 min en celdas problema (830 μ L de mezcla de reacción + extracto celular + amortiguador de actividad suficiente para llevarlo a un volumen total de 995 μ L, la reacción se inició con 16.5 μ L de XO) y a su respectivo blanco problema, que contiene todo lo anterior excepto XO. Se sustrajo la pendiente de la celda blanco problema (m_{blanco}) a la pendiente de la celda problema (m_{problema}): $m_{\text{problema}} - m_{\text{blanco}}$ y si la diferencia era $\sim m_{100\%}/2$, es decir, inhibía $\sim 50\%$ la reducción del NBT, se hacía el triplicado de la muestra con el volumen de extracto utilizado (dependiendo de la muestra entre 1 μ L y 25 μ L), si no cumplía con estas condiciones se repetía el ensayo con diferentes cantidades de extracto hasta encontrar el volumen adecuado.
- (4) Los cálculos de actividad específica de SOD se realizaron de acuerdo con Suzuki (2000), aplicables únicamente cuando $m_{\text{problema}} - m_{\text{blanco}}$ es un valor cercano a la mitad de la $m_{100\%}$, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$U_{SOD} = \left(\frac{m_{100\%p}}{(m_{prs} - m_{bprs})} \right) - 1$$

5.6.2 Catalasa

La actividad de catalasa fue determinada de acuerdo con Aebi (1984). Este método consiste en seguir espectrofotométricamente (a 240 nm, UV) la descomposición del H₂O₂ por la reacción de la catalasa. Para este ensayo se utilizó coctel de actividad (amortiguador de fosfato de sodio dibásico 100 mM, pH 7 y tritón x – 100 100 µL/L) y solución de H₂O₂ 500 mM. A continuación, se describe el procedimiento general del ensayo:

- (1) El espectrofotómetro fue calibrado a 0 en 240 nm (luz UV) con un blanco de absorbancia (3 mL de coctel de actividad) preparado en celda de cuarzo de 3 mL.
- (2) Se realizó un blanco de descomposición del H₂O₂ (2900 µL de coctel de actividad + 100 µL de H₂O₂) y se midió su absorbancia a 240 nm cada 15 s durante 3 min. La pendiente resultante fue igual a 0.
- (3) La actividad de catalasa de cada muestra fue determinada por triplicado en celdas problema (máx. 100 µL extracto celular + volumen de coctel de actividad suficiente para un volumen total de 2,900 µL, se incubó durante 2 min a TA y la reacción fue iniciada con 100 µL de H₂O₂) y sus respectivos blancos (máx. 100 µL extracto celular + volumen de coctel de actividad suficiente para un volumen total de 3,000 µL). La cantidad de extracto celular fue variable en función de la muestra (entre 5 µL – 75 µL). Se midió la absorbancia a 240 nm cada 15 s durante 3 min y se obtuvo la pendiente de la celda problema ($m_{problema}$) y la pendiente de su blanco (m_{blanco}). La diferencia de las pendientes: $m_{problema} - m_{blanco}$ fue utilizada para calcular la actividad específica de catalasa.
- (4) Las unidades de catalasa (U_{cat}) se definen como la cantidad de proteína (mg) que descompone un µmol de H₂O₂ en 1 min. Los cálculos de actividad se realizaron utilizando el coeficiente de extinción molar (ϵ) para el H₂O₂ = 43.6 M⁻¹ cm⁻¹ y la siguiente ecuación:

$$U_{cat} = \frac{\left(\frac{m_{pc} - m_{pb}}{43.6}\right)(\text{volumen de reacción en } \mu\text{L})}{\text{mg de proteína}}$$

5.6.3 Glutación peroxidasa (GPx)

El ensayo de actividad de GPx se llevó a cabo de acuerdo a Weydert y Cullen (2009). Al igual que el protocolo de SOD, este es un método indirecto de determinación de actividad. Sin embargo, el ensayo de GPx presentó una mayor dificultad debido a que necesita de más cofactores y coenzimas; GSH, H₂O₂ (para GPx selenio dependientes), glutación reductasa (GR) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH). La actividad de GPx se detectó espectrofotométricamente a 340 nm (luz UV y visible) por descomposición del NADPH, en la figura 9 se muestra la relación de esta coenzima con la actividad de GPx.

Para la determinación de la actividad se utilizó solución de ensayo (GSH 1.33 mM y GR 1.33 U/mL disueltos en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM y azida de sodio 1.1 mM), NADPH 4 mM y H₂O₂ 2.5 mM. El H₂O₂ se diluyó hasta alcanzar una absorbancia a 240 nm cercana a 0.099, como lo establece el protocolo. Esto es importante ya que, durante la estandarización del método utilizando otros protocolos, se observó que altas concentraciones de H₂O₂ provocan una disminución significativa en la absorbancia a 340 nm de la solución de ensayo con NADPH. A continuación, se describe el procedimiento general del ensayo:

- (1) El espectrofotómetro fue calibrado a 0 en 340 nm (luz UV y visible) con un blanco de absorbancia (1 mL de solución de ensayo) en celda de cuarzo de 1 mL.
- (2) La actividad de GPx de cada muestra fue determinada por triplicado en celdas problema (750 μL de solución de ensayo + 50 μL de NADPH + extracto celular y amortiguador de lisis suficientes para un volumen de 100 μL , se incubó a TA durante 2 min y la reacción se inició con 100 μL de H₂O₂) y sus respectivos blancos (750 μL de solución de ensayo + 50 μL de NADPH + extracto celular y amortiguador de lisis suficientes para un volumen de 100 μL, se incubó a TA durante 2 min). La cantidad de extracto varió en función de la muestra, entre 50

μL y $100 \mu\text{L}$. Se midió la absorbancia a 340 nm cada 10 s durante 2 min y se obtuvo la pendiente de la celda problema (m_{pG}) y la pendiente de su blanco (m_{bG}). La diferencia de las pendientes: $m_{pG} - m_{bG}$ fue utilizada para calcular la actividad específica de GPx.

- (3) Una unidad de GPx (U_{GPx}) es igual a $1 \mu\text{mol}$ de NADPH oxidado min^{-1} a la concentración de GSH utilizada o, en otras palabras, los μmoles de GSH producidos min^{-1} . Los cálculos de actividad volumétrica (U/mL de muestra) y específica (U/mg de proteína) de GPx se realizaron de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$U/\text{mL} = \left(\frac{m_{pG} - m_{bG}}{6.22} \right) \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \times \text{min} \right) (0.001 \text{ L}) \left(\frac{1000 \mu\text{moles}}{1 \text{ mol}} \right) (2 \mu\text{moles de GSH producido})$$

$$U/\text{mg} = (U/\text{mL})(\text{factor de dilución}) \left(\frac{1}{\text{concentración de proteína} \left\{ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right\}} \right)$$

Factor de dilución = 10 para $100 \mu\text{L}$ de extracto.

5.7 Bioinformática

5.7.1 Establecimiento de la muestra y descarga de secuencias

Se buscó en la literatura levaduras reportadas como adaptadas al frío (psicrófilas o psicrotolerantes) y mesófilas. Se determinó si éstas contaban con genoma y proteoma secuenciado mediante una búsqueda en la base de datos *Genome* del NCBI. Solo cuatro levaduras adaptadas al frío contaron con genoma y proteoma secuenciado, dos del phylum Basidiomycota (*Rhodotorula sp.* JG - 1b y *Moesziomyces antarcticus*) y dos del phylum Ascomycota (*Pseudogymnoascus destructans* y *Rachicladosporium antarcticum*).

El proteoma de las cuatro levaduras adaptadas al frío fue descargado (en formato FASTA), así como el de cuatro levaduras mesófilas, dos basidiomicetos (*Malassezia pachydermatis* y *Trichosporon asahii*) y dos ascomicetos (*Exophiala mesophila* y *Saccharomyces cerevisiae*). Se utilizó un total de 52,126 secuencias proteicas en el análisis estadístico, 27,243 de levaduras adaptadas al frío y 24,883 de levaduras mesófilas (Tabla 4). Adicionalmente, se buscaron

secuencias proteicas de cepas adaptadas al frío y mesófilas de *R. mucilaginosa*. De la cepa antártica *R. mucilaginosa* AN5 únicamente se encontró la secuencia de 7 proteínas, y de la cepa mesófila *R. mucilaginosa* RIT389 se encontraron solamente 31 proteínas secuenciadas (tabla 5).

Cepa	Clasificación	Preferencia térmica	Procedencia	Cantidad de secuencias proteicas analizadas	No. de acceso (GneBank, NCBI)	Referencias
<i>Rhodotorula. sp.</i> JG - 1b	Basidiomycota(Pucciniomycotina(Microbotryomycetes(Sporidiobolales(Sporidiobolaceae(<i>Rhodotorula</i> (<i>Rhodotorula sp.</i> JG-1b))))))	Adaptada al frío	Suelos de permafrost de los Valles Secos de McCurdo, Antártica	6,579	LQXB0000000	Goordial <i>et al.</i> , 2016.
<i>Moesziomyces antarcticus</i> JCM 10317	Basidiomycota(Ustilaginomycotina(Ustilaginomycetes(Ustilaginales(Ustilaginaceae(<i>Moesziomyces</i> (<i>Moesziomyces antarcticus</i>))))))	Adaptada al frío	Sedimento lacustre antártico	3,692	BBIZ01000001-BBIZ01000276, DF830068-DF830264	Saika <i>et al.</i> , 2014.
<i>Pseudogymnoascus destructans</i> 20631-21	Ascomycota(Pezizomycotina(Leotiomycetes(Leotiomycetes(<i>incertae sedis</i> (Pseudeurotiaceae(<i>Pseudogymnoascus</i> (<i>Pseudogymnoascus destructans</i>))))))	Adaptada al frío	Un pequeño murciélago café (<i>Myotis lucifugus</i>) colectado en NY, USA	8,650	LAJJ000000000	Chibucos <i>et al.</i> , 2013; Palmer <i>et al.</i> , 2018.
<i>Rachicladosporium antarcticum</i> CCFEE 5527	Ascomycota(Pezizomycotina(Dothideomycetes(Dothideomycetidae(Capnodiales(Cladosporiaceae(<i>Rachicladosporium</i> (<i>Rachicladosporium antarcticum</i>))))))	Adaptado al frío	Rocas de la Península Antártica	8,322	NAJ001000000, NAEU01000000	Coleine <i>et al.</i> , 2017.
<i>Malassezia pachydermatis</i> CBS 1879	Basidiomycota(Ustilaginomycotina(Malasseziomycetes(Malasseziales(Malasseziaceae(<i>Malassezia</i> (<i>Malassezia pachydermatis</i>))))))	Mesófila	Conducto auditivo de un perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)	3,631	LGAV01000000.1	Triana <i>et al.</i> , 2015; Hoog, 2000.
<i>Trichosporon asahii</i> CBS 2479	Basidiomycota(Agaricomycotina(Tremellomycetes(Trichosporonales(Trichosporonaceae(<i>Trichosporon</i> (<i>Trichosporon asahii</i>))))))	Mesófila	Lesión de paciente (<i>Homo sapiens</i>) con psoriasis progresiva	6,899	ALBS01000000	Yang <i>et al.</i> , 2012.
<i>Exophiala mesophila</i> CBS 40295	Ascomycota(Pezizomycotina(Eurotiomycetes(Chaetothyriomycetidae(Chaetothyriales(Herpotrichiaceae(<i>Exophiala</i> (<i>Exophiala mesophila</i>))))))	Mesófila	Sello de silicona en un hospital de Hamburgo, Alemania	8,670	JYBW00000000	Porteous <i>et al.</i> , 2003.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	Ascomycota(Saccharomycotina(Saccharomycetes(Saccharomycetales(Saccharomycetaceae(<i>Saccharomyces</i> (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>))))))	Mesófila	Cepa de laboratorio S288C. Proviene de la cepa EM93, aislada de un higo podrido	5,683	PRJNA128, PRJNA43747	Engel <i>et al.</i> , 2014; Salinas, 2014.

Tabla 4. Cepas y cantidad de secuencias utilizadas de cada una para el análisis estadístico.

Tabla 5. Proteínas de *R. mucilaginosa* AN5 y *R. mucilaginosa* RIT389 utilizadas para el análisis estadístico.

Cepa	Clasificación	Preferencia térmica	Procedencia	Cantidad de secuencias proteicas analizadas	Proteínas analizadas (No. de acceso NCBI)	Referencias
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> . AN5	Basidiomycota(Pucciniomycotina(Microbotryomycetes(Sporidiobolales(Sporidiobolaceae(<i>Rhodotorula</i> (<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> . AN5))))))	Adaptada al frío	Hielo marino antártico.	7	ASD55042, APO20773.1 ANQ47096, ANQ47095, AIK01831, QEO33296, APB88859	Kan, 2016. (direct submission)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> . RIT389	Basidiomycota(Pucciniomycotina(Microbotryomycetes(Sporidiobolales(Sporidiobolaceae(<i>Rhodotorula</i> (<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> . RIT389))))))	Mesófila	Nigeria, África, colonizando a <i>Distemonanthus benthamianus</i> .	31	YP_009443037, YP_009443040, YP_009443039, YP_009443038, YP_009443036, YP_009443035, YP_009443034, YP_009443031, YP_009443032, YP_009443030, YP_009443029, YP_009443027, YP_009443028, YP_009443026, YP_009443023, YP_009443025, YP_009443024, YP_009443022, YP_009443021, YP_009443017, YP_009443020, YP_009443019, YP_009443018, YP_009443016, YP_009443015, YP_009443014, YP_009443013, YP_009443012, YP_009443011, YP_009443010, YP_009443033.1	Gan <i>et al.</i> , 2017.

Todas las levaduras del presente trabajo pertenecen al subreino Dikarya y están distribuidas en 5 de sus 6 subphyla (Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina, Agaromycotina, Taphrinomycotina, Saccharomycotina y Pezizomycotina), según la clasificación filogenética propuesta en 2007 por Hibbett y colaboradores (fig. 14).

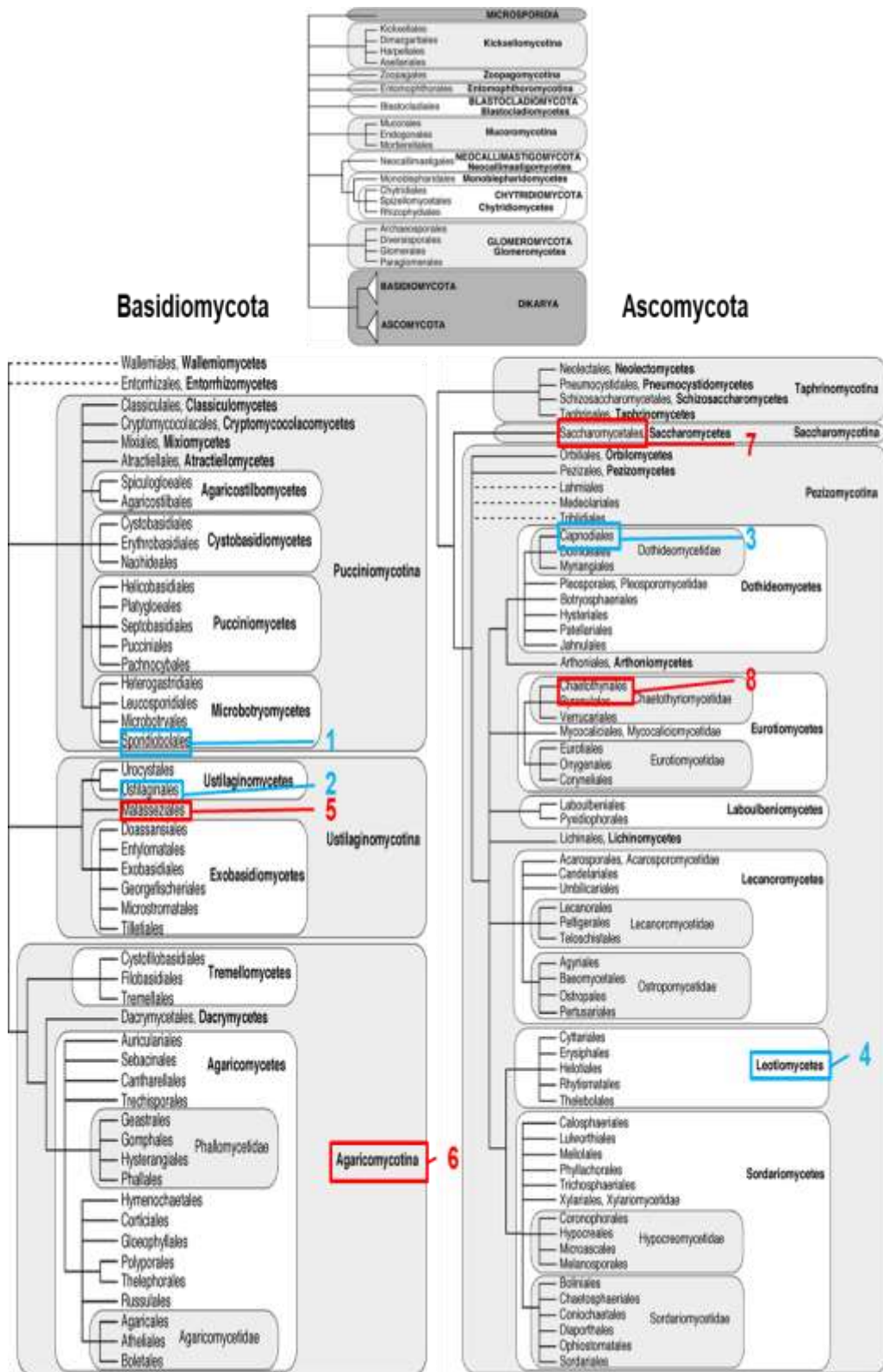


Figura 14. Hipótesis filogenética del reino Fungi propuesta por Hibbett *et al.*, (2014). Los rectángulos (azules, adaptadas al frío; rojos, mesófilas) enmarcan la clase u orden al que pertenecen las levaduras utilizadas en el presente trabajo. 1, *R. sp. JG - 1b/R. mucilaginosa* AN5/*R. mucilaginosa* RIT389; 2, *M. antarcticus* JCM 10317; 3, *R. antarcticum* CCFFEE 5527; 4, *P. destructans* 20631-21; 5, *M. pachydermatis* CBS 1879; 6, *T. ashii* CBS 2479; 7, *S. cerevisiae* S288C y 8, *E. mesophila* CBS 40295.

5.7.2 Determinación del porcentaje de aminoácidos

Las secuencias de todas las levaduras fueron analizadas con la herramienta EMBOSS Pepstats del Instituto Europeo de Bioinformática (Chojnacki *et al.*, 2017), la cual calcula el porcentaje de cada aminoácido en la secuencia problema (*input*), la masa molecular de la proteína, la cantidad de residuos, la carga, el punto isoeléctrico, el coeficiente de extinción molar entre otras características.

Una consideración importante al trabajar con una gran cantidad de secuencias es que esta herramienta sólo acepta un *input* con máximo 500 secuencias y un peso menor o igual a 1 MB. Particularmente, en este trabajo las secuencias (en formato FASTA) se analizaron repartidas en poco más de 100 archivos *.txt*.

Los porcentajes calculados para cada aminoácido fueron transferidos a una hoja de Excel (guardada como archivo CSV, delimitado por comas). Esta base de datos se utilizó para la estadística descriptiva e inferencial.

En los paquetes estadísticos STATISTICA y R (versión 3.5.1) se calculó el porcentaje promedio de cada aminoácido en las proteínas de levaduras adaptadas al frío ($n = 27,243$), en las proteínas de levaduras mesófilas ($n = 24,883$), en las proteínas de *R. mucilaginosa* AN5 (adaptada al frío; $n = 7$) y en las proteínas de *R. mucilaginosa* RIT389 (mesófila; $n = 31$), junto con la desviación estándar correspondiente. Ambos paquetes llegaron a los mismos resultados y los datos descriptivos fueron graficados en GraphPad Prism 7.00.

5.7.3 Análisis estadístico

El análisis del porcentaje de cada aminoácido en las proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas se realizó mediante un diseño de factoriales con dos criterios de clasificación, en un modelo de ANOVA de dos vías y con un nivel de significancia (α) de 0.05 (ecuación 5). Éste se llevó a cabo en STATISTICA y R, ambos paquetes estadísticos generaron resultados similares. Aquí se presentan los estadísticos de prueba generados con R.

Se definió como variable de respuesta al porcentaje de cada uno de los 20 aminoácidos (% Ala, % Gly, % Arg, % Pro... % aaX), como factores a la

preferencia térmica y al phylum y como niveles de factor a secuencias de levaduras adaptadas al frío/secuencias de levaduras mesófilas y secuencias de ascomicetos/secuencias de basidiomicetos, respectivamente.

$$Y_{ij} = \mu + \zeta_i + \beta_j + (\zeta\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad (5)$$

Y_{ij} : % aaX

μ : % promedio de aaX en las proteínas.

ζ_i : efecto de la preferencia térmica (adaptadas al frío/mesófilas).

β_j : efecto del phylum (Ascomycota/Basidiomycota).

$(\zeta\beta)_{ij}$: efecto de la interacción entre la preferencia térmica y el phylum.

ε_{ij} : error aleatorio.

Además, utilizando un modelo de ANOVA de una vía y con un nivel de significancia (α) de 0.05 (ecuación 6), se comparó el porcentaje de cada aminoácido entre las proteínas de basidiomicetos adaptados al frío ($n = 10,271$), basidiomicetos mesófilos ($n = 10,530$), *R. mucilaginosa* AN5 (adaptada al frío; $n = 7$) y *R. mucilaginosa* RIT389 (mesófila; $n = 31$). Posteriormente, se realizó una prueba de Tukey HSD ($\alpha = 0.05$) para determinar entre qué levaduras hay diferencias estadísticamente significativas, para cada aminoácido. Estos análisis fueron realizados y graficados en R (versión 3.5.1).

$$Y_{ij} = \mu + \zeta_i + \varepsilon_i \quad (6)$$

Y_{ij} : % aaX

μ : % promedio de aaX en las proteínas.

ζ_i : efecto de la preferencia térmica (adaptadas al frío/mesófilas).

ε_i : error aleatorio.

6. Resultados

6.1 Bioquímica

6.1.1 *R. mucilaginosa* alcanza una densidad óptica mayor al crecer a 4 °C que a 28 °C, pero crece 8 veces más rápido a 28 °C

El crecimiento de *R. mucilaginosa* fue 8 veces más rápido a 28 °C (tiempo de duplicación [TD] = 3 h) que a 4 °C (TD = 24 h). Sin embargo, la biomasa total al final de la fase estacionaria fue mayor a 4 °C (D.O._{339.5h} = 19.85 ± 1.988) que a 28 °C (D.O._{52.25h} = 11.40 ± 0.746) (fig. 15). Cabe mencionar que la coloración aparente de los cultivos cambió dependiendo de la temperatura y el tiempo de crecimiento; a mayor tiempo de crecimiento éstos tuvieron una coloración rosada-naranja más intensa en ambas temperaturas de crecimiento. Sin embargo, el fenómeno fue más marcado a 4 °C y se atribuye a la producción de carotenoides (fig. 16).

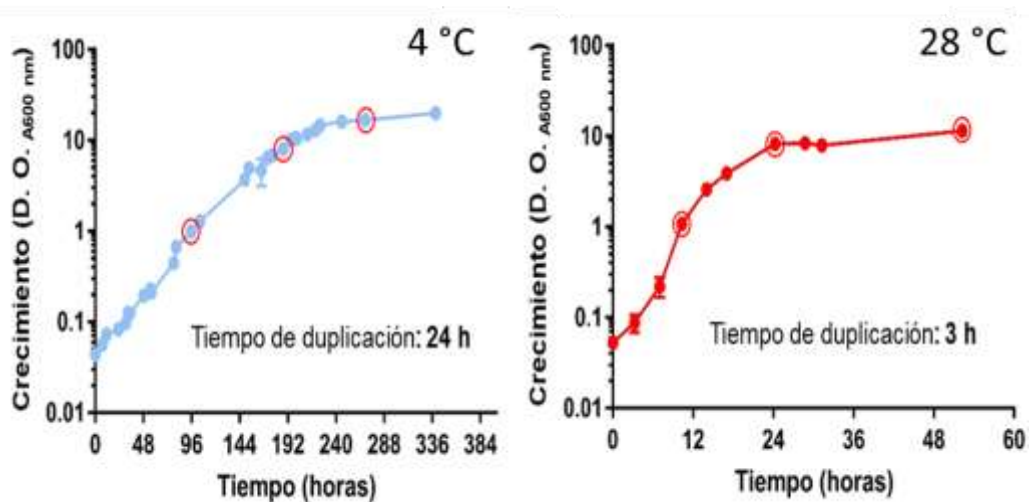


Figura 15. Crecimiento de *R. mucilaginosa* a 4 °C (azul) y 28 °C (rojo). Los círculos rojos encierran los puntos en los que se tomó muestra para medir actividad enzimática.

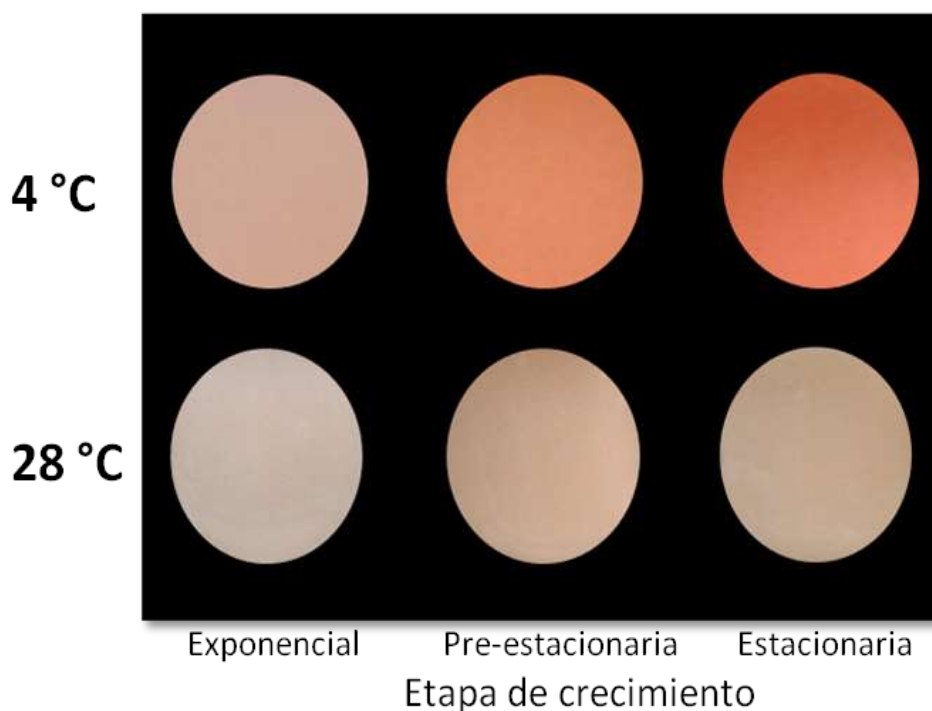


Figura 16. Coloración de los cultivos de *R. mucilaginosa* a 4 °C y 28 °C en diferentes etapas de crecimiento. Nótese que en ambas temperaturas hay un cambio en la coloración de los cultivos dependiente de la etapa de crecimiento, sin embargo, el fenómeno es más marcado en los cultivos crecidos a 4 °C.

6.1.2 Actividad de enzimas antioxidantes (SOD, catalasa y GPx)

6.1.2.1 Actividad de SOD; la actividad de SOD es máxima en la fase exponencial de cultivos crecidos a 4 °C y 28 °C

En ambas temperaturas de crecimiento, 4 °C y 28 °C, se observó un perfil de actividad de SOD muy similar, asociado a la etapa de crecimiento, con un alto nivel de actividad durante la fase exponencial de crecimiento y una fuerte reducción al disminuir la velocidad de crecimiento en las fases pre-estacionaria y estacionaria. El cultivo crecido a 28 °C tuvo 4 veces más actividad en la fase exponencial que en la fase pre-estacionaria ($p = 0.00083$), mientras que en el cultivo crecido a 4 °C la actividad fue 2.5 veces más alta en la fase exponencial que en la pre-estacionaria de crecimiento ($p = 0.0249$). SOD tuvo un valor máximo de actividad en la fase exponencial del cultivo crecido a 28 °C (34.99 ± 12.07 U/mg de proteína), sin embargo, no mostró diferencias estadísticamente significativas con la actividad en esta misma fase del cultivo crecido a 4 °C (27.53 ± 4.34 U/mg de proteína; $p = 0.5833$). Los niveles de actividad en las fases pre-

estacionaria y estacionaria de ambas temperaturas de crecimiento se mantuvieron constantes y tuvieron valores sin diferencias estadísticamente significativas (tabla 6, fig. 17).

Tabla 6. Actividad de SOD en *R. mucilaginosa* M94C9 en dos temperaturas de crecimiento y diferentes fases del cultivo.

Cepa	Fase de crecimiento	Condiciones de cultivo (Medio/ temperatura/ agitación)	Método de ensayo de actividad	pH/temperatura del ensayo	Actividad de cultivos crecidos a su temperatura óptima (U/mg)	Actividad de cultivos crecidos por debajo de su temperatura óptima (U/mg)
<i>R. mucilaginosa</i> M94C9	Exponencial	YM glucosa 1%/28 °C y 4 °C/180 rpm	Reducción del NBT	7.4/TA	34	29
<i>R. mucilaginosa</i> M94C9	Pre-estacionaria	YM glucosa 1%/28 °C y 4 °C/180 rpm	Reducción del NBT	7.4/TA	9	10
<i>R. mucilaginosa</i> M94C9	Estacionaria	YM glucosa 1%/28 °C y 4 °C/180 rpm	Reducción del NBT	7.4/TA	10	9

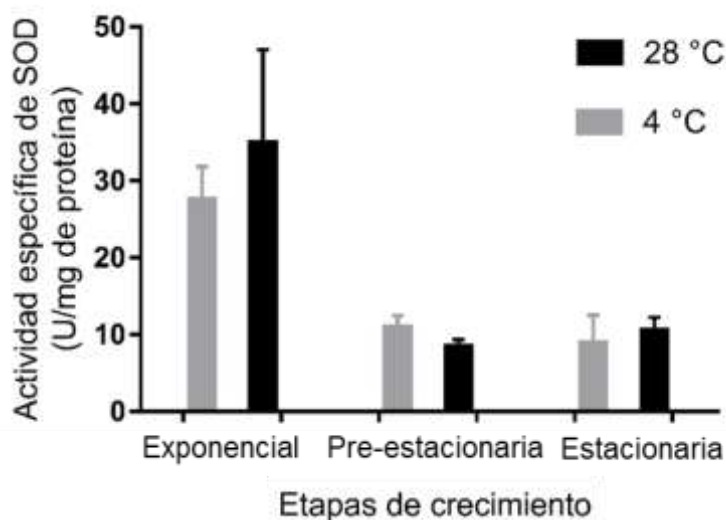


Figura 17. Actividad específica de SOD en extractos celulares crudos de cultivos crecidos a 4 °C (gris) y 28 °C (negro) y obtenidos en diferentes etapas de crecimiento. Una unidad de SOD se define como la cantidad de proteína necesaria para inhibir el 50% de producción de formazán.

6.1.2.2 Actividad de catalasa; la actividad de catalasa es máxima en la fase exponencial de cultivos crecidos a 4 °C, en cultivos crecidos a 28 °C es máxima durante la fase estacionaria

El patrón de actividad de esta enzima es muy distinto entre los cultivos crecidos a 28 °C y los crecidos a 4 °C. En el primer caso se observa una actividad máxima en la fase estacionaria de crecimiento, mientras que en el segundo caso el valor

máximo de actividad se observa en la fase exponencial. En el cultivo a 28 °C la actividad en la fase estacionaria fue 11.4 veces mayor que en de la fase pre-estacionaria ($p = 0.0000$) y 7.5 veces mayor que en la fase exponencial de crecimiento ($p = 0.0000$). Sin embargo, los niveles de actividad en estas últimas dos fases no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.9988$). El cultivo a 4 °C mostró un patrón inverso, los niveles de actividad disminuyeron con el tiempo de crecimiento; la fase exponencial tuvo 6.4 veces más actividad que la fase pre-estacionaria ($p = 0.000099$) y casi 4 veces más que la fase estacionaria ($p = 0.00058$). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la actividad de estas dos últimas fases, pre-estacionaria y estacionaria, del cultivo crecido a 4 °C ($p = 0.9988$). En todas las fases de crecimiento del cultivo crecido a 28 °C la actividad fue significativamente mayor que en cultivo crecido a 4 °C; la fase exponencial tuvo 1.8 veces más actividad ($p = 0.0002294$), la fase pre-estacionaria 7.5 veces más ($p = 0.0000056$) y en la fase estacionaria los niveles fueron 51.4 veces más altos ($p = 0.0000$) que en esta misma fase del cultivo crecido a 4 °C. La actividad en las fases exponencial y pre-estacionaria de los cultivos crecidos a 4 °C y 28 °C, respectivamente, no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.9387715$, tabla 7, fig. 18).

Tabla 7. Actividad de catalasa en *R. mucilaginosa* M94C9 en dos temperaturas de crecimiento y diferentes fases del cultivo.

Cepa	Fase de crecimiento	Condiciones de cultivo	Método	pH/temperatura	Actividad de cultivos crecidos a su temperatura óptima ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$)	Actividad de cultivos crecidos por debajo de su temperatura óptima ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$)
<i>R. mucilaginosa</i> M94C9	Exponencial	YM glucosa 1%/28 °C y 4 °C/180 rpm	Descomposición del H_2O_2 a 240 nm	7/TA	0.2	0.1
<i>R. mucilaginosa</i> M94C9	Pre-estacionaria	YM glucosa 1% / 28 °C/180 rpm	Descomposición del H_2O_2 a 240 nm	7/TA	0.15	0.01
<i>R. mucilaginosa</i> M94C9	Estacionaria	YM glucosa 1% / 28 °C/180 rpm	Descomposición del H_2O_2 a 240 nm	7/TA	1.5	0.015

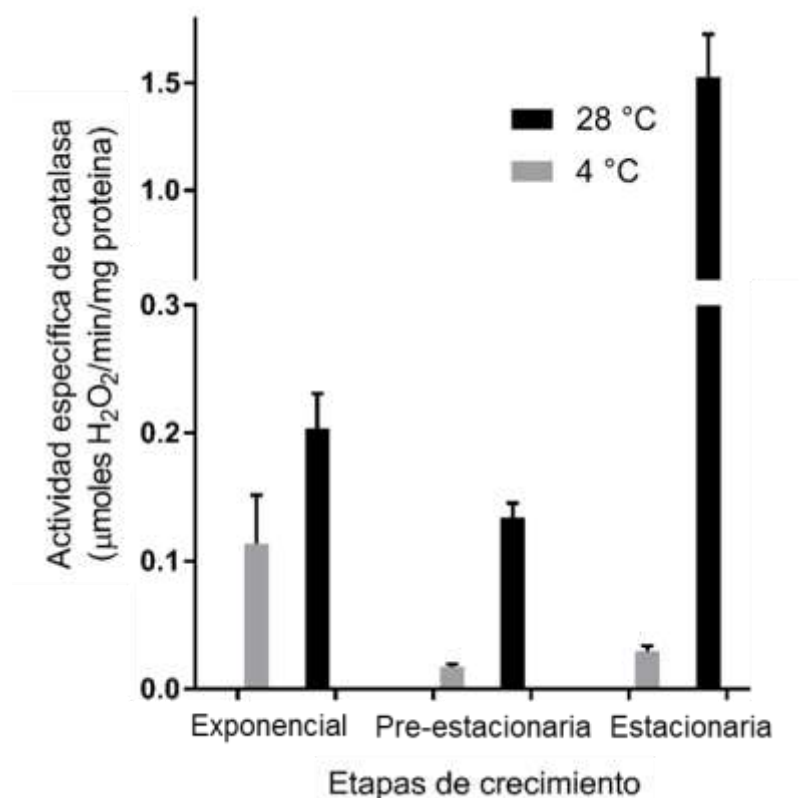


Figura 18. Actividad específica de catalasa en extractos celulares crudos de diferentes etapas de crecimiento de cultivos incubados a 4 °C y 28 °C. La actividad aumento con el tiempo en el cultivo crecido a 28 °C y mostró el patrón inverso en el cultivo crecido a 4 °C. En general, el cultivo a 28 °C tuvo niveles más altos de actividad en cada una de las fases de crecimiento que el cultivo crecido a 4 °C.

6.1.2.3 Actividad de GPx; la actividad de GPx es máxima en la fase exponencial de cultivos crecidos a 4 °C y 28 °C

El patrón de actividad fue muy similar en ambas temperaturas de crecimiento, 4 °C y 28 °C, y también fue similar al perfil de actividad observado en la SOD; en ambas enzimas se observa un patrón de actividad asociado al crecimiento, donde la actividad es mayor en la fase exponencial y decrece a medida que el cultivo disminuye su velocidad de crecimiento. El valor máximo de actividad se obtuvo en la fase exponencial del cultivo crecido a 28 °C (0.144 ± 0.025 µmoles H₂O₂/min/mg), sin embargo, no mostró diferencias estadísticamente significativas con la actividad en esta misma fase del cultivo crecido a 4 °C ($p = 0.2606$). La actividad en la fase exponencial del cultivo crecido a 28 °C fue 17 y 22 veces más alta que la actividad de la fase pre-estacionaria ($p = 0.0000$) y estacionaria ($p = 0.0000$), respectivamente. Estas diferencias fueron menos marcadas en el cultivo crecido a 4 °C, la fase exponencial tuvo casi 5 veces más

actividad que la fase pre-estacionaria ($p = 0.001$) y 6 veces más que la estacionaria ($p = 0.00053$). La actividad en las fases pre-estacionaria y estacionaria de ambas temperaturas de crecimiento se mantuvo constante y sus valores no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Los niveles de actividad en ambas temperaturas de crecimiento fueron similares para cada una de las fases (tabla 8, fig. 19).

Tabla 8. Actividad de GPx en *R. mucilaginosa* M94C9 en dos temperaturas de crecimiento y diferentes fases del cultivo.

Cepa	Fase de crecimiento	Medio de cultivo	Método	pH/temperatura	Actividad de cultivos crecidos a su temperatura óptima ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$)	Actividad de cultivos crecidos por debajo de su temperatura óptima ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$)
<i>R. mucilaginosa</i> M94C9	Exponencial	YM glucosa 1% / 28 °C/180 rpm	Descomposición del NADPH a 340 nm	7.4/TA	0.14	0.1
<i>R. mucilaginosa</i> M94C9	Pre-estacionaria	YM glucosa 1% / 28 °C/180 rpm	Descomposición del NADPH a 340 nm	7.4/TA	0.007	0.015
<i>R. mucilaginosa</i> M94C9	Estacionaria	YM glucosa 1% / 28 °C/180 rpm	Descomposición del NADPH a 340 nm	7.4/TA	0.007	0.01

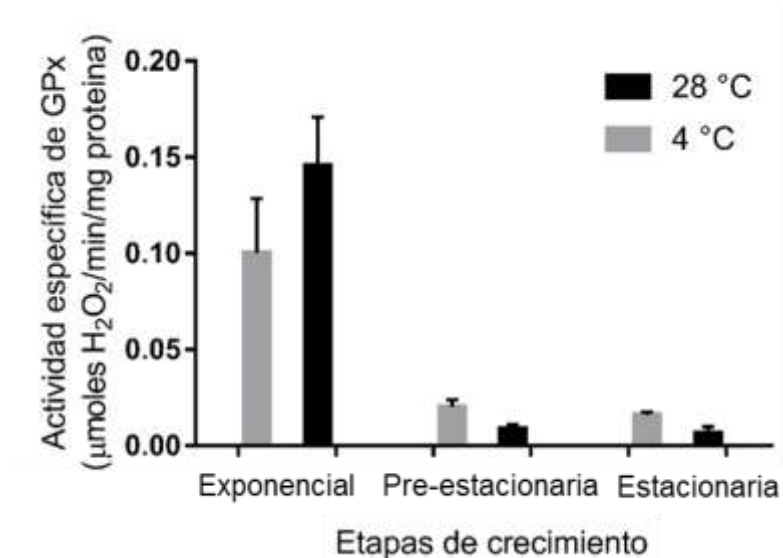


Figura 19. Actividad específica de GPx en extractos celulares crudos de cultivos crecidos a 4 °C y 28 °C y obtenidos en diferentes etapas de crecimiento.

6.1.2.4 SOD vs catalasa vs GPx; la catalasa de cultivos crecidos a 28 °C fue la única con una actividad máxima en la fase estacionaria

El patrón general de actividad de las tres enzimas fue muy similar en casi todas las condiciones; hubo una disminución a medida que el cultivo incrementaba su tiempo de crecimiento. La única excepción fue la actividad de catalasa del cultivo crecido a 28 °C, la cual mostró un patrón inverso (tabla 9, fig. 20). En la fase exponencial de crecimiento la actividad de catalasa del cultivo crecido a 28 °C fue similar sólo a la actividad de GPx del cultivo crecido a 28 °C en esta misma etapa de crecimiento ($p = 0.0618$). Sin embargo, en el cultivo crecido a 4 °C la actividad de catalasa fue similar a la actividad de GPx en ambas temperaturas de crecimiento, 4 °C y 28 °C de esta misma fase ($p = 0.997279$ y $p = 0.7057033$, respectivamente). La actividad de GPx de la fase exponencial en ambas temperaturas de crecimiento, 4 °C y 28 °C no mostró diferencias significativas con la actividad de catalasa de la fase pre – estacionaria del cultivo crecido a 28 °C ($p = 0.4808775$ y $p = 0.9997586$, respectivamente). En las fases pre-estacionaria y estacionaria de crecimiento los niveles de actividad de GPx y catalasa se mantuvieron constantes en casi todas las condiciones (excepto en la catalasa del cultivo crecido a 28 °C durante la fase estacionaria de crecimiento).

Tabla 9. Porcentaje de actividad de SOD, catalasa y GPx en *R. mucilaginosa* M94C9 en dos temperaturas de crecimiento y diferentes fases del cultivo. Se consideró como 100% de actividad al valor más alto obtenido para cada enzima.

Fase de crecimiento	% de actividad de SOD (4 °C)	% de actividad de SOD (28 °C)	% de actividad de catalasa (4 °C)	% de actividad de catalasa (28 °C)	% de actividad de GPx (4 °C)	% de actividad de GPx (28 °C)
Exponencial	100	100	100	13.32	100	100
Pre-estacionaria	39.70	24.27	15.63	8.78	20.01	5.92
Estacionaria	32.36	30.22	26.18	100	15.83	4.57

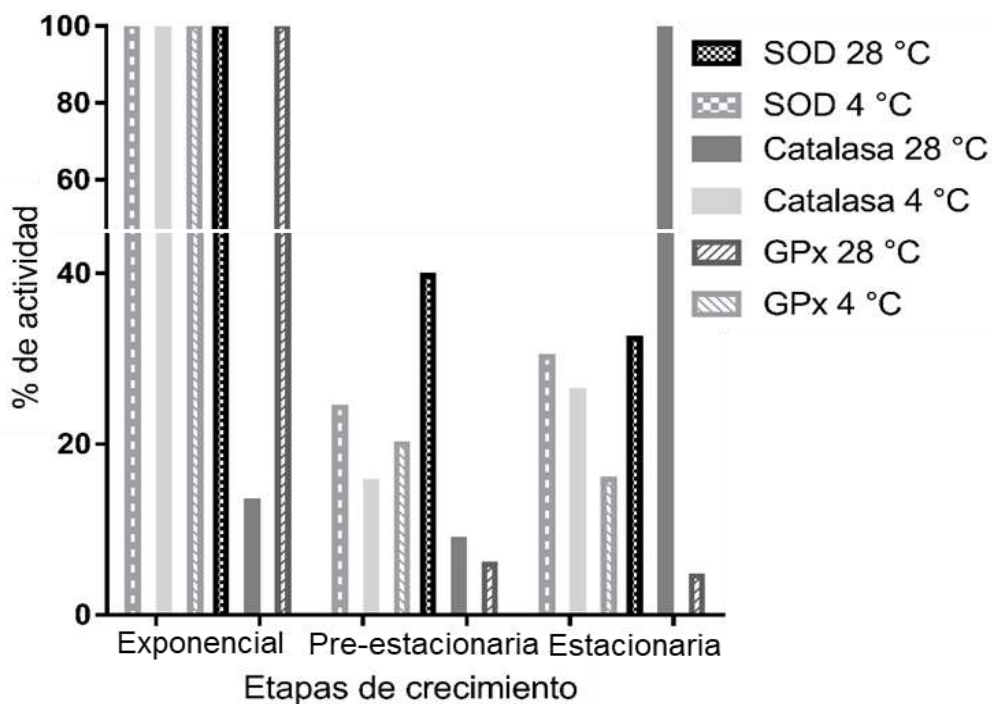


Figura 20. Porcentaje de actividad de cada enzima a 4 °C y 28 °C. Nótese que la catalasa de los cultivos crecidos a 28 °C es la única enzima que aumenta su actividad en la fase estacionaria de crecimiento con respecto a la exponencial. Se tomó como 100% de actividad al valor máximo obtenida para cada enzima en cada temperatura de crecimiento.

6.2 Bioinformática

6.2.1 Porcentaje de aminoácidos en proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas y en *R. mucilaginosa* AN5 (adaptada al frío) y *R. mucilaginosa* RIT398 (mesófila)

El aminoácido más frecuente en las proteínas de levaduras adaptadas al frío fue Ala (9.99 ± 2.87 %), seguido de Leu, Ser, Gly, Arg, Val, Pro, Glu, Thr, Asp, Lys, Ile, Gln, Phe, Asn, Tyr, His, Met, Trp y, finalmente, Cys, con sólo un 1.18 ± 1.06 %. Las proteínas de levaduras mesófilas mostraron un mayor porcentaje de Leu (8.95 ± 2.46 %) que de cualquier otro aminoácido y, al igual que en las proteínas de levaduras adaptadas al frío, el aminoácido menos frecuente fue Cys, con sólo un 1.23 ± 1.07 % (tabla 6, fig. 21). En el caso de las proteínas de *R. mucilaginosa* AN5, el aminoácido más frecuente fue Ala (11.67 ± 3.99 %), seguido de Leu, Gly, Pro, Ser, Lys, Val, Thr, Asp, Glu, Gln, Ile, Asn, Phe, Tyr, Cys, Arg, His, Trp y Met, con un 1.58 ± 0.96 %), mientras que las proteínas de *R. mucilaginosa* RIT389, tuvieron un porcentaje de Leu mayor al de cualquier otro aminoácido ($13.33 \pm$

055 %) y el menos frecuente fue Cys, con un 0.91 ± 0.73 %. En la tabla 10 se muestra el porcentaje promedio y la desviación estandar de cada aminoácido en las proteínas analizadas en el presente trabajo.

Tabla 10. Porcentaje promedio y desviación estándar de cada aminoácido en proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas y en *R. mucilaginosa* AN5 (adaptada al frío) y *R. mucilaginosa* RIT398 (mesófila).

Aminoácido	% en proteínas de levaduras adaptadas al frío	% en proteínas de levaduras mesófilas	% en proteínas de <i>R. mucilaginosa</i> AN5	% en proteínas de <i>R. mucilaginosa</i> RIT398
Ala	9.99 ± 2.87	8.55 ± 3.04	11.68 ± 3.99	7.06 ± 2.75
Leu	8.81 ± 2.53	8.95 ± 2.46	9.32 ± 4.8	13.33 ± 3.05
Ser	8.18 ± 2.80	8.23 ± 2.89	6.66 ± 3.97	7.93 ± 2.38
Gly	7.24 ± 2.63	6.51 ± 2.55	7.12 ± 1.70	6.29 ± 2.30
Arg	6.37 ± 2.36	5.93 ± 2.36	3.30 ± 1.36	3.80 ± 1.73
Val	6.18 ± 2.00	6.15 ± 1.88	5.62 ± 2.07	7.72 ± 2.54
Pro	6.17 ± 2.53	5.97 ± 2.55	6.98 ± 2.52	4.18 ± 1.37
Glu	6.13 ± 2.53	6.09 ± 2.36	4.47 ± 2.74	3.47 ± 1.45
Thr	6.00 ± 1.95	5.96 ± 1.96	5.44 ± 1.04	6.55 ± 1.71
Asp	5.57 ± 1.99	5.70 ± 1.93	5.14 ± 2.08	3.31 ± 1.84
Lys	4.83 ± 2.48	5.36 ± 2.77	6.59 ± 1.91	3.42 ± 2.05
Ile	4.35 ± 1.74	4.88 ± 1.98	4.14 ± 2.14	6.70 ± 2.57
Gln	3.89 ± 1.78	4.04 ± 1.77	4.21 ± 2.70	3.36 ± 1.51
Phe	3.39 ± 1.52	3.65 ± 1.71	3.47 ± 1.87	6.21 ± 2.58
Asn	3.20 ± 1.42	3.88 ± 1.94	3.63 ± 2.14	3.98 ± 1.73
Tyr	2.57 ± 1.38	2.81 ± 1.35	3.60 ± 1.52	4.54 ± 1.46
His	2.37 ± 1.21	2.44 ± 1.22	2.18 ± 1.43	2.72 ± 1.53
Met	2.13 ± 1.07	2.25 ± 1.03	1.58 ± 0.96	3.08 ± 1.05
Trp	1.37 ± 0.94	1.35 ± 0.93	1.73 ± 1.52	1.36 ± 1.02
Cys	1.18 ± 1.06	1.23 ± 1.07	3.09 ± 5.33	0.91 ± 0.73

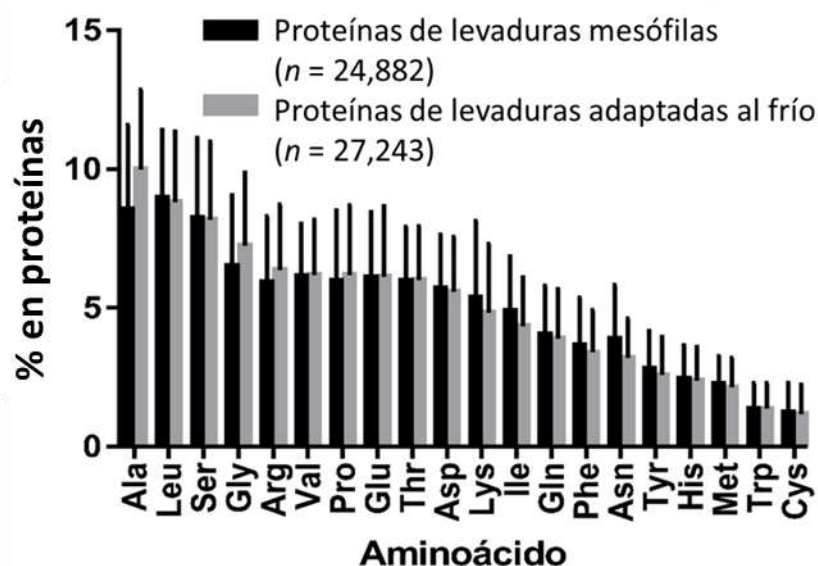


Figura 21. Frecuencia relativa de cada aminoácido en proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas.

6.2.2 Análisis factorial; 18 de los 20 aminoácidos muestran diferencias significativas entre proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas

La interacción entre la preferencia térmica (adaptadas al frío/mesófilas) y el phylum (Ascomycota/Basidiomycota) tuvo efecto significativo sobre el porcentaje de la mayoría de aminoácidos. Asp y Cys fueron los únicos aminoácidos en los que la combinación de estos dos factores no fue significativa sobre su frecuencia, $p = 0.2632$ y $p = 0.539$, respectivamente. Sin embargo, los factores individuales, preferencia térmica y phylum, sí tuvieron efecto significativo sobre el porcentaje de Asp ($p = 86 \times 10^{-13}$ y $p = 0.0446$, respectivamente) y Cys ($p = 7.09 \times 10^{-9}$ y $p = 1.31 \times 10^{-11}$, respectivamente). Además de tener efecto sobre Asp y Cys, los efectos principales también influyeron significativamente sobre el porcentaje de casi todos los aminoácidos; Ser fue el único caso donde la diferencia entre basidiomicetos y ascomicetos no fue significativa ($p = 0.8596$) y Thr y Glu donde las proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas presentaron el mismo porcentaje ($p = 0.101$ y $p = 0.19$, respectivamente).

De los 18 aminoácidos con diferencias significativas (excluyendo Thr y Glu) entre proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas, sólo 6 mostraron un aumento en proteínas de levaduras adaptadas al frío con respecto a mesófilas, los otros 12 tuvieron una disminución en su frecuencia. El que presentó un aumento

mayor fue Ala, con un incremento del 16.90 % en proteínas de levaduras adaptadas al frío ($p = 2.00E-16$), seguido de Gly, Arg, Pro, Trp y Val con sólo 0.55 % de aumento ($p = 0.00781$). Asn fue el aminoácido cuyo porcentaje disminuyó más en proteínas de levaduras adaptadas al frío con respecto a mesófilas, éste redujo su frecuencia en un 17.36 % ($p = 2.00E-16$), le siguió Ile, Lys, Tyr, Phe, Met, Cys, Gln, His, Asp, Leu y Ser, con una reducción de sólo 0.61 % ($p = 0.0395$, tabla 11).

Tabla 11. Variación en el porcentaje de aminoácidos en proteínas de levaduras adaptadas al frío con respecto a mesófilas.

Aminoácido	Aumento en proteínas de levaduras adaptadas al frío (%)	Disminución en proteínas de levaduras adaptadas al frío (%)
Ala	16.90 ($p = 2.00E-16$)	-----
Gly	11.19 ($p = 2.00E-16$)	-----
Arg	7.33 ($p = 2.00E-16$)	-----
Pro	3.34 ($p = 2.00E-16$)	-----
Trp	0.66 ($p = 0.0499$)	-----
Val	0.55 ($p = 0.00781$)	-----
Asn	-----	17.36 ($p = 2.00E-16$)
Ile	-----	10.95 ($p = 2.00E-16$)
Lys	-----	9.97 ($p = 2.00E-16$)
Tyr	-----	8.49 ($p = 2.00E-16$)
Phe	-----	6.98 ($p = 2.00E-16$)
Met	-----	5.19 ($p = 2.00E-16$)
Cys	-----	4.15 ($p = 7.09E-09$)
Gln	-----	3.61 ($p = 2.00E-16$)
His	-----	2.80 ($p = 3.29E-09$)
Asp	-----	2.19 ($p = 8.60E-12$)
Leu	-----	1.56 ($p = 8.96E-10$)
Ser	-----	0.61 ($p = 0.0395$)

6.2.3 Gráficas de interacción; las diferencias en el porcentaje de aminoácidos en proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas dependen también del phylum

Las gráficas de interacción mostraron patrones variables entre los 18 aminoácidos (con interacciones estadísticamente significativas), reflejando diferencias en los porcentajes promedio de cada aminoácido para las posibles combinaciones de factores: proteínas de ascomicetos adaptados al frío, proteínas de ascomicetos mesófilos, proteínas de basidomicetos adaptados al frío y proteínas de basidomicetos mesófilos. El porcentaje promedio de 10 aminoácidos (Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Met, Asn, Thr, Trp y Tyr) fue mayor en proteínas de ascomicetos adaptados al frío que en basidiomicetos adaptados al frío, mientras que en proteínas de sus contrapartes mesófilas el porcentaje promedio de 9 aminoácidos (Phe, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Ser, Thr y Trp) fue mayor en ascomicetos que en basidiomicetos. En proteínas de levaduras adaptadas al frío el porcentaje promedio de 9 aminoácidos aumentó (Ala, Gly y Arg) o disminuyó (His, Ile, Lys, Asn, Gln y Tyr) simultáneamente en ambos phyla (Ascomycota y Basidiomycota), con respecto a proteínas de levaduras mesófilas (fig. 22). Los 9 aminoácidos restantes (Glu, Phe, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Val y Trp) presentaron un comportamiento opuesto para cada phyla, en algunos casos el porcentaje aumentó en proteínas de ascomicetos adaptados al frío y disminuyó en basidiomicetos adaptados al frío al compararlos con las levaduras mesófilas de sus phyla correspondientes y viceversa (fig. 23).

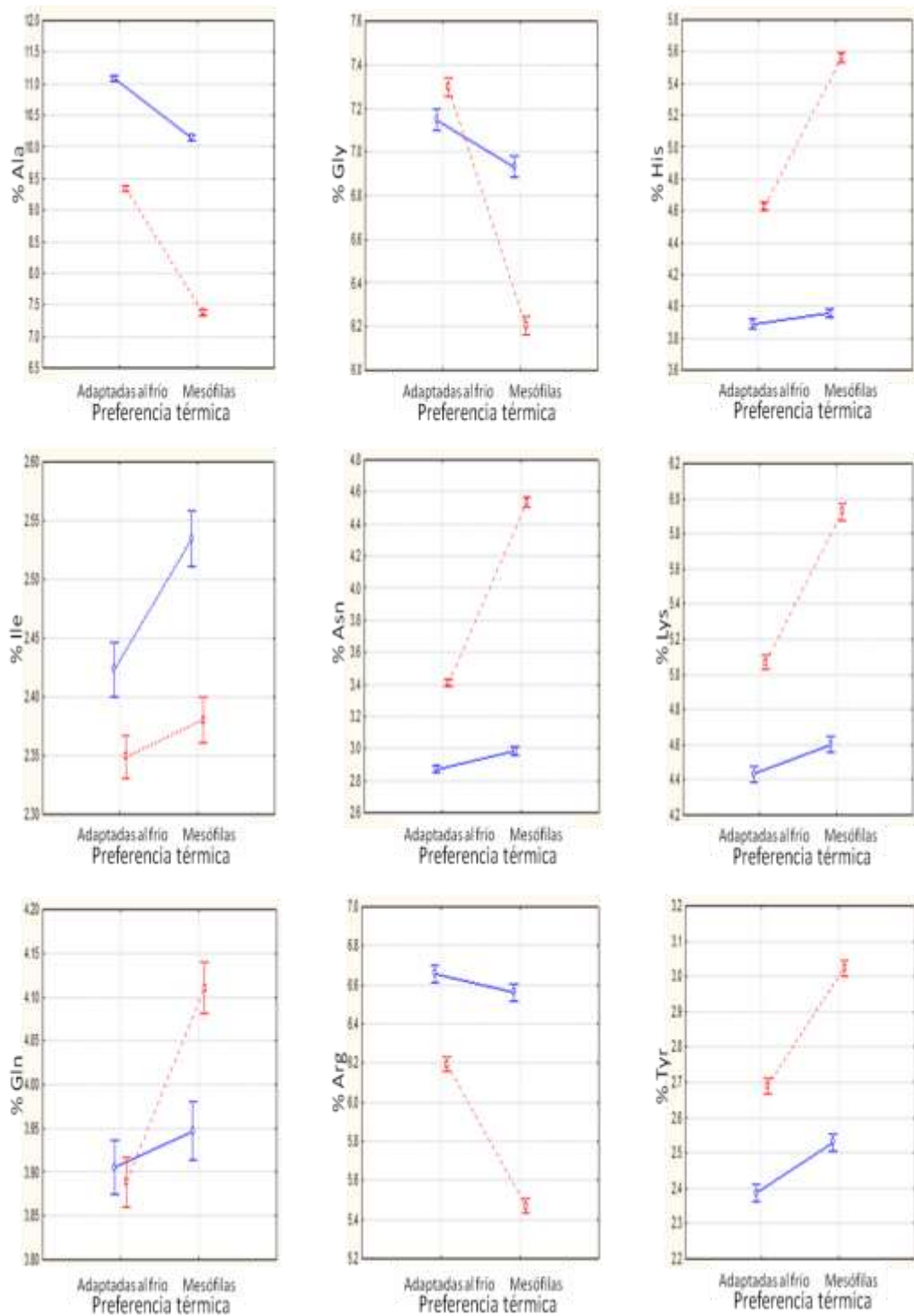


Figura 22. Gráficas de interacción de los 9 aminoácidos en los que su porcentaje aumenta (Ala, Gly y Arg) o disminuye (His, Ile, Lys, Asn, Gln y Tyr) simultáneamente en las proteínas de levaduras adaptadas al frío de ambos phyla. Nótese que los tres aminoácidos cuyo porcentaje aumenta son en los que las diferencias son mayores con respecto a proteínas de levaduras mesófilas y 4 (Asn, Ile, Lys y Tyr) de los 6 aminoácidos restantes son los que presentan una mayor reducción de frecuencia en proteínas de levaduras adaptadas al frío. Líneas azules, phylum Basidiomycota; líneas rojas, phylum Ascomycota.

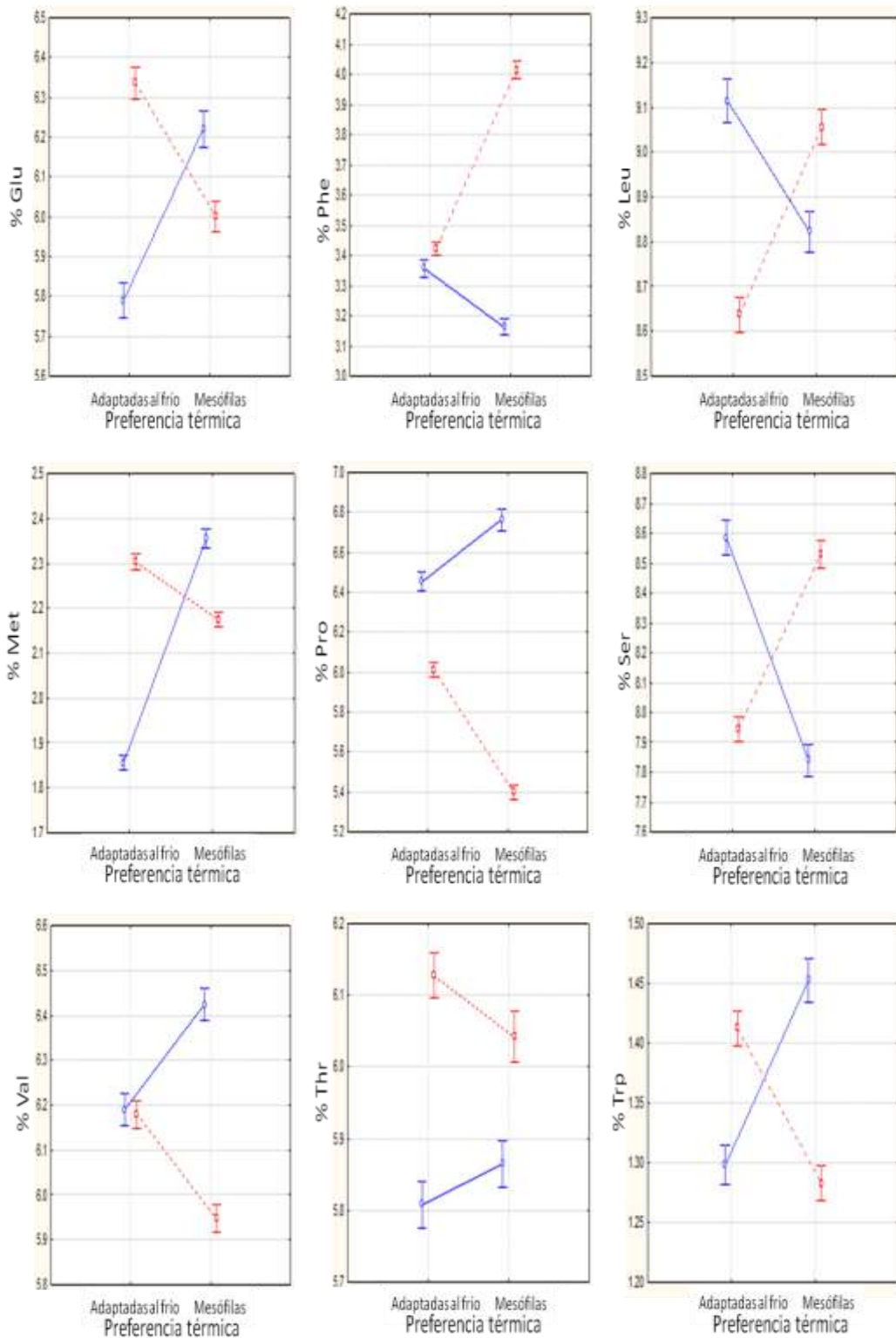


Figura 23. Gráficas de interacción de los 9 aminoácidos en los que su porcentaje aumenta o disminuye inversamente en los dos phyla. Phe, Leu y Ser disminuyeron en proteínas de ascomicetos adaptados al frío y aumentaron en proteínas de basidiomicetos adaptados al frío, mientras que Glu, Met, Pro, Thr, Val y Trp tuvieron un comportamiento opuesto, disminuyeron en proteínas de basidiomicetos adaptados al frío y aumentaron en proteínas de ascomicetos adaptados al frío. Líneas azules, phylum Basidiomycota; líneas rojas, phylum Ascomycota.

6.2.4 Comparaciones múltiples: basidiomicetos adaptados al frío vs basidiomicetos mesófilos vs *R. mucilaginosa* AN5 vs *R. mucilaginosa* RIT389

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas cepa dependientes en la mayoría de los aminoácidos analizados, sin embargo, esto puede deberse al bajo número de secuencias encontradas en las bases de datos para cada cepa de *Rhodotorula mucilaginosa*.

De los 20 aminoácidos analizados por ANOVA, 18 mostraron diferencias estadísticamente significativas entre basidiomicetos adaptados al frío, basidiomicetos mesófilos, *R. mucilaginosa* AN5 y *R. mucilaginosa* RIT389. Thr y Gln fueron los únicos dos aminoácidos que no mostraron diferencias ($p = 0.076$ y $p = 0.078$, respectivamente; ver anexo 1 para valores de p detallados). Los resultados del análisis de Tukey HSD de los otros 18 aminoácidos permitió organizarlos en tres grupos principales, según su comportamiento (ver anexo 2 para valores de p detallados): en el primero de ellos el porcentaje es similar entre proteínas de *R. mucilaginosa* AN5, basidiomicetos adaptados al frío y basidiomicetos mesófilos, pero es diferente entre estos últimos dos grupos de levaduras, además, el porcentaje en proteínas de *R. mucilaginosa* RIT389 es diferente a todos los grupos (mayor o menor, depende del aminoácido). Este comportamiento se observó en 6 de los 18 aminoácidos: Met, Phe, Pro, Val, Ile y Leu (fig. 24). El segundo comportamiento mostró que hay diferencias significativas entre proteínas de basidiomicetos adaptados al frío y basidiomicetos mesófilos, que el porcentaje de aminoácidos en proteínas de *R. mucilaginosa* AN5 y *R. mucilaginosa* RIT389 es similar entre estas dos cepas y, a su vez, es similar al porcentaje en basidiomicetos adaptados al frío y basidiomicetos mesófilos; 4 de los 18 aminoácidos mostraron este comportamiento: Trp, Ser, Gly y e His (fig. 25). En el tercer comportamiento el porcentaje en proteínas de basidiomicetos adaptados al frío y basidiomicetos mesófilos mostró diferencias estadísticamente significativas, en *R. mucilaginosa* AN5 el porcentaje fue similar al de estos dos grupos de levaduras y al de *R. mucilaginosa* RIT38; Asp, Glu y Asn mostraron este comportamiento (fig. 26). En los 5 aminoácidos restantes (Arg, Cys, Tyr, Lys y Ala) el comportamiento fue particular para cada uno (fig. 27).

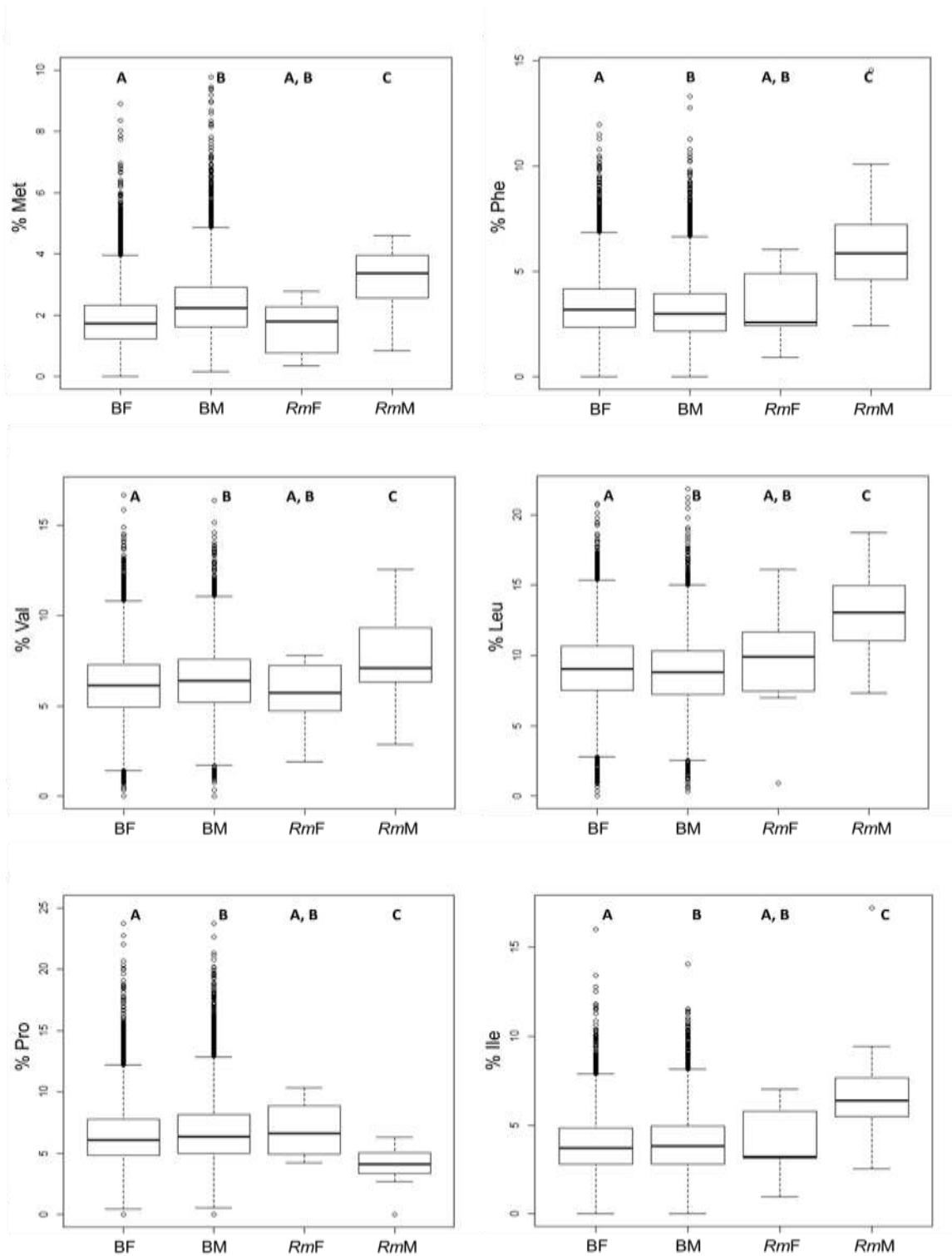


Figura 24. Resultados del análisis de Tukey HSD para los aminoácidos cuya frecuencia mostró el siguiente comportamiento: es similar entre proteínas de *R. mucilaginosa* AN5 (*RmF*), basidiomicetos adaptados al frío (BF) y basidiomicetos mesófilos (BM), pero es diferente entre BF y BM. Además, el porcentaje en proteínas de *RmM* es diferente al porcentaje observado en todos los grupos. Pro es el único aminoácido que disminuye en *RmM* con respecto al resto de levaduras.

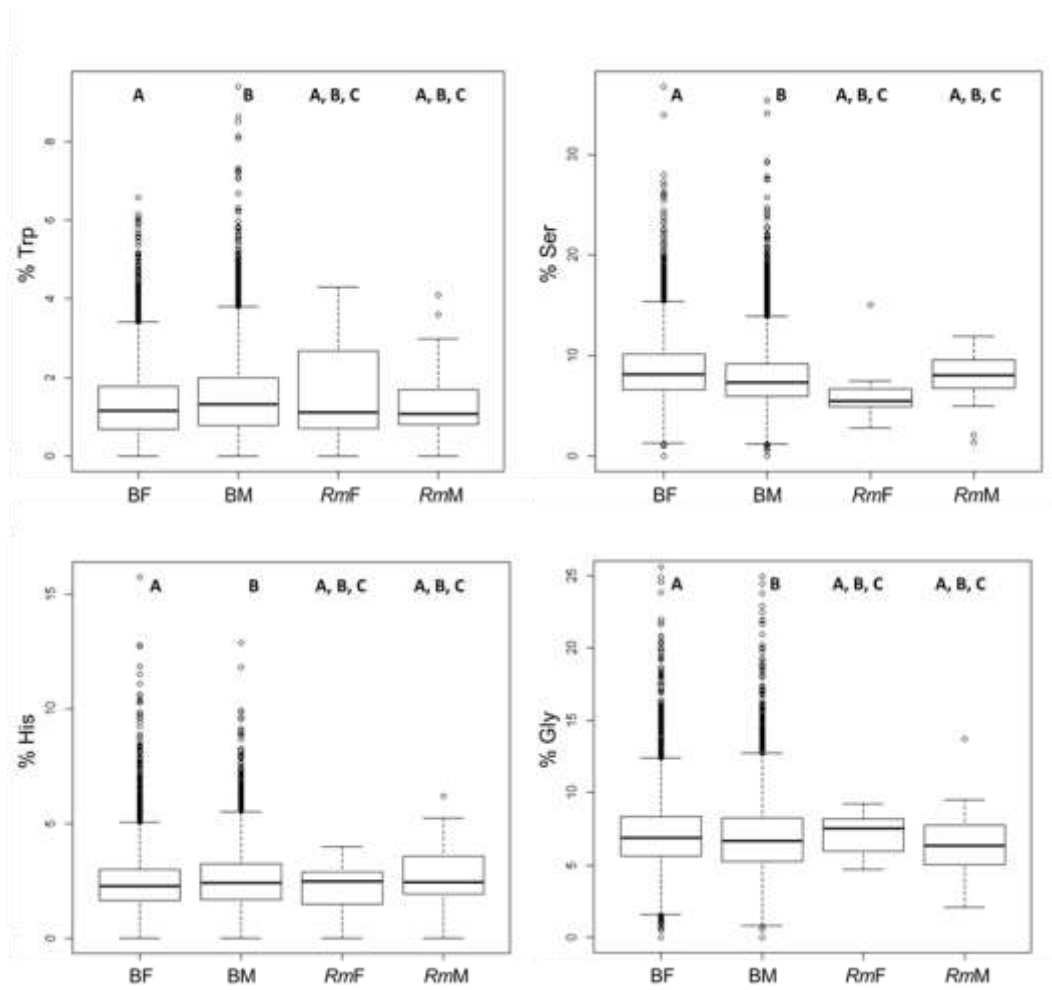


Figura 25. Resultados del análisis de Tukey HSD para los aminoácidos cuya frecuencia mostró el siguiente comportamiento: hay diferencias significativas entre proteínas de basidiomicetos adaptados al frío (BF) y basidiomicetos mesófilos (BM), el porcentaje de aminoácidos en proteínas de *R. mucilaginosa* AN5 (*RmF*) y *R. mucilaginosa* RIT389 (*RmM*) es similar, además, *RmM* y *RmF* tienen un porcentaje similar al de BF y BM.

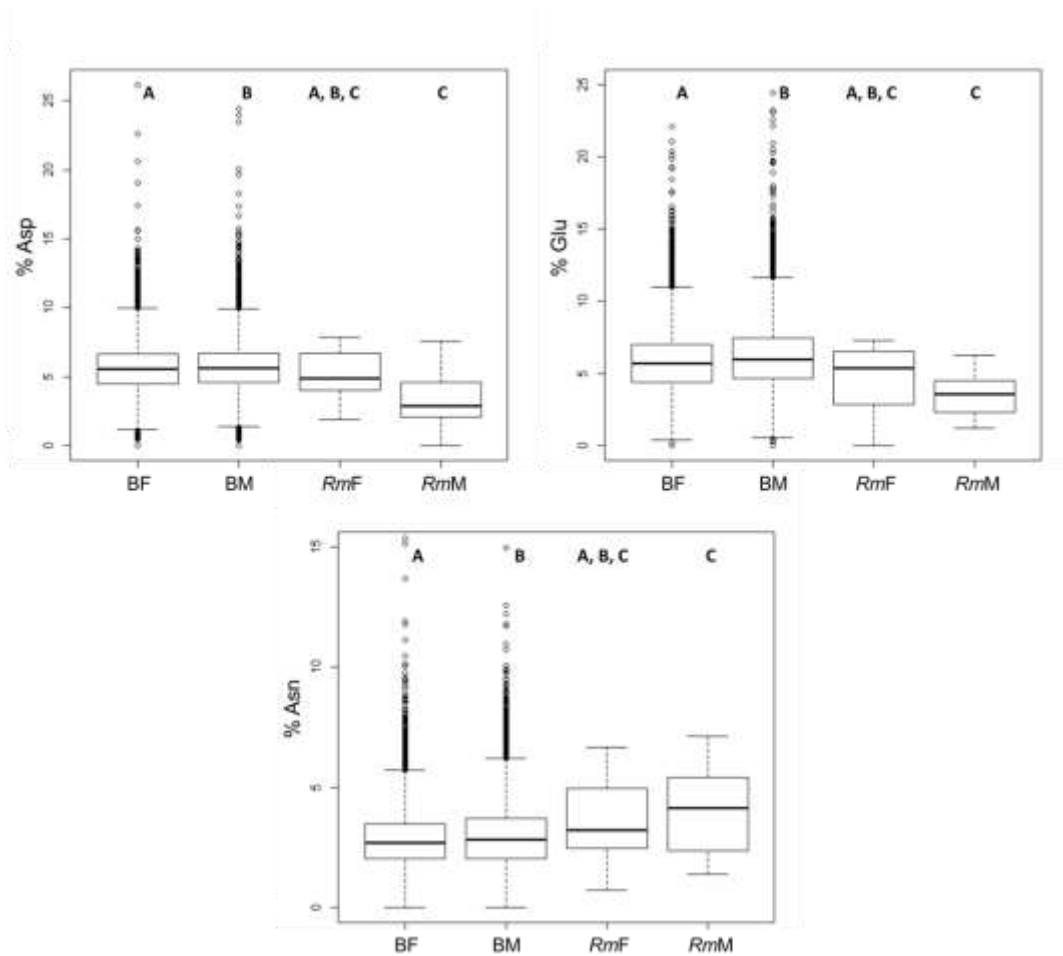


Figura 26. Resultados del análisis de Tukey HSD para los aminoácidos cuya frecuencia mostró el siguiente comportamiento: hay diferencias significativas entre proteínas de basidiomicetos adaptados al frío (BF) y basidiomicetos mesófilos (BM), en *R. mucilaginosa* AN5 (*RmF*) el porcentaje es similar al de BF, BM y al de *R. mucilaginosa* RIT38 (*RmM*). El porcentaje en *RmM* es diferente al del resto de levaduras.

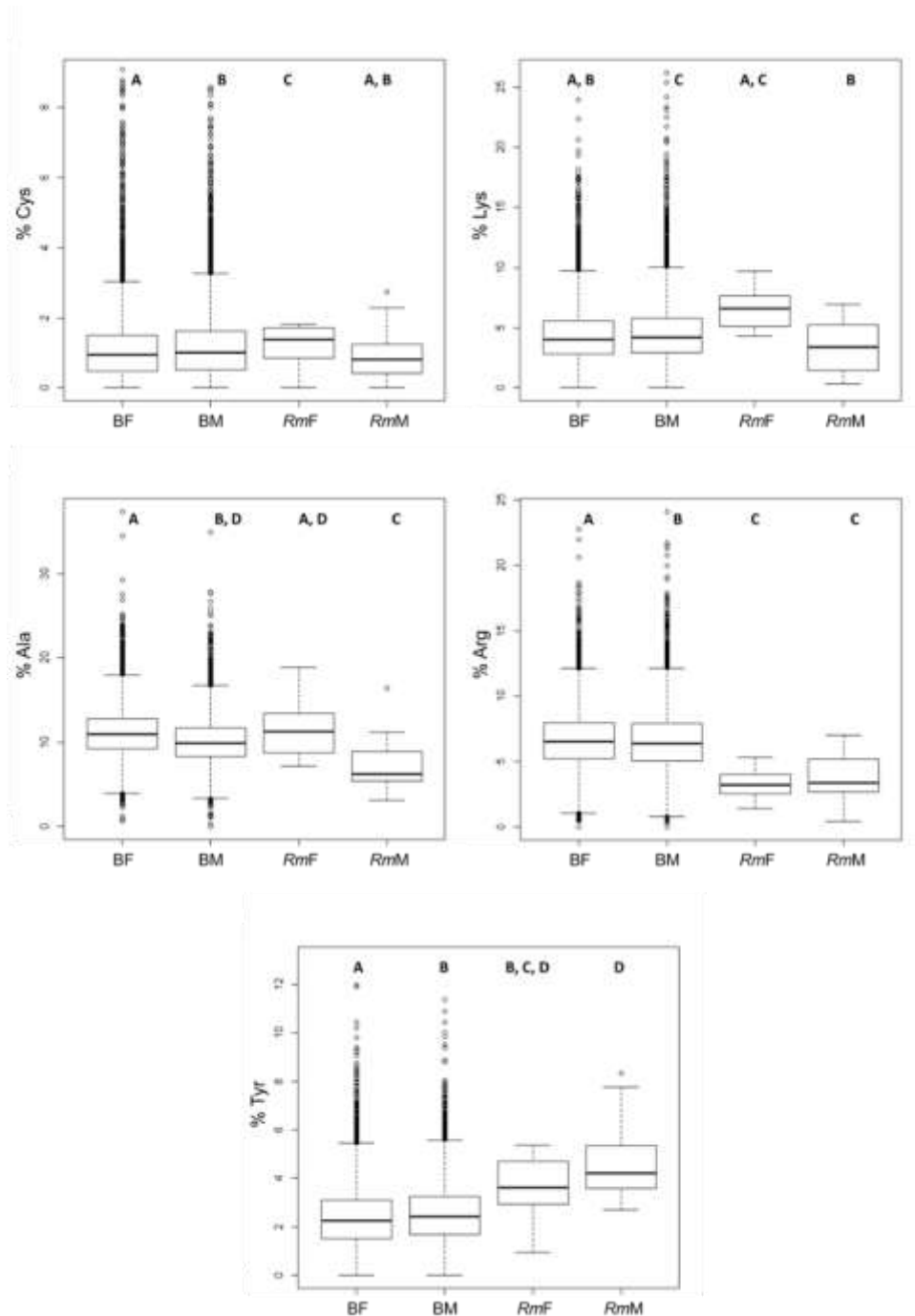


Figura 27. Resultados del análisis de Tukey HSD para los aminoácidos cuya frecuencia mostró un comportamiento particular: Cys, el porcentaje en basidiomicetos adaptados al frío (BF), mesófilos (BM) y *R. mucilaginosa* AN5 (*RmF*) presenta diferencias estadísticamente significativas, mientras que en *R. mucilaginosa* RIT38 (*RmM*) es similar al de BF y BM; Tyr, el porcentaje en *RmF* es similar al de BM y al de *RmM*, mientras que BM y BF presentan diferencias estadísticamente significativas; Lys, el porcentaje en BF muestra diferencias significativas con BM, mientras que en *RmF* es similar a estos dos grupos de levaduras, el porcentaje en *RmM* es similar únicamente a BF; Arg, el porcentaje en BF y BM muestra diferencias estadísticamente significativas, mientras que entre *RmF* y *RmM* no hay diferencias significativas; Ala, el porcentaje en *RmF* es similar al de BM y al de BF, aunque estos últimos dos grupos de levaduras muestran diferencias estadísticamente significativas, *RmM* es diferente a los tres grupos restantes de levaduras.

7. Discusión

7.1 Efecto general de la temperatura sobre la actividad de enzimas antioxidantes

Los niveles de actividad de catalasa fueron los únicos afectados por la temperatura de crecimiento, mientras que la actividad de SOD y GPx fue semejante en ambas temperaturas de crecimiento. Esto sugiere que *R. mucilaginosa* M94C9 cuenta con estrategias alternativas a las reportados por Kostadinova y colaboradores (2014) (incrementar los niveles de actividad de enzimas antioxidantes), en los ascomicetos *Penicillium* sp. 161 (psicrotolerante) y *A. glaucus* (mesófilo), para sobrellevar el estrés oxidante inducido por bajas temperaturas. Sin embargo, también es posible que la baja temperatura de crecimiento no sea un factor generador de ROS en *R. mucilaginosa* M94C9, ya que su viabilidad se mantiene y sólo se reduce la velocidad de los procesos metabólicos, lo cual está reflejado en las curvas de crecimiento. El incremento observado en la producción de carotenoides en los cultivos crecidos a 4 °C apoya la primera hipótesis; la baja temperatura de crecimiento induce un estado de estrés oxidante (como fue observado por Kostadinova *et al.*, 2014) y el aumento en la producción de carotenoides puede ser un mecanismo alternativo para contrarrestarlo, ya que ha sido reportada su actividad antioxidante (Liu y Wu, 2006; Ukibe, *et al.*, 2009; Irazusta *et al.*, 2013; Edge y Truscott, 2018).

7.2 Efecto de la fase de crecimiento

La disminución de la actividad de SOD en las fases pre-estacionaria y estacionaria de crecimiento con respecto a la exponencial, en ambas temperaturas de crecimiento, puede atribuirse a la actividad metabólica celular. Esto es congruente con lo reportado en estudios en levaduras, en los que durante la fase exponencial de crecimiento se observa un gasto energético mayor que en la fase estacionaria (donde las células entran en un estado quiescente G₀) (Kusch *et al.*, 2007; Galdieri *et al.*, 2010). Durante la fase estacionaria las células son no mitóticas, su DNA está sin replicar y cuentan con una tasa de transcripción 3 a 5 veces más baja que en la fase exponencial (Galdieri *et al.*, 2010). La mayor parte de la transcripción en la fase exponencial de crecimiento es utilizada para la biogénesis de ribosomas, del DNA total transcrito, aproximadamente 80 % corresponde a RNA ribosomal (Venema y

Tollervey, 1999). Se ha estimado que la síntesis de ribosomas consume alrededor del 90% de toda la energía celular (Warner *et al.*, 2001). También ha sido reportada una sobre-representación de proteínas necesarias para la síntesis de DNA (incluyendo componentes de las vías de síntesis de purinas y pirimidinas), RNA y proteínas, componentes de la cadena respiratoria (ATPasa Atp1p y ubiquinol-citocromo-c-reductasa Qcr2p) y proteínas metabólicas (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, fructosa-1,6-bisfosfato fosforilasa Tk11p y transaldolasa Ta11p), mientras que en la fase estacionaria hay un aumento en la expresión de proteínas de la gluconeogénesis y de respuesta a estrés oxidante: catalasa, glutatión reductasa y tioredoxin reductasa, Cu/Zn-SOD fue detectada únicamente en la fase exponencial de crecimiento (Kusch *et al.*, 2007). Estos procesos dependen profundamente de la disponibilidad de ATP, cuya síntesis se lleva a cabo principalmente en la mitocondria, a través de la cadena respiratoria. La cadena respiratoria es considerada el principal proceso metabólico productor de ROS endógenas, particularmente el O_2^- , sustrato de la SOD (Finkel y Holbrook, 2000). La actividad de SOD en la fase exponencial de crecimiento de *R. mucilaginosa* M94C9 es mayor para contrarrestar la elevada producción de O_2^- generado en la cadena respiratoria y el O_2^- debe ser un regulador importante en la transcripción de la SOD; se ha observado en levaduras que el tratamiento con agentes generadores de O_2^- , como la 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) y el paraquat provocan la relocalización nuclear de la Cu/Zn-SOD, donde funciona como factor de transcripción sobre una variedad de genes de resistencia a estrés oxidante y reparación de DNA (Tsang *et al.*, 2014). Galiazzo y Labbe-Bois (1993) observaron un fenómeno similar al crecer a *S. cerevisiae* en medio rico; SOD tuvo un pico máximo de actividad en la fase exponencial y sus niveles cayeron bruscamente en la fase estacionaria de crecimiento. Adicionalmente, detectaron que al tratar a *S. cerevisiae* con 2.5 mM de paraquat, un herbicida generador de O_2^- , se produjo un aumento del 50 % en la expresión del gen *SOD1* y del 100% en el gen *SOD2*, los cuales codifican para la Mn-SOD y Cu/Zn-SOD, respectivamente. Este fenómeno de expresión diferencial inducida por paraquat también ha sido observado en el ascomiceto *Paracoccidioides brasiliensis*, donde se detectó la inducción de genes relacionados con la detoxificación de ROS, entre ellos Cu/Zn-SOD, GPx's y peroxirredoxinas (Oliveira *et al.*, 2013). Bajas concentraciones de O_2^- , debido a una actividad metabólica y gasto

energético menores, pueden estar relacionadas con una regulación negativa de los genes de *SOD*, dando como resultado la disminución de actividad observada en las fases pre-estacionaria y estacionaria de crecimiento de *R. mucilaginosa* M94C9. Estos resultados concuerdan con los estudios de expresión en *C. albicans* (Kusch *et al.*, 2007). La alta actividad de *SOD* durante la fase exponencial provoca una mayor producción de H_2O_2 en esta etapa de crecimiento que en las fases pre-estacionaria y estacionaria, lo cual explicaría que la actividad de *GPx* y catalasa sea mayor durante el crecimiento exponencial que en las fases pre-estacionaria y estacionaria de crecimiento en la mayoría de condiciones, con excepción de la catalasa del cultivo crecido a 28 °C. Se ha mostrado que el H_2O_2 participa en la inducción de la expresión de catalasa; en *C. albicans* y *Schizosaccharomyces pombe* hubo un aumento en los niveles del mRNA de esta enzima y en los niveles de actividad tras el tratamiento con 0.2 mM de H_2O_2 (Nakagawa *et al.*, 1995; Nakagawa *et al.*, 1999). Sin embargo, los niveles de catalasa pueden estar regulados paralelamente por un tipo de inhibición por catabolito, del cual se habla un poco más a detalle en los párrafos siguientes.

En la fase exponencial de crecimiento la catalasa y la *GPx* presentan niveles de actividad similares entre cultivos de la misma temperatura. Ambas enzimas se encargan de la eliminación del H_2O_2 , pero *GPx*, además, elimina peróxidos de lípidos. Se ha reportado que *GPx3* se expresa constitutivamente (Penninckx, 2002) y que su función principal es la eliminación de peróxidos de lípidos en *S. cerevisiae* (Muthukumar *et al.*, 2011). Sin embargo, la importancia relativa de la catalasa y la *GPx* en la eliminación de H_2O_2 es controversial. En mutantes nulas de *SOD* de *S. cerevisiae*, crecidas bajo condiciones óptimas, se ha observado un incremento en la actividad de *GPx* y una disminución de casi el 50 % en la actividad de catalasa, lo que sugiere que la resistencia a H_2O_2 depende de la inducción de *GPx* y no de catalasa (Manfredini *et al.*, 2004). Mientras que mutantes acatalasémicas de este ascomiceto muestran un crecimiento similar a células silvestres en condiciones óptimas, pero una mayor sensibilidad a H_2O_2 en la fase estacionaria, lo que sugiere que la catalasa no es esencial para el crecimiento, pero sí para la tolerancia a estrés oxidante (Izawa *et al.*, 1996). El funcionamiento de la *GPx* requiere de GSH, NADPH, glucosa-6-

fosfato, GR y G-6-PD (Weydert y Cullen, 2009), mientras que la catalasa no necesita de donadores de electrones adicionales (Martins y English, 2014). Es posible que en la fase exponencial de crecimiento la GPx se encargue de la eliminación de peróxidos de lípidos y la catalasa de la reducción del H₂O₂ a H₂O y O₂, a pesar de tener niveles de actividad similares, ya que esta última enzima tiene menos restricciones para su funcionamiento y la GPx, además de remover H₂O₂, tiene una segunda función: la eliminación de peróxidos de lípidos.

La catalasa del cultivo de *R. mucilaginosa* M94C9 crecido a 28 °C tuvo niveles de actividad mayores en la fase estacionaria de crecimiento que en la fase exponencial, lo cual también ha sido observado por Cross y Ruis (1978) en *S. cerevisiae* y por Nakagawa y colaboradores (1999) en *C. albicans* y se ve apoyado por los estudios de expresión en este último ascomiceto realizados por el grupo de trabajo de Kusch (2007), donde la catalasa es sobreexpresada durante la fase estacionaria de crecimiento. Es posible que en el cultivo a 4 °C la actividad de la catalasa no incremente durante la fase estacionaria de crecimiento debido a que hay otros mecanismos para combatir al H₂O₂ y que este fenómeno se relacione con la sobreproducción de carotenoides observada.

El incremento en la actividad de catalasa reportado en *S. cerevisiae* y *C. albicans* durante la fase estacionaria de crecimiento con respecto a la exponencial ha sido asociado a un tipo de regulación por catabolito; se sugiere que la glucosa inhibe la actividad de catalasa, ya que, en función de la especie y el tipo de catalasa, su presencia disminuye o reprime totalmente su función (Cross y Ruis, 1978; Nakagawa *et al.*, 1999). En el caso de *R. mucilaginosa* M94C9 crecida a 28 °C ocurre un fenómeno similar: en la fase estacionaria de crecimiento los niveles de actividad de catalasa incrementan, lo cual puede atribuirse a este tipo de regulación por catabolito. Cabe señalar que este incremento en la actividad de catalasa durante la fase estacionaria de crecimiento no es observado en los cultivos crecidos a 4 °C, probablemente por algún tipo de regulación relacionado con la presencia de carotenoides, tal como se ha visto en el cigomiceto carotenogénico *Blakeslea trispora*, donde se detectó una mayor acumulación de β-caroteno en la fase estacionaria de crecimiento y tras la inducción de estrés oxidante hubo una disminución en la actividad de

catalasa y un incremento en la producción de carotenoides (Gessler *et al.*, 2002), tal como en *R. mucilaginosa* M94C9 crecida a 4 °C.

El incremento de actividad de catalasa en la fase estacionaria de *R. mucilaginosa* M94C9 crecida a 28 °C favorece que exista una menor disponibilidad de H₂O₂ libre para entrar en reacciones tipo Haber-Weiss, a través de las cuales se genera radical •OH, la ROS directamente responsable de la peroxidación de lípidos. Esto, a su vez, puede estar relacionado con el decremento en la actividad de GPx observado en las fases pre-estacionaria y estacionaria de crecimiento del cultivo a 28 °C; menores concentraciones de H₂O₂ y radical •OH disminuyen las probabilidades de que ocurra la peroxidación de lípidos, provocando una disminución en los niveles de GPx necesarios para su reducción. La disminución en la actividad de GPx en las fases pre-estacionaria y estacionaria de crecimiento es muy marcada con respecto a la exponencial, se puede considerar que la eliminación de productos de daño oxidante (peróxidos de lípidos) que lleva a cabo esta enzima es insignificante durante estas fase de crecimiento y que su disminución puede estar relacionada con una posible ausencia de daño oxidante gracias al incremento en la actividad de catalasa.

7.3 Efecto de las fases de crecimiento y la temperatura

Los resultados revelaron que los niveles de actividad de las tres enzimas antioxidantes (SOD, catalasa y GPx) están relacionados con el crecimiento, mostrando niveles máximos durante la fase exponencial (a excepción de la catalasa de los cultivos crecidos a 28 °C) y este fenómeno puede explicarse por la actividad metabólica celular, la interrelación que guardan las enzimas a través del H₂O₂, el mecanismo de regulación por glucosa y la producción de carotenoides. Además, no hay diferencias significativas entre la actividad de SOD de cultivos crecidos a 4 °C y 28 °C ni entre la de GPx de los cultivos incubados a las mismas temperaturas en ninguna de las fases de crecimiento, lo que sugiere que en *R. mucilaginosa* M94C9 estas enzimas no son sensibles a bajas temperaturas y que la producción de O₂⁻ a 4 °C y 28 °C es similar.

La catalasa sí es una enzima sensible a las bajas temperaturas, su actividad se ve reducida drásticamente y significativamente en todas las fases del

cultivo crecido a 4 °C. Esta reducción también ha sido observada en *R. glutinis* DSM 70398 crecida por debajo de su temperatura óptima de crecimiento (Ezgi y Takac, 2012; tabla 2) y puede estar relacionada con la sobreproducción de carotenoides, como se ha reportado en el cigomiceto carotenogénico *B. trispora* (Gessler *et al.*, 2002), donde, al igual que en *R. mucilaginosa* M94C9, hay una relación inversa entre estos sistemas antioxidantes; la actividad de catalasa disminuye cuando la producción de carotenoides incrementa. Sin embargo, no se encontraron estudios acerca de una posible co-regulación de estos sistemas.

Se sabe que los carotenoides tienen actividad protectora de membranas lipídicas, particularmente mediante la remoción de radicales peroxilo, como los formados por la peroxidación de fosfolípidos (Mata – Gómez *et al.*, 2014). En *Rhodotorula glutinis* se ha observado que la torularrodina, uno de los cuatro carotenoides presentes en *R. mucilaginosa*, tiene mayor actividad contra radicales peroxilo que el β -caroteno. También se ha reportado la capacidad de la torularrodina para actuar contra la peroxidación de lípidos y su efecto es más fuerte que el del α – tocoferol (Kot *et al.*, 2018). La sobreproducción de carotenoides en las fases pre-estacionaria y estacionaria de crecimiento de *R. mucilaginosa* M94C9 crecida a 4 °C sugiere que éste es el mecanismo principal contra estrés oxidante durante estas etapas de crecimiento, probablemente a través de la eliminación de peróxidos de lípidos, sustituyendo la función de la GPx, lo cual explicaría la disminución en la actividad de esta enzima durante las fases pre-estacionaria y estacionaria de crecimiento.

7.4 Comparación interespecífica de los niveles de actividad enzimática

R. mucilaginosa M94C9 es una cepa cuyos niveles de actividad de SOD se encuentran en la mediana de datos en la mayoría de las condiciones (la única excepción es durante la fase exponencial de los cultivos crecidos a 4 °C), además, sus valores están un orden de magnitud por arriba o por debajo del valor reportado más bajo o más alto, respectivamente.

En cambio, los niveles de actividad de catalasa se encuentran hasta dos órdenes de magnitud por debajo de los valores de actividad reportados en el resto de las cepas en casi todas las condiciones, la única excepción es en la fase

estacionaria de los cultivos crecidos a 28 °C, los cuales se encuentran en la mediana de los datos, tal como los valores de actividad de SOD. Cabe destacar que en *S. cerevisiae* YPH250 y *R. glutinis* DSM 70398 se observa un patrón de actividad similar al de *R. mucilaginosa* M94C9: los niveles de actividad de catalasa aumentan en la fase estacionaria de crecimiento con respecto a la exponencial en los cultivos crecidos a su temperatura óptima. Además, en los cultivos de *R. glutinis* DSM 70398 crecidos por debajo de su temperatura óptima ocurre el fenómeno opuesto, los niveles de actividad disminuyen en la fase estacionaria de crecimiento, tal como sucede en *R. mucilaginosa* M94C9 crecida a 4 °C. La comparación entre los niveles de actividad de catalasa en *R. mucilaginosa* M94C9 (ensayada en el presente trabajo) y *R. mucilaginosa* RCL-11 ensayada por Irazusta y colaboradores (2013), muestra un caso de actividad cepa-dependiente similar al reportado por Michan y colaboradores (2012) en *D. hansenii*, ya que los niveles de actividad en la fase estacionaria de crecimiento son de 1.5 y 9 $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente. Sin embargo, estas diferencias también pueden ser atribuidas a las condiciones de cultivo. Se ha observado que los niveles de aireación y composición del medio de cultivo afectan los niveles de actividad de la SOD en *D. hansenii* (Ramírez *et al.*, 1998).

El valor de actividad de GPx de los cultivos de *R. mucilaginosa* M94C9 crecidos en su temperatura óptima está justo en la mediana de todos los datos de la fase exponencial, por debajo de *C. neoformans* H99 y por encima de *S. cerevisiae* YPH250, mientras que en la fase estacionaria de crecimiento está cuatro órdenes de magnitud por debajo de *S. cerevisiae* EG103.

En general, *R. mucilaginosa* M94C9 es una cepa cuyas enzimas antioxidantes, SOD, catalasa y GPx, tienen niveles de actividad medios con respecto a otras cepas fúngicas, lo cual puede estar relacionado con la síntesis de carotenoides inherente a esta levadura. Sin embargo, los valores interespecíficos de actividad son altamente variables, lo cual puede estar relacionado con factores intrínsecos a las enzimas, pero también con factores extrínsecos, por ejemplo, las condiciones de cultivo; es importante destacar que en los reportes de actividad encontrados los niveles de aireación de los cultivos y la disponibilidad de glucosa en el medio son altamente variables, con valores entre las 150 rpm-500 rpm y entre 1 % - 4 %, respectivamente. Las condiciones

de crecimiento de *R. mucilaginosa* M94C9 en el presente trabajo se encuentran en el límite inferior de estos rangos, con 180 rpm y 1 % de glucosa. Niveles de aireación mayores favorecen un incremento en la disponibilidad de oxígeno para las células, lo cual, a su vez, puede incrementar la formación de ROS. Mientras que una mayor disponibilidad de glucosa puede estar participando de manera más activa en la regulación por catabolito de la catalasa. En *D. hansenii* se ha reportado un incremento en la actividad de SOD en cultivos crecidos a 500 rpm con respecto a cultivos crecidos a 100 rpm y 300 rpm (Ramírez *et al.*, 1998). Una comparación más precisa debe considerar homogeneidad de condiciones de cultivo para eliminar la variación asociada a factores extrínsecos a las enzimas, como el trabajo de Michan y colaboradores (2012), donde ensayó la actividad de catalasa de diferentes cepas de *D. hansenii* y *D. fabryi* crecidas bajo las mismas condiciones de cultivo. Dichos experimentos revelaron que la actividad de catalasa en estas levaduras es cepa-dependiente.

7.5 Estudio bioinformático-comparativo

El porcentaje de aminoácidos en proteínas de levaduras dependen del phylum y la forma de vida, adaptados al frío o mesófilos. Sin embargo, también existen diferencias de composición considerando cada factor individualmente. Esto sugiere que hay una respuesta diferencial a la adaptación al frío phylum-dependiente, lo cual está reflejado en las gráficas de interacción, donde los promedios en el porcentaje de la mayoría de aminoácidos, la tendencia a aumentar o disminuir y la proporción en la que cambian, difiere entre basidiomicetos y ascomicetos. Los casos más evidentes de esta dependencia son en los que en levaduras de uno de los phyla el porcentaje de determinado aminoácido aumenta en proteínas de cepas adaptadas al frío y en el otro phyla el porcentaje del mismo aminoácido disminuye (p. ej., Phe, Leu, Ser, Glu, Met, Pro, Thr, Val y Trp).

Si bien la estructura primaria de las proteínas es muy informativa, ya que potencialmente permite predecir la estructura tridimensional, función, localización y evolución de las proteínas, no siempre es posible llegar a inferencias estructurales y funcionales sólo a través de la secuencia (Nelson y Cox, 2005). Los resultados del presente trabajo muestran que las proteínas de levaduras adaptadas al frío tienen un mayor porcentaje de Ala, Gly, Arg, Pro, Trp

y Val, los cuales la mayoría son aminoácidos no polares, con excepción de Arg y Trp. Además, los aminoácidos cuyo porcentaje muestra un mayor incremento son Ala y Gly, con un 16.90 % y 11.19 % más, respectivamente. Gly y Ala son aminoácidos pequeños, por lo que cuentan con pocas restricciones de movimiento y potencialmente confieren mayor flexibilidad estructural. Se sabe que Gly es un aminoácido desestabilizador de α -hélices y que aumenta la flexibilidad en Asas (Horovitz *et al.*, 1992). Este efecto desestabilizador de α -hélices también se ha descrito para Pro, otro de los aminoácidos no polares cuyo porcentaje también aumenta, particularmente cuando se encuentra en el centro de las hélices, donde rompe dos puentes de hidrógeno. Sin embargo, su presencia en Asas tiene un efecto estabilizador, debido a su restricción intrínseca de movimiento que, además, reduce la libertad de movimiento del aminoácido que le precede (Richardson y Richardson, 1988). Otro de los mecanismos de adaptación al frío que se ha observado, es una distribución inusual del potencial electrostático, debido a diferencias en aminoácidos cargados (Russell *et al.*, 1998), lo cual puede estar relacionado con el aumento en el porcentaje de Arg y la disminución de Lys, His y Asp descritas en el presente trabajo. Cuatro de los seis aminoácidos cuya presencia aumentó en proteínas de levaduras adaptadas al frío son no polares. En proteínas de organismos adaptados al frío ha sido descrito un incremento en la superficie hidrofóbica expuesta a solvente (Russell *et al.*, 1998).

Considerar sólo el promedio en el porcentaje de aminoácidos en proteomas completos puede conducir a diversas interpretaciones funcionales acerca de la composición de proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas, las cuales pueden ser contradictorias o ser válidas sólo bajo determinados supuestos estructurales, ya que el fenómeno de adaptación al frío en proteínas abarca mecanismos altamente variables, específicos para proteínas individuales y no necesariamente incluyentes. Esta aseveración se ve reforzada por el hecho de que arqueobacterias, γ -proteobacterias, basidiomicetos y ascomicetos siguen tendencias de composición muy diferentes y susceptibles a múltiples interpretaciones adaptacionistas potencialmente contradictorias. Gran parte de las adaptaciones a bajas temperaturas son más evidentes a nivel estructural, donde existe un papel funcional real, por lo que se

considera necesario relacionar la información de composición con modelos tridimensionales generados experimentalmente, ya sea por cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o criomicroscopía electrónica. A la fecha se cuenta con muy pocas proteínas cristalizadas de levaduras psicrófilas. Una búsqueda en la base de datos del PDB condujo a cuatro resultados únicamente, de los cuales tres cuentan con resoluciones de entre 2-3 Å; en una el modelado está incompleto y la mayoría no cuentan con homólogos lo suficientemente similares para que la comparación e inferencias puedan ser atribuidas a la adaptación al frío. El estudio de la adaptación al frío en proteínas de levaduras es un área relativamente virgen y para florecer es sustancial generar más y mejores datos estructurales.

Ya que el porcentaje de aminoácidos en proteínas de levaduras depende del phylum y la forma de vida (adaptados al frío o mesófilos) y los datos del presente trabajo sugieren que hay una respuesta diferencial a la adaptación al frío phylum-dependiente, se hizo un análisis comparativo del porcentaje de proteínas entre basidiomicetos mesófilos, basidiomicetos adaptados al frío, *R. mucilaginosa* AN5 (adaptada al frío) y *R. mucilaginosa* RIT389 (mesófila).

La expectativa *a priori* de este análisis comparativo fue que el porcentaje de aminoácidos en proteínas de basidiomicetos adaptados al frío y *R. mucilaginosa* AN5 fuera significativamente similar, mientras que para *R. mucilaginosa* RIT389 se esperaba que dicho porcentaje se pareciera al de basidiomicetos mesófilos y, a su vez, existieran diferencias estadísticamente significativas entre basidiomicetos adaptados al frío-*R. mucilaginosa* AN5 y basidiomicetos mesófilos-*R. mucilaginosa* RIT389, es decir, que existieran diferencias cepa-dependientes coherentes en el porcentaje de aminoácidos en proteínas de *R. mucilaginosa*. Este comportamiento no se observó en ninguno de los aminoácidos, de hecho, se encontraron diferencias cepa-dependientes en 9 de los 20 aminoácidos comparados entre *R. mucilaginosa* AN5 (adaptada al frío) y *R. mucilaginosa* RIT389 (mesófila). Sin embargo, estas diferencias no concuerdan con el análisis de proteínas de basidiomicetos adaptados al frío y proteínas de levaduras mesófilas. El comportamiento que se observó en la mayoría de los aminoácidos (6 de 18) que presentaron diferencias estadísticamente significativas fue que el porcentaje en *R. mucilaginosa* AN5 sí

es similar al de basidiomicetos adaptados al frío, sin embargo, también es similar al de basidiomicetos mesófilos, además, el porcentaje en *R. mucilaginosa* RIT389 no se parece a ninguno de los demás grupos. En el segundo comportamiento más frecuente (4 de 18 aminoácidos) el porcentaje en *R. mucilaginosa* AN5 y *R. mucilaginosa* RIT389 es similar entre ambas cepas y similar al de basidiomicetos adaptados al frío y al de basidiomicetos mesófilos, a su vez, existen diferencias estadísticamente significativas entre estos últimos dos grupos. En el tercer comportamiento más frecuente (3 de 18 aminoácidos) el porcentaje de aminoácidos en *R. mucilaginosa* AN5 es similar al de basidiomicetos adaptados al frío, basidiomicetos mesófilos y *R. mucilaginosa* RIT38, sin embargo, las diferencias son significativas entre estos últimos tres grupos de organismos. Los 5 aminoácidos restantes presentaron comportamientos particulares de cada uno.

Estas similitudes y diferencias son consideradas un artefacto del análisis y se atribuyen al tamaño de muestra. Existen pocos datos de cepas adaptadas al frío de *R. mucilaginosa*, una búsqueda en la base de datos de proteínas del NCBI utilizando palabras clave como “*cold adapted*”, “*antarctic*”, “*Antarctica*”, “*psychrotolerant*”, “*psychrophilic*”, seguido de “*Rhodotorula mucilaginosa*”, condujo a sólo 7 resultados, los cuales corresponden a proteínas de la cepa antártica *R. mucilaginosa* AN5, la cual fue aislada de muestras de hielo marino en la Antártica. De manera similar, existen únicamente 134 proteínas de *R. mucilaginosa* reportadas en la base de datos de proteínas del NCBI, de las cuales la mayoría no especifica el lugar de aislamiento de la cepa (por lo tanto su preferencia térmica) a partir de la cual se secuenciaron. La cepa *R. mucilaginosa* RIT398 es a partir de la cual se ha obtenido un mayor número de secuencias y, además, está reportado su lugar de aislamiento (colonizando una planta originaria de África, en Nigeria). Sin embargo, sólo se cuenta con 31 secuencias proteicas de esta levadura.

8. Conclusiones

El patrón de actividad de SOD, catalasa y GPx en las diferentes etapas de crecimiento y temperaturas es muy similar; en casi todas las condiciones la actividad máxima ocurre durante la fase exponencial de crecimiento y ésta disminuye en las fases pre-estacionaria y estacionaria. La única excepción es la catalasa de los cultivos crecidos a 28 °C, donde la actividad máxima ocurre durante la fase estacionaria de crecimiento, lo cual concuerda con lo reportado por Cross y Ruis (1978) en *S. cerevisiae*, por Nakagawa y colaboradores (1999) en *C. albicans* y por Kusch (2007) en esta última levadura. Además, se observó una sobreproducción de carotenoides en los cultivos crecidos a 4 °C, lo que sugiere que los pigmentos son un mecanismo importante para contrarrestar el estrés inducido por frío en *R. mucilaginosa* M94C9.

El análisis bioinformático comparando la frecuencia de cada aminoácido entre las proteínas de *R. mucilaginosa* AN5 (adaptada al frío), *R. mucilaginosa* RIT389 (mesófila), basidiomicetos adaptados al frío y basidiomicetos mesófilos mostró relaciones que no concuerdan con lo esperado. Se considera que estos resultados son un artefacto inherente al pequeño tamaño de la muestra.

Se reveló que hay diferencias significativas en la proporción de aminoácidos en proteínas de levaduras adaptadas al frío y mesófilas. 18 de los 20 aminoácidos mostraron diferencias significativas. En general, las proteínas de levaduras adaptadas al frío tienen un mayor porcentaje de Ala, Gly, Arg, Pro, Trp y Val y menor porcentaje de Asn, Ile, Lys, Tyr, Phe, Met, Cys, Gln, His, Asp, Leu y Ser que las proteínas de levaduras mesófilas. Además, en 9 de los 18 aminoácidos, estas diferencias fueron phylum-dependientes. Sin embargo, sería conveniente complementar esta información comparando las proteínas a nivel de su estructura tridimensional.

9. Perspectivas

Resulta interesante determinar los niveles de peroxidación de lípidos, la producción celular de H_2O_2 y O_2^- y cuantificar los carotenoides en las diferentes fases de crecimiento de *R. mucilaginosa* M94C9 cultivada a 4 °C y 28 °C. Esto esclarecería el papel que tienen los carotenoides en la respuesta a estrés oxidante (los cuales han sido propuestos como pigmentos que actúan contra peróxidos de lípidos) y la interrelación que guarda con las enzimas antioxidantes, principalmente GPx y catalasa, ya que la primera enzima comparte una función en común con los carotenoides y la segunda mantiene una relación inversa de actividad con estos pigmentos. Para probar la hipótesis del reemplazo de GPx por la sobreproducción de carotenoides en cultivos crecidos a 4 °C se pueden seleccionar o diseñar mutantes albinas de *R. mucilaginosa* M94C9 y medir la actividad de GPx, con la expectativa de que esta enzima incremente su actividad con respecto a células silvestres. Además, si la síntesis de carotenoides y la actividad de catalasa están co-reguladas, se esperaría que la catalasa también incremente su actividad. Adicionalmente, esta información funcional puede ser complementada con estudios genéticos, determinando los niveles de expresión de la SOD, catalasa, GPx y de alguna de las enzimas clave para la síntesis de carotenoides, como la fitoeno sintasa, en las mutantes albinas y silvestres crecidas a 4 °C y 28 °C.

Además, una comparación confiable entre los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes de *R. mucilaginosa* M94C9 y los niveles de actividad de otras cepas debe tomar en cuenta homogeneidad de condiciones de cultivo y de preferencia realizarse en enzimas puras. Para esto se tendrían que diseñar los experimentos debidos; cultivar a las levaduras a comparar en el mismo medio y con los mismos niveles de agitación, extraer y purificar las enzimas por *salting out* y cromatografía y medir la actividad con el mismo protocolo. O clonar las enzimas antioxidantes en vectores plasmídicos, sobreexpresar, purificar las enzimas y hacer los ensayos de actividad debidos.

Los resultados obtenidos revelaron diferencias importantes en la composición de proteínas de levaduras mesófilas y adaptadas al frío, sin embargo, sería conveniente complementar esta información con una comparación a nivel de la estructura tridimensional. Esta comparación puede

hacerse a través de modelos tridimensionales generados *in silico*, sin embargo, esto no tendría validez, ya que para esto se requiere una proteína molde cuya estructura ya ha sido resuelta y hoy en día se cuentan con muy pocos datos estructurales de proteínas de levaduras adaptadas al frío, por lo que la predicción de la estructura tridimensional de las proteínas de diferentes levaduras tendría que hacerse con base en un mismo molde (probablemente de un organismo mesófilo), lo cual generaría una falsa alta similitud entre estructuras. Una comparación confiable requiere de nuevos datos experimentales, obtenidos por cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o criomicroscopía electrónica. A partir de datos estructurales de calidad se podrían hacer estudios comparativos que evalúen características de proteínas adaptadas al frío, como la flexibilidad a través de simulaciones de dinámica molecular en GROMACS o por comparación de factores de temperatura B, así como comparaciones estructurales con sus contrapartes mesófilas. Además, es necesario incrementar el tamaño de muestra para esclarecer si la adaptación al frío en levaduras es cepa-dependiente, para ello se puede buscar y utilizar una especie mejor caracterizada que *R. mucilaginosa* u obtener más datos para esta levadura.

10. Anexos

10.1 Anexo 1: tabla de porcentajes de aminoácidos y valores de *p* de la comparación por ANOVA entre basidiomicetos adaptados al frío vs basidiomicetos mesófilos vs *R. mucilaginosa* AN5 vs *R. mucilaginosa* RIT389

	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr
Porcentaje promedio basidiomicetos mesófilos	10.475135	1.874611	5.7065847	6.2215071	3.16304179	6.8902336	2.5348756	3.9576561	4.6009504	8.8237445	2.3552972	2.8945828	6.76260171	3.94644311	6.56345005	7.8395831	5.86516619	6.02404017	1.4852383	2.5351624
Desv. Estándar	2.75420738	1.01588833	1.91518888	2.40749134	1.47015512	2.57826866	1.23891339	1.63949138	2.47086695	2.44374371	1.08265594	1.44957594	2.71652057	1.741270497	2.37706682	2.85926281	1.71993355	1.86147566	0.96556811	1.25334617
Porcentaje promedio basidiomicetos adaptados al frío	11.0844692	1.1405344	5.6065798	5.7888172	3.35749333	7.14740395	2.4233286	3.88888888	4.43462724	9.11418684	1.85608986	2.87272703	6.45419492	3.91652734	6.65708714	8.58499971	5.80786983	6.18988634	1.29810388	2.38603709
Desv. Estándar	2.88025863	1.07580789	1.90005947	2.255916126	1.46739035	2.40629213	1.20680259	1.60839907	2.3536309	2.49405305	0.90476885	1.30405033	2.48517403	1.60882087	2.24915872	2.98822252	1.63882754	1.85211978	0.87571926	1.24578395
Porcentaje promedio <i>R. mucilaginosa</i> AN5	11.6751429	3.08942857	5.14485714	4.47457143	3.47257143	7.119	2.18071429	4.141	6.93971429	9.322	1.57928571	3.63085714	6.98140857	4.21257143	3.30842857	6.66671429	5.44471429	5.626	1.73528571	3.60157143
Desv. Estándar	3.99367297	5.32847339	2.08755754	2.74240107	1.87082287	1.70188243	1.43230196	2.14072631	1.91751573	4.7999809	0.96939495	2.14327735	2.52347649	2.6974182	1.36559985	3.97218956	1.04741773	2.07879386	1.52299537	1.52672622
Porcentaje promedio <i>R. mucilaginosa</i> RIT389	7.0616129	0.91738065	3.3188129	3.47445161	6.2182982	6.29383216	2.7204952	6.70016129	3.41964616	13.337258	3.08808323	3.89106452	4.18167742	3.33657098	3.80367742	7.92954839	6.53416129	7.72651613	1.38874194	4.54445161
Desv. Estándar	2.75128248	0.73790003	1.84217765	1.452458	2.58876846	2.30840307	1.53242137	2.57394562	2.05426976	3.0557144	1.05540404	1.75131711	1.37328811	1.51003239	1.73729421	2.38217058	1.71523561	2.94559948	1.02883508	1.46470866
ANOVA: valor de <i>p</i>	<2x10 ⁻¹⁶	8.53x10 ⁻⁸	3.25x10 ⁻¹³	<2x10 ⁻¹⁶	<2x10 ⁻¹⁶	4.27x10 ⁻⁹	1.2x10 ⁻⁹	<2x10 ⁻¹⁶	6.56x10 ⁻⁸	<2x10 ⁻¹⁶	<2x10 ⁻¹⁶	5.78x10 ⁻¹²	<2x10 ⁻¹⁶	0.0787	9.92x10 ⁻¹⁵	<2x10 ⁻¹⁶	0.0762	<2x10 ⁻¹⁶	<2x10 ⁻¹⁶	<2x10 ⁻¹⁶

10.2 Anexo 2: tabla de valores de p de la prueba de Tukey HSD entre basidiomicetos adaptados al frío vs basidiomicetos mesófilos vs *R. mucilaginosa* AN5 vs *R. mucilaginosa* RIT389

	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Arg	Ser	Val	Trp	Tyr
Basidiomicetos mesófilos-	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0	0.001	0	0	0
basidiomicetos adaptados al frío																		
<i>R. mucilaginosa</i> AN5-	0.94	0	0.92	0.44	0.99	0.99	0.95	0.97	0.08	0.99	0.88	0.45	0.95	0	0.3	0.85	0.59	0.049
basidiomicetos adaptados al frío																		
<i>R. mucilaginosa</i> RIT389-	0	0.64	0	0	0	0	0.52	0	0.09	0	0	0	0	0	0.59	0	0.97	0
basidiomicetos adaptados al frío																		
<i>R. mucilaginosa</i> AN5-	0.47	0	0.86	0.19	0.94	0.99	0.87	0.99	0.13	0.95	0.17	0.59	0.99	0	0.71	0.66	0.85	0.1
basidiomicetos mesófilos																		
<i>R. mucilaginosa</i> RIT389-	0	0.48	0	0	0	0	0.83	0	0.03	0	0	0	0	0	0.99	0	0.95	0
basidiomicetos mesófilos																		
<i>R. mucilaginosa</i> RIT389-R-	0	0	0.1	0.73	0	0.85	0.71	0	0	0	0	0.92	0.05	0.95	0.73	0.03	0.77	0.27
<i>R. mucilaginosa</i> AN5																		

11. Referencias

1. Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 186(1947), 121–126. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86091-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86091-9)
2. Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
3. Avalos, J. & Limón, C. M. (2014). Biological roles of fungal carotenoids. *Current Genetics*, 61(3), 309–324. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0454-x>
4. Birben, E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S. & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, 9 – 19. <https://dx.doi.org/10.1097%2FWOX.0b013e3182439613>
5. Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
6. Buzzini, P., Branda, E., Goretti, M., & Turchetti, B. (2012). Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(2), 217–241. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01348.x>
7. Chibucos, M. C., Crabtree, J., Nagaraj, S., Chaturvedi, S., & Chaturvedi, V. (2013). Draft Genome Sequences of Human Pathogenic Fungus *Geomyces pannorum Sensu Lato* and Bat White Nose Syndrome Pathogen *Geomyces (Pseudogymnoascus) destructans*. *Genome Announcements*, 1(6), 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomea.01045-13>
8. Chojnacki, S., Cowley, A., Lee, J., Foix, A., & Lopez, R. (2017). Programmatic access to bioinformatics tools from EMBL-EBI update: 2017. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W550–W553. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx273>
9. Coleine, C., Masonjones, S., Selbmann, L., Zucconi, L., Onofri, S.,... Stajich, E. (2017). Draft Genome Sequences of the Antarctic Endolithic Fungi *Rachicladosporium antarcticum* CCFEE 5527 and *Rachicladosporium* sp. CCFEE 5018. *GenomeAnnounc*, 5(27), 41–43. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00397-17>
10. Cross, H., & Ruis, H. (1978). Regulation of Catalase Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by Carbon Catabolite Repression. *Molec. gen. Genet.*, 166, 37-43.
11. D'Amico, S., Marx, J. C., Gerday, C., & Feller, G. (2003). Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 7891–7896. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212508200>

12. Edge, R., & Truscott, T. (2018). Singlet Oxygen and Free Radical Reactions of Retinoids and Carotenoids—A Review. *Antioxidants*, 7(1), 5. <https://doi.org/10.3390/antiox7010005>
13. Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C. ... Cherry, J. M. (2014). The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. *Genes/Genomes/Genetics*, 4(3), 389–398. <https://doi.org/10.1534/g3.113.008995>
14. Ezgi, A., & Takaç, S. (2012) Investigation of the simultaneous production of superoxide dismutase and catalase enzymes from *Rhodotorula glutinis* under different culture conditions. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40(5), 338-344. DOI: 10.3109/10731199.2012.668910
15. Farrugia G. & Balzan, R. (2012). Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontiers in oncology*, 2 (64), 1 – 21. <https://dx.doi.org/10.3389%2Fonc.2012.00064>
16. Fedorova, M., Bollineni, R. C., Hoffmann R. (2013). Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews*, 33(2), 79 – 97. <https://doi.org/10.1002/mas.21381>
17. Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., & Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1351–1371. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1351>
18. Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239–247. Recuperado de www.nature.com
19. Galdieri, L., Mehrotra, S., Yu, S., & Vancura, A. (2010). Transcriptional Regulation in Yeast during Diauxic Shift and Stationary Phase. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 14(6), 629–638. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0069>
20. Galiazzo, F., & Labbe-Bois, R. (1993). Regulation of Cu,Zn- and Mn-superoxide dismutase transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Biochemical Societies*. 315(2), 197–200. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81162-S](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81162-S)
21. Gessler, N., Sokolov, A., Bykhovsky, V., & Belozerskaya, T. (2002). Superoxide Dismutase and Catalase Activities in Carotenoid-Synthesizing Fungi *Blakeslea trispora* and *Neurospora crassa* Fungi in Oxidative Stress. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(3), 205–209.

22. Ghosh, N., Das, A., Chaffee, S., Roy, S., & Sen, C. K. (2018). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Cell Death. En Immunity and Inflammation in Health and Disease. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805417-8.00004-4>
23. Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
24. Goordial, J., Raymond-Bouchard, I., Riley, R., Ronholm, J., Shapiro, N., Woyke, T., ... Whyte, L. (2016). Improved High-Quality Draft Genome Sequence of the Eurypsychrophile *Rhodotorula* sp. JG1b, Isolated from Permafrost in the Hyperarid Upper-Elevation McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Genome Announcements*, 4(2), 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomea.00069-16>
25. Held, P. (2015). An Introduction to Reactive Oxygen Species: Measurement of ROS in Cells. *White paper*, 1–14.
26. Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S., & Floyd, R. A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10), 1456–1462. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00252-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00252-5)
27. Hernández-Saavedra, N., & Ochoa, J. (1999). Copper–Zinc Superoxide Dismutase from the Marine Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 15, 657–668.
28. Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E.... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
29. Hoog, J., Guarro, J., & Gené, M. J. (2000). Atlas of clinical fungi. Barcelona, España: CBS, Utrecht.
30. Horowitz, A., Matthews, J.M., & Fersht, A.R. (1992). α -Helix stability in proteins: II. Factors that influence stability at an internal position. *J. Mol. Biol.* 227, 560-568. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90907-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90907-2)
31. Hough, M. A., Strange, R. W., & Hasnain, S. S. (2000). Conformational variability of the Cu site in one subunit of bovine CuZn superoxide dismutase: The importance of mobility in the Glu119-Leu142 asa region for catalytic function. *Journal of Molecular Biology*, 304(2), 231–241. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4186>
32. Irazusta, V. P., Nieto, C., G., Cabral, M., E., Amoroso, M., J. & Castellanos de Figueroa, L., I. (2013). Relationship among carotenoid production, copper bioremediation and oxidative stress in *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11. *Process Biochemistry*, 48 (5-6), 803–809. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.006>

33. Inoue, Y., Tran, L., Kamakura, M., Izawa, S., Miki, T., Tsujimoto, Y., & Kimura, A. (1995). Oxidative stress response in yeast: glutathione peroxidase of *Hansenula mrakii* is bound to the membrane of both mitochondria and cytoplasm. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1245, 325-330.
34. Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., & Kimura, A. (1999). Genetic Analysis of Glutathione Peroxidase in Oxidative Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 27002–27009.
35. Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 320(1), 61–67. <https://doi.org/10.1042/bj3200061>
36. Jaafar, N. R., Littler, D., Beddoe, T., Rossjohn, J., Md Illias, R., Mahadi, N. M., Abu Bakar, F. D. (2016). Crystal structure of fuculose aldolase from the Antarctic psychrophilic yeast *Glaciozyma antarctica* PI12. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 72(11), 831–839. <https://doi.org/10.1107/S2053230X16015612>
37. Kan, G., Wen, H., Wang, X., Zhou, T., & Shi, C. (2017). Cloning and characterization of iron-superoxide dismutase in Antarctic yeast strain *Rhodotorula mucilaginosa* AN5. *Journal of Basic Microbiology*, 57(8), 680–690. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700165>
38. Kannan, N., Nguyen, L. V., Makarem, M., Dong, Y., Shih, K., Eirew, P.,... Eaves, C. J. (2014). Glutathione-dependent and -independent oxidative stress-control mechanisms distinguish normal human mammary epithelial cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(21), 7789–7794. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403813111>
39. Kelly, F. J. (2003). Oxidative Stress : Its Role in Air Pollution and Adverse Health Effects. *Occup Environ Med*, 60, 612 – 616. <http://dx.doi.org/10.1136/oem.60.8.612>
40. Knox, M. A., Wall, D. H., Virginia, R. A., Vandegheuchte, M. L., San Gil, I., & Adams, B. J. (2016). Impact of diurnal freeze–thaw cycles on the soil nematode *Scottnema lindsayae* in Taylor Valley, Antarctica. *Polar Biol.* 39, 583–592. doi: 10.1007/s00300-015-1809-6
41. Kostadinova, N., Krumova, E., Stefanova, T., Dishliyska, V., & Angelov, M. (2014). Transient Cold Shock Induces Oxidative Stress Events in Antarctic Fungi. *Oxidative Stress - Environmental Induction and Dietary Antioxidants*. <https://doi.org/10.5772/35127>

42. Kot, A. M., Błazejak, S., Gientka, I., Kieliszek, M., & Bryś, J. (2018). Torulene and torularhodin: “New” fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z>
43. Krumova, K., & Cosa, G. (2016). Overview of reactive oxygen species. En Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences; The Royal Society of Chemistry: London, UK, 2016; Capítulo 1; Volumen 1, pp. 1–21.
44. Kusch, H., Engelmann, S., Bode, R., Albrecht, D., Morschhäuser, J., & Hecker, M. (2007). A proteomic view of *Candida albicans* yeast cell metabolism in exponential and stationary growth phases. *International Journal of Medical Microbiology*, 298(3–4), 291–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.020>
45. Liu, Y. S., & Wu, J. Y. (2006). Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 663–668. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0501-8>
46. Maayer, P., Anderson, D., Cary, C., & Cowan, D. A. (2014). Some like it cold: Understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Reports*, 15(5), 508–517. <https://doi.org/10.1002/embr.201338170>
47. Manfredini, V., Roehrs, R., Peralba, M. C. R., Henriques, J. A. P., Saffi, J., Ramos, A. L. L. P., & Benfato, M. S. (2004). Glutathione peroxidase induction protects *Saccharomyces cerevisiae* sod1 Δ sod2 Δ double mutants against oxidative damage. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(2), 159–165. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000200001>
48. Martins, D., & English, A. M. (2014). Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. *Redox Biology*, 2(1), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.019>
49. Mata-Gómez, L. C., Montañez, J. C., Méndez-Zavala, A., & Aguilar, C. N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: An overview. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>
50. Maté, M. J., Zamocky, M., Nykyri, L. M., Herzog, C., Alzari, P. M., Betzel, C., ... Fita, I. (1999). Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, 286(1), 135–149. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2453>
51. McKenzie, R. L., Aucamp, P. J., Bais, A. F., Björn, L. O., Ilyas, M., & Madronich, S. (2011). Ozone depletion and climate change: Impacts on UV radiation. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 10(2), 182–198. <https://doi.org/10.1039/c0pp90034f>
52. Michan, C., Martinez, J., Alvarez, M., Turk, M., Sychrova, H., & Ramos, J. (2013). Salt and oxidative stress tolerance in *Debaryomyces hansenii* and

- Debaryomyces fabryi*. *FEMS Yeast Res.*, 13, 180–188. DOI: 10.1111/1567-1364.12020
53. Missall, T., Cherry-Harris, J., & Lodge, J. (2005). Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates. *Microbiology*, 151, 2573–2581. DOI 10.1099/mic.0.28132-0
54. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
55. Moliné, M., Flores, M. R., Libkind, D., Del Carmen Diéguez, M., Fariás, M. E., & Van Broock, M. (2010). Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: The role of torularhodin. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 9(8), 1145–1151. <https://doi.org/10.1039/c0pp00009d>
56. Morita, R. Y. (1975). Psychrophilic Bacteria. *Bacteriological reviews*, 274(7109), 957–958. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(59\)91597-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(59)91597-1)
57. Murphy, M. P. (2008). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/bj20081386>
58. Muthukumar, K., Rajakumar, S., Sarkar, M. N., & Nachiappan, V. (2011). Glutathione peroxidase3 of *Saccharomyces cerevisiae* protects phospholipids during cadmium-induced oxidative stress. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 99(4), 761–771. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9550-9>
59. Nakagawa, C. W., Mutoh, N., & Hayashi, Y. (1995). Transcriptional regulation of catalase gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Molecular cloning of the catalase gene and northern blot analyses of the transcript. *Journal of Biochemistry*, 118(1), 109–116. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124864>
60. Nakagawa, Y., Watanabe, K. K. K., Morita, Y., Mizuguchi, I., & Akashi, T. (1999). The Expression of the Pathogenic Yeast *Candida albicans* Catalase Gene in Response to Hydrogen Peroxide. *Microbiology and Immunology*, 43(7), 645–651. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1999.tb02452.x>
61. Navarrete, C., Siles, A., Martínez, J., Calero F., & Ramos J. (2009) Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.*, 9, 582–590. DOI:10.1111/j.1567-1364.2009.00500.x
62. Nedeva, T. S., Petrova, V. Y., Zamfirova, D. R., Stephanova, E. V., & Kujumdzieva, A. V. (2004). Cu/Zn superoxide dismutase in yeast mitochondria - A general phenomenon. *FEMS Microbiology Letters*, 230(1), 19–25. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00855-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00855-3)

63. Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). Amino acids, peptides and proteins. En *Lehninger Principles of Biochemistry* (75-115). USA: W. H. Freeman.
64. Oliveira, M. V. de, Oliveira, A. C. de F., Shida, C. S., Oliveira, R. C. de, & Nunes, L. R. (2013). Gene expression modulation by paraquat-induced oxidative stress conditions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology*, 60, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.05.004>
65. Palmer, J. M., Drees, K. P., Foster, J. T., & Lindner, D. L. (2018). Extreme sensitivity to ultraviolet light in the fungal pathogen causing white-nose syndrome of bats. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02441-z>
66. Penninckx, M. J. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research*, 2(3), 295–305. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00081-8](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00081-8)
67. Pereira, M. D., Herdeiro, R. S., Fernandes, P. N., Eleutherio, E. C. A., & Panek, A. D. (2003). Targets of oxidative stress in yeast sod mutants. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1620(1–3), 245–251. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(03\)00003-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00003-5)
68. Phillipot, H. R. (1985). Physical geography – Climate. En Bonner, W. N. y Walton, D. W. H. (eds) *Key Environments: Antarctica*. Pergamon Press, Oxford, 23–38.
69. Pizzorno, J. (2014). Glutathione. *Integrative Medicine*, 13(1), 8–12. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4684116/pdf/8-12.pdf>
70. Porteous, N. B., Grooters, A. M., Redding, S. W., Thompson, E. H., Rinaldi, M. G., De Hoog, G. S., & Sutton, D. A. (2003). Identification of *Exophiala mesophila* isolated from treated dental unit waterlines. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8), 3885–3889. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3885-3889.2003>
71. Ramírez, M., Hernández-Saavedra, N., Ascencio, F., Acosta B., & Ochoa, J. (1998). Cell yield and superoxide dismutase activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* under different culture conditions. *Journal of Marine Biotechnology*, 6, 255–259.
72. Ray, P. D., Huang B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 24(5): 981 – 990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
73. Richardson, J.S. & Richardson, D.C. (1988). Amino acid preferences for specific locations at the ends of α helices. *Science* 240, 1648-1652. <https://10.1126/science.3381086>

74. Rodrigues, D. F., & Tiedje, J. M. (2008). Coping with our cold planet. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(6), 1677–1686. <https://doi.org/10.1128/AEM.02000-07>
75. Russell, R. J., Gerike, U., Danson, M. J., Hough, D. W., & Taylor, G. L. (1998). Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium. *Structure*, 6(3), 351–361. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(98\)00037-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(98)00037-9)
76. Saika, A., Koike, H., Hori, T., Fukuoka, T., Sato, S., Habe, H.,... Morita, T. (2014). Draft Genome Sequence of the Yeast *Pseudozyma antarctica* Type Strain JCM10317, a Producer of the Glycolipid Biosurfactants, Mannosylerythritol Lipids. *Genome Announcements*, 2(5), 4–5. <https://doi.org/10.1128/genomea.00878-14>
77. Salinas, V. W. (2014). Improving stress tolerance in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production from lignocellulosic biomass. Recuperado de <http://lup.lub.lu.se/luur/download?func=downloadFile&recordId=4393519&fileId=4393530>
78. Saunders, N. F. W., Thomas, T., Curmi, P. M. G., Mattick, J. S., Kuczek, E., Slade, R., Cavicchioli, R. (2003). Mechanisms of thermal adaptation revealed from genomes of the antarctic Archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanacoccoides burtonii*. *Genome Research*, 13(7), 1580–1588. <https://doi.org/10.1101/gr.1180903>
79. Schiraldi C., & De Rosa M. (2014) Mesophilic Organisms. En: Drioli E., Giorno L. (eds) *Encyclopedia of Membranes*. Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-40872-4>
80. Ścibior, D., & Czczot, H. (2006). Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw*, 60, 170–180. Recuperado de http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/8969.pdf
81. Spitz, D. R., & Oberley, L. W. (1989). An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*, 179(1), 8–18. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90192-9A](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90192-9A)
82. Takemoto, D., Tanaka, A., & Scott, B. (2007). NADPH oxidases in fungi: Diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genetics and Biology*, 44(11), 1065–1076. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.04.011>
83. Triana, S., González, A., Ohm, R. A., Wösten, H. A. B., de Cock, H., Restrepo, S., & Celis, A. (2015). Draft Genome Sequence of the Animal and Human

- Pathogen *Malassezia pachydermatis* Strain CBS 1879. *Genome Announcements*, 3(5), 10–11. <https://doi.org/10.1128/genomea.01197-15>
84. Troncoso, E., Barahona, S., Carrasco, M., Villarreal, P., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2016). Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. *Polar Biology*, 40(3), 649–658. <https://doi.org/10.1007/s00300-016-1988-9>
 85. Tsang, C.K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., & Zheng, X. F. (2014) Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *NATURE COMMUNICATIONS* 5: 3446, 2014. DOI: 10.1038/ncomms4446
 86. Ukibe, K., Hashida, K., Yoshida, N., & Takagi, H. (2009). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7205–7211. <https://doi.org/10.1128/AEM.01249-09>
 87. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
 88. Venema, J., & Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, 33, 261–311. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.261>
 89. Warner, J.R., Vilardell J., & Sohn, J.H. (2001). The economics of ribosome biosynthesis. *Cold Spring Harbor Symposya Quantitative Biology*, 66, 567–574.
 90. Weydert, C., & Cullen, J. (2011). Measurement of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Cultured Cells and Tissue. *Nature Protocols*, 5(1), 51–66. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.197>. MEASUREMENT
 91. Yang, R. Y., Li, H. T., Zhu, H., Zhou, G. P., Wang, M., & Wang, L. (2012). Draft Genome Sequence of CBS 2479, the Standard Type Strain of *Trichosporon asahii*. *Eukaryotic Cell*, 11(11), 1415–1416. <https://doi.org/10.1128/ec.00237-12>
 92. Yergeau, E., & Kowalchuk, G. A. (2008). Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze-thaw cycle frequency. *Environmental Microbiology*, 10(9), 2223–2235. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01644.xx>
 93. Young, A., & Lowe, G. (2018). Carotenoids—Antioxidant Properties. *Antioxidants*, 7(2), 28. <https://doi.org/10.3390/antiox7020028>
 94. Zhao, J. S., Deng, Y., Manno, D., & Hawari, J. (2010). *Shewanella* spp. genomic evolution for a cold marine lifestyle and *in-situ* explosive biodegradation. *PLoS ONE*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009109>