



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**LAS ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS EN LA PROTECCIÓN A ESTRÉS
OXIDATIVO EN MICROORGANISMOS ANAEROBIOS.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
BIÓL. MAYEL SILVA FLORES**

TUTOR PRINCIPAL:

**DR. JOSÉ SALUD RODRÍGUEZ ZAVALA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**DRA. MARINA GAVILANES RUIZ (FACULTAD DE MEDICINA, UNAM)
DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ (FACULTAD DE MEDICINA, UNAM)**

Ciudad de México. Marzo, 2023



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.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez bajo la dirección de los Dres. José Salud Rodríguez Zavala y Ricardo Jasso Chávez.

La autora de esta tesis agradece a la beca otorgada por CONACyT (1084917) y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas (PMDCBQ, UNAM). Así mismo, a la Dra. Marina Gavilanes Ruiz y a los miembros de su laboratorio, en particular al M. en C. Ilian Giordano Ponce Pineda por su apoyo en los experimentos de qPCR.

Este proyecto fue financiado también por el apoyo de infraestructura CONACyT #281428.

JURADO ASIGNADO:

- Presidente:** Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Facultad de Química, UNAM
- Secretario:** Dr. Rodolfo García Contreras
Facultad de Medicina, UNAM
- Vocal:** Dr. Luis Cárdenas Torres
Instituto de Biotecnología, UNAM
- Vocal:** Dra. Aurora Lara Núñez
Facultad de Química, UNAM
- Vocal:** Dra. Sobeida Sánchez Nieto
Facultad de Química, UNAM

DEDICATORIA

A mis papás, por complementarse de una u otra forma para darme todo lo mejor, nunca me faltó nada. Todo lo que soy se lo debo a ustedes. Agradezco por su vida con todos sus altibajos, espero ser un buen reflejo de ustedes. Agradezco también la confianza y el amor que podemos disfrutar, me siento muy orgullosa de ser su hija.

A mi hermano, por ser un ejemplo de perseverancia y determinación, admiro mucho tu corazón tan noble y como lo has conservado a pesar de todo. Gracias por ser mi más grande admirador, yo lo soy de ti.

A mi abuelita Conse, por ser un ejemplo de vida, admiro mucho tu gran corazón y todo el camino que has recorrido. Saber que tu existencia ha tocado tantas vidas para bien me llena de orgullo de ser tu nieta. Tus chistes, tus palabras y tu buena actitud siempre tienen un gran eco en mi corazón.

“Si porque te quiero mucho, quieres que te quiera más
te quiero más que a mi vida, ¿qué más quieres, quieres más?
Te quiero tanto, que si salvarte me fuera la muerte, y perderte la vida
prefiero morir y salvarte, que tener vida y perderte.”

A mi familia, por siempre cuidarme y estar al pendiente de mí a pesar de la distancia, lo valoro mucho siempre.

A Alejandra y a Pepino Capuchino, por enseñarme lo que es la amistad incondicional y por siempre guiarme desde la distancia. Su paso por mi vida la ha cambiado definitivamente y me llena de alegría saber que a pesar de que todo es diferente desde que nos conocimos, “*everything stays*”.

Al Dr. Ricardo Jasso Chávez por esforzarse en regañarme; entendí que detrás de cada uno de sus regaños había una lección que me daba de corazón, además de la oportunidad de crecer, gracias a ello aprendí muchísimo de todos y cada uno de ellos. Es testigo de que a pesar de que me costó agarrar camino pude crecer tanto personal como académicamente, eso fue en gran medida gracias a usted. Gracias por su paciencia, por

su amistad, por motivarme y por creer en mí y apoyarme cuando casi nadie lo hizo, es invaluable. Lo respeto y lo admiro mucho como académico y como persona.

Al Dr. José Salud Rodríguez Zavala por permitirme trabajar con usted y siempre ofrecerme su consejo y su apoyo. Gracias también por sus pláticas conmigo y por la confianza que siempre depositó en mí, lo valoro mucho.

A todos mis compañeros y amigos en el laboratorio que me han acompañado durante estos años de maestría. Gracias a Betsy, Luisisho, Leslie, Chio y César. Su amistad, las risas y experiencias que compartimos durante estos años quedan como recuerdos valiosos en mi memoria.

Por último, gracias a todas esas personas nuevas en mi vida que me han permitido verla de una manera diferente y disfrutarla más.

ABREVIATURAS

O ₂	Oxígeno molecular
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
O ₂ ⁻	Radical anión superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
·OH	Radical hidroxilo
¹ O ₂	Oxígeno singulete
ALDHs	Aldehído deshidrogenasas
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
H ₂ DCFDA	Diclorofluoresceína diacetato

DCF	2',7'-diclorofluoresceína
MDA	Malondialdehído
4-HA	4-hidroxialquenes
LPO	Peroxidación lipídica
TEP	Tetraetoxipropano
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
MetOH	Metanol
TAG	Triacetilglicerol
SSA	Succinato semialdehído
-SH	Grupo tiol
E _m	Potencial redox
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
PXs	Peroxidasas
SOR	Superóxido reductasa
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

Contenido

1. ÍNDICE DE FIGURAS	7
2. ÍNDICE DE TABLAS.....	8
3. RESUMEN	9
4. INTRODUCCIÓN	10
4.1 Microorganismos anaerobios y su tolerancia a la presencia de oxígeno	10
4.2 Aldehído deshidrogenasas. Enzimas importantes en la protección de daño oxidativo	13
4.3 Generación de aldehídos como producto del metabolismo intermediario.....	16
4.4 Dominio Archaea. Árqueas metanogénicas como grupo de interés.....	17
4.5 Metanogénesis, vía central del metabolismo en metanogénicos.....	19
4.5 <i>Methanosarcina acetivorans</i> como modelo de estudio.....	24
5. JUSTIFICACIÓN	25
6. HIPÓTESIS	26
7. OBJETIVOS.....	26
7.1 General.....	26
7.2 Particulares	26
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
8.1 Condiciones de cultivo	27
8.2 Cosecha de células	28
8.3 Cuantificación de metano	28
8.4 Cuantificación de proteína.....	30
8.5 Determinación de niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	30
8.6 Cuantificación de niveles de daño oxidativo.....	31
8.7 Obtención de fracciones subcelulares y cuantificación de actividad enzimática de ALDHs	32
8.8 Aislamiento de RNA de <i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A.....	34
8.9 Síntesis de cDNA y determinación del nivel de transcritos mediante RT-PCR	34
8.10 Diseño de <i>primers</i> para técnica de RT-PCR.....	35
8.11 Análisis y construcción de árbol filogenético de posible gen codificante para ALDHs (MA_4079).....	36

9. RESULTADOS	38
9.1 Efecto de las fuentes de carbono y el estrés oxidativo sobre el cultivo de <i>M. acetivorans</i>	38
9.2 Cuantificación de niveles intracelulares de ROS	40
9.3 Cuantificación de daño oxidativo.....	41
9.4 Determinación de actividad de ALDHs en fracciones subcelulares	43
9.5 Diferencias en la regulación transcripcional de los posibles genes involucrados en la actividad de ALDHs.....	48
9.6 Análisis filogenético de un gen codificante para una posible ALDH en <i>M. acetivorans</i>	49
10. DISCUSIÓN.....	51
10.1 Producción de ROS y su relación con el daño oxidativo en diferentes fuentes de carbono	51
10.2 Actividad de ALDHs y su posible repercusión en el metabolismo de <i>M. acetivorans</i>	53
10.3 NAD ⁺ como aceptor de electrones en <i>M. acetivorans</i>	56
12. PERSPECTIVAS	58
13. REFERENCIAS.....	59
14. ANEXOS	73
14.1 Composición química de medio de cultivo <i>High Salt</i>	73
14.2 Composición química de solución de vitaminas (5X)	74
14.3 Composición química de solución de minerales.....	74

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estados redox del O ₂ con sus potenciales estándar de reducción	11
Figura 2. Mecanismo general de reacción de las ALDHs	15
Figura 3. Perspectiva general de principales vías metanogénicas	20
Figura 4. Estructura química de cofactores esenciales para el proceso de metanogénesis en microorganismos metanogénicos.....	22
Figura 5. Curva estándar de CH ₄	30
Figura 6. Determinación de ROS intracelulares	31

Figura 7. Estructura de los aldehídos utilizados en ensayos enzimáticos en fracciones subcelulares de <i>M. acetivorans</i>	33
Figura 8. Esquema del protocolo para el aislamiento de RNA en <i>Methanosarcina acetivorans</i>	34
Figura 9. Esquema del protocolo para la determinación de cambios en la expresión de posibles genes codificantes de ALDHs	35
Figura 10. Curvas de crecimiento de <i>Methanosarcina acetivorans</i>	39
Figura 11. Niveles de generación de ROS en fuentes de carbono consumidas por <i>M. acetivorans</i> en fase exponencial de crecimiento	41
Figura 13. Perfil de actividad de aldehído deshidrogenasa en diferentes fuentes de C y en condición de estrés por O ₂ en fracciones subcelulares	45
Figura 14. Árbol de distancias evolutivas de secuencia de aa del gen MA_4079 de <i>M. acetivorans</i>	50

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ecuaciones balanceadas de las principales vías metanogénicas.....	23
Tabla 2. Descripción de la configuración de cromatógrafo de gases para cuantificación de CH ₄	29
Tabla 3. Características de cebadores utilizados para la cuantificación del nivel de transcritos para posibles genes codificantes de ALDHs.....	37
Tabla 4. Medición de actividad de IDH-NADP ⁺ como indicador de contaminación cruzada entre las fracciones sub-celulares obtenidas	43

3. RESUMEN

Los microorganismos anaerobios estrictos se caracterizan por su incapacidad para proliferar en presencia de oxígeno, sin embargo, existen estudios que revelan que estos son capaces de expresar muchas de las defensas antioxidantes propias de microorganismos aerobios para de esta forma poder tolerar transitoriamente niveles substanciales de O₂. Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) son una superfamilia de enzimas responsables de la oxidación de aldehídos a ácidos carboxílicos mediante la reducción de NAD(P)⁺ a NAD(P)H. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en los tres dominios de la vida, sugiriendo una participación vital a lo largo de la historia evolutiva. En organismos aerobios estas enzimas se consideran esenciales en la desintoxicación de aldehídos producidos por la peroxidación de los lípidos de la membrana promovida por el incremento en especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Ya sea como parte de su metabolismo intermediario o en episodios de oxigenación, los microorganismos anaerobios tampoco son ajenos a la generación de intermediarios citotóxicos o de ROS. Sin embargo, el papel de las ALDHs con respecto a su protección del estrés oxidante en este tipo de microorganismos, en particular en los pertenecientes al dominio Archaea, no ha sido dilucidado.

Dentro de este dominio destacan las arqueas metanogénicas, microorganismos anaerobios estrictos cuyo análisis bioquímico y genético, sugiere que poseen la capacidad de desarrollar mecanismos para contender con el estrés oxidativo. Se ha reportado que *Methanosarcina acetivorans* un arqueón marino, desarrolla múltiples mecanismos de protección ante la presencia de O₂ y el estrés oxidante asociado a esta, logrando una disminución en la generación de ROS en células pre-adaptadas a O₂, así como una mayor expresión de la maquinaria antioxidante para contrarrestar el estrés generado. En este contexto, *M. acetivorans* puede representar un modelo clave para dilucidar mecanismos de adaptación y expresión de vías metabólicas intermediarias involucradas en la protección a estrés oxidativo como la posible expresión de ALDHs.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Microorganismos anaerobios y su tolerancia a la presencia de oxígeno

El desarrollo de una atmósfera oxigenada en la Tierra dio como resultado una división en cuanto al estilo de vida de los microorganismos presentes hasta ese momento; aquellos que proliferaron en presencia de oxígeno (O₂), los aerobios y aquellos que no, los microorganismos anaerobios (Grochowski & White, 2008).

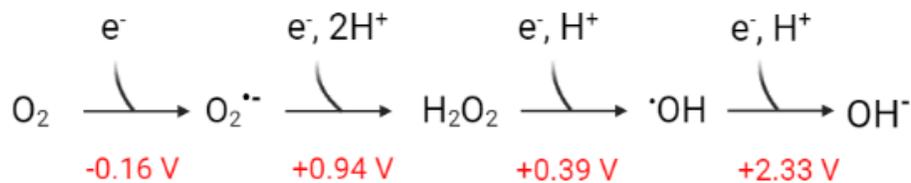
Los microorganismos anaerobios establecieron las bases de su metabolismo en condiciones altamente reductoras en las cuales, elementos como el hierro (Fe) y el azufre (S) fueron esenciales en la conformación de las biomoléculas que constituyen su metabolismo central, encontrándose compuestas principalmente por centros enzimáticos metálicos de bajo potencial con grupos funcionales como tioles (-SH) y/o centros de Fe-S (Neubeck & Freund, 2020; Khademian & Imlay, 2021; Imlay, 2013). Al representar una barrera energética fácil de sobrellevar, estos centros permitieron la capacidad de aceptar y donar electrones de manera muy eficiente, resultando así en un cambio significativo en la función catalítica de las enzimas involucradas en el metabolismo de este tipo de microorganismos (Boyd *et al.*, 2014; Imlay, 2006).

No obstante, esta característica es precisamente una de las razones por las cuales el O₂ resulta tóxico para los microorganismos anaerobios. Mientras que el O₂ no es por sí mismo un agente oxidante fuerte ($E_m = -0.16$ V), los centros Fe-S poseen un bajo potencial redox que los convierte en blancos vulnerables de oxidación; ya sea al disminuir la biodisponibilidad del Fe en su estado férrico o a través de la oxidación de intermediarios del S, la presencia de O₂ afecta directamente la integridad de componentes celulares clave del metabolismo anaerobio (Lu & Imlay, 2021; Boyd *et al.*, 2014; Imlay, 2006).

Dado que el O₂ es en sí un bi-radical, este reacciona con otros radicales a través de transferencias univalentes de electrones. El O₂ puede ser reducido tras adquirir un e⁻ de algún constituyente celular o de un xenobiótico (Lemire *et al.*, 2013). Frecuentemente, estas reacciones de oxidación llevan a la simultánea reducción de O₂ a radicales libres de O₂ y otros derivados tóxicos categorizados como especies

reactivas de oxígeno (ROS). Algunas enzimas en microorganismos anaerobios son inhibidas por O_2 ; sin embargo, la inactivación enzimática se da más frecuentemente por ROS (Imlay, 2002).

El término ROS se utiliza colectivamente para referirse a las especies derivadas del O_2 cuya naturaleza es mucho más reactiva que el O_2 mismo; es decir, son todas aquellas especies radicales y no radicales que actúan como agentes oxidantes y/o que se convierten fácilmente en compuestos tóxicos (Halliwell, 1996). Los ROS con mayor importancia biológica son el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el oxígeno singulete (1O_2); (Fig. 1) (Ślesak *et al.*, 2019).



(Basada en Imlay, 2008)

Figura 1. Estados redox del O_2 con sus potenciales estándar de reducción.

De manera general, ya sea que se encuentren involucrados microorganismos aerobios o anaerobios, estos ROS afectan el metabolismo de las células debido a que inducen la oxidación de biomoléculas. Ejemplos de lo anterior son la oxidación de polisacáridos y ácidos grasos poli-insaturados así como de residuos de aminoácidos, la pérdida de metales en metaloproteínas, mutaciones en el DNA, entre otros (Imlay, 2008).

Con lo anterior es evidente la paradoja que representa el metabolismo aerobio, mientras que el O_2 forma parte esencial para llevar a cabo sus funciones celulares simultáneamente éste resulta perjudicial (Halliwell & Gutteridge, 2015). Conforme al aumento en la presencia de O_2 en la atmósfera de la Tierra muchas especies de

microorganismos presentaron adaptaciones metabólicas que les permitieron aprovechar al O₂ como aceptor terminal de electrones en cadenas transportadoras como un medio eficiente para facilitar la producción de energía. No obstante, cuando la relación en la generación de ATP por molécula consumida fue favorecida, este cambio hacia un metabolismo aerobio implicó además la implementación de sistemas antioxidantes que brindaran protección a la célula de los ROS generados basalmente como producto de estas cadenas respiratorias (Imlay, 2008).

En microorganismos aerobios los sistemas de defensa antioxidante para la desintoxicación de ROS se encuentran constituidos por antioxidantes de bajo peso molecular (glutación, ascorbato, tocoferoles, etc.) además de enzimas antioxidantes, que regulan la homeostasis celular de ROS (Schippers *et al.*, 2012, Benzie, 2000).

Una hipótesis propuesta respecto a los microorganismos anaerobios es que estos no requirieron de implementar ningún tipo de defensa antioxidante que los protegiera del estrés oxidativo generado por ROS. Debido a esto, se estableció a la incapacidad para subsistir en un ambiente con presencia de O₂ como la principal característica para definir a un microorganismo anaerobio (Lu & Imlay, 2021). Sin embargo, estudios revelan que esta definición en realidad alberga un rango muy amplio de variación biológica puesto que se ha demostrado que microorganismos catalogados como anaerobios estrictos pueden ser capaces de expresar muchas de las defensas antioxidantes propias de microorganismos aerobios y, de esta forma, toleran niveles substanciales de O₂ de 8% hasta 10% (v/v) de O₂ (Khan *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 1997; Lu & Imlay *et al.*, 2021).

Si bien los microorganismos anaerobios no pueden sobrevivir a una exposición prolongada a O₂ debido a que su eficiente producción de energía depende de moléculas susceptibles a la toxicidad del O₂, la presencia de estrategias antioxidantes les han permitido subsistir y ampliar las fronteras entre ambientes anóxicos y con O₂, y ser más competentes en hábitats en los cuales la presencia de O₂ puede ser transitoria en episodios breves de oxigenación (Hamada *et al.*, 2014).

El objetivo principal de estas estrategias se enfoca en restaurar las funciones celulares posterior a la disipación del episodio de estrés, así como a minimizar la

extensión del daño ocasionado por O₂. Entre las principales enzimas antioxidantes estudiadas en microorganismos anaerobios se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), las peroxidases (PXs), la superóxido reductasa (SOR), entre otras (Brioukhanov *et al.*, 2002; Takao *et al.*, 1991). Sin embargo, el estudio de enzimas antioxidantes como las aldehído deshidrogenasas (ALDHs), enzimas capaces de disminuir la propagación de daño, no ha sido explorado a profundidad en microorganismos anaerobios.

4.2 Aldehído deshidrogenasas. Enzimas importantes en la protección de daño oxidativo

La incapacidad de contender con niveles elevados de ROS tiene como consecuencia la generación de estrés oxidativo y daño celular (Singh *et al.*, 2013). El estrés oxidativo generado está acoplado a la degradación oxidativa de las membranas lipídicas en un proceso conocido como peroxidación lipídica (LPO), en el cual se generan más de 200 tipos de aldehídos, muchos de los cuales son altamente reactivos y tóxicos para la célula. Así mismo, el exceso de aldehídos tóxicos generados puede ser removido por enzimas aldehído deshidrogenasas (ALDHs) (Zimniak, 2011; Marchitti *et al.*, 2008).

Aunque la LPO es un proceso con un mecanismo bien establecido de toxicidad por ROS en eucariontes, esto no ocurre de igual manera para bacterias y mucho menos aún para arqueas. Lo anterior es debido al tipo de lípidos encontrados en Eukarya comparados con Bacteria y/o Archaea, ya que en las membranas celulares de los primeros predominan los lípidos poli-insaturados. En particular, las moléculas lipídicas en el dominio Archaea están compuestas por lípidos saturados o mono-insaturados poco oxidables, por lo que no experimentan niveles extensivos de peroxidación, como ocurre en Bacteria (Bielski *et al.*, 1983). Sin embargo, no se puede descartar ni la importancia ni las repercusiones que este proceso pudiera tener en estos organismos, sobre todo en escenarios de estrés por ROS ya que la presencia de lípidos oxidados puede afectar significativamente la fisiología celular (Lemire *et al.*, 2013).

Miembros del dominio Archaea han logrado la adaptación a la gran diversidad de nichos que habitan debido en gran medida a su capacidad para sensor y adaptarse

a los cambios ambientales (Pedone *et al.*, 2004). La identificación de los mecanismos responsables de la respuesta ante el estrés que puedan enfrentar estos microorganismos en sus nichos y que los llevan a proliferar han sido solo parcialmente dilucidados, por lo que la identificación y caracterización de proteínas y/o enzimas involucradas en la disminución del efecto perjudicial de agentes estresores en estos microorganismos cobra mayor relevancia (de Macario & Macario, 2003). Es en este contexto que se propone el estudio de enzimas ALDHs en la protección a estrés oxidativo en este dominio.

Las ALDHs son una superfamilia de enzimas responsables de la oxidación de aldehídos a ácidos carboxílicos mediante la reducción de NAD(P)⁺ a NAD(P)H. Algunas ALDHs son altamente específicas por una cantidad limitada de sustratos, mientras que otras demuestran un rango más amplio de especificidad por sustratos (Yoshida *et al.*, 1998; Lindahl, 1992). Éstas se encargan de metabolizar aldehídos endógenos y exógenos, con lo que ayudan a mitigar el estrés oxidativo y electrofílico (Singh *et al.*, 2013). Este último representa el estrés generado por la presencia de moléculas electrófilas, que actúan como agentes desestabilizantes. Ya que la mayoría de las macromoléculas biológicas contienen centros nucleofílicos, se da pie a la formación de moléculas electrófilas las cuales son generadas en el metabolismo, y son particularmente reactivas y tóxicas en un contexto celular (Zimniak, 2011).

El mecanismo general de acción de las ALDHs (Belmont-Díaz *et al.*, 2016) se describe en la Fig. 2 y comienza con la unión de NAD⁺ (k_1) al sitio catalítico de la enzima el cual tiene un residuo de Cys reactivo (E-SH), esta unión induce la desprotonación de la Cys catalítica. Un ataque nucleofílico al aldehído es llevado a cabo por parte de la cisteína (k_2) dando pie a la formación de un intermediario tiohemiacetal (E-SAlD). La transferencia del hidruro (k_3) toma lugar a partir del tiohemiacetal hacia la coenzima, reduciéndola y formando un aducto tioéster, el cual es hidrolizado (k_4) por una molécula activada de agua (ion OH⁻). Finalmente, la coenzima reducida es liberada de la enzima (k_5).

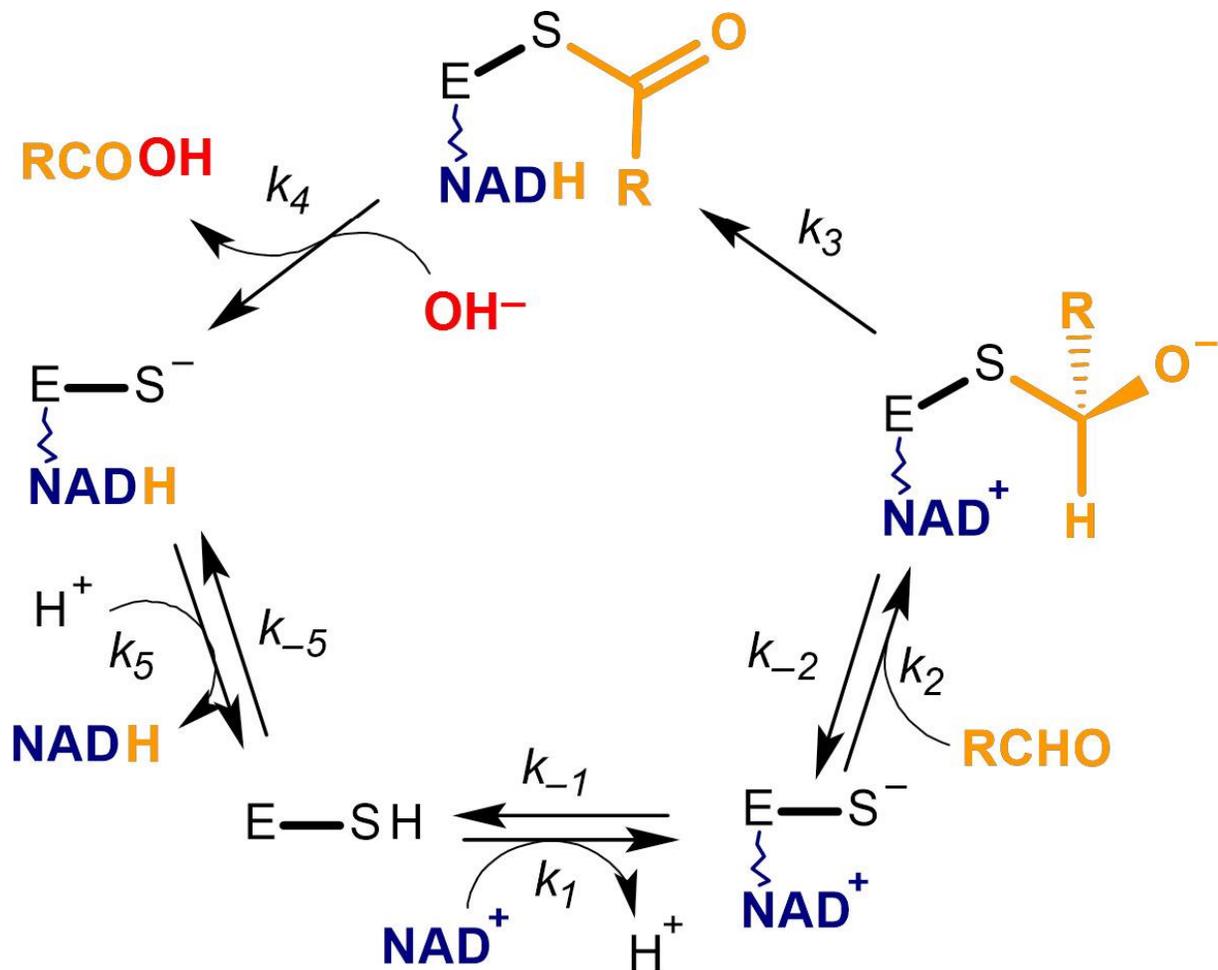


Figura 2. Mecanismo general de reacción de las ALDHs. Figura tomada de Belmont-Díaz *et al.* (2016).

Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en los tres dominios de la vida, sugiriendo una participación vital a lo largo de la historia evolutiva en organismos procariontes y eucariontes (Jackson *et al.*, 2011). Muchas ALDHs aparentemente distantes evolutivamente llevan a cabo funciones similares entre las que destaca la protección contra una amplia variedad de agentes estresores ambientales; en bacterias (estrés ambiental y osmótico) (Zaldívar-Machorro *et al.*, 2011; Cabisco *et al.*, 2000), en plantas (estrés hídrico, salino y oxidativo) (Sass *et al.*, 2012; Kirch *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2000), en levaduras (exposición a etanol y estrés oxidativo) (Aranda & del Olmo, 2003; Izawa & Inoue, 2009) y en mamíferos (estrés oxidativo y LPO); (Pan *et al.*, 2008; Ohta & Ohsawa, 2006). En cuanto a

arqueas, existen algunos reportes de la existencia de ALDHs, sin embargo, su papel en el metabolismo no ha sido dilucidado con claridad.

Las ALDHs también juegan un papel importante como defensa antioxidante al absorber la radiación UV (Estey *et al.*, 2007; Lassen *et al.*, 2007), al acarrear radicales hidroxilo por vía de los grupos sulfhidrilo de aminoácidos como la cisteína y la metionina (Uma *et al.*, 1996) y al producir NAD(P)H (Pappa *et al.*, 2003; Lassen *et al.*, 2006).

4.3 Generación de aldehídos como producto del metabolismo intermediario.

Cabe destacar que como parte del metabolismo celular también se puede dar paso a la formación de aldehídos que fungen como intermediarios citotóxicos, por ejemplo, en el metabolismo de carbohidratos, de ascorbato, de amino oxidasas, de citocromos P₄₅₀, entre otros (O'Brien *et al.*, 2005).

Un ejemplo de lo anterior encontrado en un proceso metabólico central se da en la glucólisis ya que al formar gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato estos pueden isomerizarse para formar metilglioxal, un aldehído derivado del piruvato que resulta ser citotóxico. En el dominio Archaea se ha reportado este mismo escenario de producción de metilglioxal para la gluconeogénesis (Ronimus & Morgan, 2003; White & Xu, 2006). Por lo anterior, es importante considerar que la posible expresión de ALDHs en arqueas pudiera no solo verse involucrada en la protección a estrés oxidativo derivado de un agente estresor externo sino también como parte del metabolismo intermediario, ya sea aerobio o anaerobio.

Aunado a esto, otro factor importante a considerar es la versatilidad metabólica con la que cuente un organismo para consumir diferentes fuentes de carbono ya que se ha reportado que de acuerdo a la misma pueden existir niveles diferenciales de estrés oxidativo en un mismo organismo debido a una regulación variable en la expresión del metabolismo para el consumo de una fuente de carbono específica (Li *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2022).

Ya sea como parte del metabolismo intermediario o en episodios de oxigenación, los microorganismos anaerobios tampoco son ajenos a la generación de intermediarios citotóxicos o de ROS. Sin embargo, el papel de las ALDHs con respecto a la

protección del estrés oxidante en este tipo de microorganismos, en particular en los pertenecientes al dominio Archaea, no ha sido dilucidado.

4.4 Dominio Archaea. Árqueas metanogénicas como grupo de interés

El dominio Archaea representa un taxón diverso genética y bioquímicamente con características celulares particulares que lo convierten en un eslabón fundamental en estudios evolutivos y de múltiples áreas de investigación. Estos organismos habitan nichos ecológicos sumamente diversos entre los que se encuentran los más extremos, aunque en concordancia con su amplia diversidad las arqueas representan microorganismos metabólicamente versátiles que varían de organismos mesófilos a (híper) termófilos, aerobios o anaerobios, autótrofos o heterótrofos, así como organismos simbiontes (Eme & Doolittle, 2015; Baker *et al.*, 2020). A pesar de su gran importancia, este dominio ha sido poco estudiado, sin embargo, se ha confirmado que estos organismos poseen un gran potencial para convertirse en modelos de estudio que contribuyan a ampliar el conocimiento respecto a un alcance genético y fenotípico que de otra forma no se podría explorar en este tipo de microorganismos (Spang *et al.*, 2017).

Dentro de este dominio destacan las arqueas metanogénicas, un grupo filogenéticamente diverso de microorganismos anaerobios estrictos caracterizados por su habilidad para llevar a cabo la síntesis de ATP al producir gas metano (CH₄) por medio de un proceso metabólico de conservación de energía único en su tipo llamado metanogénesis (Buan, 2018; Thauer *et al.*, 2008).

Los metanogénicos pueden ser aislados de una amplia gama de gradientes termoquímicos, así, hay microorganismos acidófilos o alcalófilos (viven a pH de 3,0 a 10,2), (híper) termofílicos o psicrófilos que viven desde -2°C a 122°C, o bien aquellos que se desarrollan en estuarios de agua dulce hasta entornos halófilos. Otros ambientes que pueden albergar a los metanogénicos son los tractos digestivos de animales, entre los cuales, estos microorganismos no han sido asociados como causa de patogénesis por factores de virulencia o toxinas, y se ha sugerido su uso como posible biomarcador de salud (de Macario & Macario, 2009; Peña-Ocaña *et al.*, 2022a).

La metanogénesis es un proceso importante en el mantenimiento del ciclo global del carbono porque representa el último paso de la degradación anaerobia de la materia orgánica en condiciones limitantes de sulfato. Debido a que estas arqueas liberan grandes cantidades de CH₄ a la atmósfera (450 Tg anualmente) se considera que estas juegan un papel fundamental en el control del cambio climático, ya que este gas se encuentra clasificado como un gas de efecto invernadero cuyo impacto es 28 veces mayor al del CO₂ (Dlugokenchy *et al.*, 2011; Ramanathan *et al.*, 1985).

El CH₄ es considerado un gas indeseable por el daño ambiental que provoca a la atmósfera, por lo que el cultivo de metanogénicos en sistemas de captación como los biodigestores, que son alimentados con materia de desechos, ha resultado en una alternativa energética sustentable. La digestión anaerobia de material de desecho produce biogás el cuál puede contener hasta 90 % de CH₄, proveyendo así de una fuente combustible sumamente valiosa (Weiland, 2010). Así mismo, se ha buscado un mayor aprovechamiento del proceso de metanogénesis a través de la bioremediación, ya que la presencia de algunos metales pesados tiene un efecto positivo sobre este proceso metabólico llevando no solo a un mayor rendimiento de este gas sino también a la retención de estos metales y con ello de su toxicidad ambiental. Con todo lo anterior, podemos decir que la metanogénesis resulta relevante no solo en procesos ecológicos y evolutivos sino también biotecnológicos y biomédicos (Peña-Ocaña *et al.*, 2022a; 2022b; Stillwell *et al.*, 2010; Jasso-Chávez *et al.*, 2019).

A pesar del reconocimiento actual de la importancia de los metanogénicos, su cultivo y caracterización se ha visto limitado. No obstante, hasta ahora el estudio de los metanogénicos ha ayudado a dilucidar las bases termodinámicas y bioenergéticas de la vida, ha contribuido a nuestra comprensión de la evolución y la biodiversidad, y ha resultado en una apreciación de la utilidad social de estudiar las interacciones tróficas. De lo anterior, resulta evidente que un mayor estudio de éstos conllevará a avances significativos en el entendimiento de la bioenergética celular y del metabolismo, con un amplio potencial para nuevos descubrimientos que desafíen lo que ya se conoce de la fisiología de estos microorganismos (Buan, 2018).

4.5 Metanogénesis, vía central del metabolismo en metanogénicos

Los metanogénicos son organismos que se distinguen de otras bacterias o arqueas que producen CH_4 como un producto secundario de su metabolismo por su necesidad de sintetizar CH_4 para la conservación de energía, a través del ciclo de Wolfe. De acuerdo a esta distinción, todos los metanogénicos conocidos a la fecha pertenecen al superfilo Euryarchaeota (Thauer *et al.*, 2008, Thauer, 2012; Buan, 2018).

El crecimiento de los metanogénicos es posible gracias a la reducción de compuestos sencillos de un carbono (C1) como el CO_2 , CO, formato, metanol, metilaminas y metilsulfuros, además de acetato (C2) a través de una de varias vías metanogénicas. Con estos diferentes compuestos, todos los metanogénicos utilizan un gradiente de iones transmembranal para la generación de ATP por medio de una ATP sintasa, en la que dependiendo de la fuente de carbono metabolizada pueden obtener de 0.5 a 2 moles de ATP por mol de sustrato. Las principales vías metanogénicas son la hidrogenotrófica, metilotrófica y acetilclástica (Rother & Metcalf, 2004; Buan, 2018; Ferry, 2015). Independientemente de cuál sea la fuente de carbono consumida, una molécula de coenzima M (CoM) es reducida a CH_4 por la acción de una metil coenzima M reductasa (Mcr) dependiente de Coenzima B (CoB) (Ermler *et al.*, 1997); (Fig. 3).

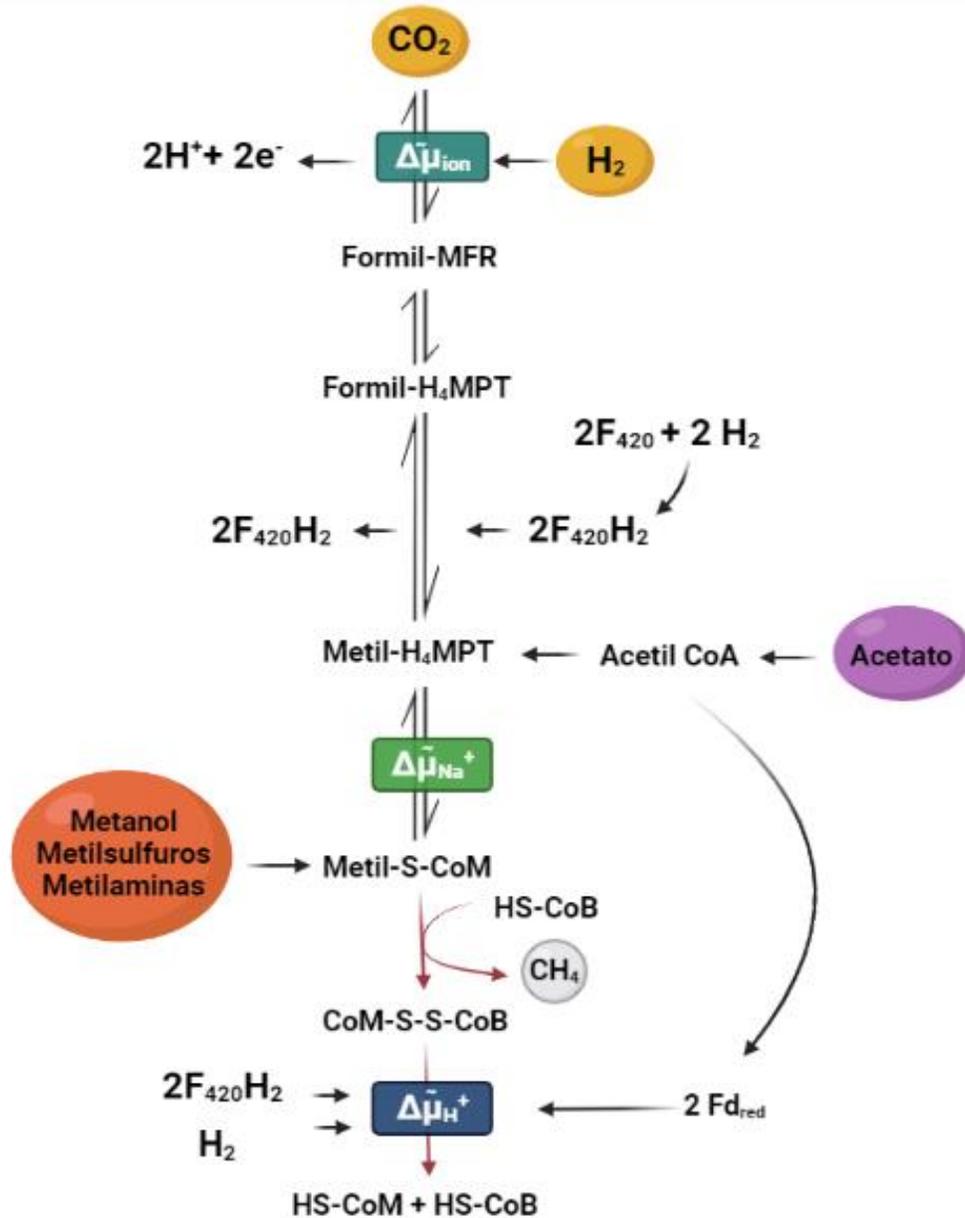


Figura 3. Perspectiva general de las principales vías metanogénicas. Basada en (Deppenmeier, 2012).

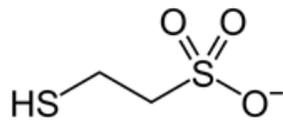
Existen diversos mecanismos para el acoplamiento del catabolismo de la fuente de carbono con la generación de un gradiente quimiosmótico en metanogénicos, entre ellos se encuentran el transporte acoplado y el bombeo activo dado por enzimas oxidoreductasas a nivel membranal (Ferry, 2015). Muchas de estas estrategias son utilizadas por los metanogénicos para la conservación de energía. Entre ellas, se incluye el bombeo de Na^+ y/o H^+ por complejos enzimáticos (Mtr, Rnf) acoplados a

un antiportador de H^+/Na^+ (Mrp) (Schlegel *et al.*, 2012; Jasso-Chávez *et al.*, 2013; Gottschalk & Thauer, 2001).

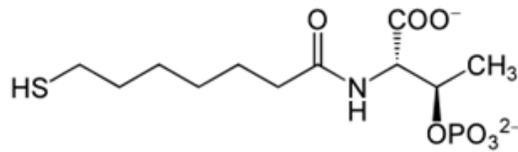
Con esto, resulta importante destacar que la metanogénesis sienta sus bases en el papel de cofactores y coenzimas únicas en su tipo que fungen tanto como donadores de e^- como acarreadores de moléculas de un carbono. La estructura y función de estas moléculas pueden presentar algunas diferencias dependiendo del organismo y de la fuente de carbono de la que se extrae el grupo metilo, sin embargo, en todas estas variaciones en las características de estas moléculas son las que les permiten llevar a cabo el correcto transporte de e^- . En la vía hidrogenotrófica, el donador de e^- es el H_2 en presencia de CO_2 , mientras que para la metilotrófica y acetilclástica es la fuente de carbono en sí. Otro factor importante en la naturaleza de estas moléculas involucradas en la metanogénesis es su dependencia en metales de transición, representando así compuestos organometálicos de gran relevancia para los organismos metanogénicos. Entre ellos se encuentra el Fe, Mo, W, Co, Zn y Ni; (Fig. 4) (Deppenmeier, 2002).

Dentro de las enzimas esenciales conservadas en todos los metanogénicos se encuentran: la metil-tetrahidrosarcinoptericina: CoM transferasa (Mtr), la metil-CoM reductasa (Mcr) y la heterodisulfuro reductasa (Hdr), de las cuales existen algunas isoformas (Hedderich & Whitman, 2006). Estas enzimas convergen en el último paso de la metanogénesis, en que, por medio de la Mtr, la coenzima B-SH (el donador terminal de e^-) entra al sitio activo de la Mcr, dona un e^- al radical metilo para la producción de CH_4 y forma un heterodisulfuro coenzima M-coenzima B (CoM-S-S-CoB) para regenerar al cofactor $Ni(I)F_{430}$ y de esta forma liberar CH_4 . El CoM-S-S-CoB sirve como el aceptor terminal de e^- en el flujo de la cadena transportadora de e^- los cuales son canalizados a través de la CoM-S-S-CoB heterodisulfuro reductasa, Hdr, y con la cual se forma un gradiente electroquímico de Na^+ y H^+ para ser utilizados por la A_1A_0 ATP sintasa en la síntesis de ATP (Schlegel *et al.*, 2012). Así, es evidente que los metanogénicos han evolucionado para llevar a cabo un proceso altamente eficiente ya que son capaces de sintetizar su propio donador y aceptor terminal de e^- , los cuales son restituidos a CoM-SH y CoB-SH libre para continuar

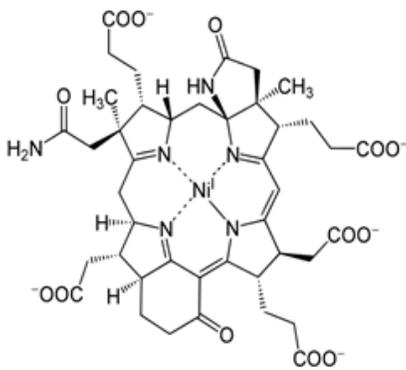
con el proceso de metanogénesis en un nuevo ciclo (Hedderich *et al.*, 2005; Buan & Metcalf, 2010).



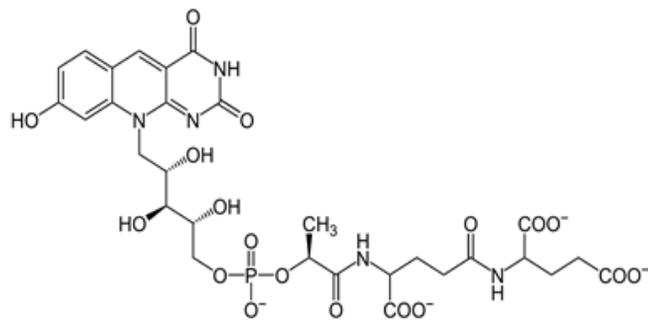
Coenzima M
CoM-SH



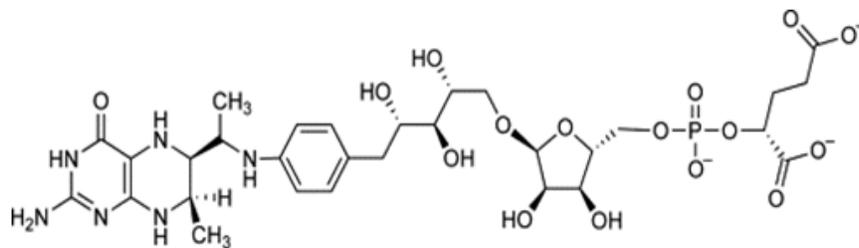
Coenzima B
CoB-SH



Coenzima F₄₃₀



Coenzima F₄₂₀



THMPT

Figura 4. Estructura química de cofactores esenciales para el proceso de metanogénesis, en microorganismos metanogénicos.

En términos generales, la termodinámica nos ayuda a determinar la posibilidad de que determinadas reacciones químicas ocurran o no. Un parámetro utilizado para determinar si una reacción química es termodinámicamente favorable es la energía libre de Gibbs (ΔG°). Si ΔG° representa un valor negativo se dice que la reacción es favorable. Este parámetro es calculado a partir de la energía de formación ($\Delta_f G^\circ$) bajo condiciones estándares a temperatura y presión constantes (1bar, 25°C, 1M), lo cual no representa el ambiente o las condiciones intracelulares; sin embargo, este puede indicar si la reacción es favorable o espontánea ($-\Delta G^\circ$) y, a su vez, la magnitud $-\Delta G^\circ$ puede utilizarse para estimar la cantidad de substrato que debe ser consumida para producir una molécula de ATP, en un estado energético favorable para la translocación de iones a través de la membrana (Buan, 2018, Schink, 1997). A continuación se presentan las ecuaciones balanceadas de las principales vías metanogénicas con sus respectivos valores de ΔG° ; (tabla 1). Como se observa todas las reacciones son termodinámicamente favorables.

Vía metanogénica	Ecuación química balanceada	ΔG° (kJ/mol CH ₄)
Hidrogenotrófica	$4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	- 138.8
Metilotrófica	$4 \text{ CH}_3\text{OH} \longrightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	- 106.5
	$4 \text{ HCOOH} \longrightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	- 119.5
	$4 \text{ CH}_3\text{NH}_3\text{Cl} + 2 \text{ H}_2\text{O} \longrightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{ NH}_4\text{Cl}$	- 75.2
	$2 (\text{CH}_3)_2\text{S} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{S}$	- 49
Acetilclástica	$\text{CH}_3\text{COOH} \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	- 36.5

Tabla 1. Ecuaciones balanceadas de las principales vías metanogénicas (Basada en Thauer, 1998).

Basados en la filogenia de genes ribosomales y del gen codificante para McrA, actualmente existen siete ordenes reconocidos de metanogénicos, cinco de los cuales albergan a metanogénicos hidrogenotróficos (Hug *et al.*, 2016; Adam *et al.*, 2017). El orden de los Methanosarcinales contiene al grupo más diverso metabólica y fisiológicamente, con muchos miembros capaces de llevar a cabo más de una vía metanogénica. La mayoría de los metanogénicos conocidos a la fecha se encuentran restringidos a la utilización de no más de uno o dos sustratos para el crecimiento; sin embargo, algunas especies de *Methanosarcina* son capaces de utilizar distintos sustratos a través de diferentes vías metanogénicas (Galagan *et al.*, 2002; Zinder, 1993). Debido a esta versatilidad metabólica se ha elegido a la especie *Methanosarcina acetivorans*, miembro de este último orden, como modelo de estudio.

4.5 *Methanosarcina acetivorans* como modelo de estudio

Methanosarcina acetivorans es un metanogénico perteneciente al orden de los Methanosarcinales aislado de sedimentos marinos en La Jolla, California (Sowers *et al.*, 1984). Esta especie pertenece al género *Methanosarcina*, el cual junto al género *Methanosaeta* representan los únicos géneros responsables del consumo de acetato, fuente de carbono de la cual se obtiene el 75 % del CH₄ producido biológicamente (Galagan *et al.*, 2002).

Este organismo es poseedor del genoma más grande conocido para una arquea con 5.7 Mb, en el que se refleja un amplio potencial genético para la expresión de diversas capacidades metabólicas y celulares. *M. acetivorans* tiene la capacidad de expresar enzimas específicas para utilizar varios sustratos para la generación de ATP, tales como metanol, metilaminas, metilsulfuros, CO y acetato. En su genoma se encuentran múltiples copias de algunos genes esenciales para llevar a cabo la metanogénesis, lo cual sugiere que algunos de ellos podrían tener una regulación diferencial o codificar para enzimas con propiedades cinéticas diferentes permitiéndole una mayor adaptación al ambiente en el que se encuentre (Galagan *et al.*, 2002).

Dentro de los metanogénicos, miembros del orden de los Methanosarcinales parecen ser de los más aero-tolerantes, posiblemente gracias a un amplio número de componentes antioxidantes y proteínas reparadoras de daño codificados en sus genomas. Aun cuando la información con respecto a los mecanismos utilizados por los Methanosarcinales para sensar y responder a la presencia de O₂ es limitada, se ha reportado que la especie *Methanosarcina acetivorans* desarrolla múltiples mecanismos de protección ante la presencia de O₂ y el estrés oxidante asociado a ésta, logrando una disminución en la generación de ROS en células pre-adaptadas a O₂, así como una mayor expresión de la maquinaria antioxidante para contrarrestar el estrés generado (Jasso-Chávez *et al.*, 2015). Debido a esto, *M. acetivorans* representa un modelo clave para la evaluación de daño oxidativo por O₂ en metanogénicos.

Análisis bioinformáticos han revelado que el número de genes que podrían codificar para ALDHs en el dominio Archaea es significativamente reducido (1-5 genes) en comparación con Bacteria (1-26 genes) y Eukarya (8-17 genes) (Sophos & Vasiliou, 2003). Sin embargo, el análisis del genoma de *M. acetivorans* revela que existen genes que codifican para 11 posibles ALDHs, lo cual lo sitúa como un arqueón destacado para discernir la importancia de las ALDHs en metanogénicos.

En este contexto, *M. acetivorans* puede representar un modelo clave para dilucidar mecanismos de adaptación y expresión de vías metabólicas intermediarias involucradas en la protección a estrés oxidativo como la posible expresión de ALDHs.

5. JUSTIFICACIÓN

Actualmente no existen reportes respecto al posible papel de las ALDHs en el metabolismo intermediario ni respecto a su contribución en la disminución de estrés oxidante por medio de la desintoxicación de aldehídos en metanogénicos, por lo que resulta de interés dilucidar si la expresión de una o más ALDHs juega un papel

importante en este tipo de organismos para contrarrestar el daño por estrés oxidativo.

6. HIPÓTESIS

Las ALDHs participan en la protección de *Methanosarcina acetivorans* durante episodios de estrés oxidante producto de exposición a ROS o como parte del propio metabolismo.

7. OBJETIVOS

7.1 General

Discernir si las ALDHs representan parte del mecanismo de protección a estrés oxidante en *Methanosarcina acetivorans*.

7.2 Particulares

- Determinar el crecimiento de cultivos de *M. acetivorans* en diferentes fuentes de carbono y en una condición de estrés inducido por un pulso de O₂.
- Determinar los niveles de estrés y daño oxidativo en todas las condiciones de crecimiento.
- Evaluar la expresión y función de posibles ALDHs dependiente de la fuente de carbono y en una condición de estrés con O₂.
- Determinar la actividad de ALDHs en fracciones sub-celulares con diferentes aldehídos.
- Analizar los niveles de transcritos para genes anotados como posibles ALDHs.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1 Condiciones de cultivo

Las células utilizadas para el desarrollo de este proyecto se cultivaron bajo condiciones anaerobias en medio de cultivo *High salt (HS medium)*, cuya composición se asemeja a las características salinas del agua de mar (Sowers *et al.*, 1993) y cuya composición química se encuentra descrita en el anexo 1. Se utilizó la cepa *Methanosarcina acetivorans* C2A, la cual fue donada amablemente por el Prof. James G. Ferry de la Universidad Estatal de Pensilvania, Estados Unidos.

Los cultivos fueron iniciados con la adición de un inóculo de células de aproximadamente 2 mg de proteína al medio de cultivo fresco. El inóculo utilizado fue tomado de cultivos en el inicio de su fase estacionaria de crecimiento. Los cultivos fueron incubados a 37°C sin agitación.

El medio de cultivo se preparó dentro de una cámara de anaerobiosis (COY Lab Products, Michigan, USA) con una atmósfera compuesta por 80 % N₂, 15 % CO₂ y 5 % H₂ (v/v). Previo a ingresar a la cámara de anaerobiosis, los gases utilizados pasaron por un matraz con virutas de cobre reducido para remover trazas de O₂. Los componentes del medio se disolvieron en agua ultrapura (Milli Q) y por medio de intercambio gaseoso (agitación y burbujeo constante) de entre 2-3 h se eliminó el exceso de O₂ disuelto en el agua. El O₂ liberado a la atmósfera de la cámara de anaerobiosis es captado por medio de un catalizador de paladio, el cual aunado a la presencia de H₂ permite la formación de moléculas de agua las cuales son capturadas por sílica gel. Como un indicador del estado de óxido-reducción del medio se adicionó resazurina ya que este compuesto cambia de color en ausencia o presencia de O₂ (Lira-Silva *et al.*, 2012). Para crear un ambiente altamente reductor (-300 mV) y asegurar la generación de un medio de cultivo anaerobio eficiente se adicionó cisteína-HCl y sulfuro de sodio para una completa eliminación del O₂ del medio. El pH final fue de 6.8. Posteriormente, 50 mL de medio de cultivo se vertieron en frascos de vidrio de 100 mL tipo ampolleta sellados herméticamente con un tapón de teflón y asegurados con un arillo de aluminio (Virmel, México). Finalmente, los

medios fueron esterilizados por calor húmedo en autoclave a 1.5 Lb/pulg² de presión durante 40 minutos.

8.2 Cosecha de células

La cosecha de las células se llevó a cabo en la fase exponencial de cultivo correspondiente a cada fuente de carbono (en metanol: día 1 de cultivo; en acetato y TAG: día 6 de cultivo) por centrifugación a 5,554 *g* durante 10 minutos; para el lavado de las células se utilizó una solución que contenía 50 mM TRIS-HCl, 20 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA y 200 mM NaCl a pH 7.2 (amortiguador TME-Na). De acuerdo al ensayo a realizar la cosecha se llevó a cabo en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis. La condición de anaerobiosis se mantuvo al realizar la cosecha en frascos sellados dentro de la cámara de anaerobiosis.

8.3 Cuantificación de metano

La cantidad de metano (CH₄) producido a lo largo de la curva de crecimiento de los cultivos fue determinada como un parámetro indicativo de crecimiento celular. Para ello se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japón) equipado con una columna capilar HP-PLOT/U de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y 10 μm de película (Agilent, USA) y un Detector de Ionización de Flama (FID). La fase móvil del cromatógrafo de gases consistió en una mezcla de aire, hidrógeno y helio. La descripción de la configuración del programa utilizado se encuentra en la tabla 2.

<i>Inlet</i>	
Configuración de inyección	<i>Split</i>
Flujo de purga	3.0 mL/min
Temperatura	150 °C
Presión	75.0 kPa
Flujo total	37.5 mL/min
Columna	
Tipo de columna	HP-PLOT/U
Flujo de columna	1.65 mL/min
Tiempo de estabilización	0.3 min

Velocidad lineal	31.8 cm/sec
Volumen de inyección	2 μ L
Detector FID	
Temperatura	170 °C
Flujo de H ₂	40 mL/min
Flujo de aire	400 mL/min
<i>Make up Flow</i> (He)	8.0 mL/min
<i>Sampling rate</i>	40 msec
Detector TCD	
Temperatura	180°C
Corriente	60 mA
Polaridad	Positiva (+)
<i>Make up Flow</i> (He)	5.0 mL/min

Tabla 2. Descripción de la configuración de cromatógrafo de gases para cuantificación de CH₄.

La medición del metano contenido consistió en la inyección de 2 μ L de la atmósfera interna de los frascos de cultivo (*headspace*) con ayuda de una microjeringa de 10 μ L de capacidad (Hamilton, Nevada, USA) con una guía metálica como auxiliar para perforar el tapón de los frascos. Como protocolo se realizó una purga de la muestra obtenida previo a su inyección en el equipo para una mayor certeza en la cuantificación de CH₄. La identificación del tiempo de retención del metano con la configuración del programa previamente descrito se obtuvo gracias a la inyección de muestras estándar de metano comercial. Se determinó que el tiempo de retención para dicho compuesto fue de 0.9 minutos. La cantidad de CH₄ producida por cultivo se obtuvo de la interpolación de los valores de área bajo la curva (AU) de cada muestra con respecto a la curva estándar realizada (Fig. 5).

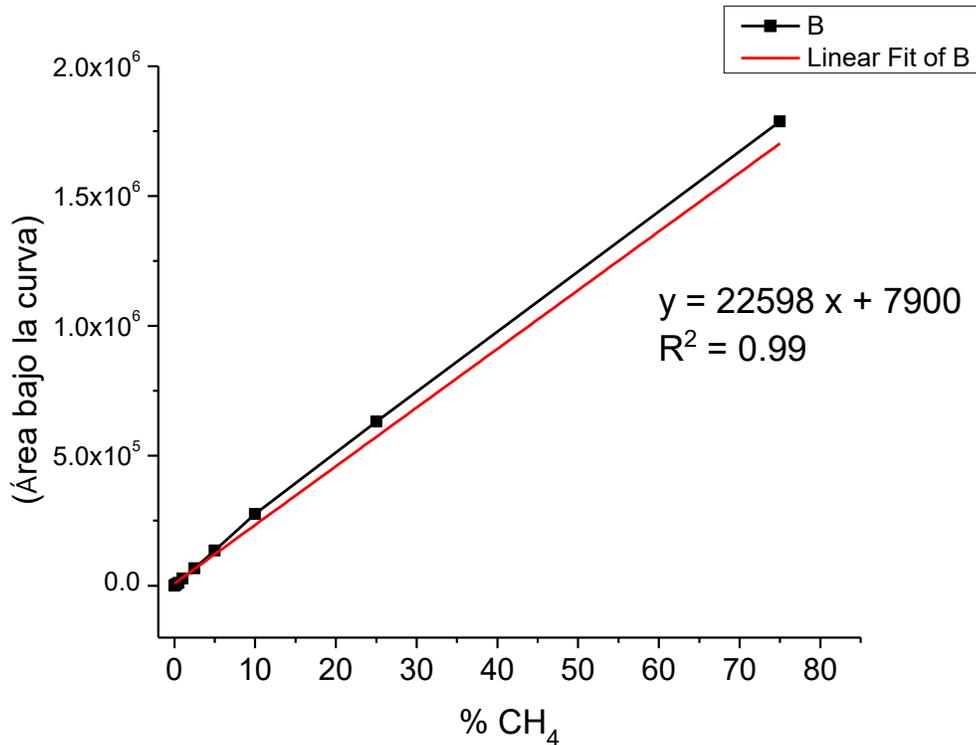


Figura 5. Curva estándar de CH₄

8.4 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína en los ensayos fue determinada por métodos colorimétricos de acuerdo a la sensibilidad de detección de los métodos de Biuret y Lowry, en que la intensidad de la coloración de la muestra es proporcional a la concentración de proteínas según la Ley de Lambert-Beer (Lowry *et al.*, 1951).

8.5 Determinación de niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) se cuantificó espectrofotométricamente al medir la oxidación de la sonda diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) bajo condiciones anóxicas dentro de una cámara de anaerobiosis de acuerdo con el protocolo establecido por Jasso-Chávez *et al.* (2015). Dicha sonda se internaliza en las células y tras la hidrólisis de los grupos de acetato por parte de esterasas intracelulares y la subsecuente oxidación del compuesto por ROS intracelulares, el H₂DCFDA se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) el cual es monitoreado para obtener la concentración de

ROS intracelulares (Invitrogen, 2006). La cosecha de las células se llevo a cabo en condiciones anaerobias y previo a la realización de cada ensayo las células fueron incubadas durante 40 minutos en la fuente de carbono correspondiente a las condiciones de cultivo de las que provenían para asegurarse que las células estuvieran metabólicamente activas. Para cada ensayo se utilizó aproximadamente 1 mg de proteína resuspendido en amortiguador TME-Na a pH 7.2, en una celda de vidrio la cual fue sellada con un tapón de teflón. Después de obtener una señal basal de la sonda se adicionaron 4 mL de aire (21% de O₂) y se monitoreó la señal a 500 nm. El coeficiente de extinción molar para el DFC es de 59.5 mM⁻¹cm⁻¹.

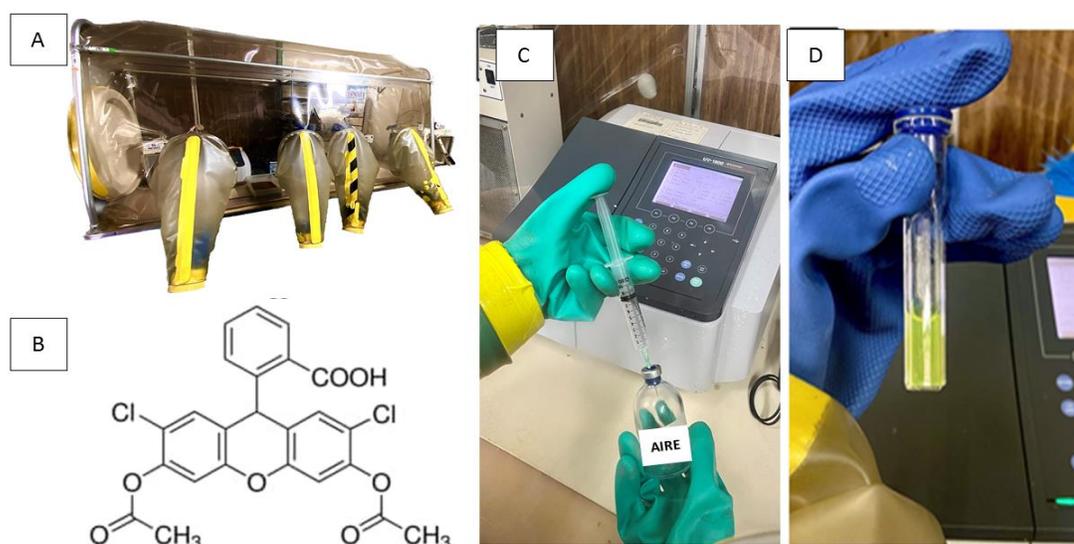


Figura 6. Determinación de ROS intracelulares. A) Cámara de anaerobiosis, B) Estructura química de sonda H₂DCFDA, C) Frasco sobrepresurizado con aire al interior de la cámara de anaerobiosis, D) Celda sellada utilizada para ensayos.

8.6 Cuantificación de niveles de daño oxidativo

Los niveles de daño oxidativo fueron determinados a través de la técnica establecida por Gerard-Monnier *et al.* (1998). El fundamento de la técnica se basa en el principio de que bajo condiciones acídicas el compuesto 1-metil 2-fenilindol reacciona con malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4-HA), ambos catalogados como

productos principales de peroxidación lipídica (LPO). Derivado de esta reacción se produce un cromóforo estable con una absorción máxima a 586 nm. Las determinaciones fueron realizadas en homogenados celulares obtenidos a partir de la cosecha celular en anaerobiosis. La reacción fue iniciada tras la adición de 150 μ L de una solución de ácido metanosulfónico concentrado más 34 μ M FeCl₃. Las muestras se incubaron a 45°C en baño seco durante 1 h y previo a su medición en un espectrofotómetro de diodos fueron centrifugadas a 12470 g durante 5 minutos para evitar interferencia. Una curva estándar con tetraetoxipropano (TEP) fue realizada para la interpolación de los resultados, dicho compuesto fue previamente hidrolizado con ácido clorhídrico durante al menos una hora.

8.7 Obtención de fracciones subcelulares y cuantificación de actividad enzimática de ALDHs

La cosecha celular se realizó en condiciones de aerobiosis y las células fueron lisadas con la adición de amortiguador TRIS-EDTA (50 mM TRIS, 1 mM EDTA) pH 8.0. La quelación de Mg²⁺ por parte del EDTA resulta en la ruptura de la célula debido a que la cepa utilizada posee una pared celular particularmente sensible a cambios en la osmolaridad, en el que el papel del Mg²⁺ resulta determinante para su estabilidad (Sowers *et al.*, 1984). Posteriormente, se adicionó 1 mM DTT y 1 mM PMSF; el primero como un agente reductor importante para la preservación de enzimas con grupos tiol y el último como un inhibidor de serina proteasas. Después se agitó la suspensión celular en vórtex a intervalos de 15 segundos seguidos de un minuto de reposo durante media hora para asegurar la ruptura celular y se adicionó DNasa I recombinante (Sigma, St Louis Mo, USA) para recobrar la consistencia líquida del extracto y se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y este se ultracentrifugó a 40,000 rpm por 40 minutos. La fracción citosólica fue separada y la fracción membranal fue resuspendida en amortiguador HKE-Na pH7.2.

La actividad de las aldehído deshidrogenasas se determinó utilizando un espectrofluorómetro Aminco-Bowman serie 2. Muestras de entre 0.2 a 0.5 mg de proteína fueron agregadas a una celda que contenía 2 mL de amortiguador HKE-Na a pH 7.2 (50 mM HEPES, 130 mM KCl, 1 mM EGTA y 50 mM NaCl) suplementado

con 0.5 mM β -mercaptoetanol. Los ensayos se llevaron a cabo en presencia de 0.01 % de Tritón X-100, 100 μ M pirazol (un inhibidor de alcohol deshidrogenasas) y en condiciones saturantes de NAD^+ y de aldehído. La estructura de los aldehídos utilizados en los ensayos enzimáticos se encuentra ilustrada en la Fig. 7. La actividad fue determinada al excitar la muestra a 340 nm y siguiendo el aumento en la fluorescencia a 460 nm debido a la formación de NADH.

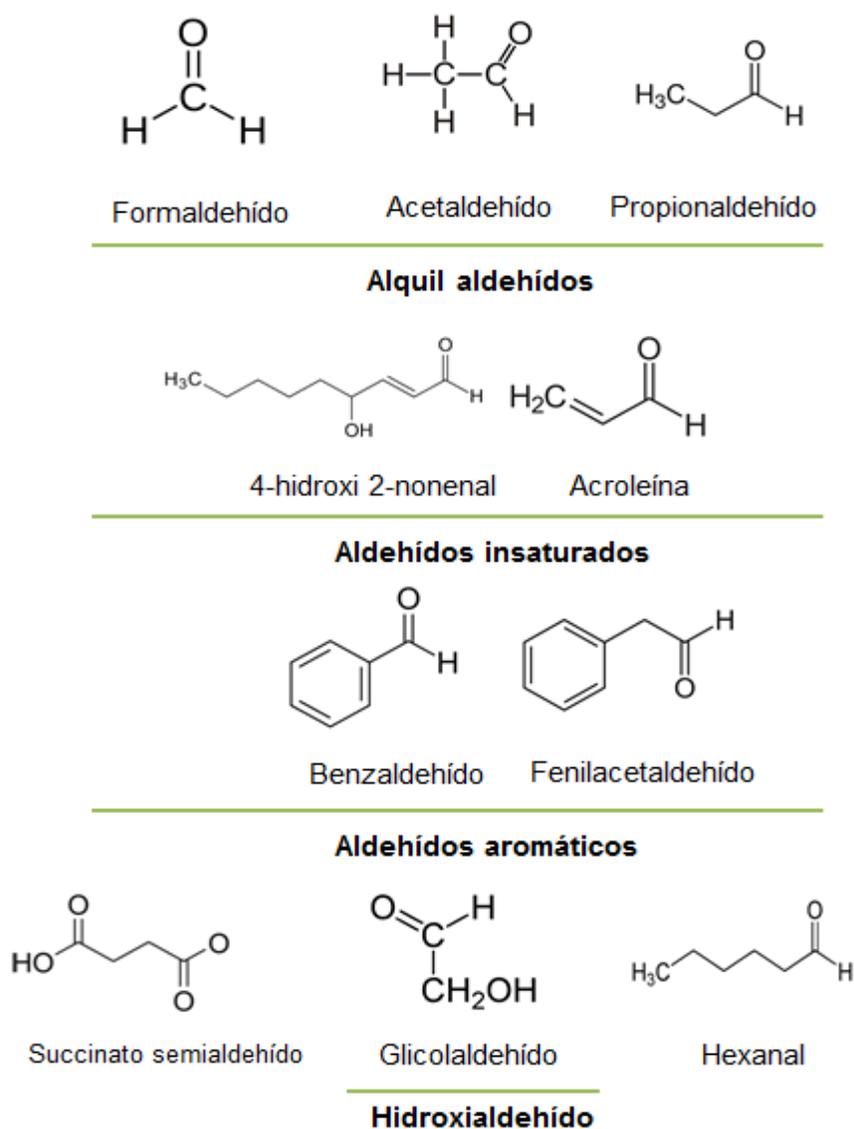


Figura 7. Estructura de los aldehídos utilizados como sustratos en ensayos enzimáticos en fracciones sub-celulares de *M. acetivorans*.

8.8 Aislamiento de RNA de *Methanosarcina acetivorans* C2A

La obtención del RNA total se logró mediante el uso del kit comercial Quick-RNA™ Mini Prep (Zymo Research, CA, USA) utilizando células en fase exponencial cultivadas en las diferentes fuentes de carbono. El protocolo se encuentra ilustrado en la Fig. 8. Todo el material utilizado fue tratado con 0.1% dietilpirocarbonato (DEPC), un inhibidor de RNasas. La integridad del RNA aislado fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % (p/v), mientras que la concentración de RNA en las muestras se obtuvo mediante la cuantificación espectrofotométrica a 260 nm. Así mismo, la relación $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ se utilizó como un parámetro para determinar la pureza de las muestras obtenidas al exponer la contaminación de proteínas en las preparaciones.

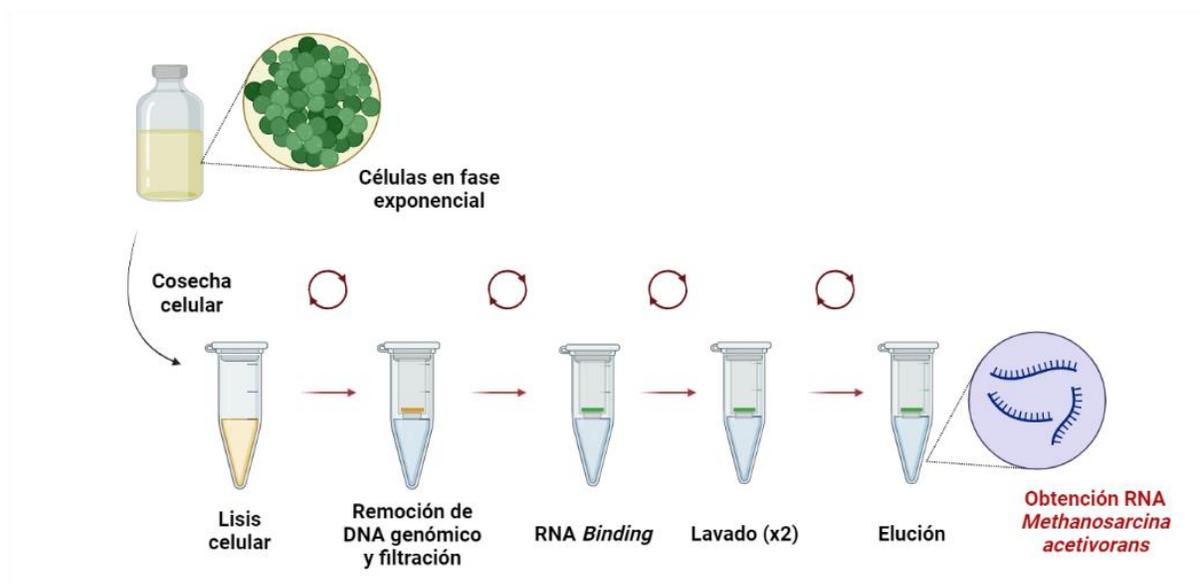


Figura 8. Esquema del protocolo para el aislamiento de RNA en *Methanosarcina acetivorans*.

8.9 Síntesis de cDNA y determinación del nivel de transcritos mediante RT-PCR

El RNA aislado se utilizó como molde para llevar a cabo la síntesis de cDNA mediante una reacción de transcriptasa reversa con el kit comercial *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA); Fig. 9. El cDNA fue sintetizado a partir de 5 μ g de RNA utilizando *primers* hexámeros

aleatorios. La concentración de las muestras se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. El cDNA obtenido se utilizó para la determinación de cambios a nivel de transcritos mediante la técnica de RT-PCR para lo cual se llevo a cabo el diseño de *primers* para cada uno de los genes de interés y para un gen cuya expresión se mantuviera constante en las diferentes condiciones experimentales (GAPDH). El protocolo para el gen constitutivo fue de un ciclo de 15 min a 95°C seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 30 s y 72°C a 30 s. El número de ciclos fue ajustado para cada gen para asegurar que los productos amplificados se encontraran dentro del intervalo lineal de amplificación.

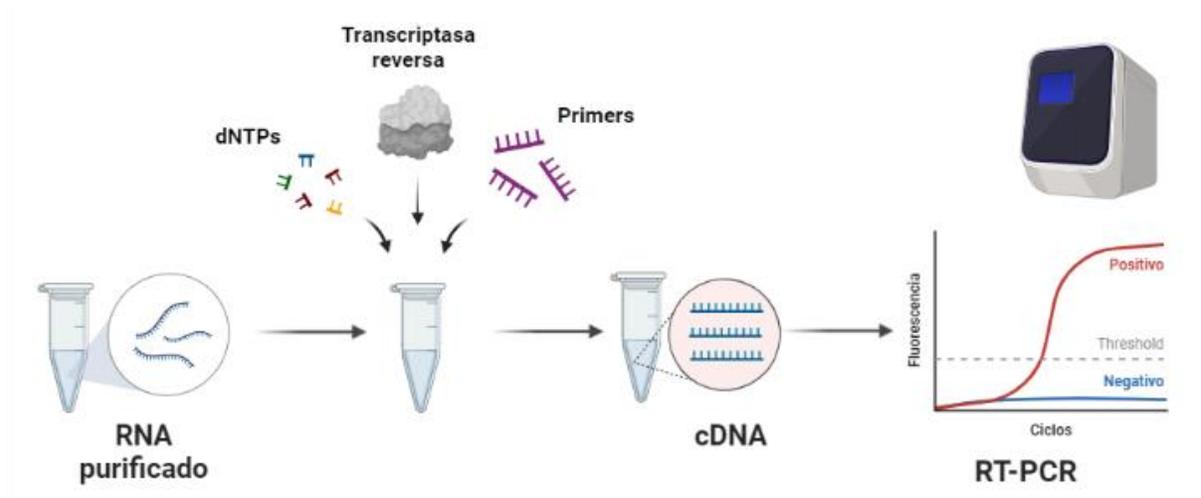


Figura 9. Esquema del protocolo para la determinación de cambios en la expresión de posibles genes codificantes de ALDHs

8.10 Diseño de *primers* para técnica de RT-PCR

Las secuencias de los genes fueron obtenidas de la base de datos del *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Los *primers* específicos para cada gen fueron diseñados teniendo en cuenta parámetros como la temperatura de desnaturalización (T_m) y de alineamiento, el contenido de GC, así como la posible conformación de estructuras internas secundarias (*hairpin*, *self dimer* y heterodímeros) entre cada par de cebadores. En cuanto a este último criterio se estableció un límite máximo de -5.0 kcal/mol (ΔG) para evitar la unión de secuencias complementarias dentro de su propia estructura. De igual manera, se estableció que

la longitud de los cebadores se encontrara entre 20-22 pb siendo la misma longitud en cada par de *primers* para un mismo gen. El producto de la amplificación con estos *primers* se encuentra en el rango de 100-190 pb. Para cerciorarse de que los cebadores diseñados fueran específicos de un solo sitio en el genoma de la cepa utilizada, se llevó a cabo un análisis BLAST en la plataforma del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Las características de cada par de *primers* se encuentra descrito en la tabla 3.

8.11 Análisis y construcción de árbol filogenético de posible gen codificante para ALDHs (MA_4079)

Se eligió un gen de *M. acetivorans* para evaluar con qué genes de otros organismos había similitud en cuanto a la secuencia traducida de estos genes. La secuencia del gen MA_4079 codificante para una posible aldehído deshidrogenasa, fue obtenida a través del KEGG tomando la secuencia correspondiente de 479 aminoácidos. Dicha secuencia se ingresó a la herramienta *Basic Alignment Local Search Tool* (BLAST), a través del portal del NCBI, utilizando como base de datos la *non-redundant protein sequences database* (nr). Una vez obtenida la lista de secuencias similares se llevó a cabo el alineamiento y los análisis evolutivos en el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

La historia evolutiva fue inferida utilizando el método Neighbor-Joining (Shaitou *et al.*, 1987). El porcentaje de repeticiones en los que los taxa asociados se unen en el muestreo *bootstrap* (500 réplicas) se muestra directamente en cada rama (Felsenstein, 1985). El árbol se diseñó a escala; la longitud de las ramas se encuentra en las mismas unidades a las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron establecidas de acuerdo al método de número de diferencias (Nei & Kumar, 2000) y se encuentra en unidades del número de diferencias de aminoácidos por secuencia. Todas las posiciones ambiguas fueron removidas para cada par de secuencias (*pairwise deletion option*). El análisis involucró 203 secuencias de aminoácidos para el gen MA_4079. En cuanto a las posiciones, un total de 508 posiciones fueron analizadas en el conjunto de datos final. La escala de color asociada a cada árbol representa el porcentaje de identidades que comparte cada secuencia.

Gen	Anotación del gen		Secuencia	% GC	Tm (°C)	Horquilla (ΔG)	Homodímero (ΔG)	Heterodímero (ΔG)	Longitud de producto
MA_0430	Aspartato semialdehído deshidrogenasa	Fw	5' CATTACTAACCTAACTGCTCC 3'	45.5	52.6	1.91	-3.14	-3.14	189 pb
		Rw	5' TCCATCTTCTTTCTTCGCTC 3'	42.9	52.6	Sin estructura	-3.61	-3.14	
MA_4079	Betaína aldehído deshidrogenasa	Fw	5' GCTCCCCGTGGTAACTGTAA 3'	55	56.8	-0.04	-3.61	-3.61	114 pb
		Rw	5' CCTTCCGTGCCCTGTCTAT 3'	55	56.9	1.85	-3.61	-3.61	
MA_0705	Succinato semialdehído deshidrogenasa	Fw	5' CCCATCAGGCAGTCCAGA 3'	61.1	56.8	-0.57	-3.14	-3.14	144 pb
		Rw	5' CACTCCCAGAGGCTCAA 3'	55.6	54.3	-0.64	-3.17	-3.14	
MA_0417	Formaldehído deshidrogenasa	Fw	5' GTGATCCCGTTGAGATGATA 3'	45	51.4	0.52	-4.62	-3.9	100 pb
		Rw	5' GCACAATCCACACCTAAAAC 3'	45	52	Sin estructura	-3.14	-3.9	
MA_0794	Aldehído ferredoxin oxidoreductasa	Fw	5' AGGACTCGGTGAAAATAGCG 3'	50	54.7	-0.35	-3.61	-4.74	115 pb
		Rw	5' GGGTACAGAGTTGGCTCTCC 3'	60	57.1	-1.4	-4.77	-4.74	
Ma_1355	Succinato/Glutarato semialdehído deshidrogenasa	Fw	5' GCAGGCACTGGAGAGATTG 3'	55	56.1	-0.56	-3.14	-3.9	127 pb
		Rw	5' GGGCTCAAAGGTGACATAGC 3'	55	55.9	-0.19	-4.74	-3.9	
MA_1714	Aldehído ferredoxin oxidoreductasa	Fw	5' GCCCTTGACCCTGATAACC 3'	55	55.7	2.76	-3.14	-3.29	130 pb
		Rw	5' GTTCCCGCTCCCTACTGTTC 3'	60	57.6	1.93	-3.61	-3.29	
MA_2860	α cetoglutárico semialdehído deshidrogenasa	Fw	5' TGACGGAGGAAATGGGAAAG 3'	50	54.8	1.65	-3.61	-4.87	155 pb
		Rw	5' CCTGAGCACGGTCATACAGA 3'	55	56.5	-0.77	-3.61	-4.87	
MA_2962	Aldehído ferredoxin oxidoreductasa	Fw	5' CACACAGGGCTTGAAACAT 3'	50	55.8	-0.32	-3.14	-3.9	190 pb
		Rw	5' TGGCAAAGAGACAGGCAACC 3'	55	58.1	-0.43	-3.14	-3.9	
MA_3989	Aldehído ferredoxin oxidoreductasa	Fw	5' GAGGGGGATTAGAGGACAGG 3'	60	56.3	1.88	-1.47	-2.92	173 pb
		Rw	5' GCACAGCAGTCAGGTTTTCA 3'	50	55.9	0.23	-3.14	-2.92	
MA_4100	Glutamato-5- semialdehído deshidrogenasa	Fw	5' ACTTGAAACCTTGCTTTTG 3'	36.8	48.9	1.2	-3.89	-3.89	110 pb
		Rw	5' GCCCTTTACATCCATACT 3'	47.4	51.6	2.21	-3.14	-3.89	

Tabla 3. Características de cebadores utilizados para la cuantificación del nivel de transcritos para posibles genes codificantes de ALDHs.

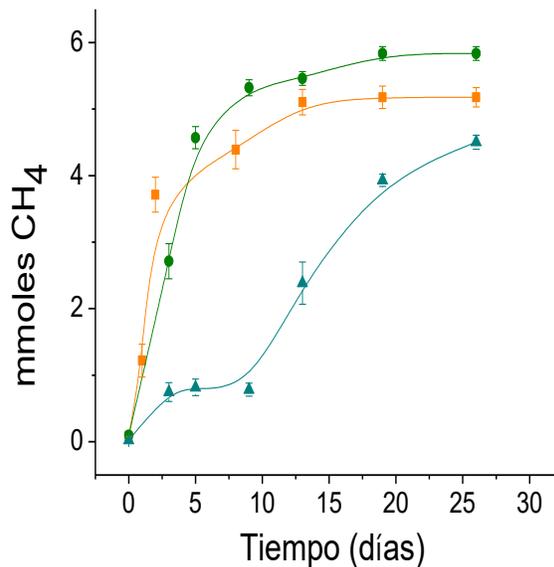
9. RESULTADOS

9.1 Efecto de las fuentes de carbono y el estrés oxidativo sobre el cultivo de *M. acetivorans*

La evaluación del crecimiento celular de *M. acetivorans* se llevó a cabo a partir de dos perspectivas: la primera a través del consumo de fuentes de carbono distintas para evaluar el metabolismo en condiciones normales de cultivo, y la segunda por medio de la exposición a una condición de estrés oxidativo para evaluar los cambios en el crecimiento celular ante un agente estresor externo.

Las fuentes de carbono utilizadas para evaluar la primera condición fueron 150 mM MetOH, 100 mM acetato y la combinación de 25 mM TAG más 30 mM acetato (Fig. 10; panel A). Utilizando la producción de metano como un parámetro indirecto de crecimiento podemos observar que el cultivo de *M. acetivorans* en diferentes fuentes de carbono demuestra un comportamiento de crecimiento diferencial ya que el tiempo de producción de CH₄ varía dependiendo de la fuente suministrada. En este aspecto, la condición con MetOH fue aquella que mostró un crecimiento más rápido en comparación con el resto de las fuentes de carbono probadas. Cabe mencionar que al llevar a cabo más pases en la combinación de TAG más acetato la fase de latencia en estas células disminuyó de forma que su comportamiento se equiparó al presentado por las células cultivadas en acetato. Con lo anterior, se estableció la duración de la fase exponencial de cada fuente de carbono, siendo de 1-3 días para los cultivos en metanol y de 5-7 días para las células en acetato y también para la combinación de TAG más acetato.

A



B

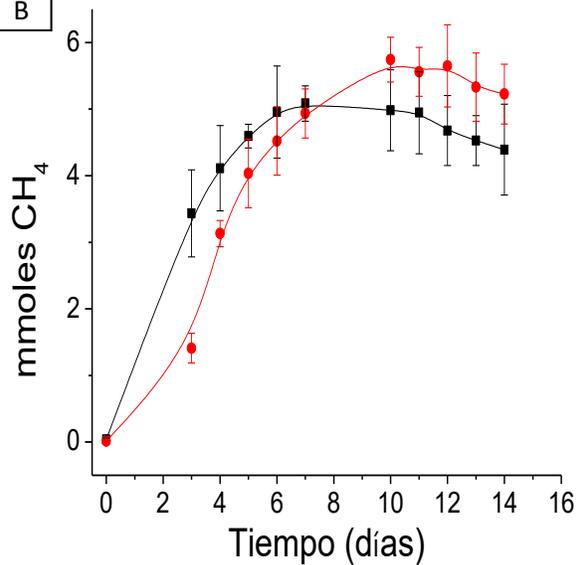


Figura 10. Curvas de crecimiento de *Methanosarcina acetivorans*. A) Curva de crecimiento en diferentes fuentes de carbono. Células en 100 mM acetato (línea verde), en 25 mM TAG más 30 mM acetato (línea azul) y en 150 mM metanol (línea naranja). B) Curva de crecimiento en condición de estrés oxidativo. En condición control con 100 mM acetato (línea negra) y en condición de estrés con un pulso de 5 % O₂ (v/v) en 100 mM acetato (línea roja). Los valores presentados son el promedio más la desviación estándar de 3 cultivos independientes en cada condición de cultivo.

Para evaluar el crecimiento celular en una condición de estrés oxidativo por un agente externo se utilizaron células cultivadas en acetato ya que este representa la fuente de carbono más abundante en el nicho ecológico del modelo de estudio. Para inducir la condición de estrés se suministró un pulso de 5 mL de aire estéril (1 % O₂) al inicio de la curva de crecimiento (Fig. 10, panel B). Cabe destacar que este pulso no fue suficiente para detener por completo el crecimiento, lo cual nos habla de la presencia de al menos un sistema antioxidante con el que cuentan las células ante la presencia de oxígeno; además del S²⁻ y Cys presente en el medio. Al comparar con el crecimiento de células control cultivadas en anaerobiosis, las células expuestas al O₂ del aire mostraron un retraso en la producción de CH₄, sin embargo, estas células alcanzaron el crecimiento esperado con respecto a las células control a partir del día 5 de cultivo.

Derivado de lo anterior, se estableció el día 4 de cultivo como el tiempo adecuado para poder percibir diferencias en el metabolismo provocadas por estrés oxidativo, al mismo tiempo que se obtiene una cantidad de biomasa aceptable para poder analizar experimentalmente en esta condición de estrés inducido.

9.2 Cuantificación de niveles intracelulares de ROS

Al observar diferencias en el crecimiento celular de acuerdo a la fuente de carbono suministrada se procedió a evaluar si de igual forma el estado basal de estrés oxidativo presentaba variación en la fase exponencial de crecimiento dependiendo de la fuente de carbono presente. Para ello, se cuantificó la velocidad de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de acuerdo con el protocolo establecido por Jasso-Chávez *et al.* (2015). La cuantificación de ROS indicó que hay niveles significativamente diferentes en TAG (65 ± 7 pmol/min*mg de proteína) y metanol (26 ± 10 pmol/min*mg de proteína) tomando como referencia a las células cultivadas en acetato (174 ± 23 pmol/min*mg de proteína); ver Fig. 11. De acuerdo con estos resultados podemos corroborar que existen diferentes niveles de estrés oxidativo conforme a la fuente de carbono disponible. Con respecto a la condición de estrés oxidativo inducido por O₂ podemos observar que los niveles de ROS generados al día 4 de cultivo son significativamente mayores al control en acetato, por lo que el metabolismo de estas células está siendo perturbado en esta fase del crecimiento ante una mayor presencia de ROS. Con base en la curva de crecimiento obtenida podemos suponer que posterior a este día de cultivo las células pudieron contrarestar los niveles de estrés ya que su crecimiento fue restablecido.

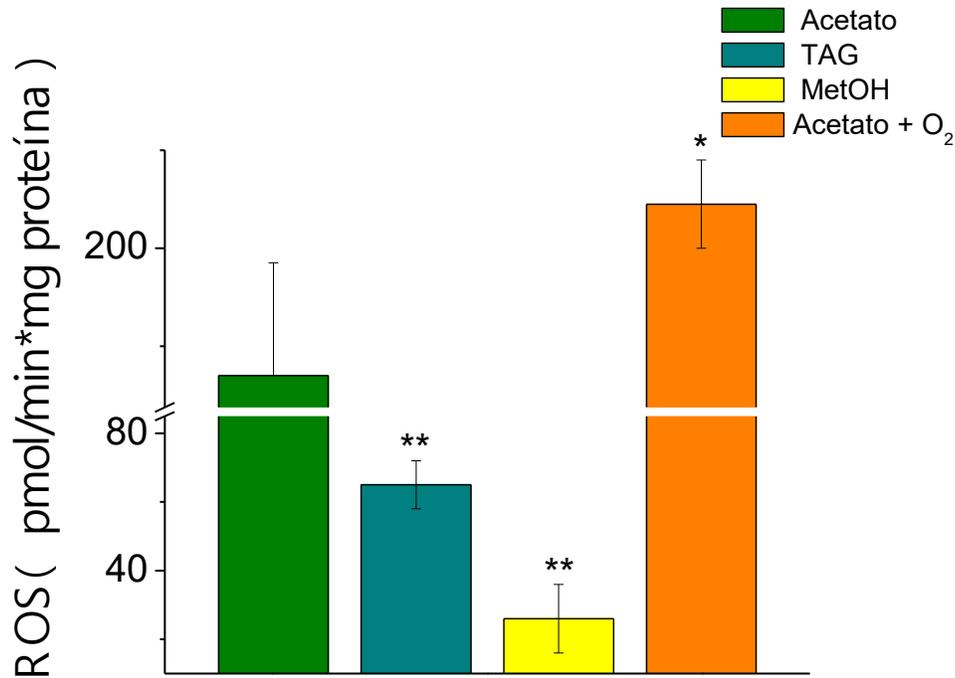


Figura 11. Niveles de generación de ROS en fuentes de carbono consumidas por *M. acetivorans* en fase exponencial de crecimiento. Células en 100 mM acetato (barra verde), en 25 mM TAG más 30 mM acetato (barra azul), en 150 mM metanol (barra amarilla) y en condición de estrés con un pulso de 5 % O₂ (v/v) en 100 mM acetato (barra naranja). Los valores presentados son el promedio más la desviación estándar de 3 cultivos independientes en cada condición de cultivo. * p < 0.05, ** p < 0.01 tomando en cuenta a las células cultivadas en acetato como control.

9.3 Cuantificación de daño oxidativo

Ante la presencia de ROS la célula se encuentra susceptible a sufrir daño oxidativo por el proceso de peroxidación lipídica por lo que la capacidad de expresión de sistemas antioxidantes, como las ALDHs, que contribuyan a la protección oxidativa para disminuir este daño cobran relevancia. Para obtener un panorama del daño oxidativo que sufren las células en diferentes fuentes de carbono y en la condición de estrés oxidativo por O₂ se midieron los niveles de MDA y 4-HA como aldehídos totales, al representar los productos principales de LPO.

Los resultados obtenidos indican que en cuanto a las diferentes fuentes de carbono las células expuestas a metanol (4.7 ± 0.3 nmol_{aldehídos}/mg de proteína) son más

susceptibles a daño por estrés oxidativo comparado con las células en acetato (3.5 ± 0.3 nmolaldehídos/mg de proteína) o TAG (2.7 ± 0.2 nmolaldehídos/mg de proteína) en fase exponencial de crecimiento; Fig. 12. Esto sugiere que dependiendo del sustrato existe un nivel distinto de expresión de enzimas que constituyen la defensa antioxidante para prevenir daño oxidativo como producto propio del metabolismo.

En cuanto a las células expuestas a O_2 , los niveles de daño son mayores comparados con su control en anaerobiosis lo cual sugeriría que la defensa antioxidante no es tan eficiente en estas condiciones, sin embargo, cabe resaltar que el crecimiento pudo restaurarse después del día 5 de cultivo, lo cual es atribuible a la participación de uno o más sistemas de protección antioxidante entre los cuales podrían encontrarse las ALDHs. De lo anterior, se establece que el día 4 de cultivo es adecuado para medir la actividad de estas enzimas.

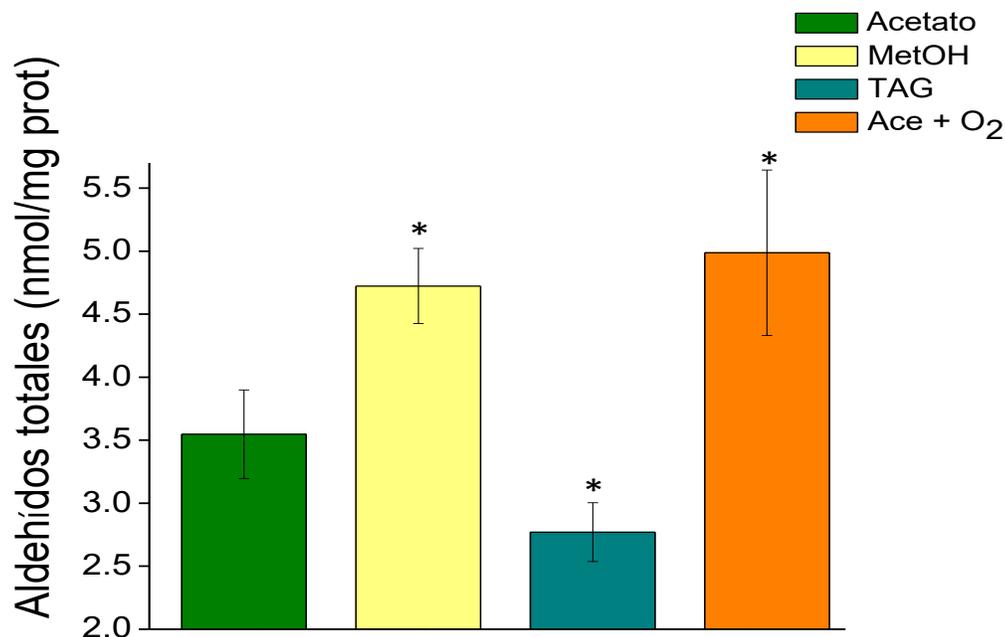


Figura 12. Daño oxidativo en *M. acetivorans* generado por el metabolismo intermediario y por una condición de estrés por O_2 . Células en 100 mM acetato (barra verde), en 25 mM TAG más 30 mM acetato (barra azul), en 150 mM metanol (barra amarilla) y en condición de estrés con un pulso de 5% O_2 (v/v) en 100 mM acetato (barra naranja). Los valores presentados son el promedio más la desviación estándar de 3 cultivos independientes en cada condición de cultivo. * $p < 0.05$ tomando en cuenta a las células cultivadas en acetato como control.

9.4 Determinación de actividad de ALDHs en fracciones subcelulares

Al corroborar que existen niveles diferentes de estrés y daño oxidativo de acuerdo a la fuente de carbono suministrada, resultó importante la determinación de la posible actividad de ALDHs en condiciones libres de un agente estresor ya que derivado de esto podría confirmarse la posible expresión basal de ALDHs como parte del metabolismo intermediario en *M. acetivorans*.

El establecimiento de un protocolo óptimo de obtención de fracciones celulares permitió llevar a cabo las determinaciones correspondientes; sin embargo, para corroborar que las fracciones celulares que se estaban obteniendo correspondían a la localización celular que se les atribuía, se midió la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ como un marcador citosólico (IDH-NADP⁺); ver tabla 4. Al no tener disponible un marcador específico para la fracción membranal se decidió medir esta misma enzima en esta fracción como un control de “contaminación cruzada” de citosol en la fracción membranal.

Tabla 4. Medición de actividad de IDH-NADP⁺ como indicador de contaminación cruzada entre las fracciones subcelulares obtenidas.

Fuente de carbono	IDH - NADP ⁺ (nmol/min*mg)	
	Citosol	Fracción membranal
Acetato	14 ± 4	0.21 ± 0.18
Metanol	6 ± 2*	0.61 ± 0.26
TAG	13 ± 4	0.37 ± 0.21
Acetato + O ₂	7 ± 1*	0.41 ± 0.22

NOTAS: La actividad se midió en amortiguador HKE-Na pH 7.2, 1 mM NADP⁺, 10 mM MgCl₂, 10mM D-L Isocitrato. Los valores presentados son el promedio más la desviación estándar de 3 cultivos independientes en cada condición de cultivo. * p < 0.01 tomando en cuenta a las células cultivadas en acetato como control.

La actividad de IDH -NADP⁺ se encontró en todas las muestras citosólicas utilizadas. Los valores de actividad fueron similares en las condiciones de cultivo en acetato y TAG, con un valor significativamente menor en las células en metanol. La diferencia

en los valores de actividad de este marcador con respecto a la fuente de carbono sugiere que existe una regulación diferente de las enzimas involucradas en el metabolismo central de acuerdo a la disponibilidad de distintas fuentes de carbono. Este fenómeno podría ocurrir también para enzimas como las aldehído deshidrogenasas, si es que se expresan en *M. acetivorans*.

Con respecto a los valores de actividad encontrados en fracciones membranales éstos no fueron significativamente diferentes en ningún tratamiento y son atribuidos a contaminación por la fracción citosólica. Mientras que un marcador específico para la fracción membranal es necesario para tener mayor certidumbre, se puede concluir que se están obteniendo las fracciones sub-celulares de manera adecuada.

Por otra parte, se demostró que en *M. acetivorans* existe actividad de aldehído deshidrogenasa en ambas fracciones sub-celulares y nuevamente hubo diferencias dependiendo de la fuente de carbono disponible; Fig. 13. Este resultado indica que en *M. acetivorans* existe una expresión de ALDHs dependiente de las condiciones de cultivo.

Benzaldehído y el glicolaldehído son los únicos sustratos con los que se pudo apreciar actividad en ambas fracciones celulares, tanto citosólica como membranal, independiente de la fuente de carbono utilizada. No obstante, el valor de actividad máxima si difiere con respecto a la fuente de carbono. En este aspecto el valor de actividad encontrado al utilizar benzaldehído con fracción citosólica de las células cultivadas en presencia de TAG es significativamente mayor al compararla con la de células cultivadas con acetato y metanol; en cuanto a la fracción membranal se encontraron diferencias significativas al utilizar benzaldehído como sustrato en la condición con TAG con respecto al control en acetato, sin significancia en la condición con metanol. Esto en la fracción citosólica podría ser indicio de que la misma enzima es responsable de la actividad con benzaldehído y que ésta se expresa de manera basal en todas las condiciones.

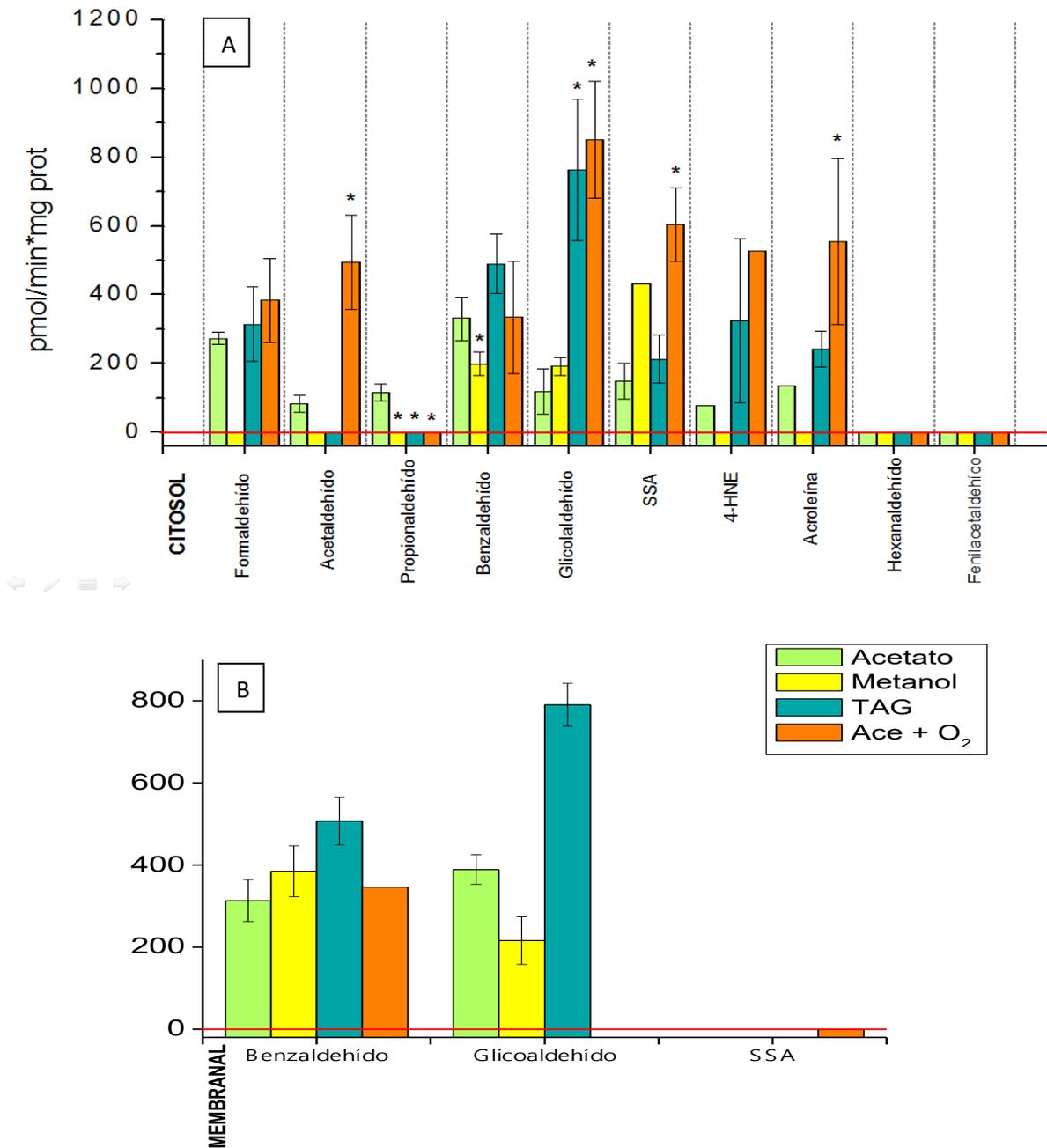


Figura 13. Perfil de actividad de aldehído deshidrogenasa en diferentes fuentes de C y en condición de estrés por O₂ en fracciones sub-celulares. Células en 100 mM acetato (barra verde), en 25 mM TAG más 30 mM acetato (barra azul), en 150 mM metanol (barra amarilla) y en condición de estrés con un pulso de 5% O₂ (v/v) en 100 mM acetato (barra naranja). A) Actividad en fracción citosólica. B) Actividad en fracción membranal. Condiciones de ensayos: Amortiguador HKE-Na pH 7.2, 37°C, 3mM NAD⁺, 100 μM Pirazol. Condiciones saturantes para todos los sustratos. Sin adición de iones. Células se encontraban en fase exponencial.

Por su parte, la actividad con glicolaldehído siguió el mismo patrón en la fracción citosólica siendo mayor en las células en TAG comparadas con el resto de los tratamientos, aunque a diferencia de la actividad con benzaldehído, la actividad con glicolaldehído no fue diferente entre las células en metanol y las células con acetato. En cuanto a la actividad en la fracción membranal si hubo diferencias con este sustrato por lo que se infiere la expresión de enzimas diferentes en la membrana que podrían poseer características distintas en cuanto a su afinidad por el sustrato.

Cabe destacar que el cultivo con la fuente de carbono que presentó actividad con un mayor número de aldehídos fue el de la condición de acetato en la fracción citosólica. La actividad con acetaldehído y propionaldehído se presenta exclusivamente en esta fracción de las células cultivadas con acetato.

Con aldehídos más complejos o de cadena más larga como el fenilacetaldehído o el hexanaldehído no se presentó actividad en ningún tratamiento por lo que a reserva de obtener actividad en fuentes como metanol o TAG se puede hablar de que las ALDHs expresadas en *M. acetivorans* tienen preferencia por aldehídos de cadena corta.

Las actividades hasta ahora presentadas no involucraban a aldehídos que fueran un producto directo de peroxidación lipídica por lo que se decidió hacer ensayos con acroleína y 4-HNE como sustratos, para determinar si las ALDHs que expresa *M. acetivorans* también pudieran tener un papel en la desintoxicación de aldehídos producidos por LPO. Se comprobó que existe actividad con ambos sustratos en la fracción citosólica de células cultivadas en acetato, lo cual es un indicio clave del papel de estas enzimas en la protección a estrés oxidativo propio del metabolismo. Con este resultado, se puede concluir que *M. acetivorans* posee enzimas ALDHs inducibles ante un evento de estrés oxidativo por O₂.

Con base en la anotación de succinato-semialdehído deshidrogenasa (SSADH) dada en algunos de los genes que se proponen como responsables de la actividad de ALDHs se probó la actividad con succinato-semialdehído (SSA) como sustrato presentando actividad en la fracción citosólica y no en la membranal de células en

acetato. Esto coincide con la localización sub-celular dada para esta enzima relacionada al ciclo de Krebs.

Por último, se probó la actividad sobre estos aldehídos en células en acetato más la presencia de O₂ como agente estresor externo al metabolismo y se encontró que la mayoría de estas enzimas incrementaron su actividad en la fracción citosólica. Cabe destacar la actividad con acroleína y 4-HNE ya que de conservarse estos valores en los siguientes ensayos indicarían que estas enzimas se expresan más en condiciones de estrés y, por lo tanto, que podrían estar más involucradas en la protección a estrés oxidativo. La actividad con SSA también resulta relevante ya que ésta fue significativamente mayor en células en condiciones de estrés comparadas con su control en acetato. El papel del ciclo de Krebs en metanogénicos pertenecientes al orden de los Methanosarcinales no ha sido dilucidado, sin embargo, de llevarse a cabo esta reacción fisiológicamente podría sugerirse que existe un aporte de equivalentes reductores en una condición de estrés oxidativo inducida por un agente externo. Se ha sugerido que estos organismos llevan a cabo la generación de 2-oxoglutarato a través de un ciclo de Krebs parcialmente oxidativo, pero esto no se ha comprobado experimentalmente para esta clasificación de metanogénicos (Anderson *et al.*, 2009).

El formaldehído resulta tóxico y es producido endógenamente como resultado del catabolismo de la metionina, metanol y glioxalato, o proveniente de la desmetilación del ADN o ARN (Grafstrom *et al.*, 1983). En relación a la actividad con formaldehído, otro aldehído altamente reactivo, no se encontró diferencia en el cultivo en acetato con respecto a su homólogo en condiciones de estrés. Queda pendiente comprobar si hay diferencias en fuentes de carbono como metanol o TAG para la actividad con este aldehído como sustrato.

Finalmente, solo se observó actividad con NAD⁺ como coenzima por las diferentes aldehído deshidrogenasas encontradas en *M. acetivorans*. Así mismo, el uso de agentes reductores para poder detectar la actividad fue clave ya que en su ausencia en las condiciones de aerobiosis en las que se realizaron los ensayos la actividad se veía disminuida. Lo anterior, sugiere que estas enzimas poseen un sitio catalítico susceptible de oxidación.

Debido a que los valores de actividad en condiciones saturantes de sustratos son diferentes de acuerdo a cada condición de cultivo, las diferencias en términos de actividad podrían ser atribuibles a la expresión de varias enzimas, lo que sugiere que podría haber varios genes involucrados en la síntesis de estas enzimas. Sin embargo, esta aseveración no considera la posible participación de uno o más mecanismos de regulación de la expresión. Por lo anterior, resulta importante la exploración del genoma de este microorganismo a través de técnicas moleculares y de bioinformática más especializadas.

9.5 Diferencias en la regulación transcripcional de los posibles genes involucrados en la actividad de ALDHs

La determinación de los niveles de transcritos para genes anotados como posibles ALDHs no pudo ser llevada a cabo debido a la actual pandemia por COVID-19, sin embargo, la regulación transcripcional podría ser un mecanismo en el cual se podrían encontrar diferencias significativas en las condiciones de estrés oxidativo evaluadas; en las diferentes fuentes de carbono suministradas y en la exposición a O₂, debido a las diferencias encontradas en la actividad de ALDHs; Fig. 13.

En cuanto a las posibles diferencias con respecto a la fuente de carbono suministrada, se ha reportado que genes involucrados alrededor de las reacciones propias del metabolismo en *M. acetivorans* son expresados diferencialmente entre los sustratos que son consumidos como fuente de carbono, sugiriendo la existencia de fenotipos metabólicamente diferentes en una extensión que sobrepasa al proceso de la metanogénesis, entre la cual se puede encontrar la expresión de ALDHs. En este sentido, la regulación de acuerdo al consumo de acetato, una fuente de consumo lento, es diferente con respecto a la regulación dada ante una fuente de carbono de consumo rápido como lo es el metanol (Peterson *et al.*, 2016). En particular en *M. acetivorans* se ha reportado que la relación de expresión de genes relacionados con proteínas de protección a estrés son mayores en células en acetato, comparadas con las células en metanol, esto bajo la premisa de que de manera general el crecimiento en acetato conlleva un escenario de estrés oxidativo más severo (Li *et al.*, 2007).

Con respecto a la expresión de enzimas ALDHs en condiciones de estrés oxidativo inducido por agentes externos, se ha reportado que enzimas como la CAT o SOD son inducibles ante la presencia del O₂ como agente estresor en *M. acetivorans*, contribuyendo así a la contención y disminución del estrés oxidativo generado por O₂ (Jasso-Chávez *et al.*, 2015). Este mismo escenario pudiera cumplirse para las ALDHs que se expresan cuando las células son expuestas a un reto por O₂. El mecanismo de regulación de las enzimas antioxidantes cuya inducción se da ante condiciones de estrés oxidativo por ROS no ha sido descrito para la mayoría de los metanogénicos, sin embargo, se sabe que muchas células utilizan la formación de disulfuros en proteínas para monitorear el estado redox celular y la presencia de ROS tóxicos (Sheehan *et al.*, 2015).

9.6 Análisis filogenético de un gen codificante para una posible ALDH en *M. acetivorans*

La obtención del árbol filogenético de secuencias con alta similitud a la secuencia de aa del gen MA_4079, Fig. 14, permitió que se llevara a cabo un análisis de la proporción de organismos por dominio para este gen. De esta forma, se observa una mayor presencia del dominio Archaea en la secuencia del gen MA_4079, tanto en proporción comparado con los dominios Bacteria y Eukarya, como en el porcentaje de identidad que comparten estas secuencias, estableciendo un valor > 90 % para el dominio *Archaea*. En particular hay una mayor presencia del filo Euryarchaeota lo cual nos sugiere que es un gen conservado dentro del filo. Así mismo hay un mayor porcentaje de identidad entre los géneros de *Methanosarcina* y *Methanoculleus* para este gen (MA_4079). En cuanto a las secuencias encontradas dentro del dominio Bacteria se encuentran principalmente en los filos Firmicutes y Proteobacteria, siendo los de mayor abundancia los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia*. Por último, el dominio Eukarya fue representado en su mayoría por organismos pertenecientes a la clase Mammalia dentro de la cual destaca la presencia de la especie *Homo sapiens* con un valor de identidad aproximado de 40 %.

Al analizar a los organismos pertenecientes a estos géneros se encontró que muchos son considerados extremófilos o anaerobios estrictos, reportes de la

caracterización de estas enzimas no se encuentran disponibles por lo cual el análisis de los mismos con respecto a nuestro organismo modelo se encuentra limitado.

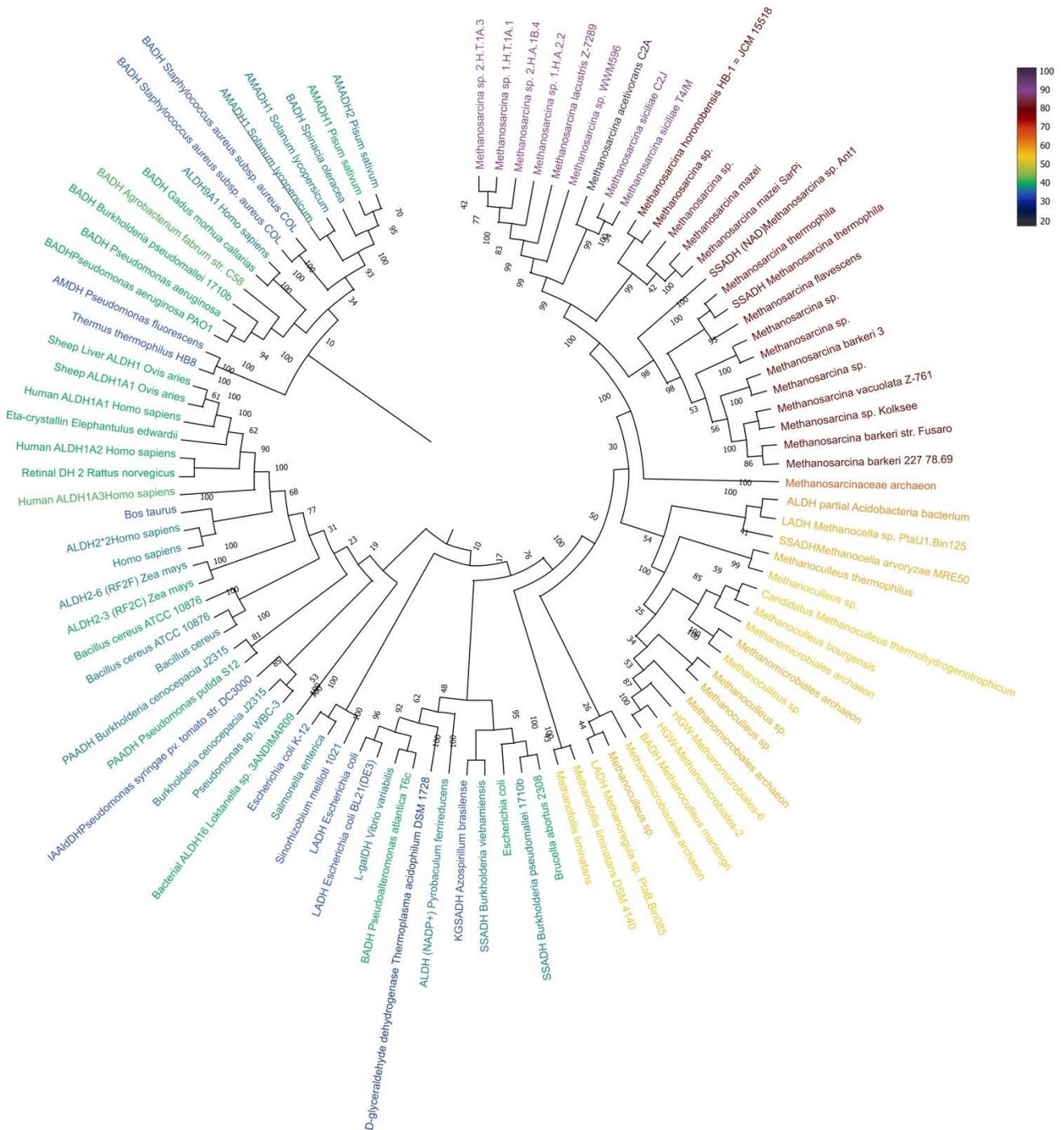


Figura 14. Árbol de distancias evolutivas de secuencias de aminoácidos que codifican para un producto similar al gen MA_4079 de *M. acetivorans*.

10. DISCUSIÓN

10.1 Producción de ROS y su relación con el daño oxidativo en diferentes fuentes de carbono

En general, cuando las células crecen en ambientes oxigenados, el O_2 abstrae ventajosamente e^- de flavinas reducidas o de centros metálicos de algunas enzimas redox y por ende genera $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (Korshunov & Imlay, 2010; Lu & Imlay, 2017). Este patrón se repite en episodios de oxigenación en ambientes y en microorganismos anaerobios, aunque en este último escenario el origen de los ROS generados no ha sido dilucidado tan claramente como en microorganismos aerobios (Lu & Imlay, 2021).

Un acercamiento importante en este aspecto se ha dado en el estudio del efecto de la exposición a O_2 en *E. coli*, un microorganismo aerobio facultativo y *B. thetaiotaomicron*, un microorganismo anaerobio con cierta tolerancia a la exposición a O_2 . Lu *et al.* (2018) reportaron que, al llevar a cabo el intercambio de condiciones en ambas especies, las enzimas que son sensibles a $O_2^{\cdot-}$ permanecen activas en *E. coli*, pero éstas pierden rápidamente su actividad en *B. thetaiotaomicron*. Este resultado lleva al reconocimiento de que los ROS son generados en un mayor nivel en este microorganismo anaerobio, y sugieren que el metabolismo intrínseco de microorganismos anaerobios podría seguir un comportamiento similar.

Siguiendo esta premisa y tomando en consideración que se ha reportado que en *M. acetivorans* se generan niveles diferenciales de estrés oxidativo de acuerdo a la fuente de carbono disponible (Li *et al.*, 2007), tiene sentido pensar que de acuerdo a la vía metanogénica que siga la célula esta pueda enfrentarse a un mayor o menor grado de ROS, de acuerdo a las reacciones enzimáticas que se lleven a cabo en cada vía.

Jasso-Chávez y colaboradores (2015) crecieron a *M. acetivorans* bajo condiciones similares a las que se realizaron en este trabajo y confirmaron la formación de ROS en nuestro modelo de estudio por la generación de MDA. En este trabajo también hemos encontrado que se producen ROS en *M. acetivorans* aunque en valores que son menores a los reportados. Las diferencias encontradas con respecto a los

valores obtenidos en nuestro estudio se atribuyen a que las células utilizadas en este trabajo se encontraban en su fase exponencial en contraste con la fase estacionaria utilizada en el trabajo realizado por Jasso-Chávez *et al.* (2015), siendo más activas metabólicamente y por ende siendo más propensas a la generación de ROS. Además, la técnica utilizada en el presente es también específica para 4-HA y no solo para la formación de MDA. En ambos trabajos se ha corroborado que los niveles de ROS en las células cultivadas en acetato y en metanol presentan niveles diferentes de ROS. Lo que lleva a preguntarse cuáles son las reacciones enzimáticas que los vuelven más propensos a aumentar los niveles de ROS en este metanogénico.

Una posible vía de generación de ROS es la utilización de ferredoxinas en ambas vías metanogénicas; la acetoclástica y la metilotrófica. Se ha reportado que los potenciales de reducción de las ferredoxinas varían en el rango de -350 a -455 mV, los cuales hacen favorable la transferencia de e^- hacia el O_2 (-160 mV) (Meyer, 2001). Esto ha sido reportado en ferredoxinas de *Clostridium pasteurianum*, donde el O_2 oxida a estas proteínas acarreadoras de e^- generando $O_2^{\cdot-}$ (Misra & Fridovich, 1971). Otras posibles fuentes de generación de ROS en el metabolismo de este metanogénico podrían ser la $F_{420}H_2$ oxidasa, flavodoxinas o las proteínas con contenido de grupos Fe-S (Cruz & Ferry, 2006).

Es importante resaltar que la velocidad de generación de ROS siguió la siguiente relación de acuerdo a la fuente de carbono suministrada: ACE > TAG > MetOH. Sin embargo, los niveles de daño oxidativo siguieron la relación inversa: MetOH > ACE > TAG. Se ha reportado que la vía acetoclástica de la metanogénesis comprende más reacciones enzimáticas en las que la ferredoxina está involucrada, por lo que es razonable la obtención de una mayor cantidad de ROS en estas células (Prakash *et al.*, 2019). Ahora, con respecto a un mayor nivel de daño en células en MetOH a pesar de que haya una menor generación de ROS, ésta podría ser atribuible a una menor eficiencia en cuanto a la detoxificación de ROS. Ya que estudios han revelado que en bacterias y eucariontes, la expresión de enzimas antioxidantes presenta una regulación que resulta crucial ante eventos de estrés oxidativo, como la exposición a H_2O_2 (Nunoshiba *et al.*, 1991), otro factor importante a considerar

podría ser la regulación de los sistemas antioxidantes propios de *M. acetivorans* de acuerdo a la fuente de carbono disponible. Con base en los resultados obtenidos es posible discernir que no solo está involucrada la generación de niveles diferenciales de ROS sino que también éstos se combaten de manera más eficiente en una fuente de carbono comparada con otra, ya que los niveles de daño oxidativo también son variables de acuerdo a la fuente de carbono suministrada. En este aspecto, se ha reportado que *M. acetivorans* es capaz de expresar enzimas antioxidantes de manera diferencial, de acuerdo a la fuente de carbono suministrada (Jasso-Chávez *et al.*, 2015), por lo que de acuerdo a la misma las células pudieran encontrarse mejor protegidas por sistemas antioxidantes más eficientes ante eventos de estrés oxidativo, entre los cuales la acción de ALDHs podría ser relevante para contrarrestar el daño oxidativo.

Con lo anterior, resulta evidente que averiguar cuál es la fuente primaria de ROS en microorganismos anaerobios y en particular en metanogénicos es de suma importancia, ya que este sigue siendo un campo de estudio poco explorado y abierto a investigación. La identidad de esta fuente podría arrojar luz sobre la posibilidad de que el daño enzimático mediado por ROS producidos endógenamente, sea un fenómeno común cuando los microorganismos anaerobios se encuentran en presencia de O₂ (Lu & Imlay, 2021).

10.2 Actividad de ALDHs y su posible repercusión en el metabolismo de *M. acetivorans*

Como ya se mencionó anteriormente muchas ALDHs han sido caracterizadas extensivamente en Eukarya y Bacteria, pero en el dominio Arquea los reportes son escasos. En estos organismos a la fecha se cuenta con reportes detallados relacionados a las enzimas gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenas (GAPNs) involucradas en la vía glucolítica semi fosforilativa Entner-Doudoroff en Euryarchaeota, una acetaldehído deshidrogenasa involucrada en el metabolismo del etanol en una arquea haloalcalinofílica *Natronomonas pharaonis*, y una ALDH termoestable en *Sulfolobus tokodaii* y parálogos de ALDH en *Sulfolobus solfataricus* (Reher & Schönheit, 2006, Cao *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013; Esser *et al.*, 2013). Por lo anterior, el presente es el primer estudio de ALDHs en metanogénicos.

Con respecto a las características en común con ALDHs en otros dominios, muchas de las isoenzimas de ALDHs se puedan sobrelapar en relación con la especificidad del substrato que son capaces de utilizar, además de la localización sub-celular de las mismas, pero varían en su eficiencia para metabolizar aldehídos específicos (Marchitti *et al.*, 2008; Sladek, 2003). De acuerdo a los resultados obtenidos en particular con benzaldehído y glicolaldehído, pareciera que varias enzimas citosólicas son afines a estos, sin embargo, en un mayor o menor grado de acuerdo a las condiciones de cultivo.

Por otro lado, la o las enzimas expresadas en la fracción citosólica de células en acetato presentan similitud con respecto al reporte de una ALDH en la especie *S. todokaii* (Liu *et al.*, 2013). Esta última enzima reportada posee su máxima actividad con acetaldehído y actividades considerables con otros aldehídos alifáticos de cadena corta como el propionaldehído, así como con aldehídos aromáticos como el benzaldehído. A su vez, también presenta actividad con glicolaldehído y formaldehído. En *M. acetivorans* hay actividad exclusivamente con la coenzima NAD⁺ y no con fenilacetaldehído, pero sí con acetaldehído, propionaldehído, benzaldehído, glicolaldehído, SSA, 4-HNE y acroleína.

Un aspecto inexplorado en nuestro estudio de ALDHs en *M. acetivorans* es el efecto de iones metálicos sobre la actividad observada. En *S. todokaii* el uso de iones divalentes no tuvo efecto, sin embargo, los iones monovalentes incrementaron la actividad de 20-30 % (Liu *et al.*, 2013). Esto puede ser atribuido a la contribución de estos iones al mantenimiento de la estabilidad de la estructura cuaternaria o por la interacción estérica entre iones metálicos y aminoácidos clave involucrados en la catálisis (Ho & Weiner, 2005). Esta representa una posibilidad pendiente de comprobar para *M. acetivorans*.

Por su parte, en la especie *S. solfataricus* se ha reportado la presencia de dos isoenzimas para la SSADH, una específica por NAD⁺ y otra que exhibe actividad con NAD(P)⁺ (Esser *et al.*, 2013). Ambas enzimas son inhibidas por una elevada concentración tanto de SSA como de NAD(P)⁺. Por lo anterior, sería importante evaluar si ese mismo escenario ocurre para las enzimas en *M. acetivorans* ya que en todos los ensayos realizados se utilizaron concentraciones altas de ambos

componentes y este representa un fenómeno que ocurre en eucariontes y bacterias indistintamente (Rothacker & Ilg, 2008; Sánchez *et al.*, 1988). El análisis filogenético de estas enzimas muestra pertenencia a un grupo de ALDHs conservado en Crenarchaeota con una evolución convergente hacia las SSADHs de *E. coli*. Sin embargo, interesantemente en un segundo grupo encontrado en este análisis se observaron homólogos de esta enzima funcional de *E. coli* en arqueas principalmente metanogénicas, bajo este análisis se sugiere que las SSADHs conforma una nueva familia de ALDHs (Esser *et al.*, 2013).

Un aspecto a resaltar en la cuantificación de la actividad de ALDHs en *M. acetivorans* es la utilización de un agente reductor como el DTT para obtener una mayor actividad, de lo anterior se infiere que podría existir un grupo tiol esencial en el sitio activo de algunas de las enzimas expresadas y así mismo, que algunas de ellas poseen una susceptibilidad diferente a la inactivación oxidativa (Muñoz-Clares *et al.*, 2010; Yoval-Sánchez *et al.*, 2012). Cabe resaltar que a pesar de esto, las enzimas expresadas presentan resistencia al O₂ ya que la cuantificación de la actividad fue llevada a cabo en aerobiosis sin que estas fueran inactivadas.

La habilidad de las células para metabolizar y desintoxicarse del contenido de aldehídos tóxicos depende de la naturaleza del aldehído y de los niveles de enzimas capaces de metabolizarlos. Al respecto, se ha reportado la colaboración entre varias enzimas además de las ALDHs para lograr un metabolismo más rápido de estos aldehídos tóxicos, lo que resulta en otro aspecto pendiente a explorar en Archaea (O'Brien *et al.*, 2005). En eucariontes se ha reportado que el catabolismo más eficiente de 4-HNE fue logrado gracias a la acción conjunta de una enzima glutatión-S-transferasa (GST), una ALDH2 y una alcohol deshidrogenasa (ADH); es decir la acción conjunta de enzimas (Hartley *et al.*, 1995). Un factor importante a considerar en este escenario es el uso de la reserva de glutatión en eucariontes para conseguir este beneficio. Los metanogénicos carecen de glutatión por lo que de llevarse a cabo algo similar en *M. acetivorans* lo más probable es que recaería sobre el contenido de tioredoxinas, las cuales son proteínas pequeñas que poseen un motivo CXXC en el sitio activo necesario para la actividad de disulfuro oxidoreductasa que le confiere su capacidad antioxidante (Fahey 2001; McFarlan *et al.*, 1992).

Por último, no se sabe cuál es el estado de oligomerización que pudieran tener estas enzimas. Anteriormente se pensaba que el análisis del C-terminal era un factor que podría estar involucrado en el estado de oligomerización de estas enzimas (Hurley *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha demostrado que la oligomerización no se encuentra mediada por la presencia del C-terminal (Rodríguez-Zavala & Weiner, 2002).

10.3 NAD⁺ como aceptor de electrones en *M. acetivorans*

La molécula de NAD⁺ ha sido catalogada como un acarreador redox esencial no solo en procesos metabólicos sino también en eventos de generación de ROS por su papel en reacciones redox (Xie *et al.*, 2020). En *M. acetivorans*, las actividades de ALDHs encontradas son activas al utilizar NAD⁺ como aceptor de e⁻ independiente de la fuente de carbono utilizada, por lo que esta molécula también resulta importante en respuesta a estrés oxidativo en este organismo.

El hecho de que las ALDHs expresadas en *M. acetivorans* sean dependientes de NAD⁺ podría significar una adaptación conveniente, ya que mientras la reserva de NAD⁺ estaría siendo aprovechada por las ALDHs en episodios de estrés oxidativo, otras enzimas antioxidantes podrían estar utilizando tanto la reserva de NADPH como la reserva de NADH, y de esta forma complementar un sistema de defensa antioxidante más eficiente en el metanogénico. Cabe mencionar que se ha reportado que *M. acetivorans* es capaz de utilizar NADH como donador de e⁻ para enzimas peroxidasas, además de otros donadores como el citocromo c reducido, la CoM-SH y ascorbato (Jasso-Chávez *et al.*, 2015). De esta forma, la exploración de aceptores de electrones diferentes al NAD⁺ para la actividad de ALDHs queda pendiente.

Otra molécula clave en la mitigación del estrés oxidativo es el NADPH ya que muchas enzimas antioxidantes como la CAT, SOD y glutatión peroxidasa (GPx) lo utilizan como coenzima y, consecuentemente, dependen de la reserva celular del mismo para su actividad (Singh *et al.*, 2007). Debido a que en *M. acetivorans* no se encontró actividad de ALDHs utilizando al NADP⁺ como aceptor de e⁻, no se les puede considerar como una de las fuentes de suministro de NADPH intracelular para procesos antioxidantes.

Se ha reportado que la mayoría de las familias de ALDHs son específicas ya sea para NAD⁺ o para NADP⁺, con algunas otras familias aún pendientes por caracterizarse. Sin embargo, en este sentido la única familia de ALDHs con la habilidad para usar indistintamente NAD⁺ o NADP⁺ es la clase 3 (Perozich *et al.*, 2001). Con los resultados obtenidos y a reserva del análisis de las secuencias de los genes en *M. acetivorans*, podría descartarse que exista un parentesco con las enzimas de esta clase en este metanogénico.

La preferencia por determinadas coenzimas es una característica variable dentro de muchas familias de ALDHs, consistente con la dependencia principal de un solo residuo en el sitio catalítico que aparentemente no tiene otros roles estructurales o funcionales y, por lo tanto, puede cambiar fácilmente a través de la evolución y seleccionarse en respuesta a necesidades fisiológicas (González-Segura *et al.*, 2015). No obstante, en *M. acetivorans*, el o los residuos responsables de la catálisis no permiten el aprovechamiento de otra coenzima disponible como el NADP⁺ en respuesta a necesidades fisiológicas que pudieran presentarse en episodios de estrés oxidativo por agentes externos o por el estrés derivado de la variación de una fuente de carbono a otra. En este sentido, un residuo de glicina en el sitio catalítico de las ALDHs ha sido asociado a la dependencia a NAD⁺, mientras que para la dependencia de NADP⁺ se trata generalmente de un residuo de alanina (Perozich *et al.*, 2001; Hempel *et al.*, 1993). El análisis en las secuencias de los sitios catalíticos de los posibles genes responsables de la actividad de ALDHs, podrían indicar la existencia de un residuo de glicina importante para la catálisis en *M. acetivorans* de mantenerse conservado evolutivamente.

Por último, se ha reportado que en diferentes etapas de crecimiento en el cultivo de *M. acetivorans* en metanol las concentraciones de NAD⁺ no varían en fase exponencial y estacionaria (Santiago-Martínez *et al.*, 2016), por lo que podría descartarse que de acuerdo a la etapa de crecimiento exista una mayor o menor actividad tomando a la concentración de NAD⁺ como un factor limitante en esta fuente de carbono. Cabe mencionar que las concentraciones de NAD⁺ en ambas etapas son muy bajas por lo que la afinidad de las enzimas por este cofactor debería ser muy grande para que la célula pueda estar utilizando activamente a este

metabolito intermediario para la catálisis. Con lo anterior, es necesario llevar a cabo la determinación de la concentración de estos metabolitos en las fuentes de carbono restantes, para determinar si esto pudiera ser una limitante en la actividad de ALDHs *in vivo*.

11. CONCLUSIONES

Methanosarcina acetivorans expresa un perfil de actividad de aldehído deshidrogenasa de manera constitutiva contra varios sustratos como parte de su metabolismo intermediario, sugerente de la presencia de varias isoformas. El nivel de expresión o actividad de la enzima depende de la fuente de carbono que se encuentre disponible. Así mismo, la exposición de *M. acetivorans* a un pulso de oxígeno induce el incremento en la expresión de ALDHs en respuesta al estrés oxidante generado, tal vez como respuesta a la mayor producción de ROS y daño oxidativo.

12. PERSPECTIVAS

La realización de este trabajo permitió ampliar el panorama con respecto a la expresión de enzimas que contribuyen a la protección celular contra daño oxidativo en organismos metanogénicos. Con los resultados obtenidos queda pendiente por dilucidar cuáles son los aldehídos que se generan específicamente como producto de un proceso metabólico como la metanogénesis, ya que de esta forma se podrían hacer ensayos enzimáticos específicos para éstos, que nos permitieran tener un mejor panorama del papel metabólico de las ALDHs en metanogénicos y en Arquea como dominio. Así mismo, la futura determinación del nivel de transcritos de los genes que codifican para las posibles ALDHs encontradas en *Methanosarcina acetivorans*, nos podrán dar un primer indicio para determinar si las diferencias en las actividades enzimáticas encontradas, son atribuibles a una regulación diferencial de su expresión de acuerdo a las condiciones de estrés en el que se encuentren las células, ya sea como parte del metabolismo o en respuesta a un agente externo. Una vez obtenidos estos resultados se podría considerar el aislamiento de los genes y la sobreexpresión de las proteínas involucradas, para obtener una caracterización

enzimática mucho más completa. Muchas enzimas aisladas de este tipo de organismos poseen propiedades enzimáticas destacadas que conllevan a su aplicación en procesos y estrategias, que involucran la ingeniería de vías metabólicas para la obtención de cepas más resistentes a procesos de estrés. De ser el caso, esto podría representar un escenario con potencial para su aplicación en procesos alternativos de obtención de recursos energéticos a futuro. En este sentido, la complementación de cepas mutantes con ausencia de estos genes podría decirnos qué tanto están involucradas estas enzimas en la susceptibilidad de las células a la presencia de múltiples tipos de estrés.

13. REFERENCIAS

Adam, P.S., Borrel, G., Brochier-Armanet, C. & Gribaldo, S. (2017). The growing tree of Archaea: new perspectives on their diversity, evolution and ecology. *ISME J.* 11, 2407–2425. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.122>.

Anderson, I., Ulrich, L.E., Lupa, B., Susanti, D., Porat, I., Hooper, S.D., Lykidis, A., Sieprawska-Lupa, M., Dharmarajan, L., Goltsman, E., Lapidus, A., Saunders, E., Han, C., Land, M., Lucas, S., Mukhopadhyay, B., Whitman, W.B., Woese, C., Bristow, J., Kyrpides, N. (2009). Genomic characterization of Methanomicrobiales reveals three classes of methanogens. *PLoS ONE* 4, e5797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005797>.

Aranda, A. & del Olmo, M.M. (2003). Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast* 20, 747–759. <https://doi.org/10.1002/yea.991>.

Baker, B.J., De Anda, V., Seitz, K.W., Dombrowski, N., Santoro, A.E., & Lloyd, K.G. (2020). Diversity, ecology and evolution of Archaea. *Nat. Microbiol.* 5, 887–900. <http://doi.org/10.1038/s41564-020-0715-z>.

Belmont-Díaz, J.A., Yoval-Sánchez, B., Calleja-Castañeda, L.F., Pardo Vázquez, J.P. & Rodríguez-Zavala, J.S. (2016). Alda-1 modulates the kinetic properties of mitochondrial

aldehyde dehydrogenase (ALDH2). *FEBS J.* 283, 3637-3650.
<https://doi.org/10.1111/febs.13833>.

Benzie, I.F.F. (2000). Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur. J. Nutr.* 39, 53–61. <https://doi.org/10.1007/s003940070030>.

Bielski, B.H.J., Arudi, R.L. & Sutherland, M.W. (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 258, 4759–4761.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)32488-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)32488-8).

Boyd, E.S., Thomas, K.M., Dai, Y., Boyd, J.M. & Outten, F.W. (2014). Interplay between oxygen and Fe-S cluster biogenesis: insights from the Suf pathway. *Biochemistry* 53, 5834-5847. <https://doi.org/10.1021/bi500488r>.

Brioukhanov, A.L., Thauer, R.K. & Netrusov, A.I. (2002). Catalase and superoxide dismutase in the cells of strictly anaerobic microorganisms. *Microbiology* 71, 281–285.
<https://doi.org/10.1023/A:1015846409735>.

Buan, N.R. (2018). Methanogens: pushing the boundaries of biology. *Emerg. Top Life Sci.* 2, 629–646. <https://doi.org/10.1042/ETLS20180031>.

Buan, N.R. & Metcalf, W.W. (2010). Methanogenesis by *Methanosarcina acetivorans* involves two structurally and functionally distinct classes of heterodisulfide reductase. *Mol. Microbiol.* 75, 843–853. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06990.x>.

Cabiscol, E., Tamarit, J. & Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 3, 3–8.
<https://doi.org/10.2436/IM.V3I1.9235>.

Cao, Y., Liao, L., Xu, X.W., Oren, A. & Wu, M. (2008). Aldehyde dehydrogenase of the haloalkaliphilic archaeon *Natronomonas pharaonis* and its function in ethanol metabolism. *Extremophiles* 12, 849–854. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0187-1>.

Cruz, F. & Ferry, J.G. (2006). Interaction of iron-sulfur flavoprotein with oxygen and hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 858–864.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.02.016>.

de Macario, E.C. & Macario, A.J.L. (2003). Molecular biology of stress genes in methanogens: Potential for bioreactor technology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 81, 95-150. https://doi.org/10.1007/3-540-45839-5_4.

de Macario, E.C. & Macario, A.J.L. (2009). Methanogenic archaea in health and disease: a novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.06.011>.

Deppenmeier, U. (2002). The unique biochemistry of methanogenesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 71, 223-283. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(02\)71045-3](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(02)71045-3).

Dlugokencky, E.J., Nisbet, E.G., Fisher, R. & Lowry, D. (2011). Global atmospheric methane: budget, changes and dangers. *Phil. Trans. R. Soc. A.* 369, 2058–2072. <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0341>.

Eme, L., & Doolittle, W.F. (2015). Archaea. *Curr. Biol.* 25, R851–R855. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.025>.

Ermler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M. & Thauer, R.K. (1997). Crystal structure of methyl coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. *Science* 278, 1457–1462. <https://doi.org/10.1126/science.278.5342.1457>.

Esser, D., Kouril, T., Talfournier, F., Polkowska, J., Schrader, T., Bräsen, C., & Siebers, B. (2013). Unraveling the function of paralogs of the aldehyde dehydrogenase super family from *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* 17, 205–216. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0507-3>.

Estey, T., Cantore, M., Weston, P.A., Carpenter, J.F., Petrash, J.M. & Vasiliou, V. (2007). Mechanisms involved in the protection of UV-induced protein inactivation by the corneal crystallin ALDH3A1. *J. Biol. Chem.* 282, 4382–4392. <https://doi.org/10.1074/jbc.m607546200>.

Fahey, R.C. (2001). Novel thiols of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 333-356. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.333>.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791. <https://doi.org/10.2307/2408678>.

Ferry, J.G. (2015). Acetate metabolism in anaerobes from the Domain Archaea. *Life*, 5, 1454-1471. <https://doi.org/10.3390/life5021454>.

Galagan, J.E., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M.G., Macdonald, P., FitzHugh, W., Calvo, S., Engels, R., Smirnov, S., Atnoor, D., Brown, A., Allen, N., Naylor, J., Stange-

Thomann, N., DeArellano, K., Johnson, R., Linton, L., McEwan, P., McKernan, K., Talamas, J., Tirrell, A., Ye, W., Zimmer, A., Barber, R.D., Cann, I., Graham, D.E., Grahame, D.A., Guss, A.M., Hedderich, R., Ingram-Smith, C., Kuettner, H.C., Krzycki, J.A., Leigh, J.A., Li, W., Liu, J., Mukhopadhyay, B., Reeve, J.N., Smith, K., Springer, T.A., Umayam, L.A., White, O., White, R.H., Conway de Macario, E., Ferry, J.G., Jarrell, K.F., Jing, H., Macario, A.J.L., Paulsen, I., Pritchett, M., Sowers, K.R., Swanson, R.V., Zinder, S.H., Lander, E., Metcalf, W.W. & Birren, B. (2002). The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res.* 12, 532–542. <http://doi.org/10.1101/gr.223902>.

Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.C. & Chaudière, J. (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1176-1183. <https://doi.org/10.1021/tx9701790>.

González-Segura, L., Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A. & Muñoz-Clares, R.A. (2015). Residues that influence coenzyme preference in the aldehyde dehydrogenases. *Chem. Biol. Interact.* 234, 59-74. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.039>.

Gottschalk, G. & Thauer, R.K. (2001). The Na⁺-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea. *Biochim. Biophys. Acta* 1505, 28–36. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(00\)00274-7](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(00)00274-7).

Grafstrom, R.C., Fornace, A.J. Jr., Autrup, H., Lechner, J. F. & Harris, C.C. (1983). Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells. *Science* 220, 216–218. <https://doi.org/10.1126/science.6828890>.

Grochowski, L.L., & White, R.H. (2008). Promiscuous anaerobes: new and unconventional metabolism in methanogenic archaea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 190–214. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.001>.

Halliwel, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 33–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.16.070196.000341>.

Halliwel, B. & Gutteridge, J.M.C. (2015). Free radicals in biology and medicine. 5th Edition, Oxford University Press, New York. <http://dx.doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.

Hamada, M., Toyofuku, M., Miyano, T. & Nomura, N. (2014). cbb3-type cytochrome c oxidases, aerobic respiratory enzymes, impact the anaerobic life of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 196, 3881–3889. <https://doi.org/10.1128/jb.01978-14>.

Hartley, D.P., Ruth, J.A. & Petersen, D.R. (1995). The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase. *Arch. Biochem. Biophys.* 316, 197–205. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1028>.

Hedderich, R. & Whitman, W.B. (2006). Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp.1050-1079. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_81.

Hedderich, R., Hamann, N. & Bennati, M. (2005). Heterodisulfide reductase from methanogenic archaea: a new catalytic role for an iron-sulfur cluster. *Biol. Chem.* 386, 961–970. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.112>.

Hempel, J., Nicholas, H. & Lindahl, R. (1993). Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Sci.* 2, 1890-1900. <https://doi.org/10.1002/pro.5560021111>.

Ho, K.K. & Weiner, H. (2005). Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the aldB gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187,1067–1073. <https://doi.org/10.1128/JB.187.3.1067-1073.2005>.

Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., Butterfield, C.N., Hemsdorf, A.W., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y. Dudek, N., Relman, D.A., Finstad, K.M., Amundson, R., Thomas, B.C. & Banfield, J.F. (2016). A new view of the tree of life. *Nat. Microbiol.* 1, 16048. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>.

Hurley, T.D., Steinmetz, C.G. & Weiner, H. (1999). Three-dimensional structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. Mechanistic implications. *Adv. Exp. Med. Biol.* 463, 15–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4735-8_3.

Imlay, J.A. (2002). How oxygen damages microbes: Oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. *Adv. Microb. Physiol.* 46, 111–153. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(02\)46003-1](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(02)46003-1).

Imlay, J.A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol. Microbiol.* 59, 1073-1082. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05028.x>.

Imlay, J.A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 755–776. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055>.

Imlay, J.A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 443-454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>.

Invitrogen. *Molecular Probes*. Grand Island, NY: 2006. Reactive oxygen species (ROS) Detection reagents; pp. 1–5.

Izawa, S. & Inoue, Y. (2009). Post-transcriptional regulation of gene expression in yeast under ethanol stress. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 53, 93–99. <https://doi.org/10.1042/ba20090036>.

Jackson, B., Brocker, C., Thompson, D.C., Black, W., Vasiliou, K., Nebert, D.W. & Vasiliou, V. (2011). Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics.* 5, 283. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-4-283>.

Jasso-Chávez, R., Apolinario, E.E., Sowers, K.R. & Ferry, J.G. (2013). MrpA functions in energy conversion during acetate-dependent growth of *Methanosarcina acetivorans*. *J. Bacteriol.* 195, 3987-3994. <https://doi.org/10.1128/JB.00581-13>.

Jasso-Chávez, R., Lira-Silva, E., González-Sánchez, K., Larios-Serrato, V., Mendoza-Monzoy, D.L., Pérez-Villatoro, F., Morrett, E., Vega-Segura, A., Torres-Márquez, M.E., Zepeda-Rodríguez, A. & Moreno-Sánchez, R. (2019). Marine archaeon *Methanosarcina acetivorans* enhances polyphosphate metabolism under persistent cadmium stress. *Front. Microbiol.* 10, 2432. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02432>.

Jasso-Chávez, R., Santiago-Martínez, M.G., Lira-Silva, E., Pineda, E., Zepeda-Rodríguez, A., Belmont-Díaz, J., Saavedra, E. & Moreno-Sánchez, R. (2015). Air-adapted *Methanosarcina acetivorans* shows high methane production and develops resistance against oxygen stress. *PLoS ONE* 10, e0117331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117331>.

Johnson, M.S., Zhulin, I.B., Gapuzan, M.E. & Taylor, B.L. (1997). Oxygen-dependent growth of the obligate anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J. Bacteriol.* 179, 5598–5601. <https://doi.org/10.1128/jb.179.17.5598-5601.1997>.

Khademian, M. & Imlay, J.A. (2021). How microbes evolved to tolerate oxygen. *Trends Microbiol.* 5, 428-440. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.10.001>.

Khan, M.T., Duncan, S.H., Stams, A.J.M., van Dijk, J.M., Flint, H.J. & Harmsen, H.J.M. (2012). The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic–anoxic interphases. *ISME J.* 6, 1578–1585. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.5>.

Kirch, H.H., Bartels, D., Wei, Y., Schnable, P.S. & Wood, A.J. (2004). The ALDH gene superfamily of Arabidopsis. *Trends Plant. Sci.* 9, 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.06.004>.

Korshunov, S. & Imlay, J.A. (2010). Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 75, 1389–1401. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07059.x>.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. and Evol.* 35, 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev%2Fmsy096>.

Lassen, N., Bateman, J.B., Estey, T., Kuszak, J.R., Nees, D.W., Piatigorsky, J., Duester, G., Day, B.J., Huang, J., Hines, L.M. & Vasiliou, V. (2007). Multiple and additive functions of ALDH3A1 and ALDH1A1: cataract phenotype and ocular oxidative damage in *Aldh3a1(-/-)/Aldh1a1(-/-)* knock-out mice. *J. Biol. Chem.* 282, 25668–25676. <https://doi.org/10.1074/jbc.m702076200>.

Lassen, N., Pappa, A., Black, W. J., Jester, J. V., Day, B. J., Min, E. & Vasiliou, V. (2006). Antioxidant function of corneal ALDH3A1 in cultured stromal fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 41,1459–1469. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.08.009>.

Lemire, J.A., Harrison, J.J. & Turner, R.J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 371–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>.

Li, L., Li, Q., Rohlin, L., Kim, U., Salmon, K., Rejtar, T., Gunsalus, R.P., Karger, B.L. & Ferry, J.G. (2007). Quantitative proteomic and microarray analysis of the archaeon *Methanosarcina acetivorans* grown with acetate versus methanol. *J. Proteom. Res.* 6, 759–771. <https://doi.org/10.1021%2Fpr060383l>.

Li, Y., Nakazono, M., Tsutsumi, N. & Hirai, A. (2000). Molecular and cellular characterizations of a cDNA clone encoding a novel isozyme of aldehyde dehydrogenase from rice. *Gene* 249, 67–74. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00152-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00152-9).

Lin, W.C., Coppi, M.V. & Lovley, D.R. (2004). *Geobacter sulfurreducens* can grow with oxygen as a terminal electron acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2525–2528. <https://doi.org/10.1128/aem.70.4.2525-2528.2004>.

Lindahl, R. (1992). Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27, 283–335. <https://doi.org/10.3109/10409239209082565>.

Lira-Silva, E., Santiago-Martínez, M.G., Hernández-Juárez, V., García-Contreras, R., Moreno-Sánchez, R. & Jasso-Chávez, R. (2012). Activation of methanogenesis by cadmium in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *PLoS ONE* 7, e48779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048779>.

Liu, T., Hao, L., Wang, R. & Liu, B. (2013). Molecular characterization of a thermostable aldehyde dehydrogenase (ALDH) from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Extremophiles.* 17, 181-190. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0503-7>.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Lu, Z. & Imlay, J.A. (2017). The fumarate reductase of *Bacteroides thetaiotaomicron*, unlike that of *Escherichia coli*, is configured so that it does not generate reactive oxygen species. *mBio.* 8, e01873-16. <https://doi.org/10.1128/mbio.01873-16>.

Lu, Z., & Imlay, J.A. (2021). When anaerobes encounter oxygen: mechanisms of oxygen toxicity, tolerance and defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 774-785. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00583-y>.

Lu, Z., Sethu, R. & Imlay, J.A. (2018). Endogenous superoxide is a key effector of the oxygen sensitivity of a model obligate anaerobe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 115, E3266–E3275. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800120115>.

Marchitti, S.A., Brocker, C., Stagos, D. & Vasiliou, V. (2008). Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4, 697–720. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.6.697>.

McFarlan, S.C., Terrell, C.A. & Hogenkamp, H.P.C. (1992). The purification, characterization, and primary structure of a small redox protein from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, an archaeobacterium. *J. Biol. Chem.* 267, 10561-10569. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50053-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50053-9).

Meyer, J. (2001). Ferredoxins of the third kind. *FEBS Lett.* 509, 1–5. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)03049-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)03049-6).

Misra, H. P. & Fridovich, I. (1971). The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *J. Biol. Chem.* 247, 6960–6962.

Muñoz-Clares, R.A., Díaz-Sánchez, A.G., González-Segura, L. & Montiel, C. (2010). Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: mechanistic and regulatory implications. *Arch. Biochem. Biophys.* 493, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.09.006>.

Nei, M. & Kumar, S. (2000). Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.0923a.x>.

Neubeck, A. & Freund, F. (2020). Sulfur chemistry may have paved the way for evolution of antioxidants. *Astrobiology.* 5, 670-675. <https://doi.org/10.1089%2Ffast.2019.2156>.

Nunoshiba, T., Hashimoto, M. & Nishioka, H. (1991). Cross-adaptive response in *Escherichia coli* caused by pretreatment with H₂O₂ against formaldehyde and other aldehyde compounds. *Mutat. Res.* 255, 265–271. [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(91\)90030-S](https://doi.org/10.1016/0921-8777(91)90030-S).

O'Brien, P.J., Siraki, A.G. & Shangari, N. (2005). Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit. Rev. Toxicol.* 35, 609-662. <https://doi.org/10.1080/10408440591002183>.

Ohta, S. & Ohsawa, I. (2006). Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease: on defects in the cytochrome c oxidase complex and aldehyde detoxification. *J. Alzheimers Dis.* 9, 155–166. <https://doi.org/10.3233/jad-2006-9208>.

Pan, J.S., He, S.Z., Xu, H.Z., Zhan, X.J., Yang, X.N., Xiao, H.M., Shi, H.X. & Ren, J.L. (2008). Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol induced gastric mucosa injury. *World J. Gastroenterol.* 14, 5857–5867. <https://doi.org/10.3748%2Fwjg.14.5857>.

Pappa, A., Chen, C., Koutalos, Y., Townsend, A.J. & Vasiliou, V. (2003). Aldh3a1 protects human corneal epithelial cells from ultraviolet- and 4-hydroxy-2-nonenal induced oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1178–1189. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00070-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00070-4).

Pedone, E., Bartolucci, S. & Fiorentino, G. (2004). Sensing and adapting to environmental stress: the archaeal tactic. *Front. Biosci.* 9, 2909-2926. <https://doi.org/10.2741/1447>.

Peña-Ocaña, B.A., Hoshiko, Y., Silva-Flores, M., Maeda, T., Pérez-Torres, I., García-Contreras, R., Gutiérrez-Sarmiento, W., Hernández-Esquivel, L., Marín-Hernández, Á., Sánchez-Thomas, R., Saavedra, E., Rodríguez-Zavala, J.S. & Jasso-Chávez, R. (2022a). Cultivation of gastrointestinal microbiota in a new growth system revealed dysbiosis and metabolic disruptions in carcinoma-bearing rats. *Front. Microbiol.* 13, 949272. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.949272>.

Peña-Ocaña, B.A., Ovando-Ovando, C.I., Puente-Sánchez, F., Tamames, J., Servín-Garcidueñas, L.E., González-Toril, E., Gutiérrez-Sarmiento, W., Jasso-Chávez, R. & Ruiz-Valdiviezo, V.M. (2022b). Metagenomic and metabolic analyses of poly-extreme microbiome from an active crater volcano lake. *Environ. Res.* 203, 111862. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111862>.

Perozich, J., Kuo, I., Wang, B.C., Boesch, J.S., Lindahl, R. & Hempel, J. (2001). Shifting the NAD/NADP preference in class3 aldehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 267, 6197-6203. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01697.x>.

Peterson, J.R., Thor, S., Kohler, L., Metcalf, W.W. & Schulten., Z.L. (2016). Genome-wide gene expression and RNA half-life measurements allow predictions of regulation and

metabolic behavior in *Methanosarcina acetivorans*. *BMC Genomics* 17, 924. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3219-8>.

Prakash, D., Chauhan, S.S. & Ferry, J.G. (2019). Life on the thermodynamic edge: Respiratory growth of an acetotrophic methanogen. *Sci. Adv.* 5, eaaw9059. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw9059>.

Ramanathan, V., Cicerone, R.J., Singh, H.B. & Kiehl, J.T. (1985). Trace gas trends and their potential role in climate change. *J. Geophys. Res. Atmos.* 90, 5547–5566. <https://doi.org/10.1029/JD090iD03p05547>.

Reher, M. & Schönheit, P. (2006). Glyceraldehyde dehydrogenases from the thermoacidophilic euryarchaeota *Picrophilus torridus* and *Thermoplasma acidophilum*, key enzymes of the non-phosphorylative Entner–Doudoroff pathway, constitute a novel enzyme family within the aldehyde dehydrogenase superfamily. *FEBS Lett.* 580, 1198–1204. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.029>.

Rodríguez-Zavala, J.S., Allali-Hassani, A. & Weiner, H. (2006). Characterization of *E. coli* tetrameric aldehyde dehydrogenases with atypical properties compared to other aldehyde dehydrogenases. *Protein Sci.* 15, 1387–96. <https://doi.org/10.1110/ps.052039606>.

Ronimus, R.S. & Morgan, H.W. (2003). Distribution and phylogenies of enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway from archaea and hyperthermophilic bacteria support a gluconeogenic origin of metabolism. *Archaea* 1, 199–221. <https://doi.org/10.1155/2003/162593>.

Rothacker, B., Werr, M. & Ilg, T. (2008). Succinic semialdehyde dehydrogenase from the parasitic cattle tick *Rhipicephalus microplus*: gene identification, biochemical characterization and comparison with the mouse ortholog. *Mol. Biochem. Parasitol.* 161, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.06.001>.

Rother, M. & Metcalf, W.W. (2004). Anaerobic growth of *Methanosarcina acetivorans* C2A on carbon monoxide: an unusual way of life for a methanogenic archaeon. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16929–16934. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407486101>.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. and Evol.* 4, 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.

Sánchez, M., Álvarez, M.A., Balaña, R. & Garrido-Pertierra, A. (1988). Properties and functions of two succinic-semialdehyde dehydrogenases from *Pseudomonas putida*. *Biochim. Biophys. Acta.* 953, 249–257. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(88\)90032-5](https://doi.org/10.1016/0167-4838(88)90032-5).

Santiago-Martínez, M.G., Encalada, R., Lira-Silva, E., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J.C., Reyes-García, M.A., Saavedra, E., Moreno-Sánchez, R., Marín-Hernández, Á. & Jasso-Chávez, R. (2016). The nutritional status of *Methanosarcina acetivorans* regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes. *FEBS J.* 283, 1979-1999. <https://doi.org/10.1111/febs.13717>.

Sass, J.O., Walter, M., Shield, J.P., Atherton, A.M., Garg, U., Scott, D., Woods, C.G. & Smith, L.D. (2012). 3-Hydroxyisobutyrate aciduria and mutations in the ALDH6A1 gene coding for methylmalonate semialdehyde dehydrogenase. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35, 437–442. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9381-x>.

Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 262–280. <https://doi.org/10.1128/membr.61.2.262-280.1997>.

Schippers, J.H.M., Nguyen, H.M., Lu, D., Schmidt, R., & Mueller-Roeber, B. (2012). ROS homeostasis during development: an evolutionary conserved strategy. *Cell Mol. Life Sci.* 69, 3245–3257. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1092-4>.

Schlegel, K., Welte, C., Deppenmeier, U. & Müller, V. (2012). Electron transport during aceticlastic methanogenesis by *Methanosarcina acetivorans* involves a sodium-translocating RNF complex. *FEBS J.* 279, 4444–4452. <https://doi.org/10.1111/febs.12031>.

Sheehan, R., McCarver, A.C., Isom, C.E., Karr, E.A. & Lessner, D.J. (2015). The *Methanosarcina acetivorans* thioredoxin system activates DNA binding of the redox-sensitive transcriptional regulator MsvR. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42, 965-969. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1592-y>.

Singh, R., Mailloux, R.J., Puiseux-Dao, S. & Appanna, V.D. (2007). Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens* *J. Bacteriol.* 189, 6665–6675. <https://doi.org/10.1128/jb.00555-07>.

Singh, S., Brocker, C., Koppaka, V., Chen, Y., Jackson, B.C., Matsumoto, A., Thompson, D.C. & Vasiliou, V. (2013). Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to

oxidative/electrophilic stress. *Free Radic. Biol. Med.* 56, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010>.

Sládek, N.E. (2003). Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17, 7–23. <https://doi.org/10.1002/jbt.10057>.

Ślesak, I., Kula, M., Ślesak, H., Miszalski, Z., & Strzałka, K. (2019). How to define obligatory anaerobiosis? An evolutionary view on the antioxidant response system and the early stages of the evolution of life on Earth. *Free Radic. Biol. Med.* 140, 61-73. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.004>.

Song, X., Hou, C., Yang, Y., Ai, L., Xia, Y., Wang, G., Yi, H. & Xiong, Z. (2022). Effects of different carbon sources on metabolic profiles of carbohydrates in *Streptococcus thermophilus* during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 102, 4820-4829. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11845>.

Sophos, N.A. & Vasiliou, V. (2003). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem. Biol. Interact.* 143–144, 5–22. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(02\)00163-1](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(02)00163-1).

Sowers, K.R., Baron, S.F. & Ferry, J.G. (1984). *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium isolated from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 971-978. <https://doi.org/10.1128/aem.47.5.971-978.1984>.

Sowers, K.R., Boone, J.E. & Gunsalus, R.P. (1993). Disaggregation of *Methanosarcina* spp. and growth as single cells at elevated osmolarity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3832-3839. <https://doi.org/10.1128/aem.59.11.3832-3839.1993>.

Spang, A., Caceres, E.F. & Ettema, T.J.G. (2017). Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. *Science* 357, eaaf3883. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3883>.

Stillwell, A., Hoppock, D. & Webber, M. (2010). Energy recovery from wastewater treatment plants in the United States: a case study of the energy-water nexus. *Sustainability* 2, 945–962. <https://doi.org/10.3390/su2040945>.

Takao, M., Yasui, A. & Oikawa, A. (1991). Unique characteristics of superoxide dismutase of a strictly anaerobic archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *J. Biol. Chem.* 266, 14151–14154. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)98656-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)98656-4).

Thauer, R., Kaster, A.K., Seedorf, H., Buckel, W. & Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 579–591. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1931>.

Thauer, R.K. (2012). The Wolfe cycle comes full circle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 15084–15085. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213193109>.

Uma, L., Hariharan, J., Sharma, Y. & Balasubramanian, D. (1996). Corneal aldehyde dehydrogenase displays antioxidant properties. *Exp. Eye Res.* 63, 117–120. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0098>.

Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 849–860. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>.

White, R.H. & Xu, H. (2006). Methylglyoxal is an intermediate in the biosynthesis of 6-deoxy-5-ketofructose-1-phosphate: a precursor for aromatic amino acid biosynthesis in *Methanocaldococcus jannaschii*. *Biochemistry.* 45, 12366-12379. <https://doi.org/10.1021/bi061018a>.

Xie, N., Zhang, L., Gao, W., Huang, C., Huber, P.E., Zhou, X., Li, C., Shen, G. & Zou, B. (2020). NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Sig. Transduct. Target. Ther.* 5, 227. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00311-7>.

Yoshida, A., Rzhetsky, A., Hsu, L.C. & Chang, C. (1998). Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur. J. Biochem.* 251, 549–557. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2510549.x>.

Yoval-Sánchez, B. & Rodríguez-Zavala, J.S. (2012). Differences in susceptibility to inactivation of human aldehyde dehydrogenases by lipid peroxidation byproducts. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 722-729. <http://doi.org/10.1021/tx2005184>.

Zaldívar-Machorro, V.J., Lopez-Ortiz, M., Demare, P., Regla, I. & Muñoz-Clares, R.A. (2011). The disulfiram metabolites S-methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfoxide and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfone irreversibly inactivate betaine aldehyde

dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, both *in vitro* and *in situ*, and arrest bacterial growth. *Biochimie*. 93, 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.022>.

Zimniak, P. (2011). Relationship of electrophilic stress to aging. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1087–1105. <https://doi.org/10.1016%2Fj.freeradbiomed.2011.05.039>.

Zinder, S.H. (1993). Physiological ecology of methanogens. In: Ferry, J.G. (eds) *Methanogenesis*. Chapman & Hall Microbiology Series. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2391-8_4.

14. ANEXOS

14.1 Composición química de medio de cultivo *High Salt*

Componentes	Concentración
Cloruro de sodio(NaCl)	300 mM
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	25 mM
Cloruro de potasio (KCl)	13.4 mM
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	115.5 mM
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	2.7 mM
Cloruro de amonio(NH ₄ Cl)	18.7 mM
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	5 mM
Cisteína- HCl (C ₃ H ₇ NO ₂ S)	4.12 mM
Sulfuro de sodio (Na ₂ S·9 H ₂ O)	0.025% (v/v)
Resazurina	0.001% (v/v)
Mezcla de vitaminas 5X	0.02% (v/v)
Mezcla de minerales 10X	0.1 % (v/v)

14.2 Composición química de solución de vitaminas (5X)

Componentes	Concentración
Tiamina (B ₁)	150 nM
Riboflavina (B ₂)	132 nM
Ácido nicotínico (B ₃)	400 nM
Ácido pantoténico (B ₅)	228 nM
Piridoxina · HCl (B ₆)	490 nM
Biotina (B ₇)	82 nM
Ácido fólico (B ₉)	45 nM
Cobalamina (B ₁₂)	7.4 nM
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico (PABA)	364 nM
Ácido lipoico	242 nM

14.3 Composición química de solución de minerales

Componentes	Concentración
Ácido nitriloacético	78.4 μM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	122 μM
MnSO ₄ · H ₂ O	27 μM
NaCl	183.5 mM
FeSO ₄ · 7H ₂ O	3.6 μM
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	3.6 μM
CaCl ₂	9 μM
ZnCl ₂ / ZnSO ₄	5.8 μM
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.4 μM
AlK(SO ₄) ₂	0.2 μM
H ₃ BO ₃	1.6 μM
NaMoO ₄	1.2 μM
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	10 μM