



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE CÉLULAS
MUTANTES DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*”**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
APLICADA A CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

BIÓL. MARIO ALBERTO VELASCO RAMOS

DIRECTOR:

**DRA. GUDALUPE TRINIDAD ZAVALA PADILLA
UME, IBt, CUERNAVACA, MORELOS**

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2020.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

***"Nuestro conocimiento solo puede ser finito,
mientras que nuestra ignorancia debe ser
necesariamente infinita".***

Karl Popper,

The Logic of Scientific Discovery, 1959.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Guadalupe Zavala por su asesoría en la realización de este trabajo ya que sin su paciencia, profesionalismo, apoyo y enseñanzas no habría sido posible concluir este trabajo. Gracias Dra. Zavala por impulsarme a dar lo mejor de mi persona e incitarme a continuar con la investigación científica y sobre todo por brindarme su amistad.

Dra. Reyna y Maestra Elizabeth, gracias por sus múltiples enseñanzas, por su calidez humana, su gran profesionalismo, por su amistad y por esas charlas y momentos tan amenos que tuvimos en el laboratorio.

Quiero agradecer a mis compañeros Óscar y Daimon, quienes se convirtieron en entrañables amigos, por todas esas aventuras que pasamos dentro y fuera del contexto académico, las cuales sin duda alguna se quedarán guardadas en mi memoria con gran estima y afecto.

Agradezco a Jacaranda, por haber compartido grandes y entrañables momentos dentro y fuera de la especialidad, por brindarme su confianza y su amistad.

También, quiero agradecer infinitamente al Dr. Luis Felipe Jiménez y al comité de ingreso a la especialidad por permitirme formar parte de este programa.

Para finalizar quiero agradecer a esta casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por seguir arropándome académicamente y por su inconmensurable grandeza. Por todo esto y más "Por mi raza hablará el espíritu".

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres, Don Mario y Doña Conchita, ya que sin su amistad, amor, apoyo y confianza no habría sido posible continuar con este proyecto. Gracias por darme la vida y por enseñarme a vivirla, los amo eternamente.

De igual manera, dedico este trabajo a mis hermanos, Toto, Lili, Alma y David por su infinito apoyo, los amo inconmensurablemente.

A mi sobrino Ángel (*the sheep*), le dedico este trabajo ya que su confianza y cariño me fomentan el deseo de mejorar tanto personal como académicamente día con día. Te quiero mucho.

También dedico este trabajo a mi amigo y hermano Víctor Becerra, tu apoyo fue elemental para la culminación de este trabajo.

Por último y no menos importante, dedico este trabajo a Eleazar Ramos, su guía fue trascendental en este proyecto.

INDICE

| | |
|---|---------|
| Resumen..... | Pág. 01 |
| Introducción..... | Pág. 02 |
| I. Generalidades de las levaduras..... | Pág. 02 |
| II. <i>S. cerevisiae</i> y microscopia electrónica..... | Pág. 03 |
| III. Levaduras y factores de transformación..... | Pág. 04 |
| Antecedentes..... | Pág. 06 |
| Justificación..... | Pág. 07 |
| Objetivos..... | Pág. 08 |
| Material y método..... | Pág. 08 |
| Fijación..... | Pág. 09 |
| Deshidratación y preinclusión..... | Pág. 09 |
| Inclusión..... | Pág. 10 |
| Ultramicrotomía..... | Pág. 10 |
| Contraste..... | Pág. 10 |
| Observación..... | Pág. 10 |
| Resultados y discusión..... | Pág. 11 |
| Conclusión..... | Pág. 25 |
| Bibliografía..... | Pág. 26 |

PRÓLOGO

La microscopía es una herramienta indispensable en la investigación científica. Hacia 1924, Louis de Broglie documentó que los electrones actuaban como partículas y ondas. En 1927, Davisson y Germer observaron por primera vez que la longitud de onda de los electrones coincide con las dimensiones atómicas y debido a una velocidad más lenta; los electrones se difractan de la matriz regular de átomos dispuestos en la superficie de un cristal. En ese mismo año, Thomson demostró el patrón de difracción de electrones de transmisión a través de una muestra delgada y se dio cuenta de que si estos electrones transmitidos podían enfocarse, la longitud de onda permitiría obtener imágenes a una mayor resolución que el microscopio de luz. Este concepto llevó a que en 1931, el físico alemán Ernst Ruska y el ingeniero eléctrico Max Knoll construyeran el primer microscopio electrónico de transmisión (MET) equipado con un aumento de 400 X.*

Desde entonces, el MET ha permitido estudiar la ultraestructura celular y la función de los tejidos en una escala nanométrica. De manera que el MET sigue siendo la técnica principal que permite estudiar sistemas biológicos debido a su resolución de nivel casi atómico. Además, el MET comprende diferentes ramas: cristalografía electrónica y análisis de partículas individuales (dedicados al estudio de proteínas y complejos macromoleculares); tomografía (crio) electrónica y microscopía crioeléctrica de secciones vítreas (CEMOVIS, por sus siglas en inglés) para orgánulos celulares y arquitectura molecular y MET convencional para morfología macroscópica. Esta amplia gama de técnicas que ofrece el MET brinda la oportunidad de encontrar la relación entre diferentes macromoléculas, sus complejos supramoleculares y orgánulos ensamblados en una intrincada red de compartimentos celulares. Por lo que el conocimiento de la ultraestructura celular contribuye a la comprensión del funcionamiento de células y tejidos en estado fisiológico y patológico.**

*Tomado de Chatterjee S *et al.* Electron Microscopy in the Perspective of Modern Biology: Ultravision and Ultradimension. Formatex (2012).

**Adaptado de Mielańczyk L *et al.* Transmission Electron Microscopy of Biological Samples. Intech (2015).



La imagen muestra el MET de energía filtrada (EFTEM ZEISS modelo LIBRA 120) único en el país, con la potencia para aumentar hasta 600 mil veces el tamaño de una muestra; magnificación que permite la caracterización estructural de materiales en el rango nanométrico y sub-nanométrico, el cual se encuentra en la Unidad de Microscopía Electrónica (UME), Instituto de Biotecnología (IBt), UNAM, Campus Morelos.

RESUMEN

Las levaduras son hongos protagonistas en el área de producción e investigación científica. En ese sentido, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ha fungido como el modelo por excelencia para muchos procesos biológicos, pero también para ciertos aspectos ultraestructurales de las células eucariotas. Sin embargo las levaduras tienen la particularidad de no permitir la infiltración adecuada de soluciones y agentes químicos al interior celular por la rigidez de su pared para su estudio con microscopía electrónica de transmisión (MET). Incluso, con las nuevas técnicas de criofijación, los detalles ultraestructurales de la arquitectura celular de *S. cerevisiae* todavía presentan dificultades para su observación al MET. De manera que el objetivo de esta investigación se centró en el estudio ultraestructural de *S. cerevisiae* de tipo silvestre y organismos modificados en MET. Los resultados demostraron cambios en la pared celular de *S. cerevisiae* silvestre y organismos modificados con el uso de fijación química, adición de un tratamiento con KMnO_4 al inicio del procesamiento e inclusión en resina Epon, sin la utilización de contraste convencional para estudios en MET.

INTRODUCCIÓN

I. Generalidades de las levaduras

Las levaduras se definen como hongos ascomicetos o basidiomicetos que históricamente han sido reconocidas como protagonistas en la producción de alimentos y bebidas mediante el proceso de la fermentación. En la actualidad son utilizadas en diferentes áreas como se muestra en la Tabla 1.^{1,2}

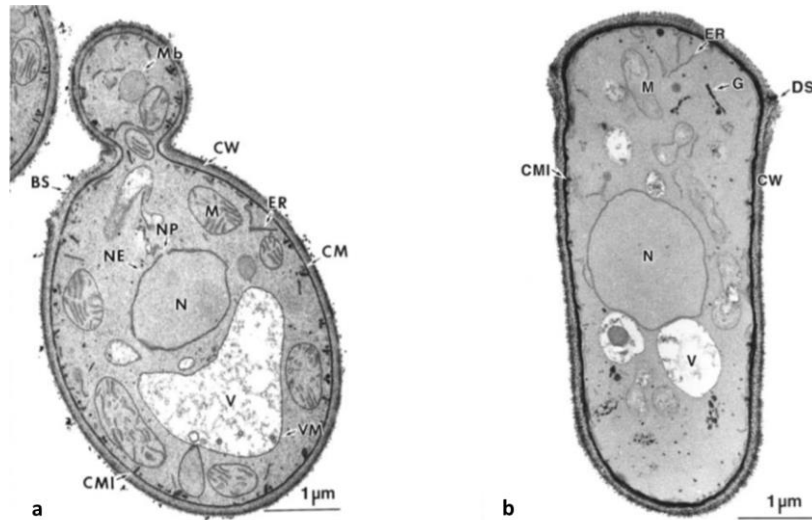
Usos de la levadura

| Área | Utilidad |
|--------------------------------------|---|
| Fermentaciones tradicionales | Producción de cerveza, vino, sake y salsa de soya. |
| Alimentaria | Producción de enzimas, saborizantes, pigmentos, aminoácidos y ácidos orgánicos. |
| Biocatálisis | Estudios farmacéuticos e intermediarios químicos. |
| Biotecnología ambiental | Aplicación en biorremediación y degradación de contaminantes. |
| Biocontrol | Protección de cultivos, alimentos y probióticos. |
| Producción de proteínas heterólogas | Producción de proteínas farmacéuticas, enzimas, hormonas, vacunas y toxinas. |
| Investigación en ciencias biológicas | Estudio de biología molecular, celular, genómica y mecanismos de sistemas biológicos. |
| Investigación biomédica | Descubrimiento, resistencia y metabolismo de fármacos. Mecanismos de enfermedades. |

Tabla 1. Adaptado de *Inf. Tecnológica* 2016;27:3-16. Se observan los principales usos de las levaduras.²

Por otro lado, las levaduras son eucariotas unicelulares con una estructura subcelular similar a las células superiores de animales y plantas, razón por lo cual es un modelo ampliamente utilizado en los campos básicos y aplicados de la biología. Estas, se reproducen vegetativamente por gemación (forma elipsoidal; 6 × 5 μm) o fisión (forma de varilla cilíndrica; 7-8 × 2.5 μm) y tienen estadios sexuales que no forman cuerpos fructíferos. Pese a estos dos tipos de proliferación celular, su estructura celular es básicamente la misma: núcleo con poros nucleares, mitocondrias, microcuerpos, vacuolas y retículo endoplasmático, principalmente (Figura 1a y 1b).^{3,4}

Características celulares



Abreviaturas: BS, cicatriz de brote; Bir S, cicatriz de nacimiento; CM, membrana celular; CMI, invaginación de la membrana celular; CW, pared celular; DS, cicatriz de la división; RE, retículo endoplasmático; G, aparato de Golgi; M, mitocondria; Mb, microcuerpo; N, núcleo; NP, poro nuclear; NE, envoltura nuclear; V, vacuola y VM, membrana de vacuolas.

Figura 1. Modificado de *Journal of Electron Microscopy* 2012;61:343-365. Muestra una electrónmicrografía con las características generales ultraestructurales de las levaduras por microscopia electrónica de trasmisión (MET). a, levadura de gemación *S. cerevisiae*; b, levadura por fisión *Schizosaccharomyces pombe*.³

II. *S. cerevisiae* y microscopia electrónica

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) es un hongo ascomiceto que ha fungido como el modelo por excelencia para la investigación de muchos procesos biológicos, pero también para ciertos aspectos ultraestructurales de las células eucariotas (Figura 2). Para este objetivo, el microscopio electrónico (ME), permite el análisis de la ultraestructura de células y tejidos, así como de compartimentos subcelulares. El ME ayuda a estudiar procesos celulares como la organización del citoesqueleto, la formación de vesículas de transporte y el establecimiento de la arquitectura de orgánulos. También, contribuye a la localización precisa de proteínas y otros componentes celulares. En ese sentido, más allá de su alta resolución, otro aspecto único del ME es que proporcionan información sobre el contexto celular de la estructura de interés, que regularmente no se puede explorar con otros enfoques experimentales; ventaja que se vuelve más clara cuando se analizan células

mutantes, ya que el ME puede proporcionar pistas sobre la posible función de una proteína y los efectos causados por su mutación. Sin embargo, este potencial se ha explorado mínimamente, debido a que la levadura representa un desafío para la mayoría de los procedimientos con ME ya que posee una pared celular que afecta la infiltración de células con productos químicos y resinas. Asimismo, su alta concentración de proteínas en el citoplasma, dificulta obtener buen contraste y resolución morfológica. Sin embargo, una serie de novedosos desarrollos y adaptaciones para el ME han contribuido significativamente para una nueva era en la investigación ultraestructural de este organismo.³⁻⁷

Arquitectura celular

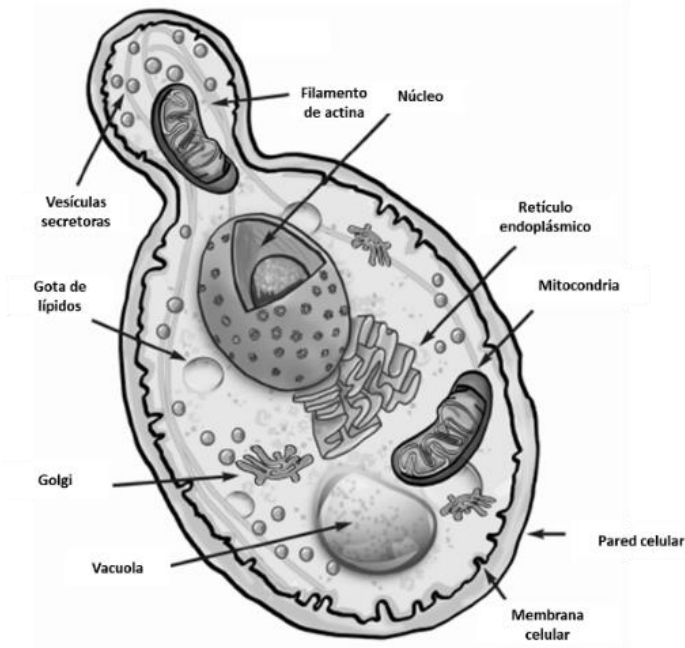


Figura 2. Adaptado de *Beverages* 2016;2:30. Se observa la composición celular típica de la levadura *S. cerevisiae*.⁵

III. Levaduras y factores de transformación

A su vez, las células de levadura se ven sometidas a varios tipos de estrés ya sea por situaciones naturales o durante procesos industriales. Por lo que el daño y la respuesta de la levadura provocada por el estrés, depende del tipo y grado del mismo, así como el estado de desarrollo de la levadura en que ocurre el estímulo. Sin

embargo, generalmente, las condiciones adversas a las que se enfrenta este organismo impacta principalmente la arquitectura celular, por ejemplo, membranas y diferentes macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, quienes también sufren modificaciones estructurales. Ante este panorama, la respuesta a estrés por calor en levadura es de las mejor estudiadas; un incremento de 10 a 15°C por arriba de la temperatura óptima de crecimiento, induce la síntesis de un grupo de proteínas llamadas HSP (*Heat Shock Proteins*, por sus siglas en inglés) involucradas en impedir la desnaturalización o inducir la renaturalización de proteínas, degradación de proteínas mal plegadas y la disgregación de agregados proteínicos causados por desnaturalización.⁶

Más aún, se encuentra bien documentado que bajo condiciones limitantes de nitrógeno o glucosa, algunas cepas de *S. cerevisiae*, por ejemplo, Σ 1278b pueden experimentar una transición de la forma de crecimiento similar a la levadura en ciernes a una en la que las células se alargan y permanecen conectadas después de la división celular, formando filamentos multicelulares denominados pseudohifas (Figura 3).⁸

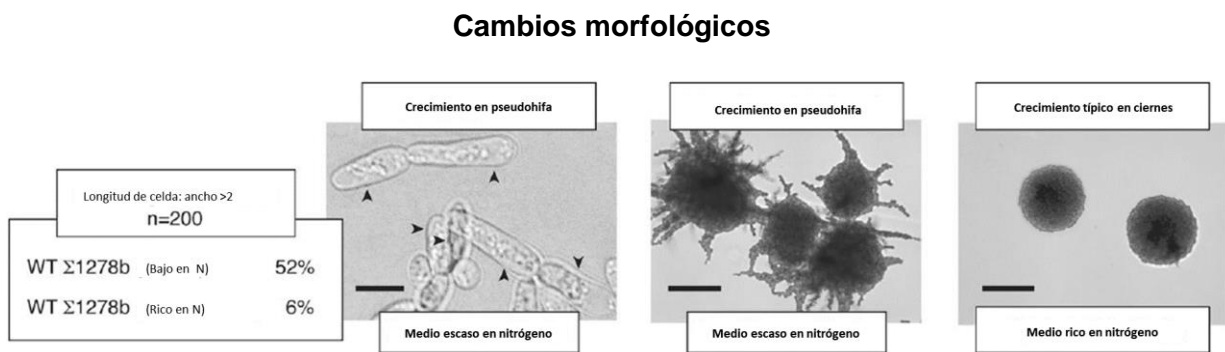


Figura 3. Adaptado de *Curr Genet* 2019;65:119-125. Se observan los cambios morfológicos en la levadura *S. cerevisiae* y colonias cultivadas en medios con sulfato de amonio limitado como fuente de nitrógeno (medios con bajo contenido de nitrógeno) o en medios con disponibilidad normal de nutrientes. La cuantificación del alargamiento de la célula se indica como el porcentaje de células que muestran una relación entre el largo y el ancho de la célula >2. Las puntas de flecha indican células alargadas típicas del crecimiento en pseudohifa. Barra de escala para células, 3 μ m; barras de escala para imágenes de colonias, 2 μ m.⁸

De manera que la supervivencia de una célula se asocia con su capacidad para adaptarse a los cambios biológicos de su entorno como lo son la temperatura,

osmolaridad, pH, disponibilidad de nutrientes o la presencia de intermediarios reactivos del oxígeno. En ese sentido, el primer caso descrito en la literatura de respuesta molecular a un factor de estrés fue la respuesta al choque térmico, la cual es la respuesta a estrés más estudiada, hasta el punto de que en ocasiones ambos términos se consideran equivalentes. Ante este panorama, en *S. cerevisiae* se han descrito proteínas de choque térmico pertenecientes a las principales familias descritas para la mayoría de organismos, y que se suelen denominar por su peso molecular aproximado. Por ello, la utilización de *S. cerevisiae* como modelo para el estudio de los sistemas de percepción del estrés y de las respuestas desencadenadas puede aportar importante información sobre los mecanismos que, en general, ha utilizado la naturaleza para permitir a las células adaptarse a un ambiente hostil.⁹

ANTECEDENTES

Wright publicó una revisión que tuvo como objetivo principal, evaluar los diferentes tipos de preparación de material biológico para el ME de transmisión (MET) y el análisis de células de levadura. Se reportó que los cultivos celulares de *S. cerevisiae wild-type* (WT), cultivadas en diferentes medios de carbono, que recibieron fijación con glutaraldehído y postfijación con permanganato de potasio (KMnO₄) se asociaron con mejores resultados ultraestructurales en comparación con protocolos que utilizan postfijación con tetróxido de osmio (OsO₄). En ese sentido, se encuentra bien documentado que el KMnO₄ se asocia con una mejor visibilidad de las membranas celulares, por lo cual es considerado como extremadamente valioso para el análisis de la organización general de la membrana de las levaduras. De hecho en levaduras, varios informes indican la utilidad del KMnO₄ como una mancha de secciones delgadas usado en una amplia variedad de concentraciones que van desde 0.5 a 6% para su procesamiento al MET.¹⁰

Bauer *et al.* publicaron un estudio para evaluar la utilización de nuevas enzimas dirigidas a la eliminación eficaz de la pared celular de las levaduras. Para este objetivo

utilizaron levaduras de la cepa WT W334 y W334-Tim23delta50. Los resultados demostraron que la eliminación parcial de la pared celular con el uso de Zymolasa-20T, permite una mejor infiltración y penetración de las soluciones a sus objetivos intracelulares durante la fijación, tinción e inclusión, y que dependiendo de las condiciones, es posible eliminar por completo la pared celular de la levadura, logrando visualizar el citoesqueleto. Sin embargo, la eliminación total de la pared celular, resultó con mayor frecuencia en una pobre integridad ultraestructural del citoplasma con base en el análisis con MET.¹¹

McConnell *et al.* publicaron un estudio que tuvo como objetivo primario estudiar la herencia mitocondrial e identificar su base molecular, aislando mutantes sensibles a la temperatura de *S. cerevisiae*. Para este objetivo, mutantes *mdm* se aislaron de células mutantes sensibles a la temperatura, derivados de la cepa A364A. Para su análisis al MET el material biológico fue procesado con base a Stevens (1977) *Biol Cell* 28:37-56 y contrastado con acetato de uranilo al 2%. Los resultados demostraron que en los mutantes (*mdm1* y *mdm2*) las mitocondrias estaban ausentes. Además, las mutaciones parecen afectar la morfología de la mitocondria en células incubadas a temperatura no permisiva; en las células WT que crecen en glucosa, las mitocondrias aparecen como estructuras largas en forma de serpiente vs. *mdm1* donde están más fragmentadas y en forma de perlas. Por otra parte, las mitocondrias en *mdm2* cultivadas en glucosa, parecen similares a las del mutante *mdm1* después de la incubación a temperatura no permisiva. Así mismo, las mitocondrias en los mutantes *mdm1* y *mdm2* cultivadas en glicerol, parecen un poco más pequeñas pero más numerosas vs. WT post-incubación a 37°C.¹²

JUSTIFICACIÓN

El presente estudio muestra las modificaciones a nivel ultraestructural de la pared celular de levaduras mutantes en respuesta a los estímulos que produce la transformación. La preservación de la pared celular depende de la aplicación de permanganato de potasio (KMnO₄), tratamiento que dificulta el contraste del citoplasma. Aunado a los cambios en la pared celular, se consideró revisar las

particularidades ultraestructurales de los organelos de las levaduras modificadas [SA (serina por alanina), SD (serina por aspártico), DAAA (aspártico por alanina) y AAAA (todos los residuos de serina y aspártico mutan por alanina] así como el grupo control (WT).

OBJETIVO GENERAL

Estudio ultraestructural de *S. cerevisiae* WT y organismos modificados (SA, SD, DAAA y AAAA) en ME de transmisión (MET).

OBJETIVO PARTICULAR

- Evaluar los cambios ultraestructurales en pared celular de los organismos modificados (SA, SD, DAAA y AAAA) en comparación con WT.
- Evaluar los cambios ultraestructurales de membrana y otros componentes celulares de organismos modificados (SA, SD, DAAA y AAAA) en comparación con WT.

MATERIAL Y MÉTODO

Para esta investigación, la metodología utilizada fue adaptada de Wright (2000) *Micros Res Tech* 51:496-510, debido a que las opciones que han permitido la mejor preservación ultraestructural del citoplasma y los organelos involucran las criotécnicas que no están disponibles actualmente en la Facultad de Ciencias de la UNAM, ni tampoco en el Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM.

Las muestras de la cepa WT de levadura *S. cerevisiae* y de las cepas modificadas fueron proporcionadas por el Biol. Daniel Lagunas, estudiante del grupo del Dr. Omar Pantoja, investigador del Departamento de Biología Molecular de Plantas del IBt.

Para la obtención de cortes en ultramicrotomo, exploración de las muestras en MET y registro de imágenes, se utilizó el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010 de la Facultad de Ciencias UNAM y se contó con sesiones de apoyo en el MET Libra 120 ZEISS de la Unidad de Microscopía Electrónica del IBt.

Para su procesamiento al MET, los pellets fueron resuspendidos por centrifugación (1500 g, durante 5 minutos) y se procedió de la siguiente manera.

Es importante resaltar que las levaduras fueron divididas en dos grupos, el primero recibió la metodología citada a continuación y el segundo, no fue contrastado con acetato de uranilo (UA) y citrato de plomo de Reynold, de manera que pasaron directamente a la fase de observación al MET.

Fijación

Se fijaron con Glutaraldehído al 4% durante toda la noche a una temperatura de 4°C, posteriormente, recibieron un tratamiento post-fijación con KMnO_4 al 2% durante 45 minutos y tetróxido de osmio (OsO_4) al 2% durante 15 minutos. Después, los pellets fueron enjuagados exhaustivamente con solución amortiguadora de fosfatos hasta que el líquido fuese totalmente cristalino.

Deshidratación y Preinclusión

El material biológico fue deshidratado con una serie creciente de etanol en concentraciones de 30, 50, 70, 80, 90 y 96% durante 10 minutos por cambio de concentración para finalizar con etanol absoluto (100%) por triplicado durante un lapso de tiempo por cambio de 10 minutos cada uno.

Transcurrido este procedimiento, los pellets recibieron un tratamiento con óxido de propileno como agente intermediario con 3 cambios durante 10 minutos cada uno. Se dejaron en preinclusión con óxido de propileno: Epon, dilución 1:1 durante un periodo de tiempo de 24 horas hasta la evaporación del agente intermediario.

Inclusión

Posteriormente, los pellets fueron incluidos en resina Epoxica (Epon) fresca en moldes planos para su polimerización a una temperatura de 60°C durante un periodo de tiempo de 24 a 48 horas.

Ultramicrotomía

Los bloques fueron retirados de los moldes y se expuso la cara de corte con la ayuda de navajas con costilla unifilo para retirar el exceso de resina y con navajas súper afiladas de acero inoxidable doble filo para refinar la cara de corte. Después, se realizaron cortes con cuchilla de vidrio en ultramicrotomo (Leica Ultracut R) a un espesor de 70-90 nm, los cuales fueron montados en rejillas de cobre con 200 mesh cubiertas con colodión.

Contraste

Enseguida, las rejillas fueron contrastadas con acetato de uranilo (UA) al 2% durante 20 minutos y fueron lavadas con la técnica de flotación por 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se colocaron inmediatamente en citrato de plomo de Reynold al 0.2% durante 5 minutos y fueron lavadas por flotación durante 15 minutos.

Observación

Finalmente, las rejillas fueron observadas al MET operado a 80 kV (Jeol 1010 & Zeiss Libra 120 Plus) y se tomaron las electronmicrografías para su análisis.

En la Figura 4 se muestra un diagrama de flujo con el resumen del procesamiento realizado en este trabajo.

Procesamiento de levaduras

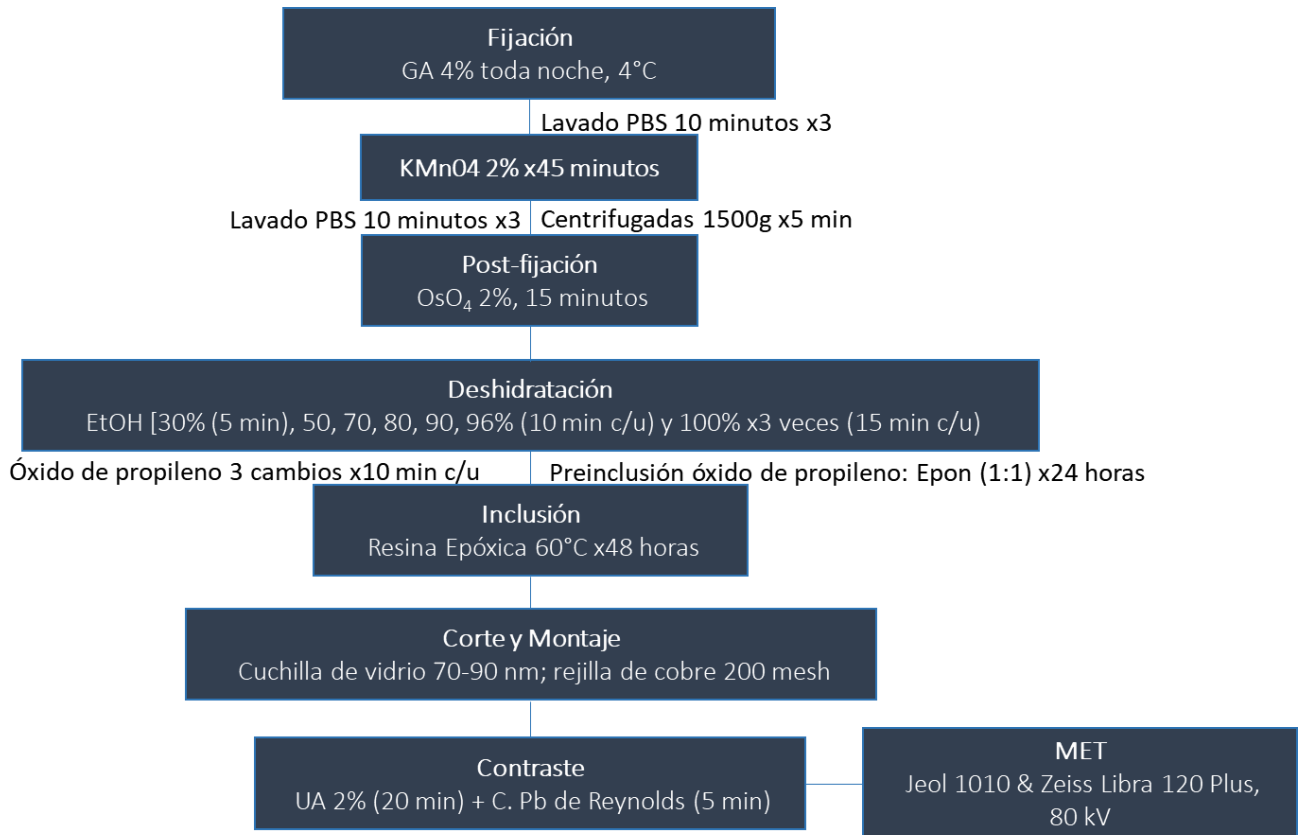


Figura 4. Presenta un diagrama de flujo con los detalles del procesamiento para MET utilizado en las levaduras *S. cerevisiae*, el cual representa una adaptación al método de Wright (2000).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

La estructura de la pared celular de las levaduras está compuesta principalmente por polisacáridos cuyo contenido puede constituir entre el 20 y el 90% de esta sustancia.¹³ En la Figura 5 se muestran los resultados del análisis ultraestructural a nivel de la pared celular de las células mutantes de la levadura *S. cerevisiae* (SD, SA, DAAA, y AAAA), así como del grupo control (WT). De hecho, en el grupo control (WT) se observa que las proteínas constitutivas de la pared celular son electrodensas en el exterior celular, resultados similares a lo reportado por Osumi M (1998) en *S. cerevisiae* silvestre (WT).¹⁴

En ese sentido, en las células mutantes las proteínas de la pared celular son electrodensas tanto al interior como al exterior de la célula. Además, en el grupo SA (serina por alanina) y DAAA (aspártico por alanina) la pared celular externa presenta una serie de acúmulos electrodensos en comparación con la pared celular externa del grupo control (WT) en donde no son tan prominentes.

Pared celular de *S. cerevisiae*

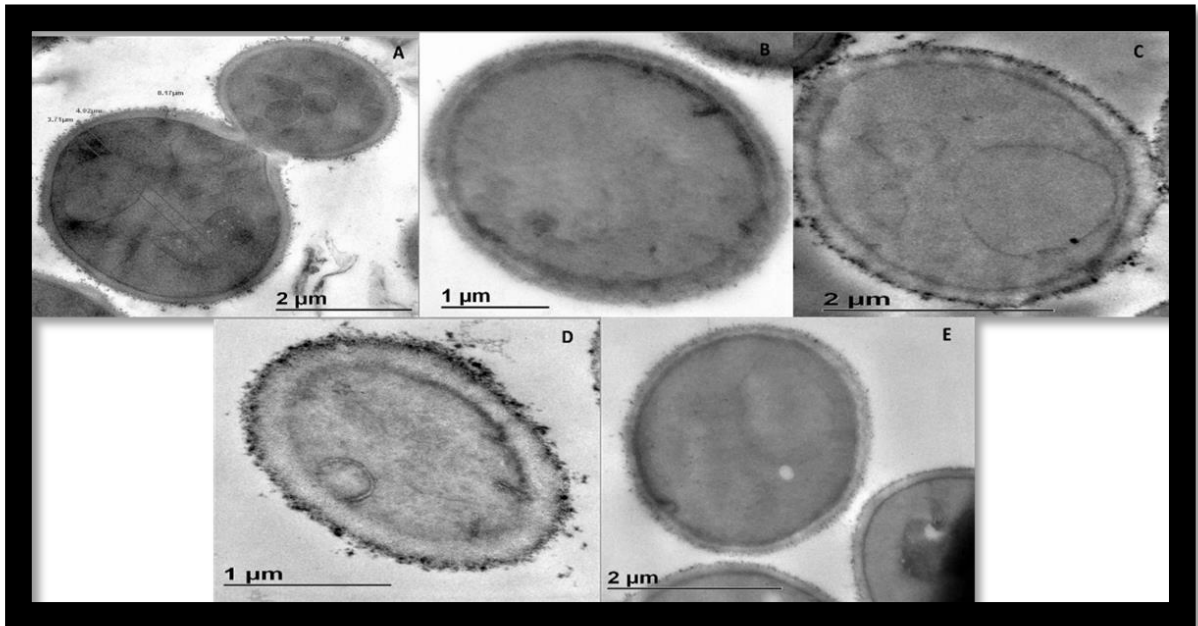


Figura 5. Electronmicrografía de *S. cerevisiae* en secciones de células de tipo silvestre y mutantes impregnadas con KMnO_4 . Se muestra la diferencia ultraestructural de la pared celular en: A) WT (*wild-type*), B) SD (serina por aspártico) mutante, C) SA (serina por alanina) mutante, D) DAAA (aspártico por alanina) mutante y E) AAAA (todos los residuos de serina y aspártico mutan por alanina) mutante. Imágenes tomadas con un aumento de 6,000 X.

Por otro lado, las levaduras tienen una pared celular gruesa compuesta por una red interna glucanos y una capa externa de manoproteínas que es una barrera para la infiltración y penetración de agentes químicos, por ejemplo, OsO_4 que se usa comúnmente como postfijador de material biológico; de manera que la postfijación con KMnO_4 contribuye en la mejoría de esta deficiencia permitiendo estudiar de la ultraestructura celular de las levaduras.³ En ese sentido, se encuentra bien documentado que el KMnO_4 es un método de post-fijación común en el procesamiento de levaduras para MET ya que preserva mejor las bicapas lipídicas, asociándose con

un fuerte contraste de membrana y aunque algunas estructuras no membranosas prominentes, como el ribosoma o microtúbulos no se conservan y ciertos orgánulos como mitocondria y gotitas de lípidos tienen una morfología parcialmente alterada, otros compartimentos subcelulares como el retículo endoplásmico, núcleo, membrana plasmática, vacuola, Golgi y endosomas están bien definidos en preparaciones de levadura fijadas con KMnO_4 .⁷

En las Figuras 6-10 se muestran los detalles ultraestructurales de las células mutantes de levadura *S. cerevisiae*, así como las del grupo WT (control). Ante este panorama, la postijación con KMnO_4 y su posterior osmificación de las levaduras utilizadas en este protocolo en combinación con el contraste con uranilo-plomo, permitieron el reconocimiento de la arquitectura celular elemental de las levaduras, así por ejemplo, núcleo, mitocondria, gotitas de lípidos, pared celular, membrana celular y cuerpos de proteínas agregadas en el grupo control (WT) (Figura 6) en comparación con los otros grupos donde los organelos son menos electrodensos o no se encuentran bien delimitados.

Ultraestructura de *S. cerevisiae*

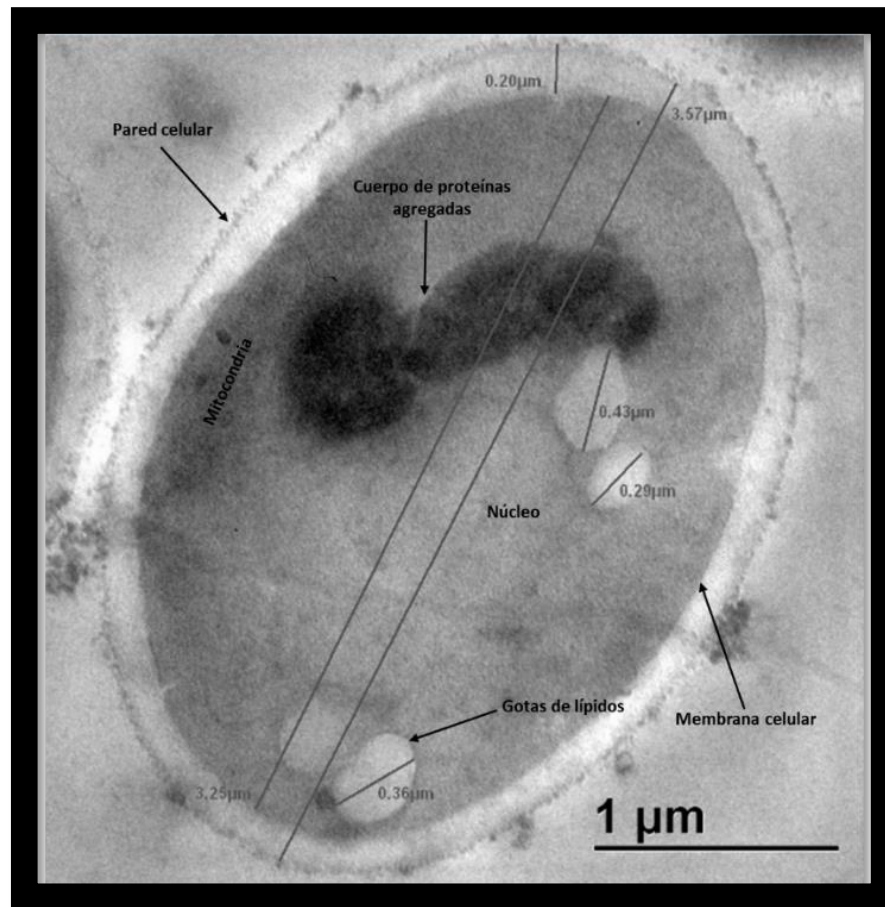


Figura 6. Electronmicrografía presenta la ultraestructura celular de *S. cerevisiae* WT (*wild-type*) en MET con postfijación de KMnO_4 y contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo de Reynold, en donde se observa la pared celular de tipo granular. Imagen tomada a una magnificación de 6,000 X.

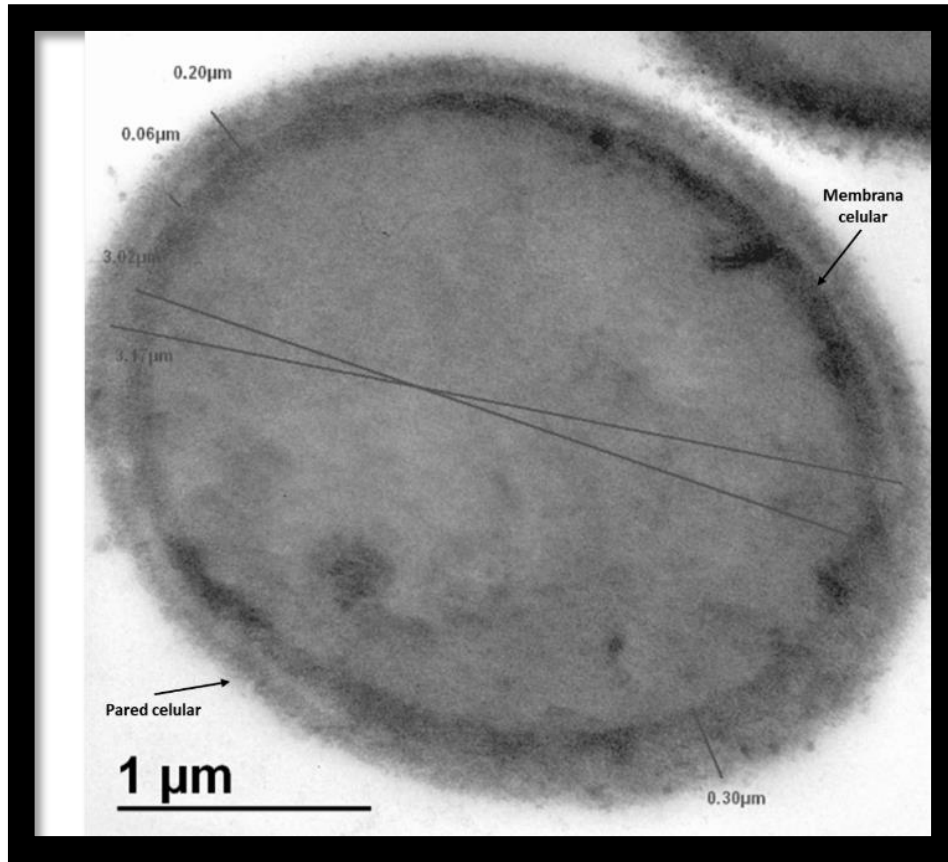


Figura 7. Electronmicrografía muestra la ultraestructura celular de *S. cerevisiae* grupo SD (serina por aspártico) en MET con postfijación de KMnO_4 y contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo de Reyold, en donde se observa la pared celular de tipo granular. Imagen tomada con un aumento de 6,000 X.

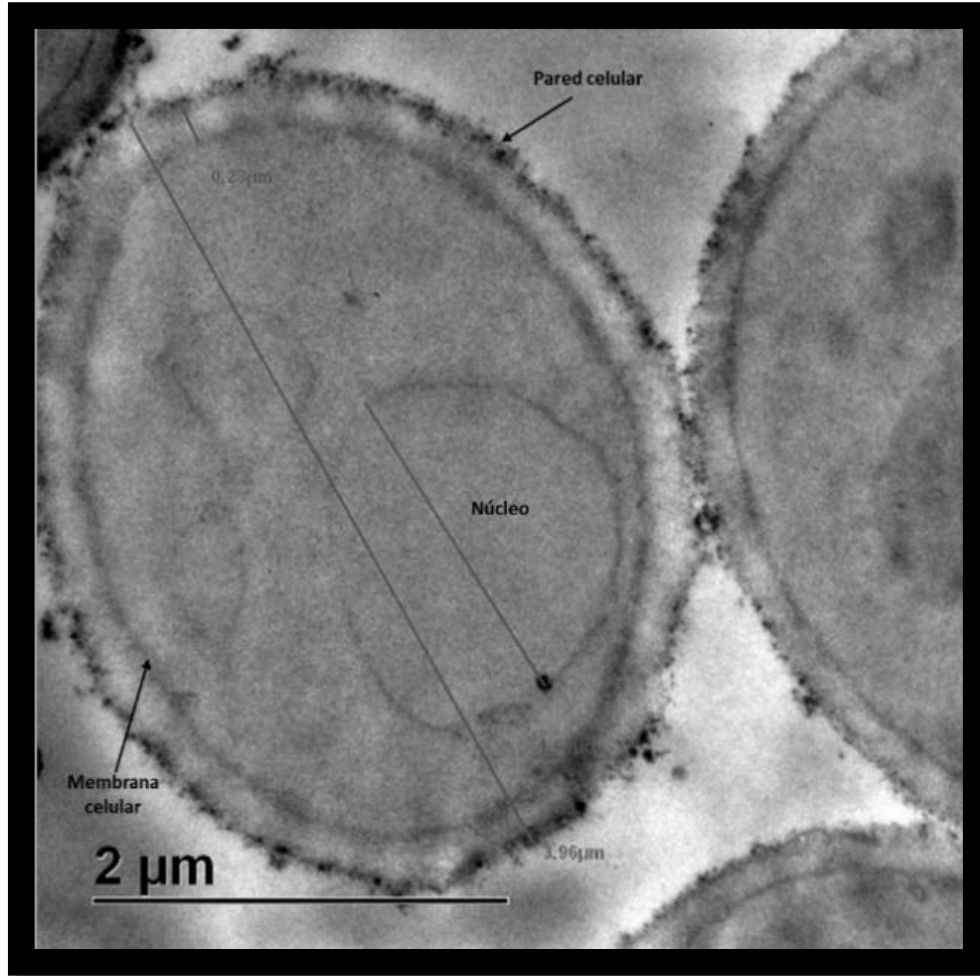


Figura 8. Electronmicrografía presenta la ultraestructura celular de *S. cerevisiae* grupo SA (serina por alanina) en MET con postfijación de KMnO_4 y contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo de Reyold, en donde se observa la pared celular de tipo granular. Imagen tomada a una magnificación de 6,000 X.

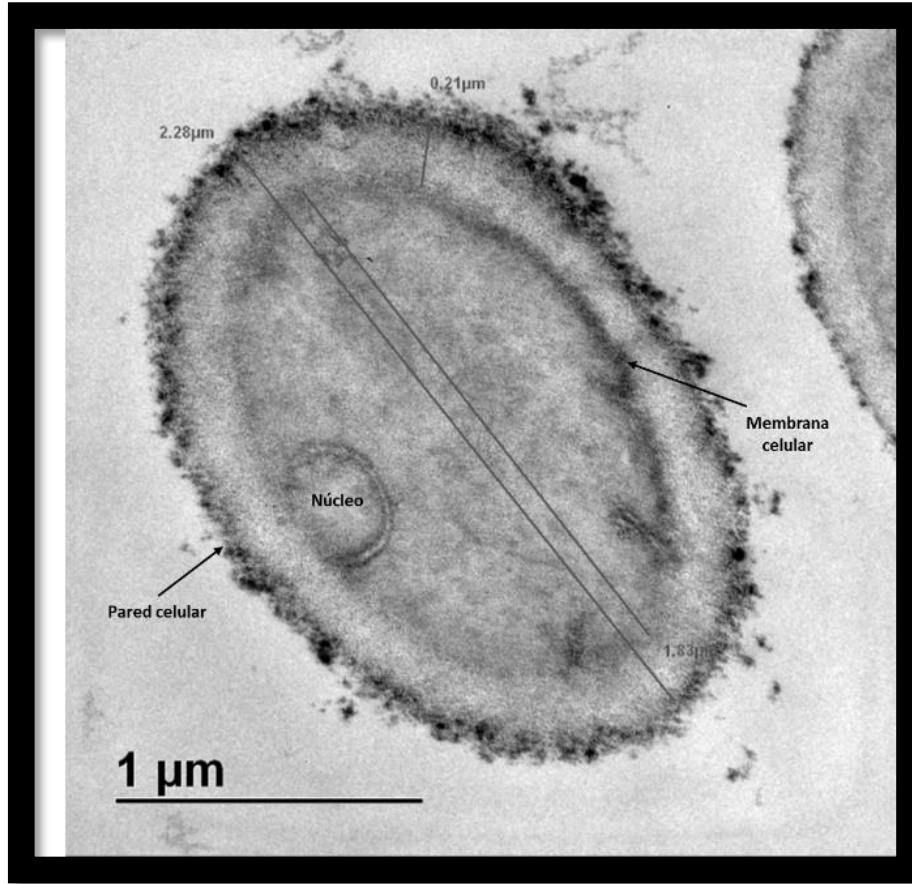


Figura 9. Electronmicrografía presenta la ultraestructura celular de *S. cerevisiae* grupo DAAA (aspártico por alanina) en MET con postfijación de KMnO_4 y contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo de Reyold, en donde se observa la pared celular de tipo granular. Imagen tomada con un aumento de 6,000 X.

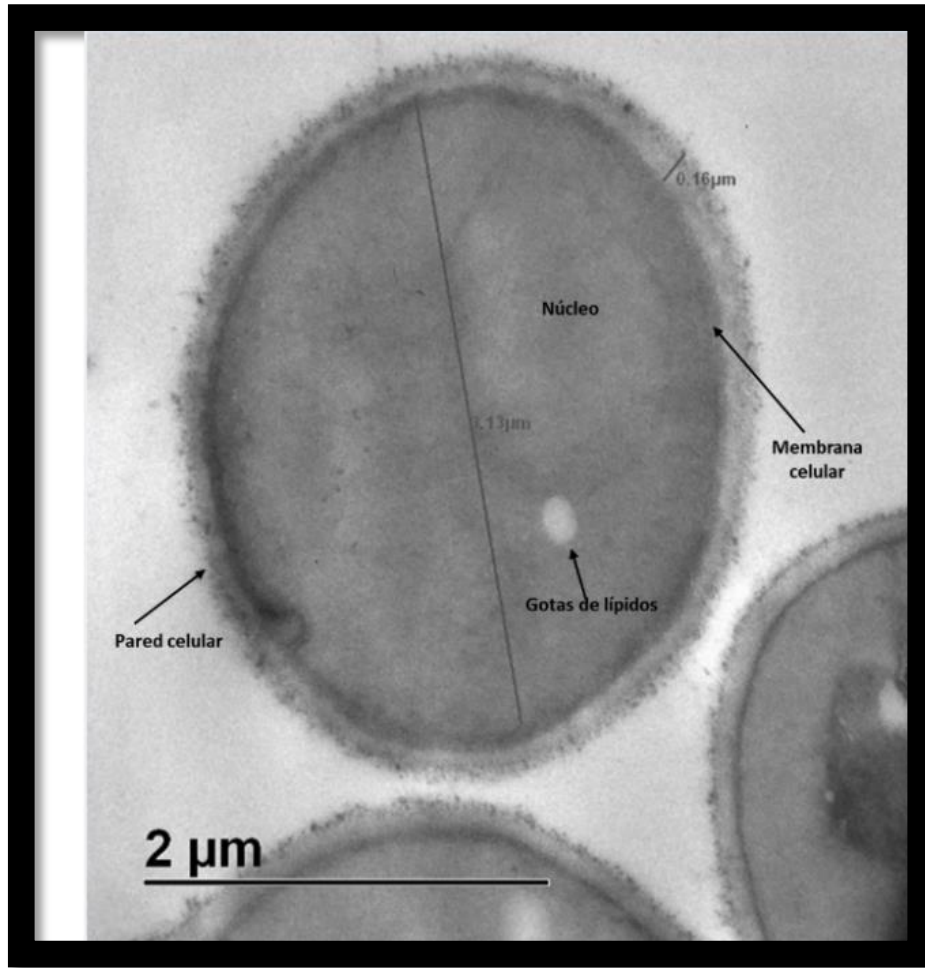


Figura 10. Electronmicrografía muestra la ultraestructura celular de *S. cerevisiae* grupo AAAA (todos los residuos de serina y aspártico mutan por alanina) en MET con postfijación de KMnO_4 y contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo de Reynold, en donde se observa la pared celular de tipo granular. Imagen tomada a una magnificación de 6,000 X.

Por otro lado, en los grupos de lavaduras que no recibieron contraste con uranilo-plomo y que pasaron directamente a observación en MET, los resultados demostraron que la post-fijación con KMnO_4 permitió la observación de las pared celular y otros compartimientos subcelulares, por ejemplo, membrana, mitocondria, gotitas de lípidos y agregados proteicos en todos los grupos de levaduras pero más electrodensos en el grupo WT (control). Las Figuras 11 a 15 se muestran los detalles ultraestructurales correspondientes a cada grupo de levaduras. Ante este panorama, se ha documentado que la incubación prolongada con KMnO_4 en levaduras se asocia con un perfil electrodensidad de membrana con un citoplasma uniformemente gris.¹⁰

Sin embargo, en nuestros resultados si es posible reconocer algunos compartimientos subcelulares. En ese sentido, se ha descrito que el KMnO_4 es un fuerte oxidante que parece estar reducido por los grupos hidrofílicos dentro de las membranas, formando un precipitado de dióxido de manganeso (MnO_2) sobre áreas ricas en lípidos y por tanto, actuar como un fuerte contrastante (mancha). De hecho, varios informes indican la utilidad del KMnO_4 como una mancha electrodensa de secciones delgadas.¹⁰

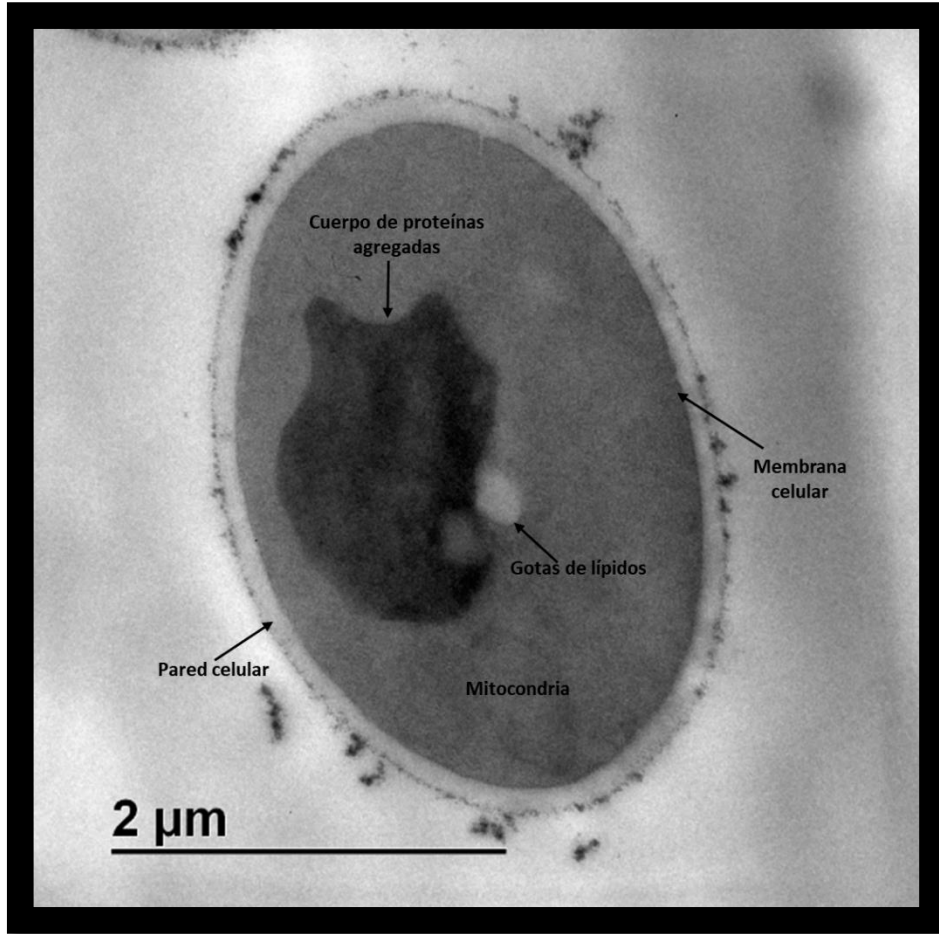


Figura 11. Electronmicrografía muestra la ultraestructura celular de *S. cerevisiae* grupo WT (*wild-type*) en MET con postfijación de KMnO_4 y sin contraste con uranilo-plomo, la cual presenta pared celular de tipo granular. Imagen tomada a una magnificación de 6,000 X.

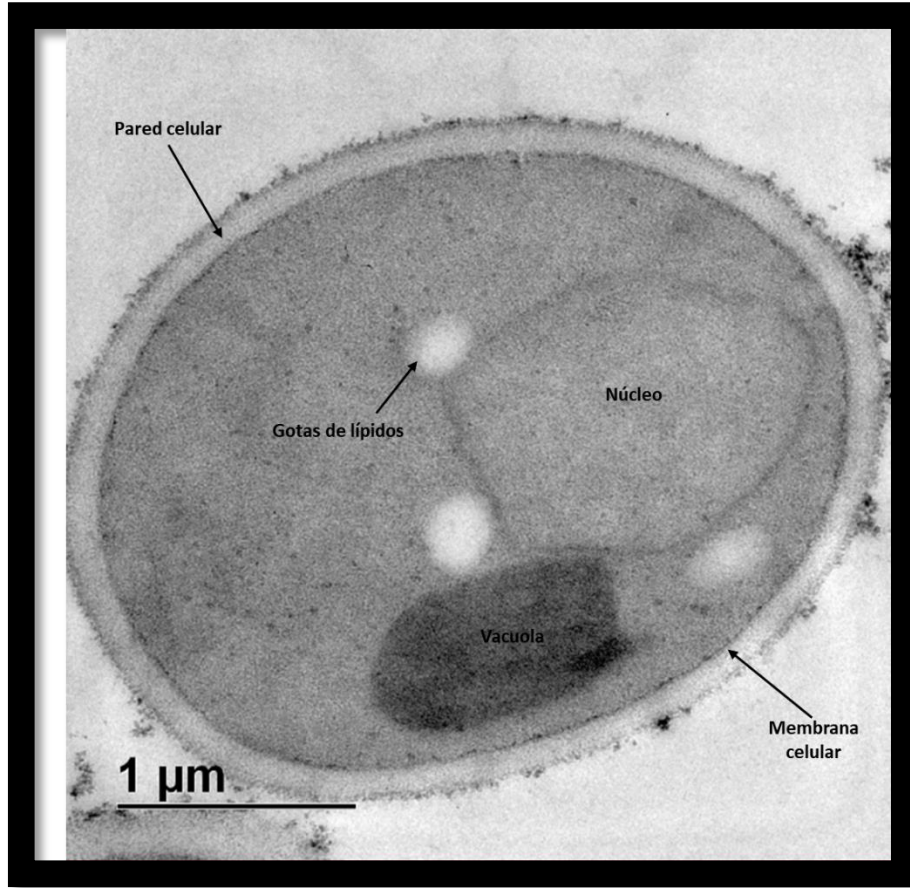


Figura 12. Electronmicrografía presenta la ultraestructura celular de *S. cerevisiae* grupo SD (serina por aspártico) en MET con postfijación de KMnO_4 y sin contraste con uranilo-plomo, la cual muestra pared celular de tipo granular. Imagen tomada con un aumento de 6,000 X.

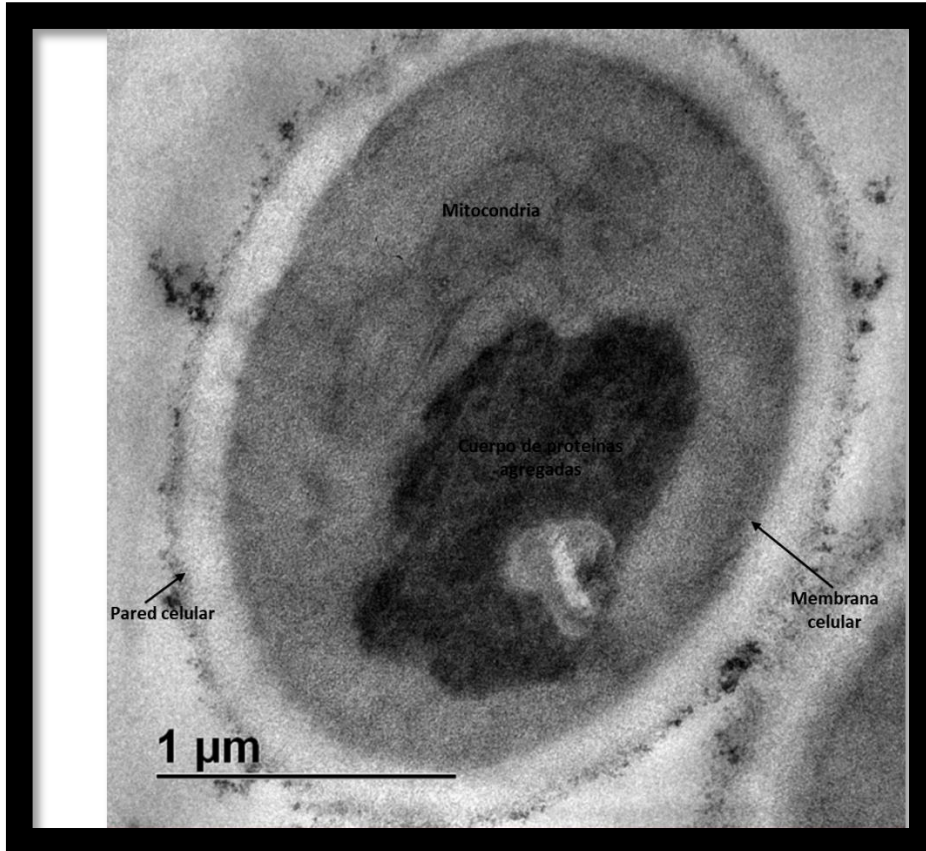


Figura 13. Electronmicrografía muestra la ultraestructura celular de *S. cerevisiae* grupo SA (serina por alanina) en MET con postfijación de KMnO_4 y sin contraste con uranilo-plomo, la cual presenta pared celular de tipo granular. Imagen tomada a una magnificación de 6,000 X.

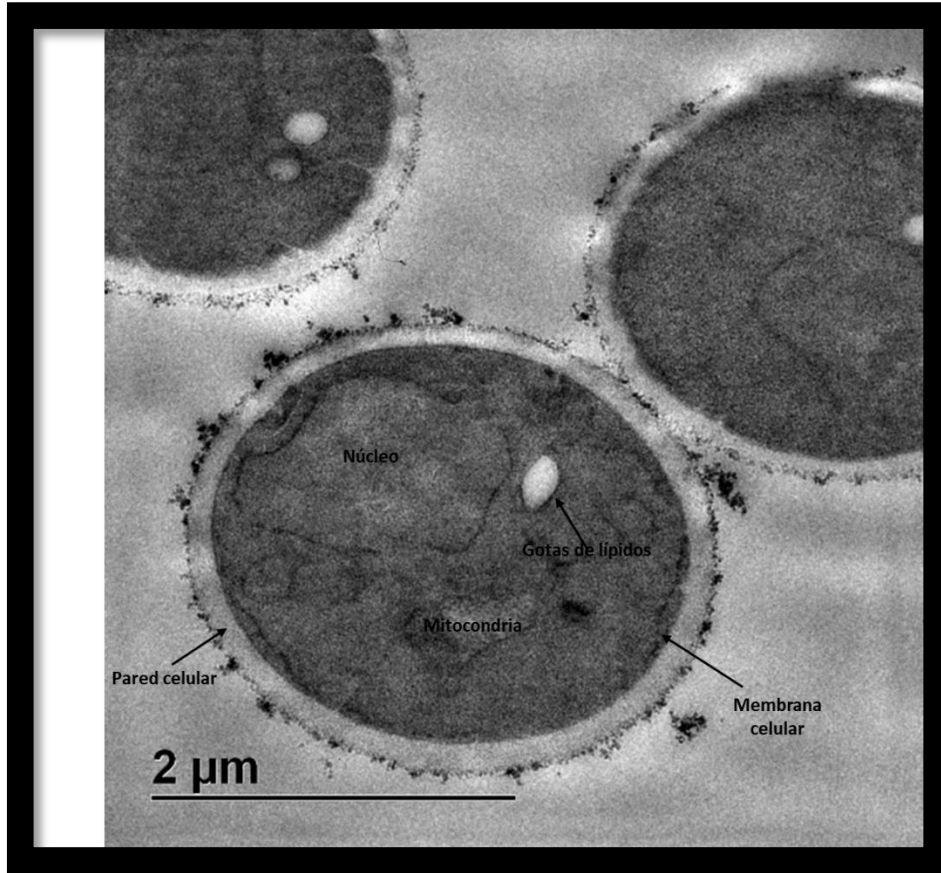


Figura 14. Electronmicrografía presenta la ultraestructura celular de *S. cerevisiae* grupo DAAA (aspártico por alanina) en MET con postfijación de KMnO_4 y sin contraste con uranilo-plomo, la cual muestra pared celular de tipo granular. Imagen tomada con un aumento de 6,000 X.

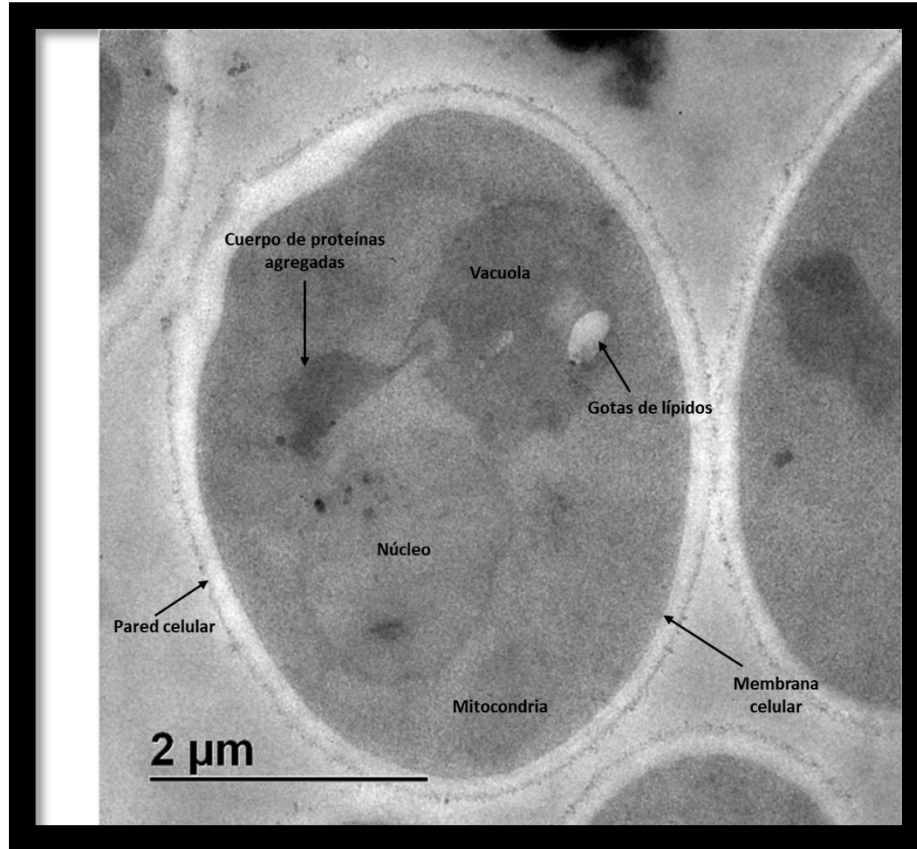


Figura 15. Electronmicrografía muestra la ultraestructura celular de *S. cerevisiae* grupo AAAA (todos los residuos de serina y aspártico mutan por alanina) en MET con postfijación de $KMnO_4$ y sin contraste con uranilo-plomo, la cual presenta pared celular de tipo granular. Imagen tomada a una magnificación de 6,000 X.

Por otro lado y en cuanto a los detalles de la pared celular, en la Tabla 2 se muestra la medición del grosor de la pared celular de las células mutantes de la levadura *S. cerevisiae* y WT. En un análisis preliminar, el tamaño de la pared celular entre los grupos de *S. cerevisiae* es similar y únicamente en el grupo AAAA el grosor de la pared celular es menor.

Pared celular

| Grupo | Longitud de pared (μm) |
|-------|-------------------------------------|
| WT | 0.20 |
| SD | 0.20 |
| SA | 0.23 |
| DAAA | 0.21 |
| AAAA | 0.16 |

Tabla 2. Presenta el grosor de la pared celular de los diferentes grupos de levaduras.

CONCLUSIÓN

La metodología utilizada en esta investigación, permitió la observación al MET de la pared celular de las levaduras mutantes de *S. cerevisiae*, así como de sus principales organelos. Además, se observaron algunas diferencias entre la pared celular del grupo *wild-type* (WT) en comparación con los grupos de levaduras modificadas. Sin embargo, el análisis del grosor de la pared celular entre grupos muestra similitud. Por otro lado, la arquitectura ultraestructural se pudo observar con mayor detalle en el grupo control (WT) en comparación con los demás grupos de levaduras. Además, los organismos fueron incluidos en resina epóxica Epon y la literatura indica que la combinación de esta resina con KMnO_4 como método de fijación para el análisis ultraestructural de levaduras no ha sido reportado; método de fijación en levaduras frecuentemente utilizado en combinación con resina Spurr (Frankl *et al.*, 2015).

Por lo tanto, concluimos que se observaron diferencias ultraestructurales de la pared celular de *S. cerevisiae* WT en comparación con los demás grupos de levaduras modificadas, aplicando un tratamiento con KMnO_4 al inicio del procesamiento, siendo incluidas en Epon y sin utilizar contraste convencional para su estudio en MET.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Mohd SH, Abdullaa R, Jambo SA et al. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports* 10:52-61.
2. Mejía-Barajas JA, Montoya-Pérez R, Cortés-Rojo C et al. (2016). Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante. *Inf. Tecnológica* 27:3-16.
3. Osumi M. (2012). Visualization of yeast cells by electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy* 61:343-365.
4. Vital P, Larralde CP. (2016). Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial. *Investigación y Ciencia* 67:86-91.
5. Graeme MW, Graham GS. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* 2:30.
6. Folch-Mallol JL, Garay-Arroyo A, Lledías F et al. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiología* 46:24-46.
7. Frankl A, Mari M, Reggiori F. (2015). Electron microscopy for ultrastructural analysis and protein localization in *Saccharomyces*. *Microb Cell* 2:412-428.
8. Mutlu N, Kumar A. (2018). Messengers for morphogenesis: inositol polyphosphate signaling and yeast pseudohyphal growth. *Current Genetics* 65:119-125.
9. Martínez-Pastor MT. (2005). Regulación transcripcional de la respuesta al estrés en la levadura *saccharomyces cerevisiae*. Papel de los factores transcripcionales msn2p y msn4p. (Tesis Doctoral). Universidad de Valencia. Valencia, España.
10. Wright R. (2000). Transmission electron microscopy of yeast. *Microsc Res Tech* 51:496-510.

11. Bauer C, Herzog V, Bauer M. (2001). Improved Technique for Electron Microscope Visualization of Yeast Membrane Structure. *Microsc Microanal* 7,530-534.
12. McConnell SJ, Stewart LC, Talin A et al. (1990). Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance. *J Cell Biol* 111:967-976.
13. Bzducha-Wróbel A, Błazejak S, Tkacz K. (2012). Cell wall structure of selected yeast species as a factor of magnesium binding ability. *Eur Food Res Technol* 235:355-366.
14. Osumi M. (1998). The Ultrastructure of Yeast: Cell Wall Structure and Formation. *Micron* 23:207-233.