



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LOS AMINOÁCIDOS TIROSINA Y TRIPTOFANO
COMO BLANCOS DE OXIDACIÓN DURANTE EL ESTRÉS SALINO EN LA
LEVADURA *Debaryomyces hansenii*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO-FARMACÉUTICO-BIÓLOGO

PRESENTA:

PALOMA ABIGAIL MONTERO PEÑALOZA

México, D.F.,

2012.





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.

JURADO DE EXAMEN

Presidente	JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE
Vocal	NORMA SILVIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ
Secretario	CLAUDIA MARISSA CALDERÓN TORRES
1^{er} Sup.	JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO
2^{do} Sup.	LAURA CARMONA SALAZAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

En el departamento de Genética Molecular en el laboratorio 306 oriente del Instituto de Fisiología Celular UNAM, bajo la asesoría del Doctor Antonio Peña Díaz y la Doctora Marissa Calderón Torres.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. CLAUDIA MARISSA CALDERÓN TORRES

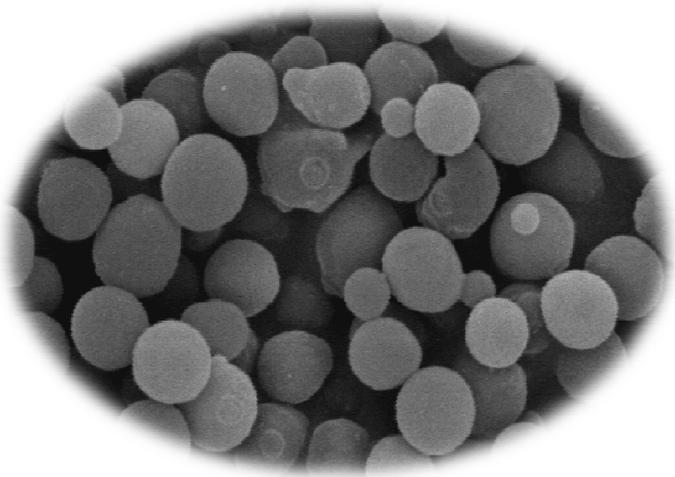
SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. DANIELA ELVIRA CASTRO GRANADOS.

SUSTENTANTE :

PALOMA ABIGAIL MONTERO PEÑALOZA

**ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LOS AMINOÁCIDOS
TIROSINA Y TRIPTOFANO COMO BLANCOS DE
OXIDACIÓN DURANTE EL ESTRÉS SALINO EN LA
LEVADURA *Debaryomyces hansenii*.**



Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber. Albert Einstein (1879-1955)

DEDICATORIA

A mi casa de estudios la UNAM y a la Facultad de Química, gracias por hacer de mí una profesional, y forjarme como una persona correcta.

A mis Padres:

Antes que nada gracias por darme la vida, ya que sin ella, no pudiese existir ahora, porque gracias a su amor, comprensión y apoyo soy lo que soy, por haberme inculcado lo mejor para mi formación. Gracias a tí Mami por desvelarte conmigo cuando estaba enferma, cuando algo me agobiaba, o simplemente por alentarme en los primeros semestres de la carrera, a que yo podía con eso y mucho más; por ser mi amiga, Gracias mami. Gracias Papá porque tus regaños y tus llamadas de atención me abrieron los ojos para saber que la vida no es fácil, porque pese a tu carácter, te quiero; gracias por darme la oportunidad de ser alguien y tener una carrera para poder defenderme en la vida, yo creo que eso fue lo mejor que me pudiste dar. Gracias.

A mis Hermanos:

Gracias por el apoyo incondicional que me brindaron, saben que son mi adoración, que los amo a cada uno de ustedes, por alentarme a seguir siempre adelante, porque me han enseñado a compartir y vivir; qué haría sin ustedes, sin sus alegrías, por tenerme siempre la confianza del mundo, en verdad gracias, Ulises, Bogar, Verónica, Israel e Ivonne.

A Helber Alvarez Parada:

Que te puedo decir amor, que no sepas, gracias por apoyarme en todo, por ser mi cómplice, mi amigo, mi todo, tú sabes cuánto costó este gran logro, pues fuiste parte de ella, en verdad amor gracias, por todo lo que hemos vivido, por creer en mí, por traerme a esta aventura de trabajar juntos, porque quiero compartir hoy y siempre estos logros a tu lado; te amo mucho amor, y ya sabes juntos hoy y siempre, nunca para atrás ni para agarrar vuelo, ok. Te amo.

A mi Familia:

Gracias tías (os), primos, cuñados (as), sobrinos, porque desde siempre me vieron crecer, porque compartieron mi vida y mis logros, por su apoyo incondicional Kaleb, Armando Cardoso y Adalid García en verdad Gracias.

A mis amigos:

Areli, porque ha sido mi mejor amiga incondicional, por los momentos inolvidables e irrepitibles que vivimos en la carrera, te quiero mucho amiga; gracias por el apoyo.

Guillermo, amigo que te puedo decir, gracias por la confianza que siempre me has brindado, por tu apoyo y los buenos momentos en la carrera.

Isabel: Por ser una gran amiga, por compartir los mejores momentos en la facultad, por tu amistad, y tú apoyo.

Josué: Amigo gracias por el apoyo, las risas y tu confianza.

Julio: Gracias amigo por los buenos ratos vividos y por tus buenos consejos.

Dr. Palacios, porque lejos de ser mi maestro, fuiste y eres mi amigo, por brindarme tu apoyo cuando más lo necesité, por creer en mí, gracias.

Leonardo, gracias por ser mi amigo y por compartir tan gratos momentos en la carrera.

Luis, porque siempre te consideré mi amigo, pero sobre todo por tu gran compañía que jamás olvidaré.

A todas aquellas personas que algún día formaron parte de mí vida, y que por algún motivo o circunstancia ya no nos vemos, gracias por existir y compartir gratos momentos.

Y Gracias a Dios por iluminar siempre mi camino y bendecir mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Peña:

Doctor gracias por creer en mí, por darme la oportunidad de ser una alumna en su laboratorio, por su gran simpatía, por todos sus conocimientos que me ayudaron a ser mejor, en verdad gracias es un amor de persona, lo admiro por quién es y su sencillez ante todo, nunca cambie, de nuevo gracias.

A la M. en C. Daniela Castro y a la Dra. Marissa Calderón:

Ambas fueron elementos claves de este logro, porque sin dudarlo me aceptaron en su equipo de trabajo, creyeron en mí, por sus gratos momentos y enseñanzas transmitidas, las quiero mucho, y recuerden que este logro también es parte de ustedes, gracias.

En particular a Daniela su disposición e invaluable labor al enseñarme y transmitirme sus conocimientos al hacer esta tesis y por revisar la tesis.

A Marissa por dirigir este proyecto y hacer las debidas correcciones para el termino de la tesis.

A mis compañeros del Lab. 306:

A la QFB Norma Silvia Sánchez y a la Dra. Martha Calahorra por su inapreciable ayuda técnica y revisión de Tesis.

Norma, gracias por tu apoyo, tus buenos consejos, por la confianza depositada y sobre todo por ser una personita que vale mil. ¡¡Nunca Claudiques!!

Martha, qué te puedo decir, gracias por tus conocimientos heredados, por la simpatía que te caracteriza, por creer en mí, y por ser tan única, gracias

A Christian, Karla, Luis, Omar, Raúl, por su compañía y los gratos momentos en el lab. y al Sr. René Flores por su apoyo como laboratorista y por ser tan gentil y amable siempre.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

ÍNDICE		Página
Agradecimientos	.	4
Índice de Figuras	.	9
Índice de Tablas	.	10
Abreviaturas	.	11
Resumen	.	12
Introducción	.	14
Marco Teórico	.	17
Objetivos Generales	.	26
Objetivos Particulares	.	26
Hipótesis	.	27
Metodología.	.	28
Determinación de especies reactivas de oxígeno	.	28
Consumo de oxígeno en cultivos control y estrés salino	.	30
Concentración de ATP en condición de estrés salino	.	30
Preparación de estándares de 3-nitrotirosina y nitrotriptofano	.	31
Cromatografía en capa fina de 3-nitrotirosina y nitrotriptofano	.	32
Espectrofotometría de fluorescencia para los estándares de 3-nitrotirosina y nitrotriptofano.	.	33
Determinación de 3-nitrotirosina por espectrofotometría de fluorescencia	.	33

Cuantificación de aminoácidos totales libres	34
Cuantificación de nitratos y nitritos	35
Curva de crecimiento	35
Resultados	36
Discusión	48
Conclusiones	54
Bibliografía	55
Anexo	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografía electrónica de células de <i>D. hansenii</i>	17
Figura 2. Modelo que muestra las rutas de transporte importantes para mantener el equilibrio osmótico en <i>D. hansenii</i>	19
Figura 3. Química de las especies reactivas de oxígeno	22
Figura 4. Modelo de Generación de especies reactivas de nitrógeno	23
Figura 5. Producción de especies reactivas de oxígeno en células de <i>D. hansenii</i> durante estrés salino	36
Figura 6. Producción de especies reactivas de oxígeno en extractos celulares de <i>D. hansenii</i> durante el estrés salino	37
Figura 7. Respiración de <i>D. hansenii</i> expuesta al estrés salino.	38
Figura 8. Capacidad respiratoria de <i>D. hansenii</i> durante estrés salino	39
Figura 9. Capacidad respiratoria de <i>D. hansenii</i> en presencia de cianuro y octil-galato	40
Figura 10. Concentración de ATP en extractos celulares de <i>D. hansenii</i> en ausencia y presencia de NaCl.	42
Figura 11. Cromatoplaqueta de capa fina, revelada con ninhidrina, a partir de extractos etanólicos de <i>D. hansenii</i> expuesta al estrés salino	43
Figura 12. Espectro de fluorescencia de excitación ($\lambda_{em}=418nm$) de 3-nitrotirosina, en extractos etanólicos de <i>D. hansenii</i> expuesta al estrés salino	44
Figura 13. Espectro de fluorescencia de emisión ($\lambda_{exc}=325nm$) de 3-nitrotirosina, en extractos etanólicos de <i>D. hansenii</i> expuesta al estrés salino	45
Figura 14. Crecimiento de <i>D. hansenii</i> en medio YPD-NaCl 2M, con o sin 5mM de tirosina.	46
Figura 15. Crecimiento de <i>D. hansenii</i> en medio YPD-NaCl 2M, con o sin 5mM de tirosina y α tocoferol 10 μ M	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Velocidad de la respiración en diferentes condiciones de crecimiento y en presencia de inhibidores	41
Tabla 2. Cociente de los valores de respiración en presencia y ausencia de inhibidores	41
Tabla 3. Medición de nitratos y nitritos en extractos etanólicos de <i>D.hansenii</i> durante estrés salino	46

Abreviaturas:

BSA	Por sus siglas en Inglés “Bovine Seric Albumin”
CCCP	Carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona
DCDHF-DA	2´7´-diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DCDHF	2´7´-diclorodihidrofluoresceína
DCF	2´7´-diclorofluoresceína
DO	Densidad óptica
ERO’s	Especies reactivas de oxígeno
ERN’s	Especies reactivas de nitrógeno
G6PDH	Glucosa 6-Fosfato deshidrogenasa
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato (reducido)
NADP⁺	Nicotín adenin dinucleótido fosfato (oxidado)
HEPES	Ácido (N-(2-hidroxietil)piperazina-N´-(2-etanosulfónico))
HK	Hexocinasa
MES	Ácido (2-(N-morfolino) etanosulfónico.
OXA	Oxidasa alterna
Phe	Fenilalanina
PMFS	Fenilmetil sulfonil fluoruro
RRC	Respiración Resistente al Cianuro
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEA	Trietanolamina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
YPD	Por sus siglas en Inglés “Yeast Peptone Dextrose”
εNADPH	Coefficiente de extinción molar del NADPH ⁺

RESUMEN

Debaryomyces hansenii es una levadura que se caracteriza por su alta tolerancia al sodio y al pH alcalino; su halotolerancia resulta de diferentes estrategias de adaptación como la osmoregulación, que involucra el transporte para la expulsión de sodio y la síntesis de compuestos orgánicos compatibles que favorecen las funciones celulares en presencia de este catión. En *D. hansenii* al igual que en otras levaduras halotolerantes, se ha encontrado el aumento en la expresión de genes de halorespuesta como *HOG1*, *ENA1*, *ENA2*, *GPD1*, *GPP*, *NHX1* y *KHA1*; sin embargo, este número reducido de genes no permite tener un modelo completo que explique la osmorregulación. Es por ello pertinente la búsqueda de nuevos genes de halorespuesta. Calderón-Torres *et al.* (2006) encontraron que en *D. hansenii* la exposición continua a NaCl 2M estimula el aumento en la expresión de *DhARO4*; este gen codifica para la enzima 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintetasa, involucrada en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr y Trp); sin embargo, no determinaron el papel fisiológico del aumento de la expresión de *DhARO4* durante el estrés hipersalino. En un trabajo previamente realizado en el laboratorio se determinó que el aumento en la expresión de *DhARO4* conduce al aumento significativo de la actividad específica de *DhAro4p* en presencia de NaCl 2 M (Calderón-Torres *et al.*, 2011); y que la alta actividad específica de *DhARO4* no lleva al aumento de tirosina libre. Por lo tanto, un objetivo primordial de este proyecto fue demostrar que este aminoácido es oxidado inmediatamente a 3-nitrotirosina, como respuesta para contrarrestar los efectos del estrés oxidante producido durante el estrés salino. Para confirmar que la tirosina recién sintetizada es un blanco de oxidación, se midieron las especies reactivas de oxígeno (ERO's) en células completas con 2'7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína; se encontró que las ERO's aumentan en presencia de NaCl 2 M. También se evaluó la respiración celular en presencia y ausencia de NaCl 2 M; y se encontró que la respiración celular aumenta al incrementarse la concentración de sodio en el medio de cultivo. Mediante espectrofotometría de fluorescencia y cromatografía de capa fina se confirmó la formación de 3-nitrotirosina. También se encontró que al añadir un exceso de tirosina a medios de

cultivo con NaCl 2 M, disminuye el retardo del crecimiento observado en *D. hansenii* en presencia de NaCl 2 M. Nuestros resultados demuestran que en condiciones de estrés hipersalino *D. hansenii* responde al estrés oxidante mediante la síntesis *de novo* de tirosina y su oxidación a 3-nitrotirosina.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras han estado ligadas a la vida humana desde la antigüedad, por la producción de cerveza, vino y pan. Los primeros reportes aparecen en Sumeria alrededor del año 7000 AC (Souciet *et. al.*, 2000). Tienen importancia a nivel industrial y biomédico por sus productos metabólicos como las vitaminas, el etanol, el ácido cítrico, los lípidos, etc. En la actualidad se les utiliza en disciplinas como la genética y la biología molecular. Dado lo pequeño de su genoma (6000 genes aproximadamente (Dujon *et al.*, 2004) se han utilizado para explorar preguntas de la evolución del genoma en eucariontes, por medio del análisis comparativo entre muy diversas especies, incluyendo la humana; aunado a lo anterior, es importante señalar que el primer organismo del que se obtuvo la secuencia completa de su genoma fue la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y que este avance contribuyó de forma significativa al desarrollo de las ciencias genómicas (Souciet *et. al.*, 2000).

Las levaduras pertenecen al reino fungi, que incluye una gran diversidad de hongos; las levaduras corresponden a la clase Ascomycota (McNeill, 1979). Actualmente la clase de los ascomicetos está compuesta por 3 grupos: Archiascomicetos, Euascomicetos y Hemiascomicetos; las levaduras pertenecen a este último grupo (Souciet *et. al.*, 2000). Los hemiascomicetos tienen un ciclo de vida con una fase de crecimiento unicelular en la que se reproducen por gemación o fusión; también pueden formar esporas sexuales llamadas ascosporas. Las levaduras son reconocidas por la típica morfología de sus colonias celulares ovaladas, y se distinguen de la bacteriana (entre 0,5 y 3 μm de diámetro), por el mayor tamaño celular que presentan (3-5 μm de diámetro) (McNeill, 1979).

Las levaduras pueden encontrarse en diferentes ambientes terrestres y acuáticos; en el medio marino se les encuentra principalmente en la zona de costa donde hay mayor disponibilidad de materia orgánica, pero también se les puede encontrar en mar abierto. En las aguas intercontinentales, las poblaciones de levaduras están integradas por gran variedad de especies correspondientes a las clases Ascomiceta, Basidiomiceta y Deuteromiceta. En el mar abierto la variedad

de especies disminuye y los ascomicetos se vuelven escasos, con excepción de la especie *Debaryomyces hansenii* (McNeill, 1979).

Las investigaciones sobre las levaduras marinas, tales como su distribución, crecimiento y metabolismo, han sido abordadas desde los años 60's. Las especies marinas se encuentran asociadas a lugares ricos en materia orgánica como superficies de animales, en el tracto digestivo de peces y desechos vegetales, o bien libres en la columna de agua, en donde se han aislado desde la superficie hasta los 4000 m de profundidad (Van y Fell, 1968); por sus características de crecimiento pueden ser fermentativas o respiratorias, y pueden soportar cambios en las tres características principales del agua de mar: la salinidad, pH y temperatura (McNeill, 1979).

La concentración de sales en el agua de mar es uno de los factores que determina la distribución de las especies marinas, la salinidad del agua de mar promedio tiene una composición definida donde sobresalen seis iones (Cl^- , Na^+ , Mg^{+2} , SO_4^{-2} , Ca^{+2} , y K^+), la proporción de los iones se mantiene constante en la mayoría de los hábitats marinos por procesos físicos como precipitación, evaporación, congelamiento, difusión molecular de iones entre las masas de agua, etc. (Libes, 1992). Sin embargo, pueden haber hábitats donde sobresale algún ión, como ocurre en los estuarios, las lagunas salobres, donde el sodio es uno de los principales compuestos; en estos hábitats hipersalinos se presentan los microorganismos halófilos y halotolerantes, los halófilos se distinguen por su requerimiento de condiciones salinas e hipersalinas para crecer; mientras que los halotolerantes pueden crecer tanto en medios de salinidad elevada como en ausencia de altas concentraciones de sales (Das Sarma y Arora, 2001).

Los halófilos se clasifican como poco, moderados, y extremos; esta clasificación depende de los requerimientos de sodio para su crecimiento. Los poco halófilos presenta un crecimiento óptimo en una concentración de sodio de 0.2-0.85 M (2-5%); los halófilos moderados a 0.85-3.4 M (5-20%); y los halófilos extremos por arriba de 3.4 M (20-30%) (González y Peña, 2002).

Entre los organismos halotolerantes, los más estudiados han sido *S. cerevisiae*, levadura que presenta una halotolerancia moderada y recientemente *D. hansenii* con halotolerancia elevada.

Puesto que los organismos halófilos y halotolerantes muestran características únicas para crecer en presencia de concentraciones elevadas de sales, tales como enzimas que pueden funcionar en condiciones que para la mayoría de las proteínas no son viables porque se desnaturalizan o precipitan, estos organismos han sido de enorme interés en disciplinas como la biotecnología y la medicina. Considerando que uno de los principales problemas actuales de la agricultura es la salinización de los suelos, una de las aplicaciones biotecnológicas de estos organismos está orientada al mejoramiento de plantas para aumentar su tolerancia a las sales del suelo (Hussain *et al.*, 2008).

Uno de los enfoques para el mejoramiento de plantas es la búsqueda de genes de respuesta al estrés salino en especies halófilas y halotolerantes. Uno de los primeros organismos eucariontes en los que se realizó esta búsqueda de genes de halorespuesta fue *S. cerevisiae*; se estudiaron algunas cepas de esta levadura que presentaban resistencia a altas concentraciones de sal; pero se consideró que *S. cerevisiae* no era un buen modelo para el estudio de la osmoregulación debido a la halotolerancia moderada que presenta (crecimiento límite hasta NaCl 1.2 M) por lo que recientemente se han propuesto que los modelos idóneos para el estudio de los mecanismos de respuesta al estrés hipersalino son los organismos con halotolerancia elevada como *D. hansenii*, que puede crecer hasta una concentración de NaCl 4.4 M (Norkrans, 1968).

Respecto a los trabajos para la búsqueda de genes de halorespuesta en *D. hansenii*, González *et al.* (2009), estudiaron la expresión parcial de genes mediante la técnica de microarreglos del ADN, y encontraron la sobreexpresión de genes de halorespuesta ya reportados en *S. cerevisiae*, además de otros que codifican para proteínas implicadas en el mantenimiento celular y de funciones mitocondriales; pero no encontraron nuevos genes que contribuyeran a explicar la elevada halotolerancia de *D. hansenii*. Otro trabajo de la expresión parcial de

genes fue el realizado por Calderón-Torres *et al.* (2006), quienes encontraron la sobre-expresión del gen *DhARO4* que codifica para la síntesis de aminoácidos aromáticos; sin embargo, no evaluaron el papel fisiológico del aumento en la expresión de *DhARO4*. Tomando en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se realizó un estudio bioquímico de los compuestos que se sintetizan después de una sobre-expresión de *DhARO4* en condiciones de estrés hipersalino y se analizó si estos compuestos pueden mejorar el crecimiento de la levadura en presencia de sodio y disminuir los efectos del estrés salino en las funciones del metabolismo como la respiración celular.

MARCO TEÓRICO

La levadura *Debaryomyces hansenii* (figura 1) ha sido reportada como una levadura marina, aunque se encuentra en diversos ambientes, en el suelo, frutas, queso, carne, vino, cerveza, así como en los productos de alto contenido de azúcar. Raramente se ha encontrado que *D. hansenii* también puede ser el agente causal de la putrefacción de salmuera en alimentos conservados, como los pepinillos (Breuer *et al.*, 2006).

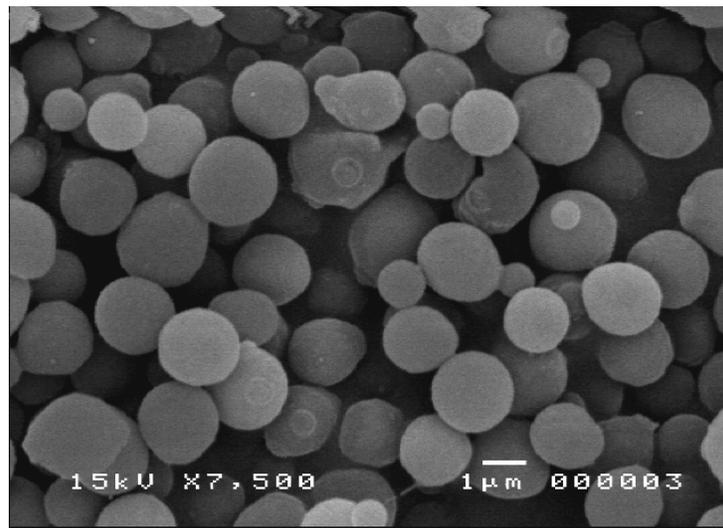


Figura 1. Microfotografía electrónica de células de *D. hansenii*. Laboratorio de microscopía electrónica del Instituto de Fisiología Celular UNAM.

D. hansenii es una levadura típicamente proteolítica, y también se le puede considerar oleaginosa, ya que acumula lípidos de hasta el 70% de su biomasa seca y en su metabolismo presenta las vías de degradación de los lípidos (Ratledge y Tan, 1990).

Se ha postulado que de *D. hansenii* hay cepas con diferencias fenotípicas, tales como variaciones en su capacidad para asimilar y fermentar varias fuentes de carbono, para crecer a diferentes temperaturas, la expresión de diferentes lipasas y proteasas y que por ello puede crecer en diversos medios de cultivo (Petersen y Jespersen, 2004).

Los primeros trabajos que se hicieron para conocer los mecanismos fisiológicos, tales como la osmorregulación, que le confieren a *D. hansenii* su elevada halotolerancia, estuvieron enfocados a determinar si acumulaba Na^+ intracelular; si la acumulación era debida a algún fenómeno de difusión pasiva o si existía un transporte activo. En el trabajo pionero de Norkrans (1968), se reportó que esta levadura puede acumular altas concentraciones de Na^+ intracelular; Prista *et al.* (1997) demostraron que el Na^+ no ejercía ningún efecto tóxico en su metabolismo. Almagro *et al.* (2000) determinaron que el Na^+ mejoraba el crecimiento de *D. hansenii* en diferentes condiciones de estrés y que podía acumular Na^+ intracelular hasta 800 mM. Considerando lo anterior fue como se postuló que *D. hansenii*, es un organismo sodio-incluyente.

En la osmorregulación por transporte de iones se determinó que el Na^+ y el K^+ son los más importantes para mantener la homeostasis iónica, que *D. hansenii* puede acumular una mayor concentración de K^+ o Na^+ en comparación con *S. cerevisiae*; este hecho reforzó la propuesta de que en *D. hansenii* la haloadaptación no depende sólo de la capacidad de extrusión de iones de Na^+ , también de su resistencia a los efectos tóxicos de éste (Prista *et al.*, 1997).

En *D. hansenii* se ha propuesto la presencia de una H^+ -ATPasa tipo P, similar a la codificada por el gen *PMA1* de *S. cerevisiae*, que en la membrana

plasmática genera un potencial transmembranal y un gradiente de pH a partir de la expulsión de protones (González-Hernández *et al.*, 2004).

Almagro *et al.* (2001) propusieron que el potencial de membrana permite la absorción de Na^+ y K^+ a través de uno o más uniportadores de Na^+ , mediante un transporte no dependiente de ATP, pero también plantearon que el Na^+ puede ser expulsado por dos ATPasas, codificadas por los genes *DhENA1* y *DhENA2*. González-Hernández *et al.* (2004) indicaron la presencia de un intercambiador similar al codificado por *NHA1* en *S. cerevisiae*.

DhENA1 se expresa en presencia de altas concentraciones de Na^+ , mientras que la expresión de *DhENA2* se activa en presencia de pH alcalino (Almagro *et al.*, 2001). En la figura 2 se muestran los diferentes transportadores para mantener el equilibrio osmótico en la levadura *D. hansenii*, mencionados con anterioridad.

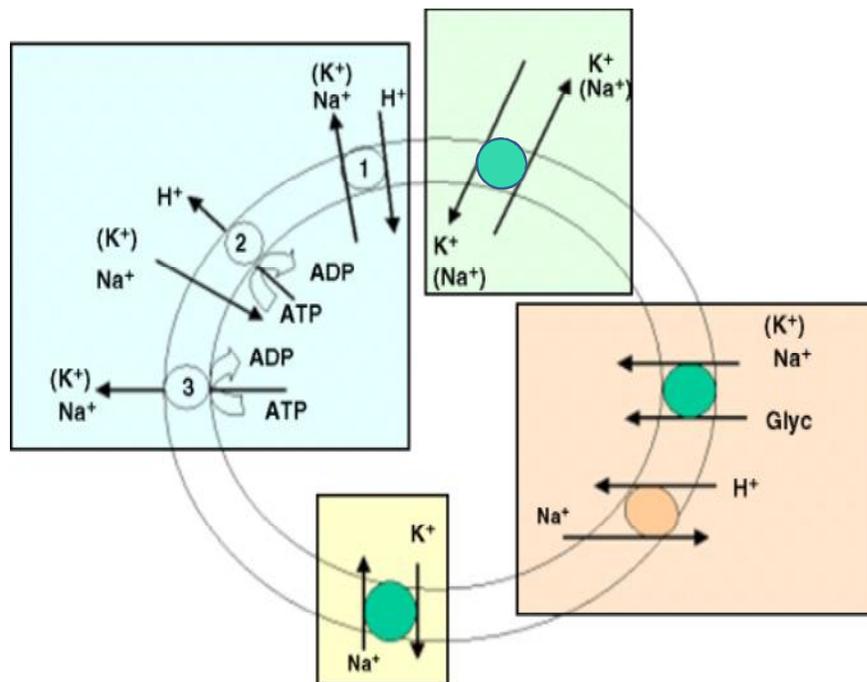


Figura 2. Modelo que muestra las rutas de transporte importantes para mantener el equilibrio osmótico en *D. hansenii*. El cuadro de la derecha muestra los transportadores propuestos por Lucas *et al.*, 1990. El cuadro del centro superior los propuestos por Prista *et al.*, 1997. El cuadro de la izquierda, los transportadores propuestos por Serrano 1980, Thome *et*

al. 1998, y González-Hernández *et al.* 2004 (1) Antiportador NHA1, (2) H⁺-ATPasa similar a Pma1p, (3) ATPasa tipo codificada por el gen *ENA1*. Cuadro inferior: transportadores propuestos por Norkrans 1968, y Norkrans y Kylin, 1969.

Un componente importante de los mecanismos de osmorregulación que permite a los organismos halófilos mantener su equilibrio osmótico y crecer en ambientes de alto contenido de sal es la producción y acumulación de compuestos llamados orgánicos compatibles (Brown y Simpson, 1972). En los hongos, el glicerol, manitol, arabinitol y eritritol son los principales compuestos orgánicos utilizados para ajustar el potencial osmótico interno como requisito necesario para su supervivencia y el crecimiento (Blomberg y Adler, 1993).

El compuesto orgánico dominante en el crecimiento de *D. hansenii* es el glicerol, mientras que el arabinitol es el compuesto orgánico principal que se encuentra en las células durante la fase de crecimiento estacionaria (Nobre y Da Costa, 1985). Estas observaciones son congruentes con otras investigaciones que muestran que la concentración de glicerol disminuye cuando las células entran en la fase estacionaria.

Adler y colaboradores (1985) describieron la relación entre la osmorregulación y la síntesis de glicerol en el metabolismo de *D. hansenii*; su estudio mostró que el glicerol se sintetiza a través de la dihidroxiacetona fosfato, que se reduce para formar glicerol 3-fosfato, seguido por su desfosforilación.

La activación de los mecanismos de osmorregulación depende de las vías de transducción de señales. En *D. hansenii* se ha propuesto que la acumulación, el transporte de iones, y la síntesis de glicerol, dependen de la vía denominada HOG (High Osmolar Glicerol) que incluye una cascada de cinasas (MAPK) cuyo blanco final es Hog1p; esta ruta o cascada también ha sido observada en *S. cerevisiae* (Hohmann, 2002). La activación de esta vía provoca una rápida fosforilación de Hog1p, una vez fosforilado es transportado al núcleo, donde fosforila a factores de transcripción que activan la transcripción de los genes de respuesta al estrés salino. La vía HOG de levaduras no sólo responde al estrés salino; también puede ser activada bajo diferentes condiciones de estrés. En *D.*

hansenii Dhhog1p se mantiene fosforilada en el citoplasma durante su crecimiento bajo estrés osmótico severo (Sharma *et al.*, 2005).

Los estudios anteriores se han enfocado a determinar los mecanismos de osmorregulación de *D. hansenii* solamente en dos vertientes: la acumulación y el transporte de iones, o bien la síntesis de glicerol; sin embargo, estos mecanismos no explican en su totalidad la elevada halotolerancia de *D. hansenii*. Se ha dejado de lado que *D. hansenii* es una levadura con una alta capacidad respiratoria y poco fermentativa (Sánchez *et al.*, 2006), y que es necesario determinar cómo mantiene el equilibrio entre la generación de compuestos oxidantes y sus sistemas antioxidantes durante el estrés salino. Respecto a su capacidad respiratoria, se ha determinado, que al igual que otras levaduras tiene una cadena de transporte de electrones con 4 complejos respiratorios y una ATPasa. Pero además de la citocromo *c* oxidasa, *D. hansenii* tiene una segunda oxidasa que actúa como oxidasa alterna para una cadena de transferencia de electrones que se ramifica a partir de la vía principal a el nivel de la ubiquinona, según lo descrito por Veiga *et al.* (2003). Esta oxidasa alterna es insensible al cianuro y la antimicina, pero sensible al ácido salicilhidroxámico y al octil-galato. El papel de la respiración resistente al cianuro es muy común en las levaduras, y no contribuye a la conservación de energía. Se ha pensado que una oxidasa alterna participa en el ajuste fino del abasto de energía de las células bajo diferentes condiciones fisiológicas reduciendo la cantidad de energía del citocromo *c* para desviar el camino hacia el flujo de electrones para la oxidasa alterna.

De forma general, durante la respiración celular se producen compuestos parcialmente reducidos del oxígeno molecular (por ejemplo, el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, y el radical hidroxilo), conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO's)(figura 3). Estas ERO's son moléculas altamente reactivas que son capaces de dañar los componentes celulares, tales como ADN, ARN, lípidos, y proteínas. Para contrarrestar los efectos de las ERO's, los organismos aerobios han desarrollado múltiples sistemas de defensas antioxidantes, que pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. Sin embargo, puede ocurrir un desbalance entre la

generación de las ERO's y la respuesta antioxidante; a este desequilibrio se le denomina estrés oxidante. Se ha observado que el estrés oxidante se puede generar en diferentes tipos de estrés (Toledano *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006).

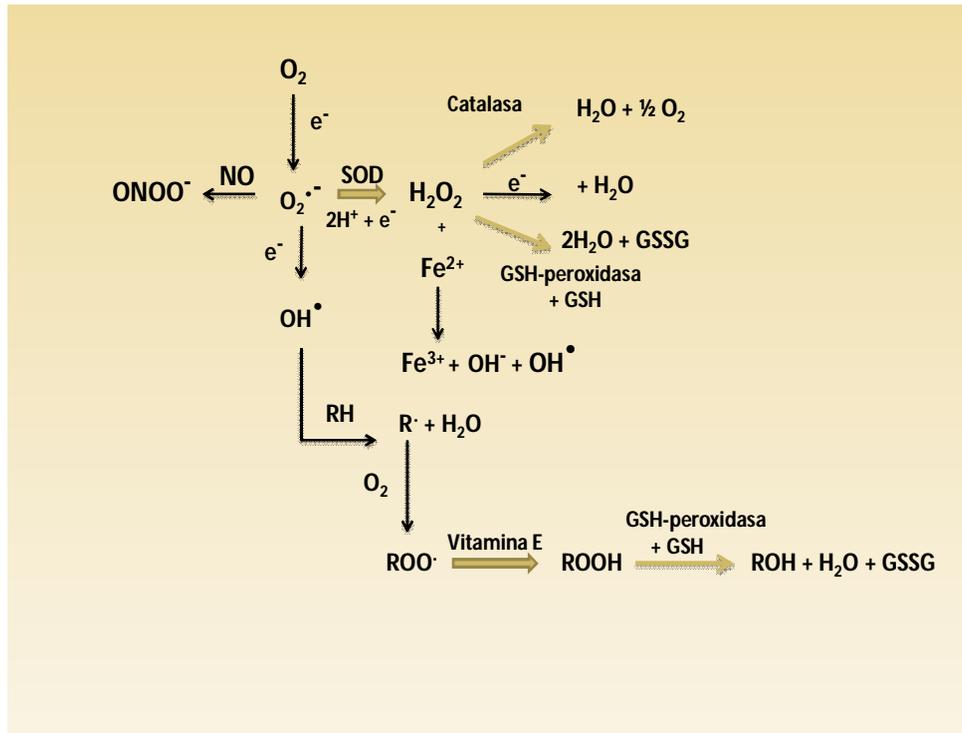


Figura 3. Química de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) y su sistema de detoxificación, SOD (superóxido dismutasa), GSH-peroxidasa (Glutación peroxidasa). Las ERO's normalmente son generadas por una reducción secuencial del oxígeno molecular (tomado de Desikan *et al.*, 2005).

Por su parte, las especies reactivas de nitrógeno (ERN's) incluyen especies derivadas de nitrógeno que pueden o no ser radicales libres. Entre los ERN's se encuentran los radicales óxido nítrico (NO^{\cdot}) y dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}) y los no radicales catión nitronio (NO_2^+) y peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), entre otros (figura 4). Dentro de las ERN's, el NO^{\cdot} Es de gran importancia debido a que es una molécula de señalización que está involucrada en numerosos procesos biológicos. Entre las funciones de NO^{\cdot} , se ha demostrado que regula a las caspasas, que participan en procesos apoptóticos (Vertuani *et al.*, 2004).

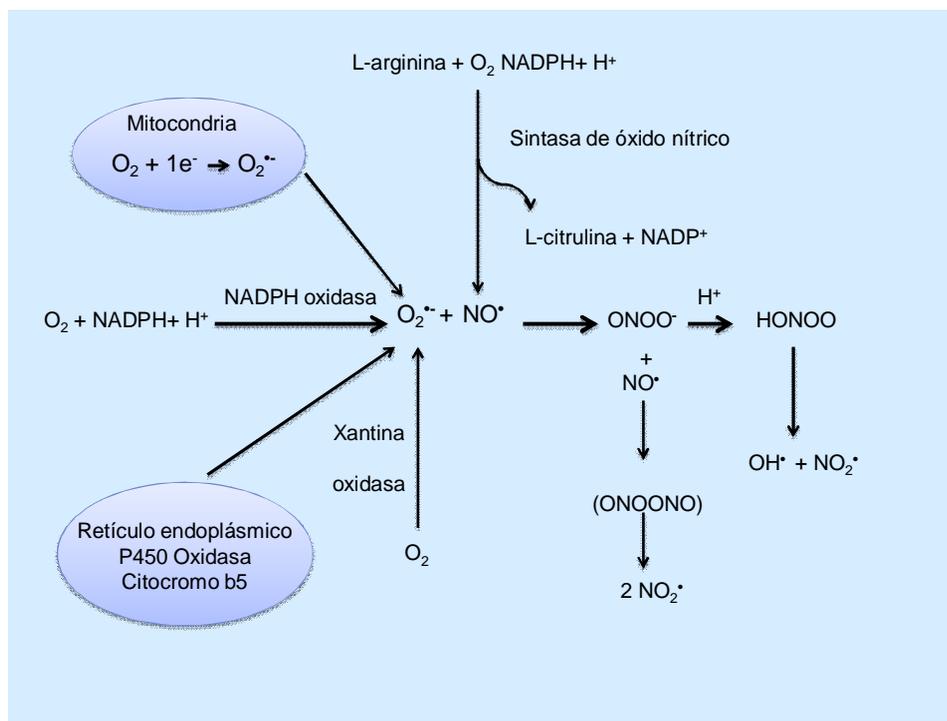


Figura 4. Modelo de Generación de especies reactivas de nitrógeno (ERN's). La reacción entre el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el óxido nítrico (NO^{\bullet}) permite la formación de peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), el cual a su vez es precursor de otras ERN's como ácido peroxinitroso ($HONOO$) y del radical dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}). El $O_2^{\bullet-}$ se forma por la reducción del oxígeno molecular por un electrón que puede provenir del transporte de electrones en la mitocondria o retículo endoplásmico o de la acción enzimática de diversas enzimas como NADPH oxidasa o xantina oxidasa. El NO^{\bullet} proviene de la acción enzimática de la sintasa de óxido nítrico (Chirino *et al.*, 2006).

El estrés oxidante puede tener como resultado daño estructural en la célula, como la lipoperoxidación de las membranas, la oxidación y nitración de proteínas.

En la respuesta antioxidante de *D. hansenii*, se han observado genes ortólogos funcionales de enzimas que participan en la detoxificación de las ERO's, y por ello se considera que tiene mecanismos antioxidantes similares a los de *S. cerevisiae*. Por ejemplo, en el genoma de *D. hansenii* se han identificado los genes de *SOD1*, *SOD2*, *GPX1*, *TRX1* y *GSH1* que codifican para la superóxido dismutasas 1 y 2, la peroxidasa, la tiorredoxina y la glutatión sintetasa, respectivamente. Sin embargo, sólo se ha confirmado el aumento de la expresión del gen *SOD1* y la actividad enzimática de Sod1p (Ramírez-Orozco *et al.*, 1998).

Recientemente se han encontrado dos genes que codifican para enzimas con actividad de catalasa (*DhCTA1* y *DhCTT1*) (Segal-Kischinevzky *et al.*, 2011). La actividad de *DhCta1p* aumenta cuando *D. hansenii* se cultiva en un medio restrictivo como YPE (extracto de levadura, peptona y etanol), y el efecto es mayor durante la fase estacionaria y obstaculizada en la presencia de NaCl. *DhCtt1p* puede ser regulada por la naturaleza o calidad de fuente de carbono.

Otro mecanismo de defensa para contrarrestar el estrés oxidante son las enzimas alquilo hidroperóxido reductasas (Ahp), estas son el segundo miembro conocido de una clase de las oxidorreductasas de disulfuros que poseen actividad frente al H₂O₂, peróxidos orgánicos, y el peroxinitrito. En *D. hansenii*, bajo estrés salino se ha logrado aislar el gen que codifica para la enzima Ahp, y se ha encontrado que el transcrito de *AHP* aumenta durante el estrés salino, por lo que se ha propuesto que este gen forma parte del sistema antioxidante de *D. hansenii* para reducir la acumulación de ERO's durante estrés salino. Esta enzima es una alquilo hidroperóxido reductasa de la familia tipo 1-Cys peroxirredoxina (Chao *et al.*, 2009).

Como ya se indicó, en el trabajo realizado por Calderón-Torres *et al.* (2006), encontraron un aumento de la expresión del gen *DhARO4* durante el estrés salino con NaCl 2M. El aumento en la expresión de este gen fue de interés porque se ha reportado que la tirosina de las proteínas puede ser un blanco de oxidación, pero los autores sólo propusieron que dicho aumento probablemente era esencial en la respuesta de *D. hansenii* contra el estrés salino. Los autores también encontraron que en *D. hansenii* expuesta a NaCl 1M, la actividad enzimática de *DhAro4p* aumentaba 6 veces con respecto a un control sin Na⁺, pero que la actividad enzimática era 10 veces mayor en NaCl 2M. También determinaron que la expresión de *DhARO4* y la actividad enzimática de *DhAro4p* durante estrés salino estaba regulada por tirosina y fenilalanina, y que la presencia de tirosina impedía el aumento de la expresión de *DhARO4* y la actividad específica de *DhARO4p*; por el contrario, al añadir fenilalanina, la expresión de *DhARO4* y la actividad de *DhAro4p*, aumentaban significativamente en NaCl 2M.

Una respuesta para explicar por qué aumenta la expresión de *DhARO4* y también la actividad enzimática de *DhAro4p* podría ser que *D. hansenii* sintetizara tirosina en exceso para utilizarla como un compuesto orgánico compatible, pero en un trabajo posterior Calderón-Torres *et al.* (2011) encontraron que en el estrés salino por NaCl 1 y 2 M la tirosina casi no aumentaba. Consideraron que la falta de aumento de la tirosina era porque una vez sintetizada, era rápidamente modificada. Como ya está reportado que la tirosina es un blanco de oxidación, era probable entonces que durante el estrés salino se generara un exceso de radicales libres. Para validar dicha propuesta en este trabajo se evaluó el efecto del estrés oxidante derivado del estrés salino sobre la respiración celular. También se encontró que la tirosina recién sintetizada es modificada por los radicales libres para formar 3-nitrotirosina, y que esta oxidación parece servir a *D. hansenii*, para disminuir los daños ocasionados por el estrés oxidante que se produce durante el estrés hipersalino.

OBJETIVOS GENERALES:

Descifrar la función fisiológica del aumento del ARN mensajero de *DhARO4* y de la actividad específica de la enzima Aro4p durante el estrés salino sin un aumento de la concentración de tirosina.

Demostrar que *D. hansenii* responde al estrés oxidante que se genera por el estrés salino, mediante la activación transcripcional de genes específicos, como *DhARO4*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Medir la producción de especies reactivas de oxígeno en células y extractos de *D. hansenii* mediante su reacción con el compuesto 2'7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína.

Determinar si el estrés salino afecta el metabolismo respiratorio de *D. hansenii*, midiendo el consumo de oxígeno.

Evaluar si el estrés salino influye en los niveles de ATP.

Determinar si la 3-nitrotirosina es la forma oxidada de la tirosina mediante espectrofotometría de fluorescencia y cromatografía de capa fina.

Confirmar la existencia de especies reactivas de nitrógeno mediante la cuantificación espectrofotométrica de nitratos y nitritos en células de *D. hansenii*.

Descifrar el papel de la tirosina en el crecimiento de la levadura cultivada en presencia de NaCl 2M.

HIPOTESIS

La función fisiológica del aumento del ARN mensajero de *DhARO4* y de la actividad específica de la enzima *DhAro4p*, es la producción de tirosina, y ésta es modificada al servir como blanco de oxidación de los radicales libres producidos durante el estrés salino.

METODOLOGÍA

Levadura y condiciones de crecimiento.

Se utilizó la levadura *Debaryomyces hansenii*, cepa Y7426 (CBS 767) de la colección del departamento de Agricultura de Peoria IL, EU. La cepa se cultivó en medio YPD sólido durante 36 horas a 30°C y luego se mantuvo a 4°C. Para los ensayos, las células se cultivaron en medio YPD líquido sin sodio por 24 hrs. (precultivo). Del precultivo se tomó una alícuota para inocular 200 mL de medio YPD sin sodio (cultivo control) o con NaCl 1 M ó 2 M (estrés salino) e iniciar dichos cultivos a una densidad óptica (DO) de 0.3 unidades a 600 nm de longitud de onda (λ). El precultivo y los cultivos se hicieron en matraces de 250 mL y 500 mL, respectivamente, y se incubaron a 30°C con agitación constante de 250 rpm. Las células en fase de crecimiento exponencial intermedia (0.8 - 1.0 unidades de densidad óptica a 600 nm de longitud de onda) se colectaron por centrifugación a 2,000 rpm por 10 min (International Centrifuge Model S8V).

Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) en células completas.

Se preparó un stock de 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCDHF-DA) 10 mM en un volumen final de 4 mL el cual se disolvió en 2 mL de NaOH 0.01 N y se dejó en la obscuridad 30 min; posteriormente se adiciono 2 mL de MES-TEA 0.1 M pH 6, obteniendo una concentración final de DCDHF-DA 10 mM. Los cultivos control y tratamiento de estrés salino se colectaron por centrifugación; el sobrenadante se decantó y el paquete celular se resuspendió en un volumen residual del medio de cultivo y se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 mL previamente tarado. La suspensión celular se centrifugó a 14,000 rpm por 30 seg en una microcentrífuga Eppendorf (Centrifuge 5415C); el medio de cultivo se desechó, el peso del paquete celular se ajustó a 200 mg y se lavó con agua estéril a 4°C (5 volúmenes), nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm por 30 seg y el

sobrenadante se descartó; finalmente el paquete celular se resuspendió en agua estéril al 50 % de su peso (peso húmedo/volumen).

En una celda de vidrio de 3 mL, se añadieron 200 μ L de MES-TEA 0.1 M pH 6, 1.7 mL de H₂O y 2 μ L de DCDHF-DA (10 mM). La celda se colocó en un espectrofotómetro de fluorescencia (SLM-Aminco) y la señal de fluorescencia fue medida a una λ de excitación de 488 nm y de emisión a 520 nm, después de 3 min de seguir la señal basal de la DCDHF-DA, se agregaron 100 μ L de la suspensión celular, y se registró el trazo de la señal de fluorescencia de la DCDHF-DA durante una hr., con agitación constante a 30°C.

Determinación de especies reactivas de oxígeno en extractos celulares.

A cultivos control y tratamiento de estrés salino por NaCl 1 y 2 M con un valor de DO_{600nm} de 0.9, se les añadió 250 μ L de DCDHF-DA 10 mM (previamente preparado) y se incubaron 30 min. Posteriormente las células fueron recolectadas por centrifugación a 2,000 rpm por 10 min (International Centrifuge Model S8V), el sobrenadante se descartó y el paquete celular se resuspendió en un volumen mínimo del medio de cultivo. La suspensión celular se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 14,000 rpm por 30 seg en una microcentrifuga Eppendorf (Centrifuge 5415C), el sobrenadante se descartó y el paquete celular se lavó con 1 mL de agua estéril 2 veces. Una vez que el peso del paquete celular fue ajustado a 200 mg, a cada tubo Eppendorf se le añadió 1 mL de MES-TEA 0.1 M pH 6, 5 μ L de PMFS (1mM) y perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro. Las células se rompieron por agitación en vortex (30 seg) e incubación en hielo (1 min) hasta completar seis ciclos (30 seg por 1 min). La suspensión celular fue centrifugada a 14,000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se incubó en hielo hasta la medición de la señal de fluorescencia, cuya medición se hizo de la misma forma que en las células completas.

Consumo de oxígeno en los cultivos control y estrés salino.

Las células de *D. hansenii* crecidas en medio sin sodio o en presencia de NaCl 1 M y 2 M se colectaron por centrifugación; el paquete celular se lavó dos veces con H₂O destilada y se resuspendió al 50% de su peso con H₂O destilada (peso húmedo/volumen). El consumo de oxígeno de las células intactas se determinó con un electrodo tipo Clark, en una cámara cerrada de 5 mL con un agitador magnético a temperatura constante de 30°C y con un sistema de adquisición y graficado de datos por computadora. En la cámara se colocó el amortiguador MES-TEA 10 mM pH 6, glucosa 20 mM, y después de 20 seg de monitoreo se añadieron 50 µL de la suspensión de levaduras. Para registrar el estado desacoplado de la respiración, después de 100 seg se añadió CCCP 10 µM. Y para la presencia de la Oxidasa Alterna a los 100 seg se añadió NaCN 200 mM y octil-galato 20 µM.

Concentración de ATP ante el estrés salino.

Las células de *D. hansenii* crecida en medio sin sodio o en presencia de NaCl 1 M y 2 M se colectaron por centrifugación; el paquete celular se lavó dos veces con H₂O destilada y se resuspendió al 50% de su peso con H₂O destilada (peso húmedo/volumen). El ATP se extrajo con ácido perclórico; para ello, en un tubo de ensaye de 15 mL se añadió 1 mL de ácido perclórico al 70% (HClO₄) a 4°C y 2 mL de la suspensión celular. El tubo se mezcló en el vórtex por 30 seg; luego se dejó la muestra durante 20 min en hielo, agitando los tubos cada 5 min. Después se centrifugaron las muestras a 3,200 rpm por 5 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, al que se le adicionaron 20 µL del indicador de pH (azul de metileno 0.05% - rojo neutro 0.05% en Etanol al 96%), mezclando por agitación en el vórtex, y luego se neutralizó el ácido perclórico con KOH 10 M (en este procedimiento la muestras se mantuvieron en hielo). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 3,200 rpm por 5 min, y se colocaron en hielo.

La concentración de ATP presente en los extractos se determinó por una reacción acoplada a enzimas. En esta determinación se colocó en una celda:

MES-HCl (50 mM) pH 7.5 40 mM, cloruro de magnesio 4 mM, NADP⁺, glucosa 10 mM y 500 µL del extracto en un volumen final de 2 mL. La celda se colocó en un espectrofotómetro de doble rayo (SLM AMINCO) y se midió la absorbencia a 340 nm que corresponde a la basal (A₁). Después de esperar a la estabilización de la señal, se adicionó la enzima Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH Sigma Aldrich Co., Número de catalogo G-7877 a una concentración final de 16.7 U/mL y se registró la lectura de la segunda señal hasta el máximo (A₂). Finalmente se añadió la enzima hexocinasa (HK, Sigma Aldrich Co., Número de catalogo H-5625 a una concentración final 13.2 U/mL), obteniéndose la tercera lectura (A₃). La cantidad de ATP presente en los extractos celulares se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Conc. ATP} = \frac{\overset{1}{\Delta \text{ DO (A}_3\text{-A}_2\text{)}} * (\text{Vol. total de la celda}) * (\text{Vol. total exto.})}{\underset{3}{(\epsilon_{\text{NADPH}})} * (\text{Vol. Exto para determinación}) * (\text{g de lev para exto.})}$$

$$\epsilon_{\text{NADPH}} = 6.317 \cdot 10^3 \text{ L/mol}^{-1} \cdot \text{cm}$$

1.- 2.0 mL, 2.- variable, 3.- 0.5 mL, 4.- 1.0 g

Preparación de estándares de 3-nitrotirosina y nitrotriptofano.

Los estándares de 3-nitrotirosina y nitrotriptofano se obtuvieron mediante la reacción de peroxinitrito con los aminoácidos aromáticos tirosina o triptófano (Tyr y Trp). El peroxinitrito se preparó de acuerdo al protocolo de Kato *et al.* (1997), que incluye la reacción de formación de ión superóxido y después la reacción con NaNO₂. La primera reacción se hizo en un tubo Eppendorf a 4 °C, al cual se le añadieron 50 µL de HCl 2N y 700 µL de H₂O₂. El producto de la reacción se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL, en el que se realizó la segunda reacción con 1 ml de NaNO₂ (0.6 M), y después de agitar 15 seg en el vórtex se añadieron 2 mL de NaOH 1.5 M y se incubó en hielo. Para la reacción del peroxinitrito con los aminoácidos aromáticos Tyr y Trp, se preparó una solución de 1 mL de dichos

aminoácidos 1 mM, con amortiguador de fosfatos (0.1 M concentración final) pH 7.2. A cada solución de los aminoácidos se le adicionaron 7 μ L de peroxinitrito; cada tubo se agitó en el vortex y se incubó a temperatura ambiente por 30 min y posteriormente en hielo.

Cromatografía en capa fina de 3-nitrotirosina y nitrotriptofano.

Para realizar las cromatografías en capa fina, primero se hicieron capilares de vidrio de 1.0 cm, uno para cada muestra, estándares o extractos. Se utilizaron placas de silica gel 60 (Merck) de 10 X 10 cm. En cada placa se marcó con lápiz una línea a 1 cm de la base, y sobre la línea se marcaron 5 puntos de 1 cm, donde se depositaron con los capilares un volumen de muestra proveniente de 25 μ g de proteína del extracto celular (extracto soluble de la precipitación con etanol). Una vez colocadas las muestras, se secaron a temperatura ambiente. Para la fase móvil de la cromatografía se utilizó una solución de butanol: ácido acético: H₂O (55:15:30). A la cámara de elución se le colocaron 100 mL de la solución de corrida, hasta que saturó con el vapor de dicha solución. Se colocó la placa de silica sin que sobrepasara la línea dibujada con lápiz. La cromatografía se llevó hasta que la solución de corrida cubriera la parte superior de la placa. Después de secar la placa a temperatura ambiente, se roció con una solución de ninhidrina al 0.2% disuelta en etanol al 96%, y posteriormente se colocó por 10 min en una estufa a 100°C. La distancia que migró cada muestra se midió y se obtuvo el factor de retención (R_f) (este cálculo se obtuvo mediante la distancia recorrida de la muestra entre la distancia recorrida por el disolvente). Se tomó como distancia de la muestra la distancia comprendida entre la línea trazada donde se depositó la muestra y el centro de la mancha.

Espectrofotometría de fluorescencia para los estándares de 3-nitrotirosina y nitrotriptofano.

En una celda de vidrio se añadió el volumen de muestra de extracto celular que correspondía a 250 µg de proteína y se ajustó a un volumen final de 2 mL con amortiguador HEPES (10 mM) NaCl (150 mM) pH 7.5. Los espectros de emisión se obtuvieron con una longitud de onda de excitación de 325 nm y se registró la señal de fluorescencia entre 350 nm y 450 nm. Los espectros de excitación se obtuvieron con una longitud de onda de emisión de 418 nm, y se registró la señal de fluorescencia entre 250 y 410 nm. Los espectros de los estándares de 3-nitrotirosina y nitrotriptofano se obtuvieron con diluciones de 3-nitrotirosina 1:100 y nitrotriptofano 1:10 (las diluciones se realizaron tomando una alícuota correspondiente de los estándares, 20 µL y 200 µL, agregando 1,980 µL y 1,800 µL del amortiguador HEPES (10 mM) NaCl (150 mM) pH 7.5, respectivamente.

Determinación de 3-nitrotirosina o nitrotriptofano por espectrofotometría de fluorescencia.

Los cultivos de *D. hansenii* de las condiciones control sin sodio y de los tratamientos con NaCl 1 M y 2 M se cosecharon y lavaron con agua estéril. 200 mg de cada paquete celular se resuspendieron en 500 µL de HEPES (10mM)-NaCl (150 mM) y 5 µL de PMFS (1mM); las células se rompieron mecánicamente por agitación con perlas de vidrio como se describió anteriormente. El lisado obtenido se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL. El tubo Eppendorf que contenía el sobrenadante se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 95% y este volumen de lavado se colocó en el tubo Falcon de 15 mL; después el tubo Falcon se agitó en el vortex por 15 seg y se incubó toda la noche a -20°C. Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 5,000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a dos tubos Eppendorf limpios (dos tubos por sobrenadante de cada muestra) y el etanol presente en el sobrenadante se evaporó por centrifugación y vació a temperatura ambiente en un aparato tipo Speed Vacc (Eppendorf) por 2 hrs o hasta que en cada tubo quedaran aprox. 100 µL de extracto. Los extractos se mantuvieron en hielo y el volumen de

los concentrados de dos tubos por muestra se juntaron para tener el extracto concentrado en un solo tubo (200 μ L). Posteriormente el volumen de los extractos fue ajustado hasta 1 mL con el amortiguador HEPES (10 mM) NaCl (150 mM) pH 7.5; y para cada muestra se cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Posteriormente los extractos fueron colocados en hielo para su uso inmediato o bien a -20°C .

Cuantificación de aminoácidos totales libres.

La concentración de los aminoácidos totales libres se determinó por el método modificado de la ninhidrina (Misra *et al.*, 2006). De los extractos etanólicos, se tomó un volumen de 0.05 mL y se transfirió a un tubo de ensayo de vidrio de 15 mL. Se le añadió 3.8 mL del reactivo de ninhidrina [1% de ninhidrina en un amortiguador de citrato 0.5 M pH 5.5, glicerol (87%), y amortiguador de citrato 0.5 M pH 5.5 en una relación de 5:12:2 respectivamente], y se mezcló por agitación en el vórtex durante 30 seg. Los tubos de ensayo se calentaron en un baño María en ebullición por 10 min, y se enfriaron por incubación de 5 min en hielo. En una celda de vidrio se pusieron 3 mL de cada muestra; la celda se colocó en un espectrofotómetro (Beckman DU 650) tomando la lectura de absorbencia a 570 nm (la lectura se tomó contra un blanco de etanol al 80%). Las lecturas de absorbencia se convirtieron a mg de aminoácidos g^{-1} de peso fresco de levadura tomando como referencia una curva estándar de glicina. La curva estándar se preparó a partir de un stock de glicina de 3 mg/mL, y en un volumen constante de 50 μ L se prepararon las siguientes soluciones de glicina: 0.05, 0.075, 0.1, 0.15, 0.3, y 0.45 mg/mL. Se midió la absorbencia de cada concentración conocida de glicina y se graficaron los datos de absorbencia contra cada una de las concentraciones conocidas. En el programa de cálculo Excel; se hizo el ajuste para obtener la ecuación de una línea recta por el método de mínimos cuadrados. A partir de la ecuación de la línea recta y con los datos de la lectura de absorbencia de las muestras de concentración desconocida se obtuvo la concentración de glicina que se utilizó como valor estimado de la concentración de aminoácidos totales.

Cuantificación de nitratos y nitritos (especies reactivas de nitrógeno (ERN's)).

Los nitritos y nitratos se determinaron mediante la reacción de Griess en presencia de cadmio. Se utilizaron lentejas de cadmio activadas mediante lavados con CuSO_4 5% y H_2O destilada (2 veces), HCl 0.1 N (2 veces), y H_2O destilada abundante. Las lentejas activadas se almacenaron en una solución de NH_4Cl al 5%. De las muestras de extractos etanólicos, se tomó una alícuota de 200 μL que corresponde a 50 mg de proteína la cual se colocó en un tubo de ensaye de vidrio y se le agregaron 50 μL de ZnSO_4 al 30%. El tubo de ensaye se agitó en el vórtex por 30 seg y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min; luego se le añadieron 3 lentejas de cadmio y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Las lentejas de cadmio se retiraron con unas pinzas de metal lavadas con etanol y a cada tubo de ensaye se le agregaron 1.5 mL de una solución de N,N-naftil-etilendiamina-HCl (0.1%) y sulfanilamida (1%) en un proporción 1:1. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Luego se leyó la absorbencia a una λ de 548 nm. Como blanco de la lectura de absorbencia se utilizó una solución de N,N-naftil-etilendiamina-HCl y sulfanilamida en un proporción 1:1 diluida con 0.5 mL de H_2O destilada.

La concentración de nitratos y nitritos de los extractos se determinó por comparación de las lecturas de absorbencia contra los datos de una curva estándar de NaNO_3 5 mM y NaNO_2 10 mM. Con los valores de absorbencia obtenidos de la curva, se realizó el mismo procedimiento mencionado en la curva de glicina, para obtener el valor real de cada muestra.

Curva de crecimiento.

D. hansenii fue cultivada durante toda la noche en medio YPD, y se inoculó en YPD fresco, YPD con NaCl 2 M con o sin tirosina 5 mM, y/o 10 μM de α -tocoferol. El crecimiento se registró en un espectrofotómetro (Bioscreen) a 600 nm de longitud de onda, 28°C y en agitación constante, durante 140 hrs.

RESULTADOS

Medición de especies reactivas de oxígeno (ERO's) en células de *D. hansenii* expuestas a 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína.

Para determinar si el estrés hipersalino genera ERO's en las células de *D. hansenii*, se determinó la presencia de radicales libres por su reacción con 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCDHF-DA); en esta reacción los radicales libres oxidan a la DCDHF-DA para formar 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). La formación de DCF se determinó durante la exposición de las células durante 1 hr con DCDHF-DA. En la figura 5 se observa que los valores de fluorescencia de DCF en *D. hansenii* crecida en medio YPD control y YPD NaCl 1 M son similares; implicando que en ambas condiciones la formación de ERO's es la misma. En el medio YPD NaCl 2 M se observa que el valor de fluorescencia de DCF es mayor al de YPD control y NaCl 1 M.

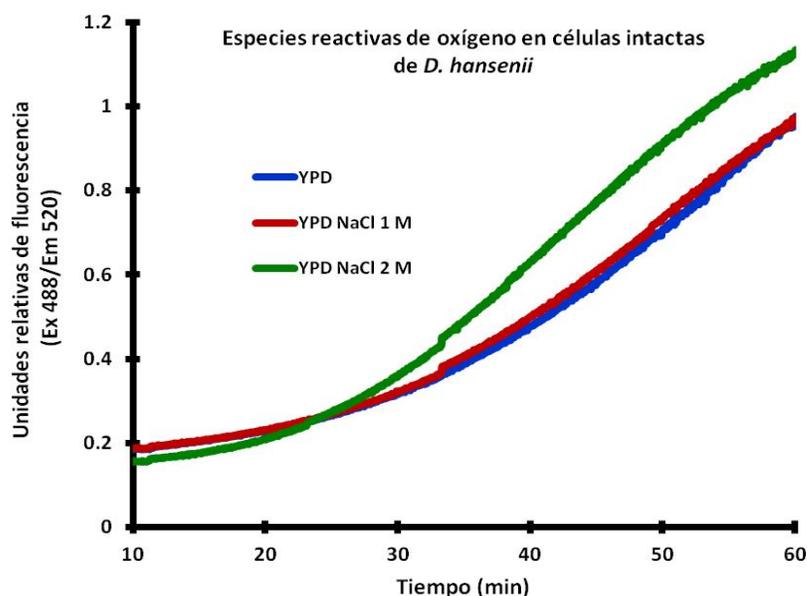


Figura 5. Producción de especies reactivas de oxígeno en células de *D. hansenii* durante el estrés salino. Las células cultivadas en medio YPD sin o con 1 M y 2 M de NaCl se cosecharon y se incubaron por 30 min con MES-TEA 0.1 M pH 6 y DCDHF-DA 10 μ M. La fluorescencia de DCDHF-DA se midió a 488 nm de excitación y 520 nm de emisión. Los datos son el resultado del promedio de tres experimentos independientes.

Al determinar la presencia de las ERO's en extractos celulares (figura 6), se encontró el mismo resultado que en las células intactas. En las condiciones de crecimiento control y NaCl 1 M, las concentraciones de radicales libres de oxígeno producidas son similares; mientras que en la condición de NaCl 2 M, se volvió a observar el aumento de las ERO's.

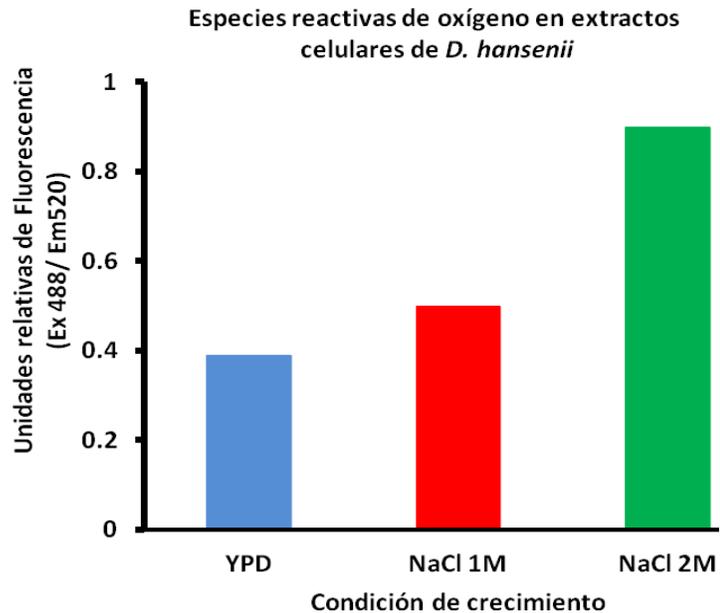


Figura 6. Producción de especies reactivas de oxígeno en extractos celulares de *D. hansenii* durante el estrés salino. Se incubaron células de *D. hansenii* con DCDHF-DA 10 μ M por 30 min y por ruptura con perlas de vidrio se obtuvieron extractos celulares de *D. hansenii*. La fluorescencia de DCDHF-DA se midió a 488 nm de excitación y 520 nm de emisión. Los datos son el resultado del promedio de tres experimentos independientes.

Respiración.

Considerando que en la mitocondria se lleva a cabo la respiración celular y que este proceso es una de las principales fuentes de generación de las ERO's; se decidió evaluar si el aumento de las ERO's durante el estrés por NaCl 2 M se relacionaba con un cambio en la respiración celular, para ello se midió el consumo de oxígeno. En la figura 7 se muestra que en presencia de NaCl 1 M, la levadura consume más oxígeno que la cultivada sin sodio; mientras que en presencia de

NaCl 2 M el consumo de oxígeno es mayor a la condición control sin sodio o con NaCl 1 M.

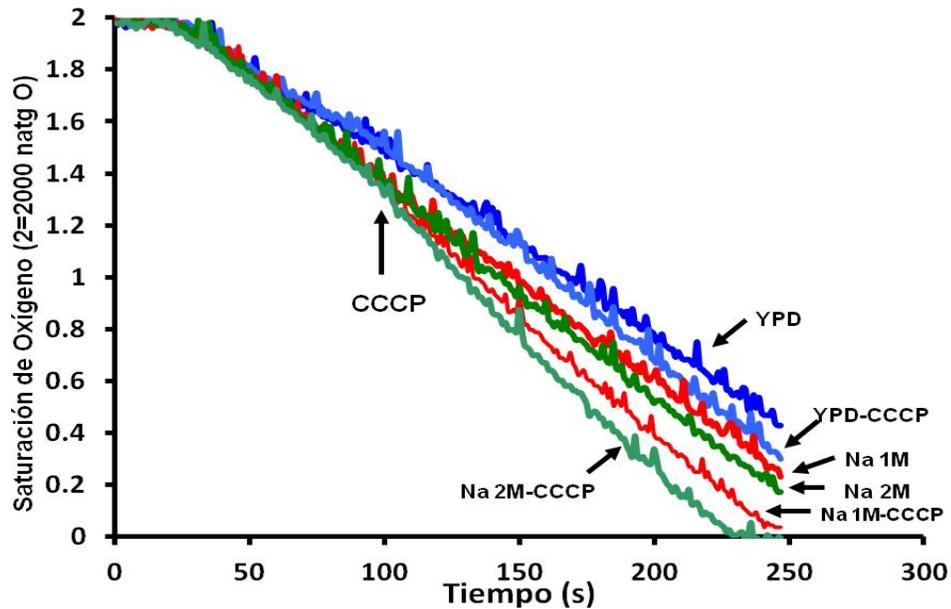


Figura 7. Respiración de *D. hansenii* expuesta al estrés salino. Células intactas de *D. hansenii* se incubaron en una cámara cerrada a 30°C en presencia del amortiguador MES-TEA pH 6, 10 mM y glucosa 20 mM en un volumen final de 5 mL. A los 100 seg se añadió CCCP 10 μ M. La respiración fue medida con un electrodo tipo Clark. Los datos son el resultado del promedio de tres experimentos independientes.

Para conocer la capacidad respiratoria máxima en cada condición experimental, se añadió CCCP, un desacoplante de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. En presencia de este desacoplante, se confirmó que el consumo de oxígeno en *D. hansenii* es mayor en presencia de sodio, y que la capacidad máxima respiratoria se observó en las células crecidas en NaCl 2 M (figura 8).

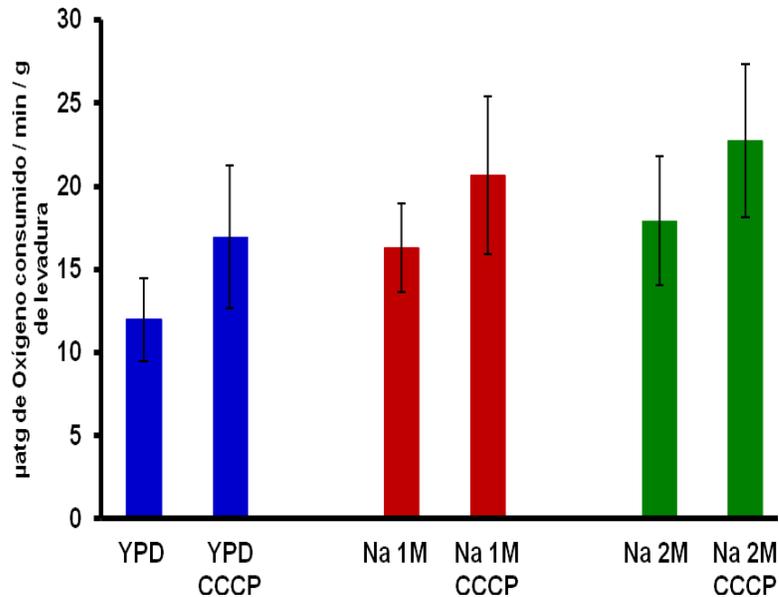


Figura 8. Capacidad respiratoria de *D. hansenii* durante estrés salino. Consumo de oxígeno antes y después de añadir 10 μM CCCP a células intactas de *D. hansenii*.

En *D. hansenii* expuesta al estrés por NaCl 2 M y en fase de crecimiento estacionaria se ha reportado la presencia de una oxidasa alterna (OXA) que acelera la respiración (Veiga *et al.*, 2003). Para evaluar si la OXA aumenta la capacidad respiratoria de *D. hansenii* en la fase de crecimiento logarítmica y en presencia de NaCl 2 M, se midió el consumo de oxígeno de esta levadura en presencia de cianuro; debido a que la respiración resistente a cianuro es una característica del funcionamiento de la oxidasa alterna. También se añadió octil-galato, un inhibidor específico de la oxidasa alterna, mostrando una inhibición mayor en ausencia de sal (figura 9).

Con el fin de valorar el efecto de NaCN y el octil-galato en la capacidad respiratoria de *D. hansenii*, se calculó la velocidad de la respiración a partir del consumo de oxígeno de cada condición de crecimiento (Tabla 1) y se observó que la velocidad de la respiración es menor en presencia de NaCl 2M. Sin embargo como la diferencia entre los valores de velocidad fue pequeña, se obtuvo el cociente de las velocidades del control y los tratamientos, con este valor se puede determinar con mayor precisión si hay una estimulación o inhibición de la

respiración (si el valor del cociente es < 1 se habla de estimulación y si es > 1 se habla de una inhibición).

Considerando solo el cociente de control/cianuro se observó que existe una estimulación en las tres condiciones, es decir existe una respiración resistente al cianuro. Y la estimulación es mayor en YPD (Tabla 2).

Cuando se añadió el octil-galato el valor del cociente (control/ los datos del cianuro+octil-galato) fue mayor a uno, esto confirma la inhibición observada en los gráficos del consumo de oxígeno (figura 9). La inhibición se presenta en las tres condiciones, con la mayor inhibición en la condición de NaCl 2M. En este punto se inhibe la cadena respiratoria principal con el cianuro y el octil-galato inhibe a la oxidasa alterna (Tabla 2).

Sin embargo, se observa que a pesar de esta inhibición existe una respiración residual ya que en NaCN + octil-galato la pendiente es diferente a cero en las tres condiciones de respiración (Tabla 1).

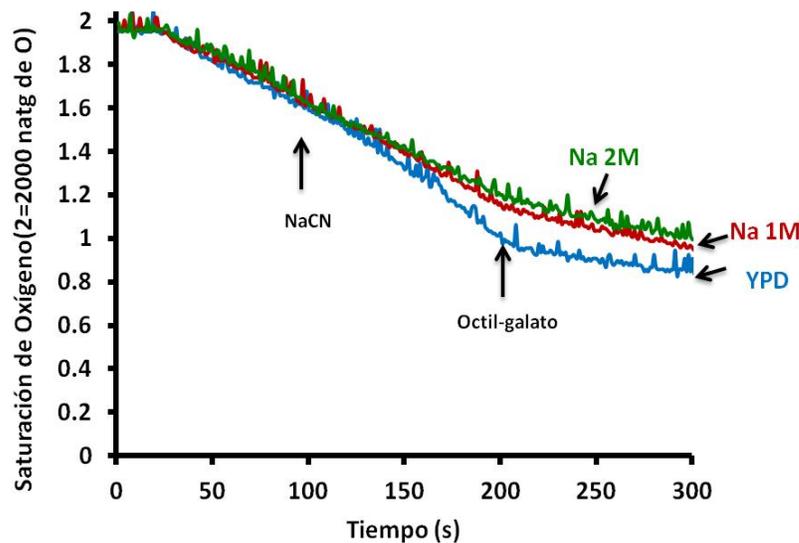


Figura 9. Capacidad respiratoria de *D. hansenii* en presencia de cianuro y octilgalato. Consumo de oxígeno en presencia de cianuro y octilgalato. Células intactas de *D. hansenii* se incubaron en una cámara cerrada a 30°C en presencia del amortiguador MES-TEA pH 6.0 10 mM y glucosa 20mM en un volumen final de 5 mL. A los 100 seg se le añadió NaCN 200 mM, y a

los 200 seg octil-galato 20 μ M. La respiración se midió con un electrodo tipo Clark. Los datos son el resultado del promedio de tres experimentos independientes.

Tabla 1. Velocidad de la respiración en las diferentes condiciones de crecimiento y en presencia de inhibidores. Los datos se muestran en $\text{natg O} / \text{min} / \text{mg}$ levadura.

	YPD	NaCl 1M	NaCl 2M
Control	0.0021	0.0019	0.0018
NaCN	0.003	0.0023	0.0021
Octil-galato	0.0006	0.0008	0.0008
NaCN+octil-galato	0.002	0.0017	0.0016

Tabla 2. Cociente de los valores de respiración en presencia y ausencia de inhibidores. Para este cálculo se tomaron los datos de la tabla 1 y se dividieron como está indicado.

	YPD	NaCl 1M	NaCl 2M
Control / NaCN	0.7	0.82	0.85
Control / NaCN + octil-galato	1.05	1.11	1.12

Concentración de ATP durante estrés salino.

En otras levaduras se ha reportado que durante el estrés salino aumenta el consumo de ATP (Petrovič, 2006). Para determinar si en *D. hansenii* expuesta al estrés salino, el gasto energético sufre algún cambio, se midió la concentración de ATP en presencia de NaCl. En la figura 10 se observa que el nivel de ATP fue mayor en ausencia de NaCl (YPD) y conforme aumentó la concentración de sodio (1 y 2 M), el ATP disminuyó. La disminución del ATP en presencia de NaCl 2 M implicaría que en esta condición de crecimiento, la célula tiene un mayor consumo de ATP, generado por la presencia de sal y el aumento en los niveles de ERO's.

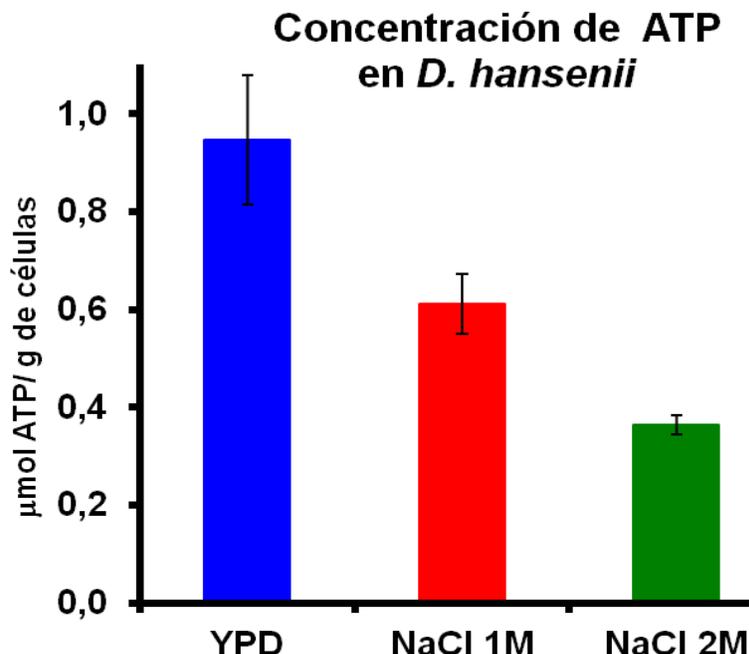


Figura 10. Concentración de ATP en extractos celulares de *D. hansenii* en ausencia y presencia de NaCl. El ATP presente en los extractos con ácido se determinó por una reacción acoplada a enzimas en un espectrofotómetro de doble rayo (SLM AMINCO), la absorbencia se midió a 340 nm. Los datos son el resultado del promedio de seis experimentos independientes \pm desviación estándar.

Formación de 3-nitrotirosina durante estrés salino de la levadura *D. hansenii*.

Retomando el trabajo previo sobre la caracterización del aumento del ARN mensajero y la actividad de Aro4p sin el aumento de tirosina (Calderón-Torres *et al.*, 2011), se decidió evaluar si podría existir un subproducto generado por la oxidación de la tirosina, durante el estrés oxidante en la levadura.

Considerando que la oxidación de aminoácidos aromáticos en las proteínas es el resultado del estrés oxidativo en general, se decidió evaluar si la oxidación de tirosina y podrían ser el resultado del aumento en la producción de ERO's durante el estrés salino.

Tomando en cuenta que uno de los productos de la oxidación de la tirosina y del es la 3-nitrotirosina y el nitrotriptofano, se evaluó la presencia de estos metabolitos en extractos etanólicos obtenidos durante estrés salino mediante una cromatografía de capa fina. Para ello se prepararon estándares de 3-nitrotirosina y

nitrotriptofano mediante la reacción de aminoácidos aromáticos con peroxinitrito (Kato *et al.*, 1997). En la figura 11 se muestra que tanto en el crecimiento sin sales, como en presencia de NaCl 1 y 2 M, la 3-nitrotirosina fue el producto principal y no el nitrotriptofano. Aunado a lo anterior se observó que la intensidad de la banda que corresponde a la 3-nitrotirosina es mayor en la condición de estrés salino por NaCl 2 M.

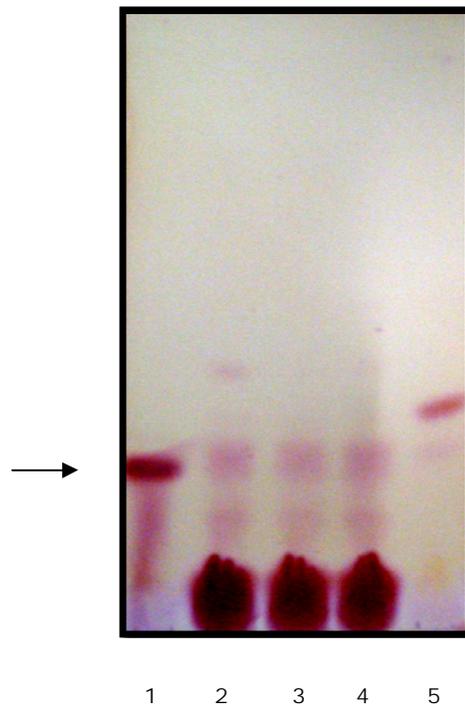


Figura 11. Cromatoplaaca de capa fina, revelada con ninhidrina, a partir de extractos etanólicos de *D. hansenii* expuesta al estrés salino. Estándares de 3-nitrotirosina (1) y nitrotriptofano (5), muestras de YPD control (2), NaCl 1M (3), NaCl 2M (4). La flecha indica que la banda principal corresponde a la 3-nitrotirosina.

Con el fin de confirmar la presencia de 3-nitrotirosina en los extractos etanólicos de *D. hansenii* durante el estrés salino, se compararon los espectros de fluorescencia de excitación y emisión de los estándares de 3-nitrotirosina y nitrotriptofano con los espectros de los extractos celulares etanólicos de *D. hansenii*. En las figuras 12 y 13 se observa que los valores máximos de fluorescencia de excitación (a una λ emisión 418 nm) y emisión (a una λ excitación 325 nm) del estándar de 3-nitrotirosina son semejantes a los que se obtuvieron en los extractos celulares de *D. hansenii* y que estos patrones no corresponden a los

espectros del estándar de nitrotriptofano. Se encontró también que tanto en la condición control como en la de NaCl 1 M, la fluorescencia de 3-nitrotirosina fue similar; sin embargo, el mayor aumento fue en presencia de NaCl 2 M.

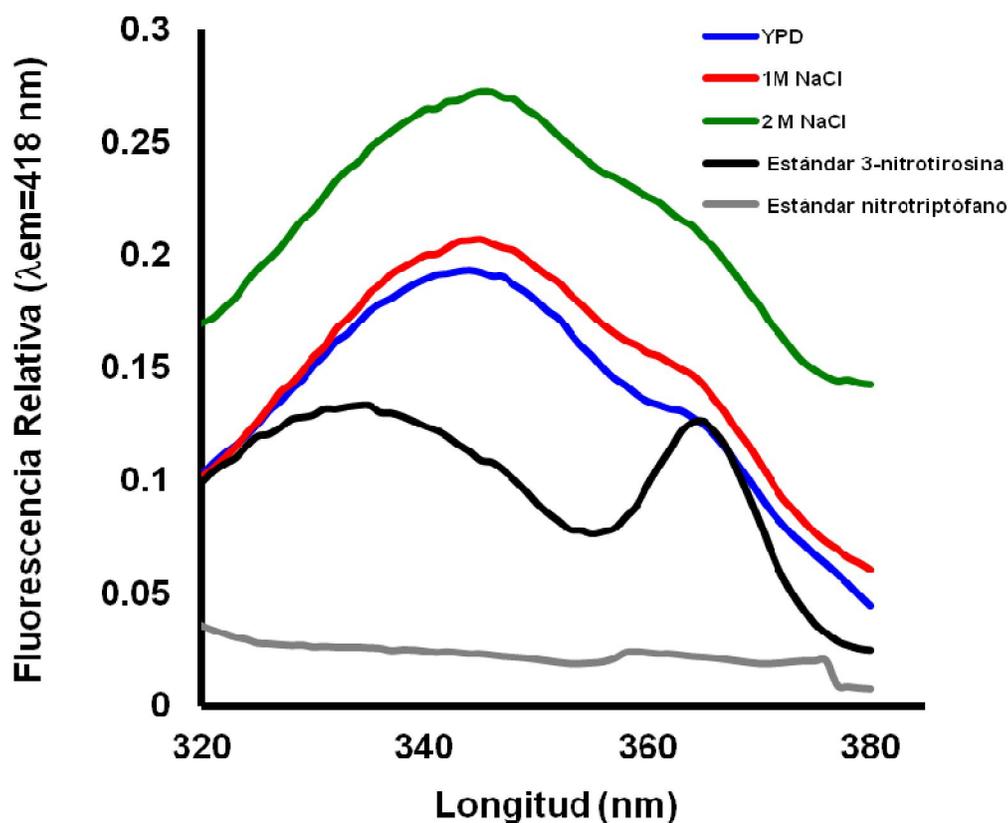


Figura 12. Espectro de fluorescencia de excitación ($\lambda_{em}=418\text{nm}$) de 3-nitrotirosina, en extractos etanólicos de *D. hansenii* expuesta al estrés salino. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

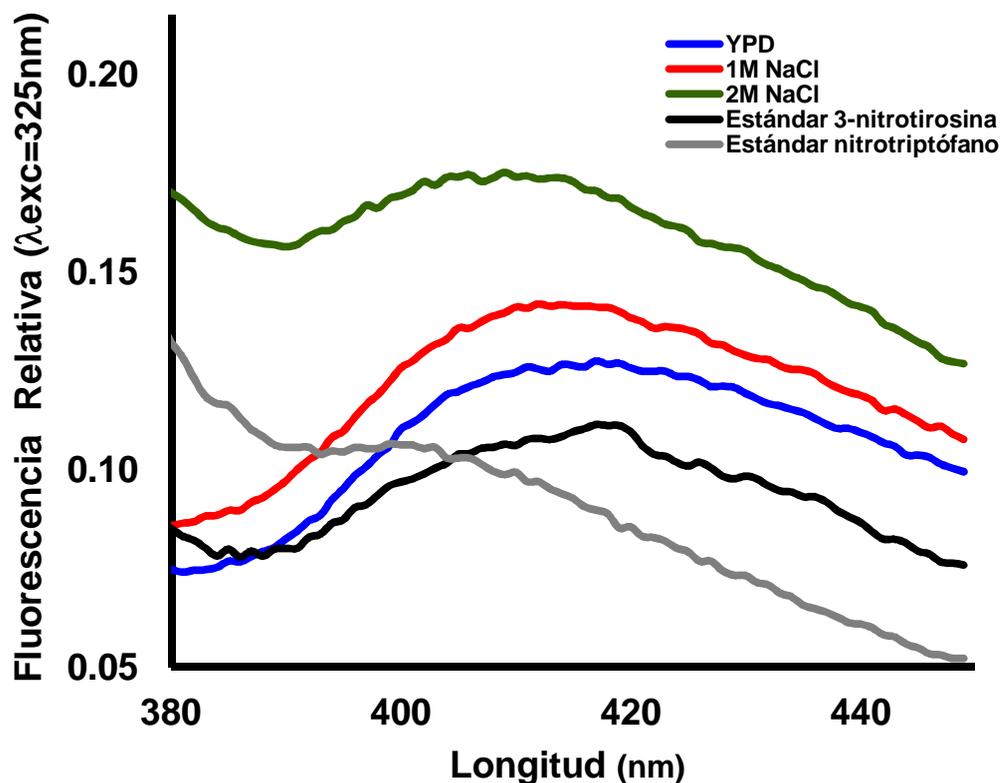


Figura 13. Espectro de fluorescencia de emisión ($\lambda_{exc}=325nm$) de 3-nitrotirosina, en extractos etanólicos de *D. hansenii* expuesta al estrés salino. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Para explorar si la formación de 3-nitrotirosina puede ocurrir en *D. hansenii* ante la presencia de peroxinitrito (formado por la reacción del ión superóxido con el Oxido Nítrico, Figura 4), en extractos etanólicos de *D. hansenii*, se estimó la presencia de óxido nítrico por la medición indirecta de la concentración de nitratos y nitritos. En las mitocondrias de levaduras expuestas a hipoxia se ha observado la producción de Oxido Nítrico (NO^{\bullet}) a partir de nitrito por la citocromo C oxidasa que reduce el nitrito a NO^{\bullet} (Castello *et al.*, 2006). En la tabla 3, se observa que la concentración de nitratos y nitritos tanto en YPD control, como en presencia de sal es la misma.

Tabla 3. Medición de nitratos y nitritos en extractos etanólicos de *D. hansenii* durante estrés salino.

Condición	Nitritos (μM)	Nitratos (μM)
YPD	5 ± 0.05	4.98 ± 0.28
NaCl 1M	5.49 ± 0.18	5.45 ± 0.16
NaCl 2M	5.56 ± 0.14	5.51 ± 0.10

Los resultados son el promedio \pm desviación estándar de 6 experimentos independientes.

Curvas de Crecimiento.

Para esclarecer el posible papel de la tirosina durante la adaptación de *D. hansenii* a la alta salinidad, a un cultivo expuesto al estrés por NaCl 2 M se le añadió tirosina 5 mM. En la figura 14 se muestra la adición de 5mM de tirosina, mejora el crecimiento de *D. hansenii* en NaCl 2M.

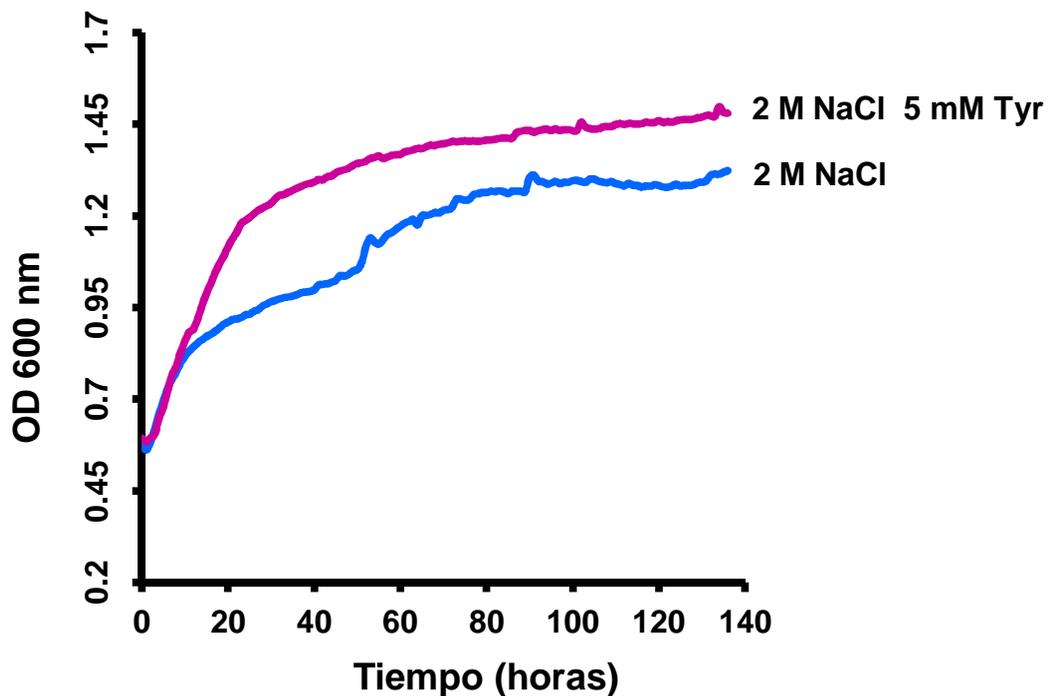


Figura 14. Crecimiento de *D. hansenii* en medio YPD-NaCl 2M, con o sin 5 mM de tirosina. El crecimiento de *D. hansenii* se realizó en medio líquido y se registró en un espectrofotómetro automático a una $\lambda_{600 \text{ nm}}$ por 140 h. Los datos son el resultado del promedio de tres experimentos independientes.

Para evaluar si la reacción de la tirosina con las ERO's hasta la formación de 3-nitrotirosina puede ser considerado como un mecanismo antioxidante que mejora el crecimiento de *D. hansenii* durante estrés salino; se decidió incluir en los medios de cultivo de YPD NaCl 2 M el antioxidante α -tocoferol, que al igual que la tirosina tiene un grupo fenólico con un grupo radical OH que puede ser oxidado por las ERO's. En la figura 15, se observa que en *D. hansenii* la optimización del crecimiento es mayor con la adición de α -tocoferol y tirosina en NaCl 2M.

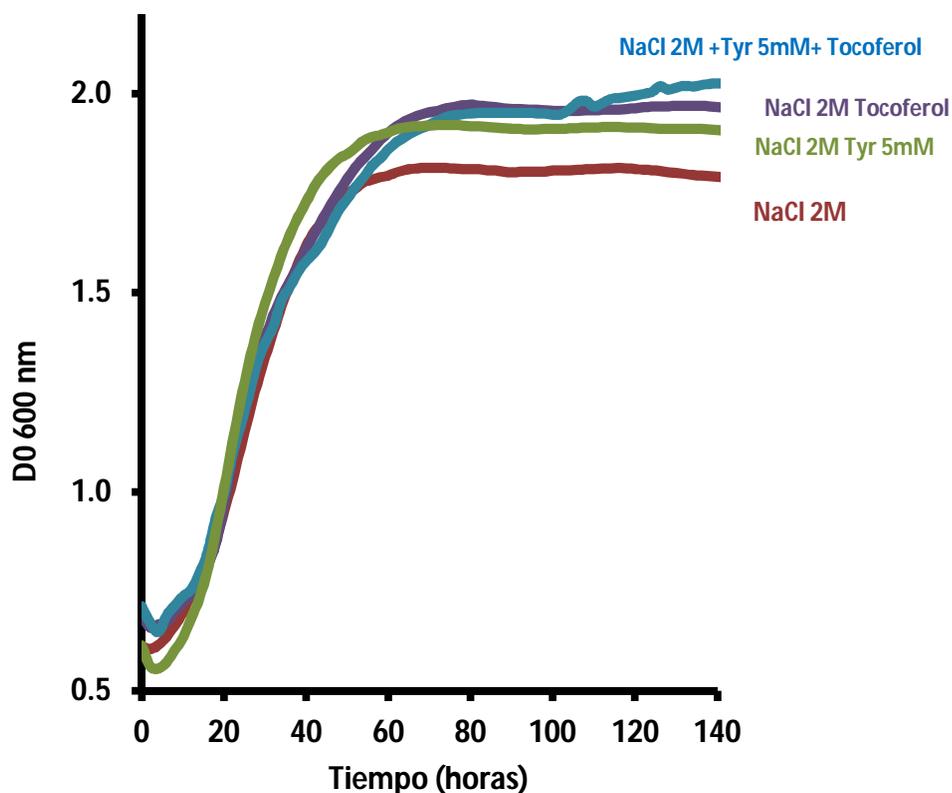


Figura 15. Crecimiento de *D. hansenii* en medio YPD-NaCl 2M, con o sin 5 mM de tirosina y 10 μ M α -tocoferol. El crecimiento de *D. hansenii* en medio líquido se registró en un espectrofotómetro a una λ_{600nm} por 140 hrs. Las curvas corresponden a un experimento independiente de tres repeticiones.

DISCUSIÓN

Como ya se reportó en el estudio previo de Calderón-Torres *et al.* (2011) sobre la expresión genética de *D. hansenii* expuesta a estrés hipersalino, el ARN mensajero del gen *DhARO4* y la actividad específica de la enzima codificada por *DhARO4* aumentan en esta condición estresante, pero no encontraron que la concentración de tirosina aumentara también. Considerando los resultados anteriores, en este trabajo se evaluó la hipótesis de que la ausencia significativa de un nivel alto de tirosina en contraste con la actividad elevada de *DhAro4p* durante estrés salino fuera el resultado de la formación de subproductos de la tirosina recién sintetizada.

Los subproductos de la tirosina pueden ser: radical tirosilo, fosfotirosina, tirosina 3-hidroxilasa, 3-nitrotirosina, y ditirosina (Ischiropoulos *et al.*, 1998). Se ha demostrado que uno de los subproductos que con mayor frecuencia se encuentra en proteínas modificadas por agentes oxidantes es la 3-nitrotirosina. La 3-nitrotirosina es el producto que resulta de la reacción entre el peroxinitrito y la tirosina. El peroxinitrito es un oxidante formado por la reacción entre dos radicales libres: el óxido nítrico (NO[•]) y superóxido.

La nitración es una modificación química que se utiliza para investigar el papel funcional de los residuos de tirosina y su efecto en la función enzimática o la actividad específica de las proteínas. El estrés oxidante produce la nitración de la tirosina; por ello, la presencia de 3-nitrotirosina en las proteínas se utiliza como un marcador de daño por ERO's durante el estrés oxidante (Gow *et al.*, 1998).

Considerando que uno de los principales subproductos de la tirosina durante estrés oxidante es la 3-nitrotirosina, en este trabajo se decidió determinar si hay agentes oxidantes (especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno) durante el estrés salino que pudiesen conducir a la formación de 3-nitrotirosina. Al determinar las especies reactivas del oxígeno, se observaron niveles elevados en

la condición del estrés salino por NaCl 2 M, tanto en los extractos celulares como en las células intactas de *D. hansenii*.

Cabe destacar que en los extractos celulares, los niveles de ERO's fueron mayores a los encontrados en las células intactas; esta diferencia probablemente sea el resultado de una mayor degradación de los componentes celulares en los extractos, lo que puede conducir a una mayor concentración de ERO's con los que puede reaccionar la 2'7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína.

Por lo que respecta a las especies reactivas de nitrógeno (ERN's), se encontró que los niveles nitritos y nitratos fueron iguales, tanto en ausencia como presencia del estrés por sodio. Lo anterior se puede explicar si se considera que los niveles de ERO's aumentan cuando se incrementa la concentración de sodio en el medio; pero en esta condición también aumentarían los niveles de peroxinitrito. Si el peroxinitrito reacciona con la tirosina recién sintetizada, entonces los niveles de nitritos si pueden ser similares con y sin sodio. Y se puede concluir que la formación de nitrotirosina podría estar evitando el aumento de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

Una vez confirmada la generación de ERO's y de ERN's en *D. hansenii*, se decidió evaluar si este aumento se debía a un cambio en la respiración mitocondrial. En este organelo es en donde se generan ERO's de forma natural, ya que en el pasaje electrónico de la cadena respiratoria que va desde la NADH-ubiquinona reductasa (Complejo I) hasta la ubiquinol-citocromo c reductasa (Complejo III) algunos electrones pueden "escaparse" y reaccionar con el O₂ para formar radicales libres. Por ello el consumo de oxígeno es un índice de la producción de ERO's. Y en efecto, al medir el consumo de oxígeno de *D. hansenii* cultivada en NaCl, se encontró un aumento en la respiración en comparación con los cultivos sin sodio. Indicando que en presencia de estrés salino sí ocurrió un cambio en la respiración que resultó en una mayor generación de ERO's, como previamente se había encontrado. Esto parece deberse a un sistema antioxidante insuficiente en presencia de concentraciones elevadas de sodio. Es importante

remarcar que el aumento en la respiración que se observó durante estrés salino es similar al que encontraron Sánchez *et al.* (2008).

El aumento del consumo de oxígeno durante estrés por NaCl 2M, se confirmó agregando CCCP, que desacopla la cadena de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa; el desacoplamiento se produce porque el CCCP hace permeable a los protones de la membrana interna mitocondrial, impidiendo la relación obligada entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. Cuando esto ocurre hay una inhibición de la producción de ATP al no generarse el gradiente de pH pero la cadena de transporte de electrones sigue funcionando libremente; a esto se le conoce como capacidad máxima respiratoria. Nuestros resultados en presencia de CCCP también revelaron una mayor capacidad respiratoria en las células cultivadas en presencia de sodio, que es mayor en NaCl 2 M.

En *D. hansenii* cultivada en sodio, el consumo de oxígeno aumentó, tanto en ausencia como en presencia de CCCP; este aumento puede ser el resultado de una mayor demanda de energía necesaria para activar los mecanismos de respuesta y contrarrestar los efectos de las sales, tales como la producción elevada de glicerol y la expulsión de cationes (Petrovič, 2006). También puede deberse a la mayor demanda de energía, debida a la disminución de los niveles de ATP que se detectaron en las células crecidas en presencia de NaCl.

El estrés oxidante puede influir en el nivel de ATP de las células (Gille y Sigler, 1995; Petrovič, 2006); dado que la cadena respiratoria mitocondrial es la principal fuente de ERO's en las células aeróbicas (Gille y Sigler, 1995). Se ha reportado que la NADH deshidrogenasa es un blanco de intoxicación de oxígeno mitocondrial debido a una inhibición generada por estrés oxidante que conduce a una disminución de producción de ATP (Schoonen *et al.*, 1990). Nosotros consideramos que esta alternativa podría ser una opción a los cambios en la concentración de ATP, sin embargo proponemos que la disminución de ATP, en *D. hansenii* ocurre como en el modelo de Petrovič, (2006), es decir el ATP disminuye, porque hay un mayor gasto energético para contrarrestar los efectos

del sodio, un mayor gasto energético se puede comprobar con nuestros resultados de la respiración, ya que observamos el mayor consumo de oxígeno en estrés salino; si aumenta la respiración es muy probable que aumente la concentración de ATP pero como el gasto energético es elevado entonces la concentración de ATP disminuye, tal como lo observamos en el estrés salino.

En este contexto es importante señalar que *D. hansenii* ha sido definida como una levadura respiratoria (Serrano *et al.*, 1973), y más recientemente, una levadura con una capacidad de fermentación baja (Sánchez *et al.*, 2006). En este trabajo, se observó que la concentración de ATP en las condiciones de crecimiento sin sodio o con NaCl 1 M son mayores que durante el estrés salino por NaCl 2 M, esta disminución de ATP puede estar directa o indirectamente relacionada con el alto recambio energético que debe tener *D. hansenii* para contrarrestar los efectos del estrés salino. No se puede olvidar que esta levadura, en presencia de sal expresa un sistema para la expulsión del Na⁺ (ENA), que representa un gasto adicional de ATP por la célula.

En diversas levaduras se ha encontrado la presencia de una oxidasa alterna (OXA), cuya característica principal es la resistencia al cianuro (RRC) (Veiga *et al.*, 2000). El grupo de Veiga *et al.* (2003) observó que en la fase estacionaria, *D. hansenii* expuesta a NaCl 1.5 M, la RRC aumenta durante el estrés salino y oxidante. Sin embargo, cuando inhibieron OXA, no encontraron cambios en los niveles de ERO's en *D. hansenii*, por lo que concluyeron que la oxidasa alterna no previene la producción de ERO's.

Por otra parte, en nuestro trabajo también se midió la respiración en presencia de cianuro y octil-galato (para inhibir la oxidasa alterna); se encontró que la RRC en *D. hansenii* se estimula en presencia y ausencia de sal, siendo mayor en YPD este cambio; respecto a la OXA se encontró que existe una inhibición en todas las condiciones, sin embargo esta inhibición es mayor en ausencia de sal, por otra parte se encontró que existe una respiración residual, lo que conlleva a concluir que quizás exista un complejo respiratorio alternativo a los antes descritos, y que posiblemente se active durante la fase logarítmica.

Una vez que se encontró que el estrés salino podía provocar un aumento de ERO's debido a un cambio en la respiración celular, se retomó la hipótesis de que la tirosina es oxidada para formar 3-nitrotirosina, y se evaluó la presencia de este metabolito mediante cromatografía de capa fina; se encontró que en los extractos etanólicos de *D. hansenii* expuestos a NaCl 2 M, el principal componente fue la 3-nitrotirosina. Aunque en las células cultivadas en medio sin sal también se encontró 3-nitrotirosina, este resultado es de esperarse, ya que las especies reactivas de oxígeno se producen en condiciones sin estrés como producto de la respiración mitocondrial. Sin embargo, la banda de la 3-nitrotirosina presentó la coloración más intensa en la muestra de los extractos de NaCl 2 M, este resultado concuerda con la mayor generación de ERO's encontrada en estrés hipersalino que estaría implicada en el aumento de la oxidación de la tirosina. La presencia de 3-nitrotirosina se confirmó mediante espectros de emisión y excitación y el nivel más alto de fluorescencia se encontró en NaCl 2 M.

No existen antecedentes con respecto a la tirosina como un antioxidante durante el estrés salino; sólo en un trabajo realizado por Frears *et al.* (1996), se evaluó la posible función de la tirosina como antioxidante. Estos autores encontraron que durante estrés oxidante por peroxinitro, la tirosina, el triptofano y la metionina pueden atenuar la inhibición enzimática de la GDPH, la explicación que ofrecen los autores es que estos aminoácidos reaccionan directamente con el peroxinitrito.

Para determinar si la tirosina tiene un papel antioxidante durante el crecimiento de *D. hansenii* expuesta a NaCl 2 M se añadió tirosina y se comparó el crecimiento en presencia de un antioxidante, el α -tocoferol. Con ambos compuestos se encontró que el crecimiento aumentó en comparación con el crecimiento de *D. hansenii* solo con NaCl 2 M. La explicación para esta similitud se debe a que la tirosina y el α -tocoferol presentan un anillo fenólico en sus estructuras químicas que puede interactuar con las ERO's generadas por la respiración celular.

Con los resultados anteriores, en el presente trabajo se valida la propuesta de que la oxidación de la tirosina durante estrés salino es un mecanismo para disminuir los efectos del estrés oxidante, atrapando los radicales libres como 3-nitrotirosina, y que este mecanismo depende de un aumento en la expresión del gen *DhARO4* y del subsecuente aumento en la actividad específica de *DhAro4p*.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se apoya la teoría de que una respuesta contra el estrés oxidante de *D. hansenii* durante el estrés hipersalino, es el aumento en la expresión de *DhARO4* y de la actividad específica de *DhAro4p* para sintetizar tirosina, y que ésta es oxidada para proteger del exceso de radicales libres; lo anterior queda sustentado porque:

En el estrés salino de NaCl 2 M se encontraron mayores niveles de ERO's, ello demuestra que el estrés oxidante es un efecto del estrés hipersalino y muy probablemente responsable de la oxidación de la tirosina.

La concentración de ATP en presencia de NaCl 2 M disminuyó debido a que durante el estrés hipersalino se requiera de un mayor gasto energético para que *D. hansenii* lleve a cabo la osmoregulación.

La alta actividad de *DhARO4*, resulta en mayor síntesis de tirosina, que no se detecta porque se oxida para formar 3-nitrotirosina, que aumenta en presencia de NaCl 2 M.

La presencia de NO^{*} y los niveles elevados de ERO's son los responsables de la nitración de la tirosina.

El crecimiento de *D. hansenii* en estrés hipersalino, pero en presencia de un exceso de tirosina aumenta al igual que cuando se añade un antioxidante como el alfa tocoferol. Esto demuestra que la oxidación de la tirosina protege contra la producción de ERO's observada durante estrés de NaCl 2 M y este mecanismo contribuye a la elevada halotolerancia de *D. hansenii*.

BIBLIOGRAFÍA

Adler L, Blomberg A, Nilsson A. 1985. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. J Bacteriol 162: 300-306.

Almagro A, Prista C, Castro S, Quintas C, Madeira-Lopes A, Ramos J, Loureiro-Dias MC. 2000. Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. Int J. Food Microbiol. 56: 191-197.

Almagro A, Prista C, Benito B, Loureiro-Dias M, Ramos J. 2001. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. J Bacteriol 183: 3251-3255.

Breuer U, y Harms H. 2006. *Debaryomyces hansenii* an extremophilic yeast with biotechnological potential. Yeast 23: 415-437.

Blomberg A, y Adler L. 1993. Tolerance of fungi to NaCl. In Stress Tolerance in Fungi, Jennings DH (Ed.). Marcel Dekker: New York, Basel, Hong Kong; 233-256.

Brown AD, y Simpson Jr. 1972. Water relations of sugar tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. J Gen Microbiol 72: 589-591.

Calderón-Torres M, Peña A, Thomé PE. 2006. DhARO4, an amino acid biosynthetic gene, is stimulated by high salinity in *Debaryomyces hansenii*. Yeast 23: 725-734.

Calderón-Torres M, Castro D, Montero P, Peña A. 2011. DhARO4, induction and tyrosine nitration in response to reactive radicals generated by salt stress in *Debaryomyces hansenii*. Yeast 10:733-46.

Castello PR, McClure T, Crook Z, Poyton RO. 2006. Mitochondrial cytochrome oxidase produce nitric oxide under hypoxic conditions: implications oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. Cell Metab 3:277-287.

Chao H, Yung-fu Y, Ku MSB. 2009. Characterization of a salt-induced DhAHP, a gene coding for alkyl hydroperoxide reductase, from the extremely halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. BMC Microbiology 9:182.

Chen C, Wanduragala S, Becker DF, Dickman MB. 2006. Tomato QM-like protein protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress by regulating intracellular proline levels. Appl Environ Microb 72: 4001-4006.

Chirino Y, Orozco M, Pedraza J. 2006. Evidencias de la participación de peroxinitrito en diversas enfermedades. Imbiomed. 58: 350-358

Das Sarma S, y Arora P. 2001. Halophiles. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group/www.els.net: 1-9.

Desikan R, Hancock J, y Neill S. 2005. Reactive oxygen species as signaling molecules. In: N. Smirnoff (ed).pp.169-191.

Dujon B, Sherman P, Fisher G, Durrens P, Casaregula S. 2004. Genome evolution in yeasts. Nature 430: 35-44.

Frears ER, Zhang Z, Blake DR, O'Connell JP, Winyard PG. 1996. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite. FEBS 381: 21-24.

Gille G y Sigler K. 1995. Oxidative stress and living cells. Folia Microbiol 40: 131-152.

González-Hernández JC, Cardenas-Monroy CA, Peña A. 2004. Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. Yeast 21: 403-412.

González JC, y Peña A. 2002. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). Rev. Latinoamer. Microbiol. 44:137-156.

González NA, Vázquez A, Ortiz Zuazaga HG, Sen A, Olvera HL, Peña de Ortiz S, Govind NS. 2009. Genome-wide expression profiling of the osmoadaptation response of *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 26: 111-124.

Gow AJ, McClelland M, Garner SE, Malcolm S, Ischiropoulos H. 1998. The determination of nitrotyrosine residues in proteins. *Methods Mol Biol.* 100: 291-299.

Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol* 66: 300-372.

Hussain TM, Chandrasekhar T, Hazara M, Sultan Z, Saleh BK, Gopal GR. 2008. Recent advances in salt stress biology a review. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 3: 008-013.

Ischiropoulos H. 1998. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 356: 1-11.

Kato Y, Ogino Y, Aoki T, Uchida K, Kawakishi S, Osawa T. 1997. Phenolic antioxidants prevent peroxynitrite-derived collagen modification *in vitro*. *J Agric Food Chem* 45: 3004-3009.

Libes, S. 1992. *An Introduction to Marine Biogeochemistry*. John Wiley and Sons, Inc. Canada. Pp.734.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, and Rabdall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.

Lucas C, Da Costa M, Van Uden N. 1990. Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 6: 187-191.

McNeeill, J. 1979. *Sea Microbes*. Ed. Oxford.

Misra N, Gupta AK, y Dwivedi UN. 2006 Changes in Free Amino Acids and Stress Protein Synthesis in Two Genotypes of Green Gram under Salt Stress. *Journal of Plant Sciences* 1: 56-66.

Nobre MF, y Da Costa MS. 1985. The accumulation of polyols by the yeast *Debaryomyces hansenii* in response to water stress. *Can J Microbiol* 31: 1061-1064.

Norkrans, B. 1968. Studies on marine occurring yeast: Respiration, fermentation and salt tolerance. *Archiv. Für Mikrobiologie*. 62: 358-372.

Norkrans B, and Kylin A. 1969. Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *J Bacteriol* 100: 836-845.

Petersen KM, y Jespersen L. 2004. Genetic diversity of the species *Debaryomyces hansenii* and the use of chromosome polymorphism for typing of strains isolated from surface ripened cheeses. *J Appl Microbiol* 97: 205-213.

Petrovič U 2006. Role of oxidative stress in the extremely salt-tolerant yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Yeast Res* 6: 816-822.

Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* 63:4005-4009.

Ramírez OM, Hernández-Saavedra NY, Ascencio VF, Acosta GB, Ochoa JL. 1998. Cell yield and superoxide dismutase activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* under different culture conditions. *J Mar Biotechnol* 6: 255-259.

Ratledge C, y Tan K-H. 1990. In *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, Verachtert HJ, De Mot R (eds). Marcel Dekker: New York; 223-253.

Sharma P, Meena N, Aggarwal M, Mondal AK. 2005. *Debaryomyces hansenii*, a highly osmo-tolerant and halo-tolerant yeast, maintains activated Dhog1p in the cytoplasm during its growth under severe osmotic stress. *Curr Genet* 48: 162-170.

Serrano R, Gancedo JM, Gancedo C. 1973. Assay of yeast enzymes *In situ*. A potential tool in regulation studies. *Eur J. Biochem*. 34: 479-82.

Serrano R. 1980. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. *Eur J Biochem* 105: 419-424.

Sánchez NS, Calahorra M, González-Hernández JC, Peña A. 2006. Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 361-374.

Sánchez NS, Arreguin R, Calahorra M, Peña A. 2008. Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 8: 1303-1312.

Segal-Kischinevzky C, Rodarte-Murguía B, Valdes-Lopez V, Mendoza-Hernandez G, González MA, Alba-Lois L. 2011. The euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii* has two catalase genes encoding enzymes with differential activity profile. *Journal, Curr Microbiol* 62: 933-943.

Schoonen WG, Wanamarta AH, van der Klei-van Moorsel JM, Jakobs C, Joenje H. 1990. Respiratory failure and stimulation of glycolysis in Chinese hamster ovary cells exposed to normobaric hyperoxia. *J Biol Chem* 265: 1118-1124.

Souciet J, Aigle M, Artiguenave F, Blandin B, Bolotin M, Bon E, Brottier P, Casaregola S, De Montigny J, Dujon B, Durrens P, Gaillardin C, Wesolowski M, Wincker P, Weissenbach J. 2000. Genomic exploration of the Hemiascomycetous yeasts 1. A set of yeast species for molecular evolution studies. *FEBS Lett.* 487: 3-12.

Thomé P, Peña A, Ramírez J. 1998. Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast* 14: 1355-1371.

Toledano MB, Delaunay A, Biteau B, Spector D, Azevedo D. 2003. Oxidative stress responses in yeast. *Yeast Stress Responses* (Hohmann S & Mager WH, eds), Springer-Verlag, Heidelberg. pp. 241-303.

Van N, y Fell J. 1968. Marine Yeasts. *Advances in microbiology of the sea*. Vol. 1. Academic Press London and New York. P. 167-201.

Veiga A, Arrabaca JD, y Loureiro-Dias MC. 2000. Cyanide resistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic fermentation. *FEMS Microbiology Letters* 190, 93-97.

Veiga A, Arrabaca JD, Sansonetty F. 2003. Energy conversion coupled to cyanide-resistant respiration in the yeasts *Pichia membranifaciens* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 3: 141-148.

Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. 2004. The antioxidants and pro-antioxidant, network: an overview. *Curr Pharma Des* 10: 1677-1694.

ANEXO

Medios de Cultivo

Medio YPD

Extracto de levadura	1%	10 g/Lt
Extracto de peptona	1%	10 g/Lt
Glucosa	2%	20 g/Lt
Agar	2%	20 g/Lt

Medio YPD + 1.0 M NaCl

Extracto de levadura	1%	10 g/Lt
Extracto de peptona	1%	10 g/Lt
Glucosa	2%	20 g/Lt
NaCl = 58.44 g= 1 M en 1 lt		

Medio YPD + 2.0 M NaCl

Extracto de levadura	1%	10 g/Lt
Extracto de peptona	1%	10 g/Lt
Glucosa	2%	20 g/Lt
2 M NaCl = 116.86 g en 1 Lt		

Medio YPD + 5 mM L-Tirosina

Extracto de levadura	1%	10 g/Lt
Extracto de peptona	1%	10 g/Lt
Glucosa	2%	20 g/Lt
5 mM L-Tirosina= 0.906 g en 1 Lt		

Solución de ZnSO₄ 30% p/v = 30 g /100 mL de H₂O= 3 g/10 mL de H₂O

N, N-naftil-etilendiamina – HCl 0.1% = 0.1 g/100 mL

Sulfanilamida 1% en H₃PO₄ 5% = 1 g en solución ácida/100 mL = 1 g de sulfanilamida + H₃PO₄ 5.90 mL + H₂O 94.1 mL

Solución de Sulfato de Cobre (CuSO₄) 5% = 5 g en 100 mL H₂O destilada

HCl 0.1 N

NH₄Cl 5% v/v = 5 mL en 100 ml de H₂O

Stock de NaNO₃ = 5 mM = 0.0042 g en 10 mL

Stock de NaNO₂ = 10 mM = 0.0069 g en 10 mL

Buffer MES-TEA pH 6 = 0.1 M = 19.52 g en 1 Lt ajustado a pH 6 con TEA al 50%.

Trietanolamina 50% = 99.0% pureza = 50.5 mL en 100 mL

Buffer de fosfatos (KH₂PO₄) = 136.1 g = 1M en 1 Lt = ajustado a pH 7.2 con KOH

Buffer de citrato de sodio = 294.10 g = 1 M en 1 Lt = 0.5 M = 147.05 g en 1 Lt ajustado a pH 5.5.

Buffer HEPES-NaCl pH 7.5 = HEPES = 10 mM = 2.383 g, NaCl = 150 mM = 8.766 en 1 Lt ajustado a pH 7.5 con NaOH.

PMFS = 1mM = 0.1742 g en 10 mL Etanol al 96%.

Stock de Tirosina = 181.2 g = 1 M en 1 Lt = 1 mM = 0.1812 g en 1 Lt

Stock de Triptofano = 204.2 =1 M en 1 Lt = 1 mM = 0.2042 g en 1 Lt

Acido acético: butanol: H₂O (15:55:30) = 15 mL acido acético+ 55 mL butanol +30 mL H₂O para 100 mL de buffer de corrida.

Solución de revelado Ninhidrina = Ninhidrina 0.2% = 0.06 g en 30 mL de Etanol al 96%.

Determinación de Proteínas por el método de Lowry

Solución A:

Na ₂ CO ₃	2.0%
NaOH	0.4%
Na ₂ K tartrato	0.16%
SDS	1.0%

Solución B:

CuSO ₄ .5H ₂ O	4%
--------------------------------------	----

Reactivo de Folin 1N (Diluir 1:1 el del stock 2N) Preparar al momento

Mezcla de trabajo (C) = A + B: (100:1) Preparar al momento

Curva estándar:	H ₂ O (mL)	BSA, 1 mg/mL (mL)	Mezcla C (mL)	} incubar 10 min	Folin 1N (mL)
0µg prot	1.0	0.000	3.0		0.3
25 µg	0.975	0.025	3.0		0.3
50 µg	0.950	0.050	3.0		0.3
100 µg	0.900	0.100	3.0		0.3
150 µg	0.850	0.150	3.0		0.3
200 µg	0.800	0.200	3.0		0.3

Muestras	H ₂ O (mL)	Extracto (mL)	Mezcla C (mL)	} incubar 10 min	Folin 1N (mL)
YPD	0.950	0.05	3.0		0.3
Na 1 M	0.950	0.05	3.0		0.3
Na 2 M	0.950	0.05	3.0		0.3

Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y leer a 660nm