



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**LAS CATALASAS DE *D. hansenii*: ANÁLISIS DE LA  
COMPLEMENTACIÓN HETERÓLOGA EN UNA MUTANTE  
ACATALASÉMICA DE *S. cerevisiae***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIOLOGO**

**P R E S E N T A:**

**MIGUEL ANGEL GARCÍA CAMPOS**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY  
2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

1. Datos del alumno

García  
Campos  
Miguel Angel  
62 84 34 57  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
408030452

2. Datos del tutor

Dra.  
Claudia Andrea  
Segal  
Kischinevzky

3. Datos del sinodal 1

Dra.  
Martha Eydi Ruse  
Calahorra  
Fuertes

4. Datos del sinodal 2

M. en C.  
Norma Silvia  
Sánchez  
Sánchez

5. Datos del sinodal 3

Biól.  
Geovani  
López  
Ortiz

6. Datos del sinodal 4

Biól.  
Mónica  
Ramírez  
Hernández

7. Datos del trabajo escrito.

Las catalasas de *D. hansenii*: Análisis de la complementación heteróloga en una  
mutante acatalasémica de *S. cerevisiae*  
67p  
2014

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias, bajo la tutoría de la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky.

Parte de esta investigación fue financiada gracias al programa PAPIIT, proyecto IN218611, “Estrés oxidativo en *Debaryomyces hansenii*”.

## **Dedicatoria**

A mi madre María del Rocío Campos Regalado, porque aun con las innumerables adversidades que enfrentamos año tras año, me ha apoyado durante mis 25 años de vida, en los que hemos aprendido a ser compañeros de vida, tratarnos como iguales, amarnos y procurarnos en las buenas y en las malas. Gracias por no dejarme sólo.

A mi abuela Rosa Amelia Regalado Hernández, porque es la persona que más me ha enseñado a sonreír y hacerle frente a la vida con esa sonrisa, siendo yo mismo. Gracias por quererme tal cual soy.

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky por todo el apoyo que me ha brindado a lo largo de este proyecto, e incluso antes y después. Al recibirme con amabilidad, orientarme en la investigación y siempre buscar mi superación como investigador en formación. Sus consejos y enseñanzas me han servido para crecer como estudiante y como ser humano. ¡Muchas gracias Clau!

A la Dra. Luisa Alvarina Alba Lois por abrirme las puertas a su laboratorio al realizar el servicio social y volver a recibirme para realizar la tesis con Claudia, además de su apoyo y consejos. Al Dr. Víctor Valdez López y al M. en C. José Vilchis Peluyera por el apoyo y las recomendaciones que me dieron al ser parte de su laboratorio. A la Quím. Viviana Escobar Sánchez y al M. en C. Arístides III Sampieri Hernández, por el apoyo técnico recibido, las pláticas y las recomendaciones prácticas en el trabajo diario.

A Mónica Ramírez Hernández por ser una excelente compañera de laboratorio, y brindarme su tiempo y apoyo como amiga. A Román Alfonso Castillo Díaz por siempre estar dispuesto a ayudarme en el trabajo de laboratorio.

A mis sinodales el Biól. Geovani López, la M. en C. Norma Silvia Sánchez Sánchez, la Dra. Martha Eydi Ruse Calahorra Fuertes, y la Biól. Mónica Ramírez Hernández por el tiempo y la seriedad con la que revisaron mi trabajo de tesis, y sus observaciones atinadas.

Al programa PAPIIT IN218611 “Estrés oxidativo en *Debaryomyces hansenii*” por el apoyo económico brindado.

A todos mis amigos: Ricardo, Alan, Daniel, Eder, Diana, Rigel, Fernanda, Elena, Marcos, Leopoldo, Rubén, Tania, y los que me faltan. Gracias por el apoyo, los buenos ratos y las enseñanzas de vida en estos años, porque sin eso no estaría titulándome.

A la persona que ha estado apoyándome y aguantándome durante ya más de 2 años, y aun así sigue buscando siempre hacerme reír y que me sienta bien, gracias Gerardo.

***“Nearly everything is really interesting if you go into it deeply enough”***

**-Richard P. Feynman**

# ÍNDICE

I. RESUMEN.....	8
II. INTRODUCCIÓN.....	9
<b>Las levaduras. Empezando por el principio.....</b>	<b>9</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Una levadura antropológica.....	9
<i>S. cerevisiae</i> como organismo modelo y la complementación homóloga.....	11
<i>Debaryomyces hansenii</i> , una levadura extrema.....	13
<i>D. hansenii</i> en procesos biotecnológicos.....	16
<b>Estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno.....</b>	<b>17</b>
Origen del oxígeno atmosférico, agente tóxico en la vida temprana.....	17
La toxicidad del oxígeno.....	18
Estrés oxidativo, bagatelas en el siglo XX.....	19
Formación de las ERO.....	20
Blancos celulares de las ERO y patologías asociadas.....	22
Funciones fisiológicas relacionadas a ERO.....	23
Antioxidantes.....	25
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , una ERO con dos caras.....	27
<b>Catalasas.....</b>	<b>28</b>
Catalasas en <i>S. cerevisiae</i> y <i>D. hansenii</i> .....	30
III. ANTECEDENTES.....	31
IV. JUSTIFICACIÓN.....	33
V. OBJETIVOS.....	34
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Cepas y medios de cultivo.....	35
Mantenimiento de las cepas y condiciones de cultivo.....	37
Protocolo: Curvas de crecimiento.....	37
Cálculo de tiempo de duplicación.....	38
Protocolo: Obtención del extracto crudo.....	39
Protocolo: Cuantificación de proteínas en extractos crudos por el método de Bradford.....	40
Protocolo: Ensayo de actividad específica de catalasa.....	40
Protocolo: Ensayo de sensibilidad a choque por peróxido de hidrógeno.....	41
Análisis bioinformático de secuencias de aminoácidos.....	42
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
Curvas de crecimiento.....	43
Tiempo de duplicación en fase de crecimiento exponencial.....	44
Ensayos de actividad de catalasa.....	47
Ensayos de sensibilidad a choque por peróxido de hidrógeno.....	51
Adaptaciones halofílicas de las catalasas <i>DhCTA</i> y <i>DhCTT</i> : análisis bioinformático.....	54
VIII. Perspectivas.....	58
IX. CONCLUSIONES.....	59
X. REFERENCIAS.....	60

## I. RESUMEN

*Debaryomyces hansenii* es una levadura aislada por primera vez del mar, pero presente en diversos hábitats naturales y creados por el hombre. Estos en su mayoría presentan baja actividad acuosa, altos contenidos de sales y temperaturas bajas. Por lo que *D. hansenii* ha tenido que desarrollar sistemas celulares de resistencia ante tales tipos de estrés.

El estrés oxidativo es un efecto secundario del metabolismo aerobio, la presencia del oxígeno en las células, y el desequilibrio entre la consecuente generación de especies reactivas de oxígeno y los sistemas que las controlan. Este estrés provoca daños a estructuras celulares como DNA, lípidos y proteínas, por lo que está relacionado con diversas enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, enfermedades cardíacas, Alzheimer, envejecimiento, entre otras.

A partir de la experiencia que se ha obtenido del modelo biológico *Saccharomyces cerevisiae*, y de las investigaciones que se han realizado en la levadura *D. hansenii*, se han realizado estudios en los genes que codifican a las catalasas de la segunda, llamados *DhCTT* y *DhCTA*. La presente investigación se centró en caracterizar la fisiología y bioquímica de cepas mutantes acatalasémicas de *S. cerevisiae*, transformadas con los genes de catalasa de *D. hansenii*.

Los resultados demostraron que las cepas complementadas con los genes de catalasa de *D. hansenii*, presentan características fisiológicas y bioquímicas diferentes a la cepa silvestre de *S. cerevisiae*, obteniendo en la mayoría de los casos mejores tasas de crecimiento y mayor resistencia a estrés oxidativo que esta última. Se concluyó que la catalasa T de *D. hansenii* tiene notables contribuciones como sistema de defensa contra el estrés oxidativo, tanto endógeno como exógeno. Por otra parte se obtuvieron indicios y respaldo experimental de la regulación de ambos genes expresados en la levadura modelo.

## II. INTRODUCCIÓN

### Las levaduras. Empezando por el principio

La palabra inglesa *yeast* para levadura, ha sido usada desde poco antes del año 1,000 de nuestra era; su origen proviene del inglés antiguo *gyst* que significó “hervir”, “espumar”, “burbujear” y este probablemente del sánscrito *yásati* (hierve) (Dictionary.com-Unabridged); en español, el diccionario de la Real Academia de la Lengua Española, da referencia a que la palabra proviene de “levar”, “levantar”, como lo es la acción que tiene la masa de pan al agregársele levadura, pero también define la palabra con un enfoque biológico más actualizado, como: el nombre genérico que se le da a ciertos hongos unicelulares, que tienen forma ovoidea, se reproducen por gemación o división y que producen enzimas capaces de descomponer diversos cuerpos orgánicos, principalmente los azúcares, en otros más sencillos.

Las levaduras han estado presentes a lo largo de cada una de nuestras vidas, y sin percatarnos, lo han estado en toda la historia de la civilización humana; pero su carácter microscópico las ha despojado por mucho tiempo del protagonismo que merecen. Quedo en que la siguiente información, cambie este punto de vista del lector.

### ***Saccharomyces cerevisiae*. Una levadura antropológica.**

*Saccharomyces cerevisiae* es un hongo perteneciente al phylum Ascomycota, siendo la principal característica de este grupo la formación de una estructura microscópica sexual llamada asca, la cual da origen a esporas no móviles, llamadas ascosporas; aunque algunas especies pueden formar ascas de forma asexual.

Presente en la vida del ser humano por milenios, el uso de *S. cerevisiae*, aunque fue inconsciente, se remonta de acuerdo a evidencias arqueológicas a 7,000 años antes de nuestra era en la producción de bebidas fermentadas en China (McGovern *et al.*, 2004), pero se estima que el uso de este hongo y la domesticación de las cepas se

remonta aún más, a los inicios de la civilización humana en Mesopotamia, hace más de 10 mil años (Legras *et al.*, 2007).

Desde entonces *S. cerevisiae* ha jugado un papel importante en el procesamiento de diversos tipos de alimentos, y también ha sido parte del proceso de diversificación cultural. *S. cerevisiae* participa en la elaboración de panes, vinos, cervezas, preparaciones fermentadas de fruta o leche y otras bebidas alcohólicas, y las diferentes cepas o variedades que existen en la actualidad se han diversificado reflejando la historia humana, pues estas se han generado a partir de los procesos de migración de nuestra especie, teniendo así una estrecha relación con el hombre y sus alimentos; la plantación de viñedos y granos, que son fermentados para la obtención de bebidas alcohólicas; los lugares en los que se realizan los procesos de fermentación, como los sótanos, ambientes ideales para su alojamiento; y a sus otros usos, como el de “elevar” la masa de pan (Legras *et al.*, 2007).

El desarrollo tecnológico de las bebidas alcohólicas es un fenómeno casi universal, las sociedades humanas en distintos niveles de complejidad han descubierto cómo hacer bebidas fermentadas a partir de las fuentes de azúcares de sus hábitats locales (McGovern, 2003), este fenómeno casi universal puede ser explicado por los evidentes efectos combinados del etanol: analgésico, desinfectante y de alteración de la mente. Quizá siendo el más importante el segundo, ya que es sabido que en la cultura occidental, desde la primeras civilizaciones históricas como Egipcia, Mesopotámica, Hebrea, Asiria, Romana o Griega hasta el siglo XIX, consideraban al agua como inadecuada para el consumo, debido a que regularmente esta generaba enfermedades agudas o crónicas al ser ingerida; y a diferencia de la cultura oriental, el método de purificación por ebullición era desconocido o desdeñado en esta zona geográfica (Jansson *et al.*, 1994).

No cabe duda que los productos alimenticios generados a partir de la fermentación, que en gran medida es causada por *S. cerevisiae*, han llegado a marcar identidades

culturales, como lo es el sake para Japón, la cerveza para Alemania o el pulque para México.

Con esto en mente no cabe duda que en el momento en el que los estudios de las ciencias biológicas se volvieron más finos, los investigadores centraron inmediatamente su atención en *S. cerevisiae*; y debido a que resultó ser un organismo con amplia versatilidad experimental, bajo costo de mantenimiento y rápida tasa de crecimiento se ha convertido en la actualidad en uno de los organismos modelo más estudiados.

### ***S. cerevisiae* como organismo modelo y la complementación homóloga.**

El primer genoma eucarionte secuenciado fue el de *S. cerevisiae* y se liberó de forma electrónica en 1996 (Cherry *et al.*, 1998). La importancia del estudio de *S. cerevisiae* en las ciencias biológicas radica principalmente en que al ser un organismo eucarionte, los hallazgos de su biología en general pueden ser extrapolados a distintas ramas de la biología, incluyendo al estudio del ser humano.

Pero en primera instancia ¿qué tan similar es con respecto a los mamíferos? Hasta donde se sabe, el 31% de las secuencias con potencial para codificar proteínas tienen un homólogo en proteínas de mamífero (Botstein *et al.*, 1997), lo cual es remarcable tomando en cuenta el tiempo de divergencia entre los reinos Fungi y Animalia, el cual fue aproximadamente hace 1,600 millones de años (Wang *et al.*, 1999). Por lo que la probabilidad de que un nuevo gen descubierto en humano tenga su homólogo en la levadura es bastante buena, más aun la manipulación genética en levadura es fácil y barata, mientras que tal manipulación no lo es así en sistemas mamíferos aun cuando sea posible.

La importancia del estudio de la biología molecular de la levadura, como organismo modelo para toda la biología eucariota, puede justificarse por la facilidad con la que se puede establecer la relación entre estructura del gen y función de su proteína (Botstein *et al.*, 1988).

El desarrollo de diversas técnicas de manipulación genética ha hecho posible el objetivo anterior. Por ejemplo, a través de la delección de genes en *S. cerevisiae* es posible observar los efectos que genera la falta de ese gen en el organismo o en sus partes. Estas modificaciones en el genoma de la levadura pueden ser benéficas o neutrales bajo ciertas condiciones, pero comúnmente se presentan como deletéreas o letales, presentando fenotipos que proporcionan pistas de la función del gen suprimido y de su proteína, en el caso de codificar alguna.

La complementación homóloga sería la contraparte a la delección como herramienta genética, por la cual se introduce nuevamente el gen que se removió, de forma que se demuestra que la causante del fenotipo deletéreo era la falta del gen; si el gen con el que se restaurará la función perdida pertenece a otro organismo, se le denomina complementación heteróloga. Por medio de esta técnica es posible recuperar el fenotipo silvestre o generar distintos fenotipos, que proporcionan información de las características del gen insertado y de la función de su proteína en el caso correspondiente.

Los mejores ejemplos relativos al uso de esta tecnología usando a la levadura como organismo modelo, conciernen a los avances en la comprensión de las enfermedades genéticas humanas, de las cuales en muchos casos sólo se conocía que la herencia de los genes resultaba en la enfermedad. Un ejemplo ilustrativo es el caso del síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis, que está asociado a los genes homólogos MSH2 y MLH1 en *S. cerevisiae*. Las células con mutaciones en estos genes presentan inestabilidad en las secuencias cortas, fenotipo celular compartido entre células de mamífero y de levadura. Otros ejemplos de enfermedades genéticas que han sido mejor comprendidas gracias al estudio de *S. cerevisiae* serían: Ataxia-telangiectasia (TEL1 en levadura), Neurofibromatosis tipo 1 (IRA2 en levadura), y el síndrome de Werner (SGS1 en levadura); en este último el fenotipo celular compartido es un máximo de tiempo de vida acortado, y se descubrió que el

gen mutado codifica para una DNA helicasa en levadura, muy probablemente codificando una proteína de igual función en humano (Botstein *et al.*, 1997).

En las áreas de biología molecular, biotecnología y farmacéutica, la expresión de proteínas foráneas ha sido una herramienta para el aprovechamiento biológico que ha recurrido al uso de *S. cerevisiae*, ya que al ser tan ampliamente usada en procesos biotecnológicos tradicionales, esta levadura es clasificada como “organismo generalmente considerado seguro” (GRAS por sus siglas en inglés) (Ostergaard *et al.*, 2000), y esto ha permitido que tanto el trabajo de laboratorio como la generación de productos sea sencilla y segura.

La expresión de proteínas foráneas se realiza al insertar el gen deseado en la levadura, mediante vectores de expresión genética, los cuales pueden integrarse al genoma o expresarse en forma de plásmidos; pero la simple inserción en un vector no garantiza un alto nivel de expresión de la proteína foránea. La expresión génica es un proceso multifactorial y pueden surgir problemas en distintas etapas de la producción de una proteína, desde el reconocimiento y transcripción del gen hasta la estabilidad de su proteína.

Con todo lo anterior, podemos asegurar que *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura mejor estudiada y la mayoría de nuestros conocimientos de expresión heteróloga en eucariontes proviene de estudios realizados en este organismo (Breuer & Harms, 2006); sin embargo, *S. cerevisiae* tiene limitaciones y no es apta para todos los fines biotecnológicos, por lo menos no en su forma silvestre.

### ***Debaryomyces hansenii*. Una levadura extrema.**

Dadas las limitaciones de *S. cerevisiae* como organismo modelo y de producción, se han realizado esfuerzos por investigar otras levaduras para obtener un conocimiento más amplio de la diversidad genética y metabólica esperada en éstas. Por ejemplo, se generó interés en las levaduras extremófilas, entre estas *Debaryomyces* spp. que

probaron ser levaduras genética y bioquímicamente interesantes con amplia promesa biotecnológica (Breuer & Harms, 2006).

El género *Debaryomyces* se caracteriza por ser osmotolerante y los miembros de este género pueden crecer hasta en 4 M de NaCl, mientras que *S. cerevisiae* está limitada a menos de 1.7 M de NaCl (Breuer & Harms, 2006), lo cual lo hace biotecnológicamente interesante, ya que permite la producción cuasi-no-estéril y altas concentraciones de producto/volumen entre otras ventajas (Breuer & Harms, 2006). Sin embargo, este género presenta dificultades para ser transformado y no se han logrado realizar en él técnicas de genética clásica, como deleciones o cruza, lo que ha dificultado su estudio.

Entre las levaduras *Debaryomyces* se encuentra la especie *D. hansenii* var. *hansenii*, que destaca marcadamente como organismo extremófilo, ya que tiene características osmo-, xero-, halo-, quimio- y criotolerantes (Breuer & Harms, 2006; Davenport, 1980). Los primeros estudios de esta levadura los realizó Norkrans en 1966, aislándola del mar, estos constaron de analizar su crecimiento en distintas concentraciones de NaCl (Norkrans, 1968), por lo que es considerada generalmente como una levadura marina (González-Hernández & Peña, 2002; Butinar *et al.*, 2005), pero también se le encuentra en diversos hábitats, frecuentemente con baja actividad acuosa, naturales tales como: el agua de mar, formando parte de la microbiota intestinal de truchas, suelo, fruta; y artificiales como: queso, carne, vino, cerveza, productos con altos niveles de azúcar o sal y productos en congelación (Dalton *et al.*, 1984; Flores *et al.*, 2004; Ferreira & Biljoen, 2003; Reyes-Becerril *et al.*, 2008; Petersen *et al.*, 2002; Guerzoni *et al.*, 1993).

*D. hansenii* se caracteriza por poder crecer en un medio con hasta 25% de NaCl o 18% de glicerol (Butinar *et al.*, 2005), asimila un amplio espectro de sustratos de carbono, como lo muestra la tabla 1. *D. hansenii* tiene alta tolerancia al estrés químico, por lo que puede ser cultivada en altas concentraciones de muchos sustratos, sin embargo presenta crecimiento pobre en ausencia de oxígeno (Tilbury, 1980). Su temperatura de crecimiento óptimo se encuentra entre los 20 – 25 °C, pero el crecimiento entre 5 –

10 °C e incluso debajo de 0 °C ha sido reportado (Davenport, 1980), y su rango de pH es de 3.0 a 10 en diferentes condiciones de temperatura y actividad acuosa (van den Tempel, 2000).

Glucosa	+	Melecitosa	V	N-Acetil-D-glucosamina	V	D-Gluconato	+/D
Galactosa	+	Inulina	V	Metanol	-	DL-Lactato	V
L-Sorbosa	V	Almidón soluble	V	Etanol	+/D	Succinato	+
Sacarosa	+	D- Xilosa	+	Glicerol	+	Citrato	V
Maltosa	+	L-Arabinosa	+/D	Eritritol	V	Inositol	-
Celobiosa	+	D-Arabinosa	V	Ribitol	+	Hexadecano	V
Trehalosa	+	L-Rhamnosa	V	D-Manitol	+	Nitrato	-
Lactosa	V	D-Glucosamina	V	D-Glucitol	+/D	Nitrito	V
Melibiosa	V	2-ceto-D-gluconato	+	$\alpha$ -Metil-D-glucósido	+	5-Ceto-D-gluconato	V
Rafinosa	+	Sacarato	-	Salicina	+/D	Ribosa	V
Dulcitol	V						

+, positiva; D, débil; V, variable; -, negativa.

**Tabla 1.** Asimilación de sustratos por *D. hansenii*. Tomada de Breuer & Harms, 2006 basándose en los trabajos de Nakase *et al.* 1998.

Una amplia revisión de la filogenia, ecología, fisiología y biología molecular de *D. hansenii* fue realizada por Breuer *et al.* en el año 2006 (Breuer & Harms, 2006), siendo una de las mejores referencias para empezar a conocer sus características particulares y tener referencias de los estudios realizados sobre este organismo.

Debido a las características que hacen a *D. hansenii* una levadura extrema, fue incluida por el Consorcio Génolevures para ser completamente secuenciada, publicándose un adelanto de su genoma en el año 2000 y completamente en el 2004 (Rosa & Peter, 2006; Dujon *et al.*, 2004; Lépingle *et al.*, 2000). Gracias a este adelanto científico, el trabajo de investigación en *D. hansenii* a nivel molecular y genético se ha visto ampliamente beneficiado.

## ***D. hansenii* en procesos biotecnológicos**

Como anteriormente fue mencionado, las levaduras han formado parte de los procesos de transformación de alimentos humanos desde tiempos ancestrales, esta no es la excepción con *D. hansenii*, ya que es común de encontrar en todo tipo de quesos (Ferreira & Biljoen, 2003; Petersen *et al.*, 2002; Borelli *et al.*, 2006). Su presencia en los quesos afecta características importantes que determinan su valor, como el olor, color y sabor; estos son generados debido a la coloración del propio hongo, del color que adquieren sus ascosporas y a las sustancias volátiles y no volátiles que produce (van den Tempel & Jakobsen, 2000; Hansen & Tempel, 2001; Nakase *et al.*, 1998; Nichon *et al.*, 1996; Arfi *et al.*, 2002; Leclercq-Perlat *et al.*, 2004). Incluso se ha demostrado que existe una sucesión microbiana entre diferentes cepas de *D. hansenii* en la producción de un solo tipo de queso, debido a las diferentes condiciones que se generan en el proceso (Petersen *et al.*, 2002).

Así como *D. hansenii* ha demostrado ser relevante para la elaboración de distintos tipos de quesos, esta levadura también es importante en el procesamiento de carnes fermentadas; Dalton y cols. encontraron que *D. hansenii* era la levadura más común en 383 aislados de muestras de embutidos (Dalton *et al.*, 1984), indicando su importancia en estos productos cárnicos; la participación en este proceso es conocida desde los años 1960's, cuando Rankine y cols. describieron brevemente cepas inespecíficas de *Debaryomyces* como productoras de sulfito de hidrógeno, compuesto que sirve como conservador en la carne (Rankine, 1964).

*D. hansenii* también tiene potencial para ser usada en aplicaciones biotecnológicas de alta tecnología, como lo son la síntesis de compuestos orgánicos y enzimas relevantes para la industria química, farmacéutica, agroquímica y alimenticia. De entre los compuestos que es capaz de sintetizar se encuentran: D-arabinitol y xilitol, principalmente usados como edulcorantes; riboflavina, vitamina relevante en la alimentación humana; ácido pirúvico, sustancia con amplio uso en la industria química y farmacéutica. Debido a su versatilidad, puede ser competitiva como fuente

de superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1), una metaloenzima con aplicaciones médicas tales como la modulación de la respuesta inmune, regresión de tumores malignos, protección en quimioterapia, artritis y tratamientos antienvjecimiento (Breuer & Harms, 2006).

Biocnológicamente, *D. hansenii* es un organismo prometedor debido a características clave que posee: **a)** oleagenicidad, la capacidad de acumular del 20 al 25% de su biomasa en aceite; **b)** las levaduras pueden producir lípidos potencialmente útiles que no producen las plantas; **c)** halotolerancia, esta resistencia puede ser útil para generar cepas industriales para procesos con estrés salino; **d)** adicionalmente existe el interés de generar plantas resistentes a la salinidad (Serrano, 1996) para incrementar el área de tierras cultivables en el planeta, expresando los genes que le confieren a *D. hansenii* la resistencia a sal (Breuer & Harms, 2006); **e)** no patogenicidad, esta característica es crucial para disminuir tiempos y costos de desarrollo de un producto biocnológico, sin embargo se han reportado algunos casos emergentes de patogenicidad en humanos de *D. hansenii*, uno de infección en hueso y otro en el que generó alveolitis alérgica extrínseca (Qong et. Al, 1982; Yamamoto & Osanai, 2002), por lo que es necesario su estudio en esta área para conocer esta posibilidad y evitarlo.

## **Estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno.**

### **Origen del oxígeno atmosférico, agente tóxico en la vida temprana**

La Tierra tiene poco más de 4.5 giga años (giga = G =  $1 \times 10^9$ ) de edad, es decir 4,500 millones de años. Durante los primeros 500 millones de años, eón geológico conocido como el Hadeano, el ambiente de la Tierra estuvo caracterizado por frecuentes y masivos impactos de meteoritos, algunos de los impactos tenían tal fuerza que se piensa que pudieron ser capaces de evaporar toda el agua del planeta; al finalizar estos fenómenos comenzó el eón Archeano, que se caracteriza por el inicio de la vida,

probablemente comenzando hace aproximadamente 3.8 a 4.0 G-años. Los primeros estromatolitos fósiles, que contienen la evidencia de la fijación biológica de carbono, tienen 3.8 G-años de edad, y sólo tomó 0.3 G-años para que evolucionara la vida fotosintética, en forma de los ancestros de las cianobacterias con el fotosistema II, comenzando así un proceso de cambio atmosférico que alteraría la vida en su totalidad: la generación de una atmósfera oxidante (Xiong & Bauer, 2002).

En aproximadamente 1 G-año, las cianobacterias incrementaron los niveles de dioxígeno ( $O_2$ ) aproximadamente en un cuarto del nivel actual. Algunos sugieren que el éxito de las cianobacterias no sólo fue debido a la ventaja energética de la fotosíntesis, la cual produce 18 veces más energía que el metabolismo anaerobio (Dismukes *et al.*, 2001), sino también por la inhibición de competidores a través de la creación de un agente tóxico, el dioxígeno ( $O_2$ ) (Xiong & Bauer, 2002).

### **La toxicidad del oxígeno**

La popularización del conocimiento del uso de dioxígeno como parte esencial de nuestra respiración y su presencia en nuestra atmósfera, muchas veces nos hace desconocer u olvidar sus efectos tóxicos.

La toxicidad del oxígeno se explica debido a la formación de las especies reactivas del oxígeno (ERO). Estas especies de  $O_2$  son moléculas altamente reactivas, algunas ERO son radicales, es decir tienen electrones desapareados, sin embargo el hecho de que una molécula sea un radical no indica una alta reactividad (Hansberg, 2008).

Se consideran ERO al oxígeno atómico ( $O$ ), generado al romper los dos enlaces covalentes en la molécula de  $O_2$  a través de la luz ultravioleta de alta energía o a descargas eléctricas; al ozono ( $O_3$ ), que se genera con la unión del antes mencionado  $O$  al  $O_2$ ; al oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados del  $O_2$ ; al anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), formado cuando un  $O_2$  capta un electrón que se aparea con uno de los dos electrones libres de los orbitales



Sin embargo esta hipótesis fue dejada de lado por veinte años debido a diversos factores, quizá el principal era la oposición a la concepción teórica de que el metabolismo oxidativo, presente en toda la vida compleja y en el ser humano, fuera en cierta medida tóxico. Fue hasta los años 1970's que el trabajo de Gerschman cobró validez generalizada, cuando Joe McCord e Irwin Fridovich demostraron la actividad de la enzima SOD, la cual cataliza la dismutación del radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ ), con esto se demostró la presencia de radicales libres oxidantes en los organismos vivos. Al mismo tiempo realizaron ensayos en distintos tejidos, demostrando que la SOD se encuentra ampliamente distribuida en los organismos mamíferos (McCord & Fridovich, 1969); posteriormente se descubriría que están presentes en todos los dominios de la vida (Brioukhanov *et al.*, 2000; Kroll *et al.*, 1995). McCord y Fridovich puntualizan en su investigación que la abundancia y distribución de la SOD sugiere que puede jugar un papel importante, incluso vital, en la protección del organismo ante los efectos dañinos del radical superóxido (McCord & Fridovich, 1969).

Estos dos descubrimientos fueron la chispa que daría inicio a una prolífica área de estudio, la del estrés oxidativo, cuya definición fue establecida por vez primera en los 1980's por Helmut Sies: “un desbalance entre los oxidantes y antioxidantes en favor de los oxidantes, llevando a una disrupción de la señalización y control reductor-oxidante y/o al daño molecular” (Stahl & Sies, 2012; Lane, 2012).

### **Formación de las ERO**

Las ERO han formado parte de las dinámicas celulares, prácticamente desde los inicios de la vida misma, su importancia se encontraría a discusión y no es el propósito de este trabajo. Sin embargo, no cabe duda al mencionar que la presencia del oxígeno en la atmósfera liberó un gran potencial energético, que le ha permitido a la vida evolucionar en formas cada vez más complejas; algunos de los mecanismos

## **Blancos celulares de las ERO y patologías asociadas.**

Las proteínas, al ser después del agua el componente más abundante de cualquier sistema biológico, ya sean células o tejidos -incluso en las membranas plasmáticas de muchas células 50 a 60 % del peso seco corresponde a proteínas (Zentella & Piña, 2008)-, son de las moléculas más comprometidas con el daño oxidativo.

El daño oxidativo a proteínas puede afectar tanto a las cadenas laterales de los aminoácidos que la integran, como a la cadena proteínica dada por los enlaces peptídicos, la columna vertebral de la proteína. La reacción de ERO menos reactivas con residuos azufrados específicos de aminoácidos (-SH y -S-CH<sub>3</sub>) en las proteínas, produce oxidación del residuo, que se acompaña de un cambio en la estructura, función y actividad de la proteína, dicha oxidación es reversible; cuando las proteínas son dañadas por oxidación no reversible estas son degradadas intracelularmente por proteasas, sin embargo en algunas ocasiones se acumulan irremediamente en células y tejidos. Tanto el daño oxidativo a proteínas como la acumulación excesiva de las proteínas oxidadas están asociadas a numerosas enfermedades humanas como Alzheimer, síndrome de inmunodeficiencia respiratoria, distrofia muscular, cataratas, artritis reumatoide, progeria, diabetes, aterosclerosis, envejecimiento, entre otras (Zentella & Piña, 2008).

Para el DNA la mayoría de las ERO son relativamente poco reactivas, pero el radical •OH, generado por la reacción de Fenton o por radiólisis del agua inducida por rayos X o  $\gamma$ , es muy reactivo, no sólo abstrayendo átomos de hidrógeno sino también adhiriéndose a las bases formando aductos, lo cual produce una gran diversidad de daños. Debido a que el DNA es una molécula de información genética única en cada célula su importancia es singular. Las ERO producen diferentes tipos de daño al DNA, como daño a las bases, azúcares, entrecruzamientos de proteínas con DNA, así como rupturas de cadena doble o sencilla y formación de sitios abasídicos. Este tipo de lesiones se han relacionado con procesos cancerígenos, de envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y muerte celular (Medeiros, 2008).

Los lípidos también son blancos celulares importantes del daño causado por ERO, daño conocido como lipoperoxidación no enzimática. Cuando la lipoperoxidación es inducida por ROS resulta en lípidos con radicales libres formados en sus carbonos, estos radicales afectarán de la misma forma a otros lípidos, propagando así el daño oxidativo de forma autocatalítica, sin una defensa en contra de estos radicales. La peroxidación generalmente termina cuando un radical lipídico reacciona con otro, formando un agregado o un dímero que queda dentro de la membrana y altera sus funciones, principalmente la fluidez y permeabilidad. Este daño a las membranas celulares altera el funcionamiento de proteínas, receptores e iones integrados en las mismas y la concentración de iones al interior de la célula, por lo que sus efectos a nivel tejido pueden ser diversos. Los daños generados a lípidos están relacionados con enfermedades como la aterosclerosis y el daño tisular provocado por infarto de miocardio, pero potencialmente está relacionado con una gran cantidad de patologías (Zenteno-Savin, 2008).

### **Funciones fisiológicas relacionadas a ERO**

Hasta aquí las ERO parecen ser los jinetes del apocalipsis de la fisiología celular, pero cabe recordar que no son solamente agentes dañinos para las células; como antes se mencionó, el estrés oxidativo ocurre sólo cuando hay un desequilibrio entre las ERO y los mecanismos de defensa que las contrarrestan. Cada vez existen mayores evidencias de que algunas enzimas específicas, como las NADPH oxidasas (NOX), producen ERO para regular diferentes funciones celulares, incluyendo inmunidad, diferenciación celular, proliferación celular, adhesión celular, transducción de señales, transporte de iones y apoptosis (Foreman *et al.*, 2003; Finkel, 2003; Aguirre *et al.*, 2005; Dröge, 2002).

Los peroxisomas son organelos que en su interior poseen la maquinaria enzimática para producir  $H_2O_2$ , pero no  $O_2^{\bullet-}$ . Bajo condiciones fisiológicas (Valko *et al.*, 2004) los peroxisomas tienen un gran consumo de oxígeno en la célula y participan en varias funciones metabólicas que producen  $H_2O_2$ . El peróxido producido es usado para

oxidar una variedad de moléculas, el organelo también contiene catalasa, una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno y presumiblemente previene la acumulación de este compuesto tóxico. Así, el peroxisoma mantiene un balance delicado con respecto a las concentraciones o actividades relativas de estas enzimas para asegurar que no exista una producción neta de ERO. Los mecanismos de mantenimiento de este equilibrio aún no son totalmente claros, pero si los peroxisomas fueran dañados y sus enzimas consumidoras de  $H_2O_2$  reguladas negativamente, el  $H_2O_2$  se liberaría al citosol, lo cual generaría un gran estrés oxidativo en la célula (Valko *et al.*, 2007).

Estudios recientes han demostrado que la unión a receptor de numerosos factores de crecimiento peptídicos estimulan la generación de ERO y que este estallido oxidativo es requerido para ciertos aspectos de la señalización río abajo (Dröge, 2002); una de las modificaciones involucradas en esta señalización es la que se lleva a cabo en residuos específicos de cisteína, a través de esta modificación enzimas como la Cdc25C, que es una enzima regulatoria del ciclo celular, sufren una inactivación, que puede ser enzimática o espontáneamente reversible a su forma activa; algunas evidencias sugieren que por lo menos para algunas proteínas, la restauración de la actividad requiere de un intermediario proteína-glutación (Finkel, 2003). En el dominio eucariota se ha propuesto que las ERO están directamente relacionadas con la regulación de la diferenciación celular (Aguirre *et al.*, 2005), característica de los organismos complejos.

Hace casi 45 años el papel de las ERO en los sistemas biológicos fue apenas dilucidado y aceptado por la comunidad científica, pasando primeramente por descripciones meramente dañinas hasta la concepción en la actualidad, de sus beneficios, demostrando ser parte de un fenómeno complejo al interior de los sistemas biológicos celulares y que necesitan estar libres de concepciones maniqueas. Su descripción y mayor comprensión necesitarán justamente un enfoque que no las catalogue como malas ni buenas, sino que meramente las comprenda como parte de las moléculas biológicas que conforman a la vida y sus funciones.

## **Antioxidantes**

Como se ha descrito anteriormente, la participación de las ERO en las células no es fortuita, ni sólo dañina; es amplia y con papeles distintos bajo diferentes cantidades, tiempos y lugares. El estrés oxidativo que pueden generar las ERO presentes en las células, es prevenido y/o regulado por distintos mecanismos, los más estudiados en la actualidad son aquellos relacionados con la producción de moléculas llamadas comúnmente antioxidantes.

Se conoce como antioxidantes a las moléculas que median la depuración de las ERO en las células, estos pueden ser de diversa naturaleza, pero en general se les divide en enzimáticos y no enzimáticos.

A grandes rasgos, el mecanismo de acción de los antioxidantes no enzimáticos es reaccionar con las ERO, neutralizándolas, amortiguando así el daño que se generaría en la función o estructura de otras moléculas; posteriormente los antioxidantes no enzimáticos en su forma oxidada pueden ser reciclados, siendo reducidos por diferentes enzimas específicas usando NADPH como poder reductor (Apel & Hirt, 2004).

Entre los principales antioxidantes no enzimáticos se encuentran: ascorbato, glutatión (GSH), tocoferoles, flavonoides, alcaloides, y carotenoides (Apel & Hirt, 2004). No todos los grupos filogenéticos producen todos estos antioxidantes, en el caso particular de los animales, como el humano, una cantidad importante de antioxidantes son adquiridos de la dieta, o producidos por la microbiota comensal del tracto digestivo.

Los antioxidantes enzimáticos por otro lado, son parte del repertorio enzimático celular, son la defensa antioxidante que tiene cada organismo codificada en su propio genoma. El papel de estos antioxidantes es catalizar reacciones que conviertan a las ERO en moléculas menos reactivas o completamente inocuas. Tal es el caso de la

superóxido dismutasa, que está encargada de catalizar la transformación del radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), en una especie menos reactiva, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); posteriormente esta especie será transformada en agua por otras enzimas antioxidantes como las catalasas (Gómez-Quiroz & Cuevas-Bahena, 2008).

Los principales antioxidantes enzimáticos son: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa, tiorredoxinas, hemo-oxigenasas y catalasas. Aunque la mayoría de estas enzimas están presentes en todos los dominios de la vida, no todos los organismos las poseen; sin embargo debido a la versatilidad del genoma y a la fuerza motora de la evolución, los sistemas antioxidantes codificados por los propios organismos demuestran gran plasticidad y suelen tener redes de regulación que compensan la carencia de uno u otro antioxidante, por ejemplo, incrementando la producción de un antioxidante por otro, que tenga una producción deficiente, nula o presente mutaciones deletéreas, o bien por redundancia de protección antioxidante (Willekens, 1997).

Los antioxidantes mantienen un “estado de equilibrio” en las concentraciones de ERO en las células, determinado por el balance entre las tasas de producción de las ERO y las tasas de su remoción por los diversos antioxidantes (Valko *et al.*, 2007). De esta forma, cada célula está caracterizada por una concentración particular de electrones almacenados en diferentes constituyentes celulares, conocidos como parejas redox - como es el caso de la pareja GSSG/2GSH-; la relación de sus formas reversibles oxidadas y reducidas es lo que se ha definido originalmente como “estado redox”, pero más recientemente se ha usado este término no sólo para describir el estado de una pareja redox en particular, sino también para describir el “ambiente redox”. Schafer y Buettner proponen que una correcta definición de este término sería: “la suma de los productos del potencial de reducción y la capacidad reductiva de un conjunto de parejas redox relacionadas en un fluido biológico, organelo, célula o tejido” (Schafer & Buettner, 2001).

más relevantes para la evolución de la vida eucariota como la diferenciación celular y la apoptosis están directamente relacionados con las ERO (Valko *et al.*, 2007).

Algunas ERO pueden ser generadas a partir de la excitación de los átomos de oxígeno por radiaciones ionizantes, tales como las de los rayos UV que provienen del sol, u otros mecanismos que ocurren abióticamente; cuando estas especies son asimiladas, son de fuente externa a la célula. Sin embargo existen muchas otras vías por las cuales son generadas por la célula misma, tales como las reacciones enzimáticas, espontáneas, de fotosensibilización, flujos y escape de electrones, entre otras. Debido a la gran diversidad de mecanismos por las que las ERO son generadas y la imposibilidad de describirlas a detalle, se presenta la tabla 2 como resumen práctico (Hansberg, 2008).

Especie	Fuente	Concentración intracelular	Reactividad	Eliminación
<b>O<sub>2</sub></b> Dioxígeno	Externa, catalasa	10 a 20 $\mu$ M	Hemo, Fe(II), flavinas, pterinas alcoxilos, NO•	Respiración, oxidasas
<b>O<sub>3</sub></b> Ozono	Externa	$\approx 0$	Ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, sacáridos y demás compuestos celulares	Ascorbato
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b> Oxígeno singlete	Fotosensibilización, descomposición H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (HOBr), dismutación espontánea del O <sub>2</sub> •-, peroxilípidos, NO <sub>2</sub> + ONOO-	$\rho$ M, vida $\frac{1}{2} < 1 \mu$ seg	Ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, sacáridos y demás compuestos celulares	Carotenos, tocoferoles, glutatión, ascorbato.
<b>O<sub>2</sub>•-</b> Radical anión superóxido	Externa e interna: cadena respiratoria, NADPH oxidasas, xantina oxidasas, lipoxigenasa, P <sub>450</sub> , hemoglobina, peroxidasas	$\rho$ M - $\mu$ M	O <sub>2</sub> •-, NO•, Fe(III), [4Fe-4S], quinonas, difenoles	SOD, dismutación espontánea
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> Peróxido de hidrógeno	Externa e interna: dismutación del O <sub>2</sub> •-, oxidasas	nM - $\mu$ M	Ascorbato, hemo, Fe-S	Catalasa, peroxidasas, peroxirredoxinas
<b>•OH</b> Radical hidroxilo	Reacción de Fenton	$\approx 0$	Cualquier compuesto vecino	Glutatión, ascorbato, solutos compatibles

**Tabla 2.** Fuente, concentración intracelular, reactividad y eliminación del dioxígeno y de las principales ERO. Tabla tomada del capítulo 2 del libro “Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas” [Hansberg, 2008].

El mantenimiento del ambiente redox de una célula es similar al mantenimiento de su pH, en el sentido de que bajo condiciones normales se mantiene en un rango reducido; sin embargo, el cambio del ambiente redox en algunos organelos o en la célula en general es necesario para una forma de señalización recientemente descrita, la señalización redox (Valko *et al.*, 2007).

Juntos antioxidantes y ERO, forman parte de una intrincada red de regulación, cuya comprensión apenas ha sido arañada, y los resultados se podrán ver reflejados en el mejoramiento de terapias y medicamentos para enfermedades relacionadas con ERO, procesos biotecnológicos asociados con estrés oxidativo y el entendimiento de la señalización redox y sus implicaciones biológicas.

### **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> una ERO con dos caras.**

El peróxido de hidrógeno, comúnmente conocido como agua oxigenada, se forma cuando cada uno de los dos electrones libres del O<sub>2</sub> se han apareado con un electrón de giro contrario. Es un líquido similar al agua aunque más denso y más viscoso. Es un ácido débil y como base es 10<sup>6</sup> veces más débil que el agua. Tiene un momento dipolar y una constante dieléctrica mayor que el agua, por lo que forma más puentes de hidrógeno y es un mejor disolvente de solutos polares que el agua; sin embargo, en concentraciones mayores a 70% es explosivo, por lo que generalmente se usa diluido en agua al 30% o menos (Hansberg, 2008).

La reacción de la enzima SOD transforma al radical anión O<sub>2</sub>•-, una de las ERO más reactivas, en una especie con menor toxicidad oxidativa, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de esta forma se produce la mayor parte del peróxido intracelular, contribuida también en menor proporción por la actividad de algunas oxidasas. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no interacciona con los compuestos como el NADPH, los ácidos nucleicos, los aminoácidos de proteínas -salvo algunos tioles particularmente reactivos-, ni con los lípidos, incluso en concentraciones milimolares, por lo que es considerada una de las ERO menos reactivas y más estables. Sin embargo la toxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es en mayor parte debida a

que esta especie puede difundir a través de los compartimentos celulares y membranas, formando aductos (uniones directas entre moléculas sin cambios estructurales) con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas, y en estos sitios generar a otras especies más reactivas como el  $^1\text{O}_2$  y el  $\bullet\text{OH}$ , a través de la reacción con algunos metales de transición como el hierro (reacción de Fenton). En este caso forma  $\text{HO}_2\bullet$ , el cual interacciona en el sitio donde se forma; así una molécula de peróxido de hidrógeno antes casi inocua, es transformada en un radical hidroxilo y ocasiona modificaciones irreversibles en las proteínas y alteraciones en el DNA, las cuales no siempre pueden ser reparadas (Hansberg, 2008). Esta es una de las razones por las que la vida desarrolló mecanismos de defensa contra las ERO.

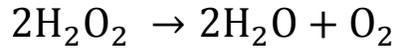
En contraste, el peróxido de hidrógeno puede actuar como segundo mensajero en la transducción de señales, principalmente para la activación de los sistemas antioxidantes, de las células inmunológicas, inflamación, proliferación celular y apoptosis (Zamocky, 2008).

## **Catalasas**

En respuesta a la toxicidad indirecta del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , los organismos han tenido que generar mecanismos que controlen el estrés oxidativo provocado por esta especie. Uno de los mecanismos más estudiados para contender con esta ERO son los antioxidantes enzimáticos conocidos ampliamente como catalasas, aunque más correctamente llamadas hidroperoxidadas (Chelikani *et al.*, 2004).

La reacción completa catalizada por las catalasas es la degradación de dos moléculas de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (fórmula 1), usando a una molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como oxidante y una segunda como reductor, volviendo así la enzima a su estado de reposo.

### **Fórmula 1:**



Se han caracterizado tres distintas clases de proteínas sin relación en estructura ni secuencia que presentan alta actividad de catalasa. La clase más distribuida en la naturaleza y más estudiada, está compuesta por enzimas monofuncionales con grupo hemo, subdivididas por tener subunidades pequeñas (<60 kDa) o grandes (>75kDa). El segundo grupo está compuesto por enzimas bifuncionales con actividad de catalasa-peroxidasa, también con grupo hemo. Y la tercera clase incluye a las catalasas sin grupo hemo, también conocidas como catalasas de manganeso (Chelikani *et al.*, 2004).

Las catalasas están presentes en los tres dominios de la vida, también se han encontrado en organismos anaerobios facultativos y estrictos (Peraza-Reyes, 2008), sugiriendo que estos organismos también están expuestos al oxígeno y sus especies reactivas y la importancia de los mecanismos para controlarlas para sobrevivir.

Las catalasas monofuncionales son las más abundantes y se encuentran presentes a lo largo y ancho del árbol de la vida, dividiéndose en tres clados: el clado 1 contiene catalasas de eubacterias, algas y plantas, siendo estas de subunidad pequeña (55-69 kDa); el clado 2 de bacterias y hongos de subunidad grande (75-84 kDa); y el clado 3, la más ampliamente distribuida, con catalasas de todos los dominios y reinos de la vida, siendo de subunidad pequeña (43-75 kDa). En este último clado se encuentran las catalasas de hígado bovino, eritrocito humano y de *S. cerevisiae*, con gran importancia médica y científica (Zamocky, 2008).

La falta de catalasa o su deficiencia en humanos, está ligada a: agregación y malfuncionamiento de eritrocitos, inflamación pulmonar, generación de ERO por células cancerígenas, defectos en proliferación celular y acatalasemia. La acatalasemia es una enfermedad hereditaria, en la que la actividad de catalasa es menor al 10% del nivel normal, lo que generalmente conduce a síntomas como: gangrena oral;

ulceración; alteraciones en metabolismos de lípidos, sacáridos y homocisteína; y un mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus (Zamocky, 2008).

### **Catalasas en *S. cerevisiae* y *D. hansenii***

*S. cerevisiae* posee dos catalasas: *ScCTT1* -comúnmente llamada catalasa T- localizada en el citoplasma; y *ScCTA1* -o catalasa A-, cuya localización se suponía exclusiva del peroxisoma.

Los estudios de las catalasas de *S. cerevisiae* han propuesto que estas enzimas no tienen un papel significativo en la detoxificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bajo condiciones fisiológicas, sin embargo han remarcado que estas enzimas sí son relevantes para condiciones de estrés, como lo es la fase estacionaria y también para optimizar una respuesta adaptativa al estrés por peróxido (Izawa *et al.*, 1996); a su vez también se ha descrito que el sistema de detoxificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por medio de la catalasa es redundante con el de glutatión, esto es: la presencia de uno compensa la ausencia del otro, pero si ambos sistemas tienen deficiencias, el estrés oxidativo se verá exacerbado (Grant *et al.*, 1998). Por lo que la relevancia de su estudio radica principalmente en entender los mecanismos del estrés oxidativo en *S. cerevisiae*, cuyos resultados con el debido cuidado pueden ser extrapolados a otros organismos.

En *D. hansenii* se encuentran homólogos de ambas catalasas de *S. cerevisiae*, *DhCTA* para la catalasa A y *DhCTT* para la catalasa T. Sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos se encuentran publicadas en la página del Consorcio Génolevures <http://genolevures.org/>. El estudio de estas enzimas es realizado actualmente en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias, UNAM.

### **III. Antecedentes**

El presente estudio encuentra sus antecedentes principalmente en el trabajo de investigación realizado por el equipo del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias, UNAM. De este destacan el artículo publicado “The Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii* has two catalase genes encoding enzymes with differential activity profile” por Segal-Kischinevzky *et al.* (Segal-Kischinevzky *et al.*, 2011); la tesis para grado de licenciatura “Complementación heteróloga de una mutante acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae* con el gen de la catalasa A de *Debaryomyces hansenii*” de Diego Noriega-Samaniego (Noriega-Samaniego, 2012) y la tesis para grado de licenciatura “Expresión del gen *DhCTT1* de *Debaryomyces hansenii* en una mutante acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae*” de Román Alfonso Castillo-Díaz (Castillo-Díaz, 2013).

En estos trabajos se obtuvieron resultados relevantes para el estudio de las catalasas tanto de *D. hansenii* como de *S. cerevisiae*.

Segal-Kischinevzky y colaboradores observaron que *D. hansenii* presenta una actividad específica de catalasa alta, mayor que la de *S. cerevisiae*, cuando ambas levaduras son crecidas en las mismas condiciones y que esta actividad aumenta aún más cuando *D. hansenii* es cultivada en etanol como única fuente de carbono en fase estacionaria; sin embargo cuando se agrega NaCl al medio de cultivo, la actividad específica de catalasa disminuye, lo que sugiere una disminución en el estrés oxidativo bajo esta condición, argumento que se suma a los ya varios reportes sobre un papel protector que tendría el NaCl contra distintos tipos de estrés en *D. hansenii* (Segal-Kischinevzky *et al.*, 2011; Prista & Almagro, 1997).

A su vez, probaron mediante Northern blot que la mayor actividad de catalasa corresponde a un mayor nivel de RNA mensajero del gen que codifica para la catalasa A en *D. hansenii*; sin embargo la baja en actividad en presencia de NaCl no la relacionan con una reducción de los niveles de expresión de mRNA cuando la fuente de carbono es etanol pero sí cuando ésta es glucosa. Por otra parte sus resultados

mostraron que la proteína *DhCTT* sólo es evidente en cultivos crecidos en medio rico con glucosa (YPD) en fase estacionaria, mientras que demostraron la presencia de su mRNA tanto en cultivos de fase exponencial como estacionaria: también demostraron que la expresión de *DhCTT* es reprimida cuando está en presencia ya sea de etanol, NaCl o ambos. Por lo que concluyen que tanto *DhCTA* como *DhCTT*, poseen mecanismos post-transcripcionales que juegan un papel importante en su regulación, y que el incremento de actividad de catalasa en presencia de NaCl en *S. cerevisiae* no se observa en *D. hansenii*, por el contrario esta se ve disminuida (Segal-Kischinevzky *et al.*, 2011).

Noriega-Samaniego y Castillo-Díaz determinaron que los genes de catalasa de *D. hansenii* *DhCTA* y *DhCTT* complementaron exitosamente cepas de *S. cerevisiae* antes acatalasémicas, generando dos cepas de *S. cerevisiae* con actividad de catalasa correspondiente a las proteínas de *D. hansenii*: *Sc acat::DhCTA*, una cepa doble mutante de *S. cerevisiae* antes acatalasémica conteniendo el gen de catalasa A de *D. hansenii* (Noriega-Samaniego, 2012); y *Sc acat::DhCTT*, conteniendo el gen de catalasa T de *D. hansenii* (Castillo-Díaz, 2013).

Ambos genes lograron ser expresados bajo el control de su promotor nativo (*D. hansenii*) utilizando la maquinaria transcripcional de *S. cerevisiae* y la actividad de catalasa fue restituida en las dobles mutantes de *S. cerevisiae*.

Sus resultados también demostraron que la cepa *Sc acat::DhCTA* se caracterizó por crecer de forma más rápida en medio rico con etanol como fuente de carbono, mientras que la cepa *Sc acat::DhCTT* presentó mayor actividad específica de catalasa y mayor biomasa que las cepa silvestre de *S. cerevisiae* (*Sc Wt*) y sus mutantes simples: *Sc ΔCTA*, sin catalasa A; y *Sc ΔCTT*, sin catalasa T.

#### **IV. Justificación**

Los procesos de estrés oxidativo son generales para todas las formas de vida, el estudio de los mecanismos que los controlan es de relevancia académica, biotecnológica, económica y social, pues el estudio de los mismos ha permitido el avance de muchos campos de interés común como lo son la medicina, la industria alimentaria, la ciencia y la tecnología, entre otras.

El estudio aquí presentado plantea analizar la expresión heteróloga de las catalasas A y T de *D. hansenii* en una mutante acatalasémica de *S. cerevisiae* con el fin de apreciar las diferencias fisiológicas y bioquímicas relevantes de dicha expresión en comparación con su completa ausencia y la expresión nativa de las catalasas de *S. cerevisiae* y de *D. hansenii*.

## V. Objetivos

### Objetivo general

Realizar un análisis fisiológico y bioquímico comparativo de las cepas transformadas *Sc acat::DhCTA* y *Sc acat::DhCTT* con un enfoque en el estrés oxidativo.

### Objetivos particulares

Obtener información fisiológica y bioquímica de la expresión heteróloga de los genes que codifican para las catalasas A y T de *D. hansenii* en una mutante acatalasémica de *S. cerevisiae*, relevante a los procesos que median estas enzimas.

Cuantificar y comparar la actividad específica de catalasa en las distintas cepas transformantes en comparación con *S. cerevisiae*, *D. hansenii* y una mutante acatalasémica de *S. cerevisiae*, esto a su vez en diferentes condiciones de cultivo.

Determinar cualitativamente la resistencia a estrés oxidativo de las cepas transformantes *Sc acat::DhCTA* y *Sc acat::DhCTT*, en comparación con la cepa silvestre de *S. cerevisiae*.

Evidenciar posibles mecanismos de defensa celular simultánea a estrés osmótico y oxidativo.

## VI. Materiales y métodos

### Cepas y medios de cultivo

Para el análisis fisiológico de las cepas *Sc acat::DhCTA* y *Sc acat::DhCTT* se usaron como referencia las levaduras *S. cerevisiae* en su forma silvestre (*Sc Wt*), *D. hansenii* también en su forma silvestre (*Dh Wt*) y una cepa de *S. cerevisiae* completamente acatalasémica (*Sc acat*), previamente obtenida de la cruce de dos levaduras con deleciones en los genes que codifican para catalasas, una en el gen *ScCTA1* (YDR256C) y la otra en el gen *ScCTT1* (YGR088W), las cepas utilizadas para la realización de los experimentos se encuentran enlistadas en la tabla 3.

Cepa	Nomenclatura usada	Origen	Genotipo
<i>S. cerevisiae</i> S288c	<i>Sc Wt</i>	Cepa de referencia	MAT $\alpha$ SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6
<i>S. cerevisiae</i> Y13615	$\Delta$ <i>cta1</i>	Euroscarf: European <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Archive for Functional Analysis	BY4742 MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 YDR256c::KanMX4
<i>S. cerevisiae</i> Y04718	$\Delta$ <i>ctt1</i>	Euroscarf: European <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Archive for Functional Analysis	BY4741 MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 YGR088w::KanMX4
<i>S. cerevisiae</i> Y04718xY13615	<i>Sc acat</i>	Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias, UNAM	BY4742xBY4741 MAT ? his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 YDR256c::KanMX4 YGR088w::KanMX4
<i>S. cerevisiae</i> Y04718xY13615 pRS316:: <i>DhCTA</i>	<i>Sc acat::DhCTA</i>	Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias, UNAM	BY4742xBY4741 MAT ? his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 YDR256c::KanMX4 YGR088w::KanMX4
<i>S. cerevisiae</i> Y04718xY13615 pRS316:: <i>DhCTT</i>	<i>Sc acat::DhCTT</i>	Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias, UNAM	BY4742xBY4741 MAT ? his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 YDR256c::KanMX4 YGR088w::KanMX4
<i>D. hansenii</i> Y7426	<i>Dh Wt</i>	Cepa de referencia	Genotipo silvestre desconocido

**Tabla 3.** Listado de cepas por: nombre, nomenclatura usada, origen y genotipo.

Los medios usados en los experimentos fueron medios ricos, conteniendo todos extracto de levadura (Becton Dickinson Microbiology Systems) y peptona de caseína (Becton Dickinson Microbiology Systems), pero difiriendo en su fuente de carbono - glucosa o etanol- y en la adición de NaCl, su composición se presenta en la tabla 4.

	<b>Proveedor</b>	<b>YPD</b>	<b>YPD+NaCl 0.6M</b>	<b>YPE</b>	<b>YPE+ NaCl 0.6M</b>
<b>Extracto de levadura</b>	Becton Dickinson Microbiology Systems	10 g	10 g	10 g	10 g
<b>Peptona de caseína</b>	Becton Dickinson Microbiology Systems	20 g	20 g	20 g	20 g
<b>Dextrosa</b>	Sigma	20 g	20 g	-	-
<b>Etanol*</b>	Sigma	-	-	20 mL	20 mL
<b>NaCl</b>	Amresco	-	35.7 g	-	35.7 g

\* El etanol se esterilizó por luz UV y filtración y se añadió a los medios ya esterilizados en autoclave.

**Tabla 4.** Composición de ingredientes por litro en los distintos medios usados en los experimentos del presente estudio.

Para el mantenimiento de las cepas transformantes se usó un medio mínimo YNB (Amresco) adicionado con aminoácidos (Sigma) sólo para sus auxotroffias correspondientes, su composición se encuentra en la tabla 5.

<b>Medio mínimo selectivo por litro</b>	
YNB	6.7 g
Glucosa	10 g
Agar	10 g
Histidina (49 mM)	2 mL
Metionina (67mM)	2 mL
Leucina (76.2 mM)	3 mL
Lisina ( 54.7 mM)	3 mL
Sulfato de amonio	5 g

**Tabla 5.** Composición medio mínimo selectivo por litro.

## **Mantenimiento de las cepas y condiciones de cultivo**

Las cepas fueron mantenidas en cajas Petri por separado, conteniendo medio adicionado con agar purificado para microbiología (Merck) al 2% en refrigeración a 4 °C, las cepas fueron resembradas cada 30 días; las cepas de *Sc Wt* y *Sc acat* fueron mantenidas en YPD-agar, las cepas transformantes *Sc acat::DhCTA* y *Sc acat::DhCTT* en medio selectivo YNB-agar, mientras que *D. hansenii* fue mantenida en YPD-agar + NaCl 0.6 M.

La temperatura de crecimiento que se mantuvo en la incubadora para todos los experimentos fue 28 °C, en el caso de medios líquidos se aplicó agitación a 180 rpm. Para todos los experimentos se realizaron precultivos con incubación por 48 y hasta 72 horas.

## **Curvas de crecimiento**

Cada cepa fue cultivada en 100 mL de medio rico, con glucosa o etanol como fuente de carbono, y con presencia o ausencia de NaCl a una concentración de 0.6 M. Las levaduras se inocularon a una densidad óptica de 0.05  $A_{600nm}$  y se crecieron durante 72 horas a 28 °C con agitación constante a 180 rpm.

Durante el crecimiento se tomaron muestras en los intervalos de tiempo: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 30, 36, 48, 54, 60 y 72 horas; se diluyó la muestra en agua bidestilada cuando la densidad óptica sobrepasaba 0.5  $A_{600nm}$ , buscando precisión en la medición. Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas de la figura 3.

## **Protocolo: Curvas de crecimiento**

1. Inocular medios de cultivo líquido YPD (50 mL) o YPD-NaCl en el caso de *D. hansenii*, con levadura crecida en medio sólido, en condiciones asépticas.
2. Incubar los cultivos a 28 °C, 180 rpm, durante dos días.

3. Centrifugar los cultivos en tubos cónicos de polipropileno de 50 mL a 3,000 rpm durante 10 min.
  4. Lavar las levaduras con H<sub>2</sub>O ddi (destilada, desionizada, esterilizada)
  5. Volver a centrifugar a 3,000 rpm durante 10 min
  6. Resuspender en H<sub>2</sub>O ddi en un volumen pequeño, aprox. 2 mL.
  7. Realizar una dilución en cámara de espectrofotómetro 1:1000. Colocando 2,970 µl de H<sub>2</sub>O ddi + 30 µl del concentrado de levadura.
  8. Medir en espectrofotómetro a 600 nm. Tomar como blanco H<sub>2</sub>O ddi
  9. Realizar los cálculos necesarios para obtener una absorbancia final en los medios en los que se realizará la curva de crecimiento de 0.05 A<sub>600nm</sub>.
  10. Inocular con la cantidad calculada los medios, agitar vigorosamente.
  11. Tomar una muestra de 3 mL y medir en espectrofotómetro la absorbancia (A) a 600 nm. Tomar como blanco medio YPD estéril.
  12. Colocar en incubadora a 28 °C, 180 rpm.
  13. Tomar mediciones subsecuentes de la absorbancia a 600 nm de los medios en los siguientes intervalos de tiempo: 3, 6, 9, 12, 24, 30, 36, 48, 54, 60 y 72 horas.
- Nota: El rango de linealidad del instrumento considera una A<sub>600nm</sub> de 0.05 a 0.5, por lo que las muestras fueron diluidas para entrar en ese rango, cuando fue necesario.

### **Calcular tiempo de duplicación**

El tiempo de duplicación se calculó usando la herramienta en línea *Doubling-time calculator* (Roth, 2006), cuya URL es <http://www.doubling-time.com/compute.php>.

### **Procedimiento:**

1. Tabular los datos de la fase de crecimiento exponencial por hora y absorbancia en Excel.
2. Copiar los valores en el cuadro bajo el título *Several Time Points*.
3. Seleccionar si el valor que conforma la primera columna es el tiempo o la cantidad.
4. Dar click en submit.

5. Los datos serán analizados y el programa dará como resultado el tiempo de duplicación (Doubling Time) y la tasa de crecimiento (Growth Rate).

### Several Time Points

Paste your data here  
(couple time-amount):

This format  
(from excel)  
0 0.4  
24 1.1  
45 2.5  
78 6.1  
EXAMPLE !!!  
OR this one

What is the 1<sup>st</sup> column ?

Time

Amount

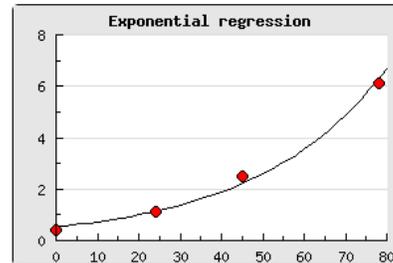
Doubling Time = **21.86**<sub>=ln(2)/0.0317</sub>

Growth Rate = 0.0317

Growth Rate = number of doublings that occur per unit of time

Equation : amount=0.5288\*e<sup>0.0317\*time</sup>

At t=0, calculated cell concentration = 0.5288



**Figura 2.** Ejemplo de resultados en pantalla del programa “*Doubling-time calculator*”. Resaltado en negritas está el tiempo de duplicación, dado en la unidad de tiempo usada en los datos ingresados.

### Protocolo: Obtención del extracto crudo

1. Colectar las células de la fase estacionaria (72 horas de crecimiento) en tubos cónicos de polipropileno de 50 mL y centrifugar 10 min a 3,000 rpm, repetir de ser necesario hasta colectar todas las células.
2. Agregar aprox. 25 mL de H<sub>2</sub>O ddi, agitar en vórtex hasta que se resuspenda por completo la pastilla.
3. Centrifugar nuevamente por 10 min a 3,000 rpm.
4. Poner 1 tubo de ensayo en hielo por cada experimento.
5. Resuspender las células del paso 2 en 1 mL de amortiguador de extracción de catalasa (glicerol 20%, TrisHCl 0.1 M, pH 8).
6. Pasar a tubos de ensayo previamente enfriados, las células resuspendidas en el paso 5 y añadir ½ del volumen de perlas de vidrio de 710 – 1,180 µm de diámetro esterilizadas.
7. Agitar cada tubo en vórtex vigorosamente durante 1 min y reposar en hielo por lo menos 1 min, repetir 4 veces más con cada muestra.

8. Transferir a microtubos estériles con pipeta Pasteur.
9. Centrifugar durante 15-20 min a 14,000 rpm en frío.
10. Pasar el sobrenadante a microtubos limpios.

**Protocolo: Cuantificación de proteína en extractos crudos por el método de Bradford (Bradford, 1976)**

Curva patrón

1. En 5 tubos de ensayo poner 20  $\mu$ L de estándares de Albúmina Sérica Bovina (BSA) partiendo de 0.1 mg/mL hasta 0.9 mg/mL y añadirlos a 1 mL de reactivo de Bradford 1X (Bio-Rad).
2. Agitar levemente en vórtex.
3. Incubar las muestras durante 5 minutos y leer en celdas de plástico de 1 mL a 590 nm.

Muestras problema

4. En tubos de ensayo con 1 mL de reactivo de Bradford agregar 20  $\mu$ L de la muestra, en caso de estar demasiado cargada, realizar diluciones hasta que su absorbancia esté dentro de la curva patrón.
5. Agitar levemente en vórtex e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Leer las muestras en espectrofotómetro a 590 nm.

NOTA: las muestras se deben analizar por triplicado.

**Protocolo: Ensayo de la actividad específica de catalasa (Aebi, 1984 y Segal-Kischinevzky, 2011)**

1. Preparar una solución fresca de  $H_2O_2$  500 mM
2. En una celda de cuarzo añadir 2.9 mL de buffer de actividad de catalasa (fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0) y de 1 a 20  $\mu$ L de extracto proteínico.

3. Agregar 100  $\mu\text{L}$  de la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  500 mM, mezclar por inversión la celda y rápidamente iniciar la medición de la absorbancia a 240nm.
4. Seguir el decaimiento del  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 2 minutos, obteniendo la pendiente por minuto,  $m$ .
5. Calcular la actividad específica usando la fórmula 2.

**Fórmula 2:**

$$AEC = \frac{m}{V_{extP} \cdot [P] \cdot \epsilon}$$

En donde:

$AEC$  = Actividad Específica de Catalasa (mmol  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidado/min/mg de proteína)

$m$  = Pendiente por minuto calculada a partir de mediciones (1/min)

$V_{extP}$  = Volúmen de extracto proteínico usado (mL)

$[P]$  = Concentración de proteína por ml de muestra (mg/mL)

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción molar ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) = 0.00422

**Protocolo: Ensayo de sensibilidad a choque por peróxido de hidrógeno (Segal-Kischinevzky, 2011)**

1. Hacer precultivos de las cepas en 50 mL de medio rico YPD ó YPD-NaCl en el caso de *D. hansenii* e incubar por dos días
2. A partir de los precultivos, reinocular 50 mL de cultivos nuevos del medio pertinente para el experimento, a 0.05  $A_{600\text{nm}}$ , incubar durante 20 a 24 horas.
3. Preparar 8 tubos de ensaye que contengan 5 mL de cultivo limpio y las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  correspondientes a cada tubo, descritos en la tabla 6.

# Tubo	$\mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{O}_2$ (30%)	$[\text{H}_2\text{O}_2, \text{mM}]$
1	0	0
2	1.28	2.5
3	2.55	5
4	3.82	7.5
5	5.10	10
6	7.65	15
7	10.20	20
8	15.31	30

**Tabla 6.** Concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por tubo en el ensayo de sensibilidad.

4. A partir del cultivo en fase exponencial (<24h), inocular los 8 tubos ajustándolos a 0.5 ab<sub>S600nm</sub>, incubarlos durante 180 minutos a 28°C 180 rpm.
5. Transferir el contenido a tubos cónicos de polipropileno de 50 mL y centrifugar a 3,000 rpm durante 10 minutos, descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla celular en 1 mL de agua ddi estéril.
6. A cada muestra medir la absorbancia en 600 nm y diluir en microtubos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ddi estéril para tener 0.05 A.
7. Realizar diluciones seriales en microtubos 1:10, 1:100 y 1:1000.
8. Plaquear gotas de cada muestra y sus diluciones en cajas Petri YPD-agar, manteniendo un orden en las concentraciones de peróxido usado por muestra y sus diluciones.
9. Incubar durante 3 días a 28 °C.

### **Análisis bioinformático de secuencias de aminoácidos**

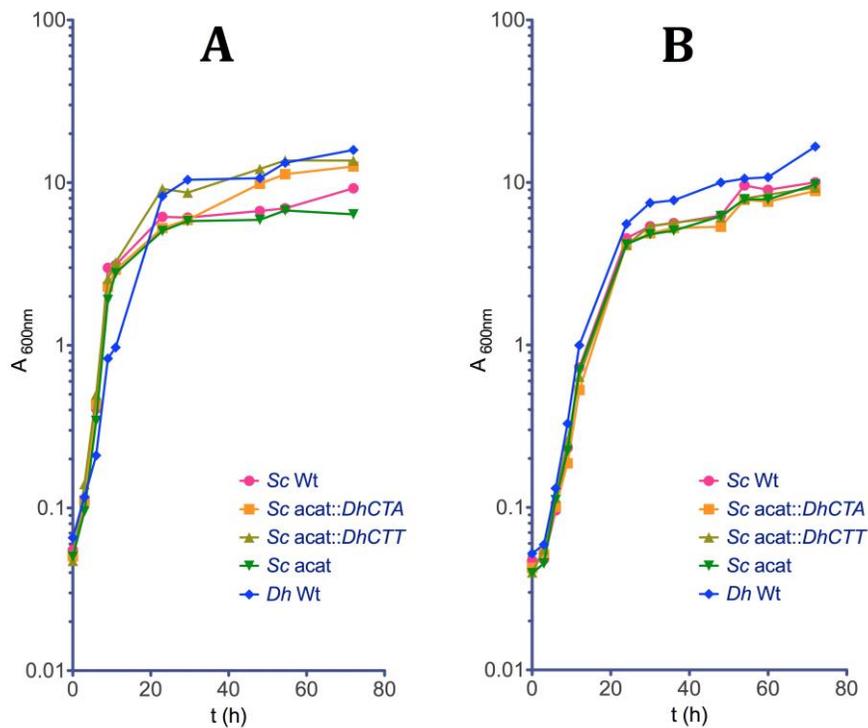
Las secuencias de aminoácidos de las catalasas de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* fueron obtenidas de la base de datos del consorcio Génolevures (83), cada secuencia fue alineada con su homólogo, es decir *ScCTA1* fue alineada con *DhCTA* y *ScCTT1* con *DhCTT*, con el programa Clustal Omega (84), para finalizar se obtuvo la composición de aminoácidos de las secuencias usando el programa bioinformático en línea PEPSTATS del proyecto de software abierto EMBOSS (85).

Con el uso de estas herramientas se obtuvieron los porcentajes de identidad entre las secuencias y la cuantificación de aminoácidos por proteína. Para realizar los cálculos de diferencia de aminoácidos entre secuencias se tomó como 100% a los aminoácidos en los que difiere la proteína, sólo se consideraron como aminoácidos de carácter hidrofóbico: cisteína (Cys), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), leucina (Leu), metionina (Met), valina (Val) y triptófano (Trp).

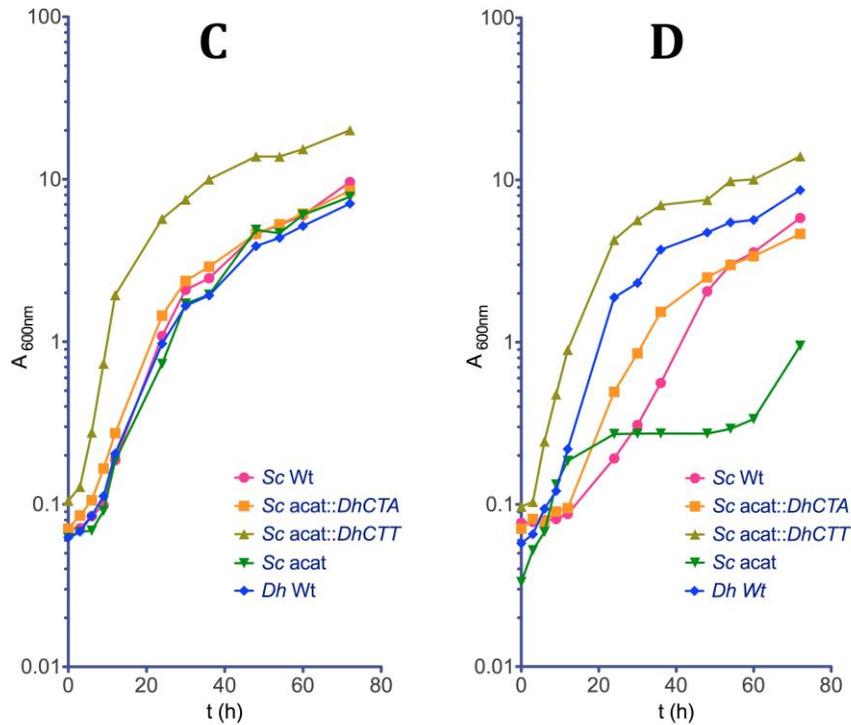
## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Curvas de crecimiento

Con el fin de analizar el crecimiento de las cepas transformadas *S. cerevisiae* acatalasémica::*DhCTA* y *S. cerevisiae* acatalasémica::*DhCTT*, se procedió a su cultivo simultáneo junto con cepas de *D. hansenii* silvestre (*Dh Wt*), *S. cerevisiae* silvestre (*Sc Wt*) y acatalasémica (*acat*), fungiendo estas tres últimas como referencia para realizar el análisis (figura 3).



**Figura 3 (1ra Parte).** Curvas de crecimiento de las cepas en distintos medios de cultivo, durante 72 horas. Las mediciones se realizaron en espectrofotómetro, con las 5 cepas cultivadas simultáneamente en cada medio (A) YPD, (B) YPD + NaCl, (C) YPE y (D) YPE + NaCl, las muestras se tomaron en los mismos intervalos de tiempo.



**Figura 3 (2da Parte).** Curvas de crecimiento de las cepas en distintos medios de cultivo, durante 72 horas. Las mediciones se realizaron en espectrofotómetro, con las 5 cepas cultivadas simultáneamente en cada medio (A) YPD, (B) YPD + NaCl, (C) YPE y (D) YPE + NaCl, las muestras se tomaron en los mismos intervalos de tiempo.

### Tiempo de duplicación en fase exponencial

A partir de los datos de crecimiento, se tomaron los de la fase exponencial de la curva para analizar los tiempos de duplicación correspondientes a cada cepa. Para obtener este resultado se usó la herramienta informática en línea “*Doubling Time On-line Calculator*” (Roth, 2006), la cual calcula la regresión exponencial a partir de los datos introducidos y la ajusta a la ecuación de crecimiento exponencial (fórmula 3), dando como resultado la tasa de crecimiento,  $k$ .

Fórmula 3:

$$X_t = X_0 \cdot e^{kt}$$

en donde:

$X_t$  = Concentración celular en tiempo  $t$

$X_0$  = Concentración celular inicial

$k$  = Tasa de crecimiento

$t$  = Tiempo

Posteriormente, el tiempo de duplicación  $T_d$  se calcula con la tasa de crecimiento  $k$  usando la siguiente fórmula:

Fórmula 4:

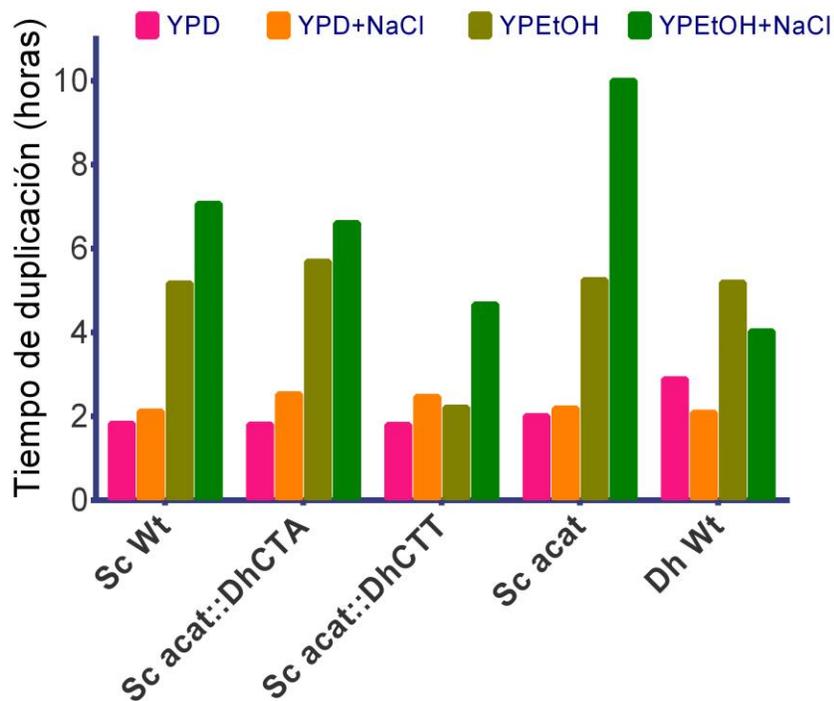
$$T_d = \frac{\ln(2)}{k}$$

en donde:

$T_d$  = Tiempo de duplicación

$k$  = Tasa de crecimiento

Los datos obtenidos fueron graficados por cepa en la figura 4 y los datos numéricos se muestran en la tabla 7.



**Figura 4.** Tiempo de duplicación por cepa en medios de cultivo con glucosa o etanol como fuente de carbono y en presencia o ausencia de sal (NaCl 0.6M). Los datos fueron calculados en la fase exponencial de las curvas de crecimiento de cada cepa.

	YPD	YPD+NaCl	YPE	YPE+NaCl
<i>S. cerevisiae</i> Wt	1.83	2.12	5.17	7.07
<i>Sc acat::DhCTA</i>	1.81	2.53	5.69	6.61
<i>Sc acat::DhCTT</i>	1.8	2.47	2.21	4.67
<i>Sc acat</i>	2.01	2.19	5.25	10.00
<i>D. hansenii</i> Wt	2.89	2.09	5.19	4.03

**Tabla 7.** Tiempo de duplicación (horas) en fase exponencial de cada cepa en los medios usados. Se consideraron sólo los puntos que reflejan la fase de crecimiento exponencial y se descartaron los demás datos para hacer este cálculo, se usó una herramienta en línea para realizar los cálculos matemáticos. Datos numéricos de la figura 4.

En medio rico con glucosa al 2% (YPD), las cepas *Sc* Wt, *Sc acat::DhCTA*, *Sc acat::DhCTT* y *Sc acat* presentaron crecimientos en fase exponencial y tiempos de duplicación muy similares entre sí, mientras que *D. hansenii* tuvo un tiempo de duplicación ligeramente mayor. Las dos cepas transformantes *Sc acat::DhCTA* y *Sc acat::DhCTT* junto con *D. hansenii* (*Dh* Wt) alcanzaron una biomasa mayor a la de *S. cerevisiae* silvestre (*Sc* Wt) y acatalasémica, que fueron muy similares entre sí. Al agregar NaCl 0.6M a este medio (YPD+NaCl) las fases exponenciales y tiempos de duplicación fueron equivalentes para todos los genotipos de *S. cerevisiae*, mientras que *D. hansenii* alcanzó una mayor densidad óptica, y por lo tanto mayor biomasa, reflejando su naturaleza halófila.

En medio rico con etanol 2% (YPE), el crecimiento de *Sc acat::DhCTT* fue notablemente mayor en biomasa, mientras que el crecimiento de *S. cerevisiae*, *Sc acat::DhCTA*, *Sc acat* y *D. hansenii* fue muy similar entre sí. De igual manera, el tiempo de duplicación de *Sc acat::DhCTT* fue por lo menos dos veces menor que las demás cepas; mientras que *D. hansenii* fue la que tuvo el menor crecimiento, siendo este el medio en el que menor crecimiento presentó esta levadura. Al agregar NaCl 0.6 M a este medio (YPE+NaCl) las cepas presentaron curvas de crecimiento muy distintas entre sí: *Sc acat* tuvo el mayor tiempo de duplicación, demostrando que la función de las catalasas es importante en esta condición, mientras que *D. hansenii* presentó el menor tiempo de duplicación; sin embargo la cepa que alcanzó la mayor biomasa fue *Sc acat::DhCTT* con un tiempo de duplicación

equiparable al de *D. hansenii*; mientras que *Sc acat::DhCTA* presentó un crecimiento similar al de *S. cerevisiae* silvestre (*Sc Wt*).

La cepa transformante *Sc acat::DhCTA* mostró un crecimiento similar al de la transformante *Sc acat::DhCTT* en medios con glucosa como fuente de carbono; en contraste, cuando fueron cultivadas en medios con etanol como fuente de carbono, *Sc acat::DhCTT* tuvo un tiempo de duplicación menor a los de *Sc acat::DhCTA*, 2 horas menos en medio YPE+NaCl y casi 3.5 horas menos en medio YPE, y por lo tanto una mejor adaptación a esta fuente de carbono y el uso de oxígeno que conlleva su respiración, lo cual puede explicarse en función de que la catalasa *DhCTT* se encuentre en el citoplasma y contienda mejor con las ERO de esta forma que si sólo se encontrara en los peroxisomas, como puede ser el caso de la catalasa *DhCTA*, que esperaríamos se encontrara en estos organelos únicamente.

De forma general, cuando las cepas transformantes crecieron en medios con presencia de NaCl, su tiempo de duplicación se incrementó de forma similar a como sucede en la cepa silvestre de *S. cerevisiae*, en contraste con *D. hansenii* que disminuye sus tiempos de duplicación, lo que nos indica que en este caso el gen no está contribuyendo de manera significativa a la adaptación osmótica.

*D. hansenii* demostró su naturaleza halófila (González-Hernández, J. & Peña, A., 2002) al tener un tiempo de duplicación menor en los medios con NaCl a 0.6 M, con una reducción de aproximadamente una hora en su tiempo de duplicación, con respecto a los medios con la misma fuente de carbono en ausencia de NaCl.

## **Ensayos de actividad de catalasa**

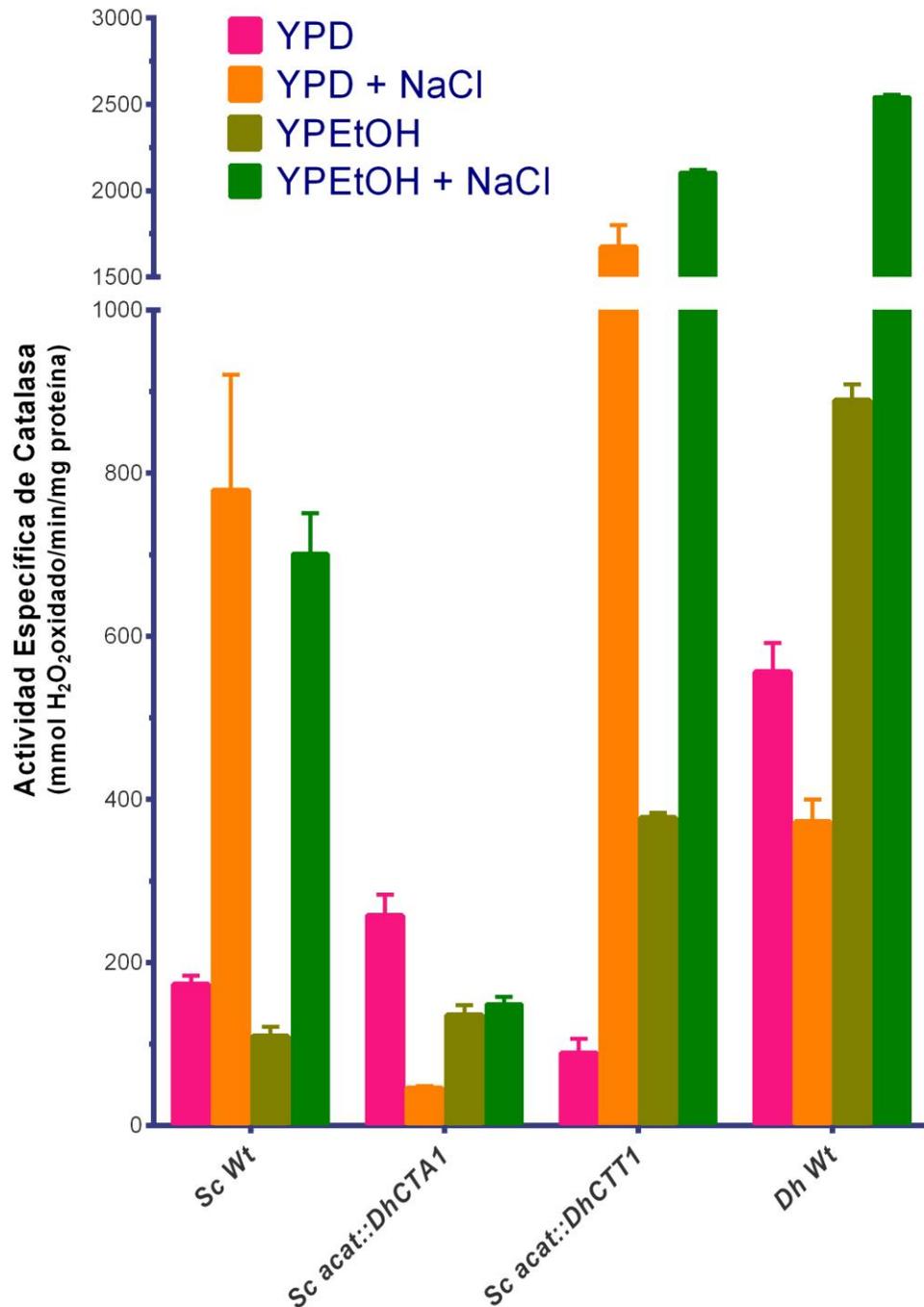
La actividad de catalasa fue determinada por un método adaptado por Segal-Kischinevzky (Segal-Kischinevzky et.al, 2011) a partir de uno de Aebi (Aebi, 1984). Consiste en medir por métodos espectrofotométricos el decaimiento del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocado por la catalasa presente en el extracto proteínico, midiendo la absorbancia a 240 nm en celda de cuarzo.

Después de que los cultivos crecieron por 72 horas se les realizó extracción proteínica (método descrito en materiales y métodos); en celdas de cuarzo de 3mL con 2.9 mL de buffer de actividad, se añadieron de 1 a 20  $\mu$ L del extracto proteínico, finalmente la reacción fue iniciada agregando 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500mM a la celda (concentración final H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 16.6 mM), rápidamente se agitó 3 veces por inversión y se colocó la celda en el espectrofotómetro, la actividad de la catalasa fue seguida durante 2 min.

Los resultados de los ensayos arrojan una pendiente dada en minutos (m/min) la cual describe el decaimiento del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el tiempo, que es proporcional a la velocidad inicial de reacción de la catalasa, condición en la que se encuentra un gran exceso de sustrato y la cinética enzimática de la reacción es llevada a cabo en equilibrio dinámico (Schnell & Chappell, 2006). Las actividades de catalasa fueron normalizadas a la cantidad total de proteína cuantificada por muestra (procedimiento en materiales y métodos) y expresadas en milimoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidado por miligramo de proteína (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidado/min/mg de proteína). Las actividades fueron determinadas por triplicado promediando los resultados y obteniendo su desviación estándar, datos que se encuentran graficados en la figura 5 y en la tabla 8 de forma escrita.

	YPD			YPD + NaCl			YPE			YPE + NaCl		
	Promedio	SD	N	Promedio	SD	N	Promedio	SD	N	Promedio	SD	N
<i>Sc Wt</i>	173.1	10.4	3	778.6	142.0	3	109.4	11.7	3	700.8	50.1	3
<i>Sc acat::DhCTA</i>	257.3	25.9	3	45.9	2.3	3	135.3	12.6	3	148.7	8.9	3
<i>Sc acat::DhCTT</i>	88.8	17.4	3	1673.7	127.2	3	377.1	6.4	3	2104.1	17.5	3
<i>Dh Wt</i>	556.0	35.4	3	372.1	27.7	3	889.3	19.6	3	2543.9	12.8	3

**Tabla 8.** Actividad específica de catalasa por cepa en diferentes medios de cultivo. Se muestran los promedios con su desviación estándar (SD) y el número de muestras (N). Datos numéricos de la figura 5.



**Figura 5.** Actividad específica de catalasa por cepa en diferentes medios de cultivo. Se extrajo la proteína de los cultivos crecidos por 72 h por rompimiento celular con perlas de vidrio, con estos extractos se realizaron ensayos espectrofotométricos calculando el decaimiento del  $H_2O_2$  midiendo la absorbancia a 240 nm, las mediciones se realizaron por triplicado y se calculó la desviación estándar graficada. Los valores numéricos de esta gráfica se encuentran en la tabla 8.

La actividad específica de catalasa es una variable multifactorial, algunos de los factores que probablemente afectan esta característica en cada cepa son: regulación transcripcional, post-traducciona, metabólica y la respuesta mediada por la susceptibilidad inherente del organismo al estrés osmótico y oxidativo -dada por la composición molecular de su citoplasma, membrana y pared celular de cada especie-.

En las cepas transformantes, las secuencias de regulación genética de *D. hansenii*, que poseen los genes de catalasa *DhCTA* y *DhCTT*, no son las mismas que tiene *S. cerevisiae* para regular la expresión de sus propios genes de catalasa, por lo que su regulación no debe ser exactamente la misma entre especies, incluso pueden no ser reconocidas, o es posible que mantengan cierta conservación y similitud. A esta fecha no tenemos certeza de cuáles sean los niveles de expresión ni la regulación post-traducciona de los genes *DhCTA*, *DhCTT* y sus productos en *S. cerevisiae*.

Sin embargo los experimentos de actividad específica de catalasa realizados sugieren que existe cierta relación en la expresión de las catalasas de *D. hansenii* en *S. cerevisiae* con la regulación nativa de cada levadura; en el caso de *Sc acat::DhCTA*, la actividad específica en medio con glucosa fue cinco veces mayor en ausencia de sal que en su presencia, esto es acorde a los estudios de regulación de *DhCTA* en *D. hansenii*, la cual presenta una sobre expresión de *DhCTA* en ausencia de NaCl (Segal-Kischinevzky, *et al.*, 2011), por lo que la regulación de este gen y su enzima debe funcionar de forma similar en ambas levaduras cuando estas se encuentran en un medio de cultivo fermentable. Por el contrario Segal-Kischinevzky y cols. muestran que la expresión de *DhCTA* en *D. hansenii* aumenta en presencia de etanol, lo que no sucede en la cepa *Sc acat::DhCTA*.

Por otro lado, la cepa *Sc acat::DhCTT* mostró similitudes con las actividades específicas de *S. cerevisiae* en estado silvestre, siendo estas mayores en presencia de sal que en su ausencia, 19 veces más cuando su fuente de carbono es glucosa y 5.5 veces más cuando ésta es etanol. Los estudios de la regulación de *DhCTT* en *D. hansenii* es contraria a estos resultados, lo que sugiere que en la cepa *Sc acat::DhCTT*, la

regulación de la expresión del gen de la catalasa *DhCTT* ocurre tal como lo haría *S. cerevisiae* con su gen nativo *ScCTT1*.

## **Ensayos de sensibilidad a choque por peróxido de hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]**

Análisis previos de nuestro laboratorio dieron como resultado que tanto *D. hansenii* como *S. cerevisiae* son más susceptibles al daño celular provocado por estrés oxidativo en fase de crecimiento exponencial, generado por un choque con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que durante la fase estacionaria, en la cual presentan mayor tolerancia (Segal-Kischinevzky, *et al.*, 2011).

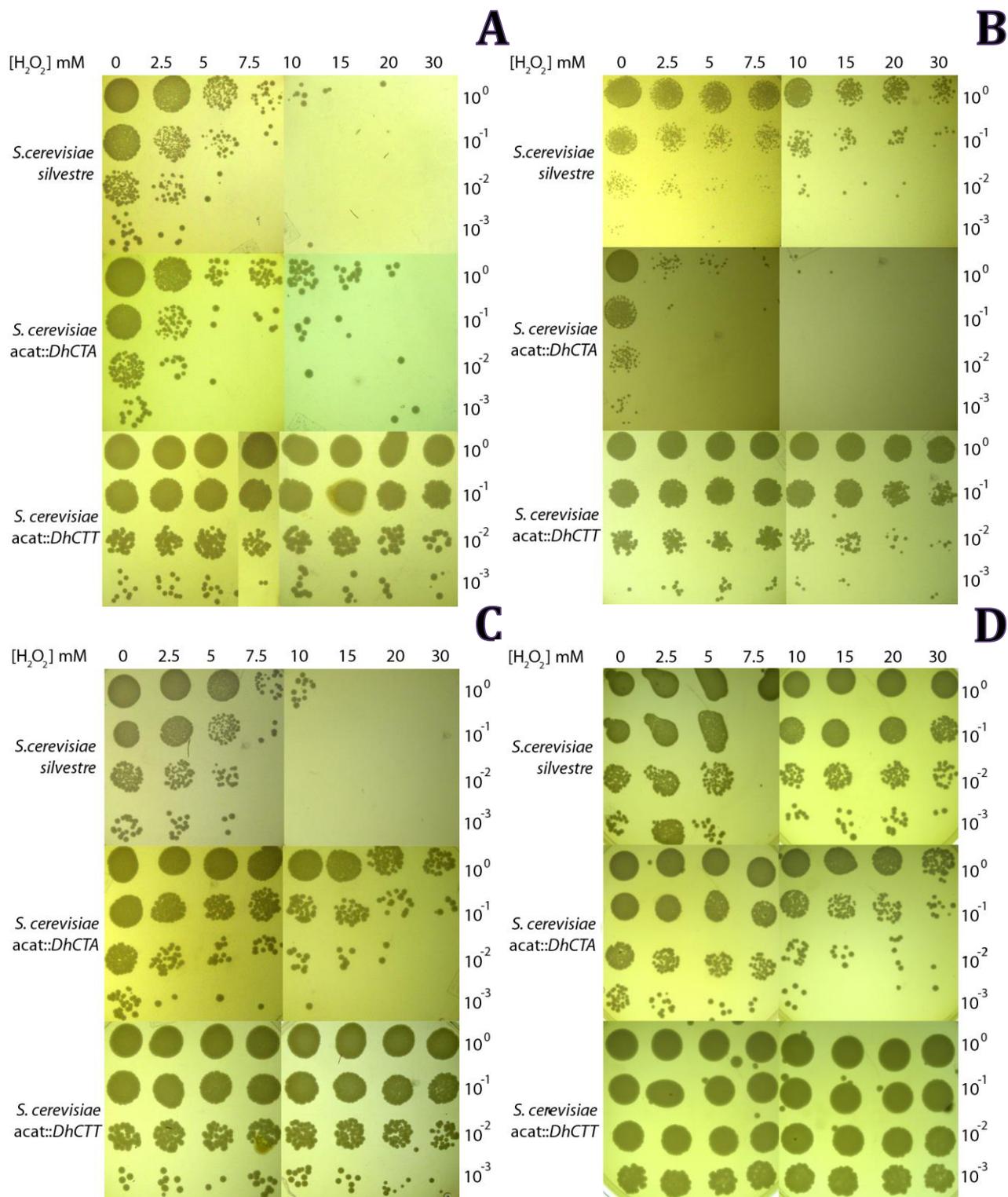
Dando seguimiento a estos resultados, se realizaron pruebas de viabilidad ante un choque con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las cepas transformantes *Sc acat::DhCTA* y *Sc acat::DhCTT*, tomando como referencia a la cepa silvestre de *S. cerevisiae* (*Sc Wt*). Las pruebas consistieron en exponer a las células de la fase exponencial de crecimiento durante 180 minutos a un medio con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones crecientes desde 0 hasta 30 mM, posteriormente a este tratamiento se removió el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se colectaron las células por centrifugación, finalmente se diluyeron las muestras en concentraciones 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000, sembrando gotas de cada dilución en placas de YPD-agar secas. Las pruebas se realizaron en cultivos de levaduras con glucosa o etanol como fuente de carbono y en presencia o ausencia de NaCl, buscando observar diferencias en la susceptibilidad al choque mediada por los diferentes tipos de metabolismo y condiciones de salinidad.

Los resultados de estos ensayos de viabilidad (figura 6) muestran que, en fase exponencial *Sc acat::DhCTT* presentó una gran resistencia al estrés oxidativo en todas las condiciones empleadas, creciendo en concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las que no logró crecer *S. cerevisiae* silvestre. De forma muy interesante, el incremento en la susceptibilidad de *Sc acat::DhCTT* ante el incremento de la intensidad del choque de peróxido fue mínimo. Comparando la viabilidad control (0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) contra la

viabilidad a máxima concentración (30mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), no se percibieron cambios significativos.

Estos resultados, aunados a que las regiones promotoras de *DhCTT* son las nativas de *D. hansenii*, sugieren que la expresión del gen de la catalasa T es regulada por factores de transcripción de estrés comunes para *S. cerevisiae* y *D. hansenii*, como yAP1p y el elemento general de respuesta al estrés (STRE) (Moradas-Ferreira *et al.*, 1996; Finkel, 2003), por lo que es regulado positivamente bajo el choque de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, la alta actividad específica de catalasa de *Sc acat::DhCTT*, obtenida en los ensayos mencionados en la sección anterior, en comparación a la de la cepa silvestre (*Sc Wt*), puede estar amplificando la resistencia observada, obteniendo un fenotipo similar al que se observa cuando *S. cerevisiae* ha llegado a fase estacionaria, en la cual las defensas antioxidantes son positivamente reguladas.

En contraste, la cepa *Sc acat::DhCTA* sólo se mostró resistente al choque de peróxido cuando el medio en el que se encontraba no contenía NaCl. Esto concuerda con la baja actividad específica de catalasa en presencia de sal mostrada en los resultados de la sección anterior y con los estudios de Segal-Kischinevzky sobre regulación de *DhCTA* en *D. hansenii*, en los que se observa sobre-expresión del gen sólo en ausencia de sal (Segal-Kischinevzky *et al.*, 2011).



**Figura 6.** Resistencia a  $H_2O_2$  de *S. cerevisiae* silvestre, *Sc acat::DhCTA* y *Sc acat::DhCTT* en fase exponencial de crecimiento, en glucosa o etanol como fuente de carbono, con y sin sal ( $NaCl$   $0.6M$ ). Cultivos de *Sc* Wt, *Sc acat::DhCTA* y de *Sc acat::DhCTT* en fase estacionaria fueron diluidos en medio fresco YPD (A), YPD+ $NaCl$   $0.6M$  (B), YPE (C), YPE+ $NaCl$   $0.6M$  (D) y expuestos a una concentración de  $H_2O_2$  de 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 y 30 mM durante tres horas. Después del tratamiento, el  $H_2O_2$  fue removido por centrifugación. Los cultivos fueron resuspendidos en agua bidestilada, diluidos serialmente y sembrados en placas de YPD, buscando plaquear cantidades iguales de células. Las placas fueron incubadas a  $28\text{ }^\circ C$  durante tres días.

La deficiente resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de NaCl de la cepa transformante *Sc* *acat::DhCTA* puede deberse principalmente a la carencia de la catalasa citoplasmática, ya que se ha demostrado que la catalasa T en *S. cerevisiae* tiene un papel importante en la resistencia al estrés osmótico (Schüller *et al.*, 1994), lo cual aunado al estrés oxidativo generado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pudo provocar una menor viabilidad en condiciones con estrés osmótico. Sin embargo se observó una mayor resistencia al estrés oxidativo cuando la cepa creció en etanol como medio de cultivo, lo cual puede ser contradictorio ya que el metabolizar el etanol conlleva generación de ERO en la cadena de transporte de electrones. Esto se explicaría si el etanol regulara positivamente a la catalasa A de *D. hansenii* y entonces así, esta catalasa sería la responsable de contrarrestar eficientemente el estrés oxidativo generado por el peróxido.

A la fecha no tenemos evidencia de la localización específica de las catalasas *DhCTA* y *DhCTT* de *D. hansenii* en la misma levadura y en las transformantes, pero los resultados aquí presentados sugieren que tienen la misma localización que las catalasas de *S. cerevisiae* en su estado silvestre, es decir, la catalasa A en peroxisomas y la T en citoplasma, ya que la función de mediación de estrés oxidativo está ligada con la regulación positiva de la catalasa T, confiriendo una mejor resistencia a la cepa *Sc* *acat::DhCTT*; mientras que la regulación positiva de la catalasa A está ligada a la oxidación metabólica de ácidos grasos (Moradas-Ferreira *et al.*, 1996). Realizar un experimento en el que la cepa *Sc* *acat::DhCTA* sea forzada a adoptar este metabolismo y comparar su eficiencia ante el estrés oxidativo con las demás cepas, podría dar resultados positivos a este supuesto.

### **Adaptaciones halofílicas de las catalasas *DhCTA* y *DhCTT*. Análisis bioinformático.**

Debido a la importancia que debe representar la adaptación al NaCl en *D. hansenii* para colonizar ambientes con estrés osmótico y halino, es posible que las catalasas de *D. hansenii* presenten adaptaciones moleculares para estos ambientes. Se han descrito



## Alineamiento de secuencias de aminoácidos para catalasas tipo T *DhCTT* x *ScCTT1* = 53% Identidad

```

DEHA2B16214g.aa    MVSEYIQNTKKDPAVYSTSNGVVPYANHPYGAQTAGPGGPLLLQDFNLMDDISHFHERIP
SACE0G07722g.aa    -MNVFGKKEEKQEKVYSLQNGFPYSHHPYASQYSRDPGPILLQDFHLLENIASFDRERVP
                    :. : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
DEHA2B16214g.aa    ERVVHAKGGGAHGYFELTDSLSDLTYARLPQSPGYKCPVSVRFSTVGGERTPTDIRDPR
SACE0G07722g.aa    ERVVHAKGGGCRLEFELTDSLSDITYAAPYQNVGYKCPGLVRFSTVGGESGTPDTARDPR
                    *****.: *****:*** * . ***** ***** ***** *****
DEHA2B16214g.aa    GFSIKLKTDIGNMDWVFNNTPIFFIRDPKFKSFIHTQKRDPSTNLNQLTDPYHTWDYFI
SACE0G07722g.aa    GVSFKFYTEWGNHDWVFNNTPVFRLDAIKFPVFIHSQKRDPQSHLNQFDTTIYWDYLT
                    *.*:*: * : * * *****:***:*** * * * * * : : : : : : : : : : : : : : : : :
DEHA2B16214g.aa    QNPECLHQITYMFGKRGIPKSWAEMHGYSGHFTFKLINDKDEITYIQIHCLADGGFDGFS
SACE0G07722g.aa    LNPESIHQITYMFGDRGTPASWASMNAYSGHSFIMVNKEGKDTYVQFHVLSDTGFETLTG
                    **.:*****.*** * ***.**..***:* :*:*: * :*:*: * :*:*: * :*:*: * :
DEHA2B16214g.aa    KEGKELAGSSPEYNTKDLYERIAAGNYPYSFYVQTMTPKQAEFRYSINDLTKVWPHKE
SACE0G07722g.aa    DKAELSGSHPDYNQAKLFTQLONGEKPKFCYVQTMTPKQAEFRYSVNDLTKIWPHE
                    :. : *:* * : * * . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
DEHA2B16214g.aa    FPLRKFGRMVLDKNPNVNHDEIEQIAFSPAHLVPGIEPSNDPVLQSRLYSYSDTHRHRL
SACE0G07722g.aa    FPLRKFGTITLTENVNDNYFQIEQVAFSPNTCIPGIKPSNDSVLQARLFSPDTQRHRL
                    ***** :. * : * * :*****:*****. :*****:*** * :*:*: * :*:*: * :
DEHA2B16214g.aa    GANYQQLPVNKPRTFDS-----NSGCPFLAGNFQREGIASIDNQSRPNYLSLL
SACE0G07722g.aa    GANYQQLPVNRPRNLGCPYSKGDQYTAEQCPFKAVNFQRDGPMSYINFGPEPNYISSLP
                    *****:*. : . : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :
DEHA2B16214g.aa    PINSVNDPKSYKNGLPPVEEKYLGVPVKRSTDKYEILQK-ERNLKAHEEKIWLKSYDY
SACE0G07722g.aa    NQT-----LKFKNEDNDEVSDKFKGIVLDEVTEVSVRKEQDQIRNEHIVDAKINQYYY
                    . :** . : ** . : * : * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
DEHA2B16214g.aa    ISGFSELDVEQPRALYKNIISKQDKGDFIEAIVGHASKISVPQIKERVPQLWGLIDGDLG
SACE0G07722g.aa    VYGISPLDFEQPRALYEKVNDEQKFLFVHNVVCHACKIKDPKVKRVTQYFGLLNEDLG
                    : * : * * .*****: : : : * : . : * * . * . * : : * * * : * : * : *
DEHA2B16214g.aa    SEVAKGLGVSYKHLTVDEYIEDLGIAPAN*
SACE0G07722g.aa    KVIAECLGVPWEPVDLEGYAKTWSIASAN*
                    . : * : * * : : : : * : . * * * *

```

### Simbología:

\* = Identidad : = Cambio conservativo . = Cambio semi-conservativo

Catalasas T	
Posiciones totales	562
Aminoácidos idénticos	297
Aminoácidos diferentes	265
% de identidad	<b>53%</b>

Catalasas A	
Posiciones totales	515
Aminoácidos idénticos	348
Aminoácidos diferentes	167
% de identidad	<b>68%</b>

**Tablas 9 y 10.** Resultados de la alineación de las secuencias de aminoácidos de las catalasas T y A de *D. hansenii* y *S. cerevisiae*. Debido a que en el alineamiento pareado algunas posiciones muestran espacios en blanco o *gaps*, para realizar el análisis, se tomó en cuenta el número máximo de posiciones (posiciones totales), siendo éste el de la secuencia de mayor tamaño; con este valor se calculó a partir del porcentaje de identidad dado, el número de aminoácidos idénticos y diferentes, estos valores son usados para el análisis posterior.

Tomando en cuenta la identidad de las proteínas (tablas 9 y 10), se le otorgó mayor peso a los cambios en los aminoácidos que no están conservados en las secuencias, de manera que sólo se usaron estos últimos para realizar el análisis.

Para determinar la presencia de aminoácidos con carácter hidrofóbico y ácido, se usó el programa bioinformático en línea PEPSTATS del proyecto de software abierto EMBOSS (Rice *et al.*, 2000); resultó que tanto la catalasa tipo T como la tipo A de *D. hansenii* presentan cambios en sus secuencias que reflejan las tres características predichas por Lanyi como adaptaciones moleculares para proteínas halófilas (Lanyi, 1974): *DhCTA* tiene un decremento de 4% y *DhCTT* de 3% en la cantidad de aminoácidos hidrofóbicos, ambas proteínas de *D. hansenii* tuvieron un contenido mayor de aminoácidos de carácter ácido y de serina, en comparación con las catalasas de *S. cerevisiae* (Tabla 11).

Aminoácidos	<i>DhCTT</i>		<i>DhCTA</i>	
	Número de cambios	%	Número de cambios	%
<b>Hidrofóbicos</b>	-9	-3.40	-7	-4.20
<b>Ácidos</b>	1	0.38	1	0.60
<b>Serina</b>	8	3.02	2	1.20

**Tabla 11.** Resultados finales del análisis de composición proteínica. Usando la herramienta bioinformática PEPSTATS de la suite EMBOSS, se obtuvieron los datos arriba presentados, los porcentajes fueron obtenidos tomando en cuenta como el 100% sólo los aminoácidos en los que difieren las secuencias de *D. hansenii* con respecto a las de *S. cerevisiae*.

El tipo de interacciones que tienen los aminoácidos en las proteínas son muy complejos como para determinar que los cambios aquí identificados en las secuencias de las catalasas de *D. hansenii* son justamente adaptaciones moleculares, pero es importante recalcar que tanto *DhCTA* como *DhCTT* tienen cambios en la composición de aminoácidos comparándolos con *ScCTA* y *ScCTT*, de forma muy similar, por lo que estos no deben ser producto del azar, lo que sugiere que estos cambios en realidad son funcionales y probablemente estén ligados a una resistencia al estrés halino en ambientes con altas concentraciones de sal.

## VIII. PERSPECTIVAS

Los resultados aquí presentados, revisados con la bibliografía, sugieren que la catalasa A de *D. hansenii* es poco relevante en la respuesta a estrés oxidativo exógeno, generado por el peróxido, y endógeno, al metabolizar el etanol. Es posible que su importancia radique en funciones del metabolismo de ácidos grasos; experimentos que determinen su importancia y eficiencia en procesos que requieran este tipo de metabolismo, pueden ser clave para mejorar la eficiencia de procesos biotecnológicos.

Estudios posteriores que busquen mecanismos de resistencia a estrés deben centrar sus esfuerzos y observaciones en la comprensión de la catalasa *DhCTT*, ya que estos estudios demuestran que su respuesta ante diferentes tipos de estrés de forma simultánea es muy buena, contrarrestando los efectos negativos de las ERO y permitiendo crecer bajo condiciones de estrés oxidativo.

Se sugiere que para tener una mayor comprensión de la función de las catalasas, se realicen experimentos de inmunotinción o co-expresión con una proteína fluorescente, para localizar a nivel celular las catalasas *DhCTA* y *DhCTT*, tanto en *D. hansenii* como en las cepas transformantes. Aunado a esto, los análisis de expresión de las catalasas en las transformantes ayudarán a comprender cómo están funcionando los genes y específicamente en qué momentos son regulados positiva o negativamente.

Por último, la generación de una cepa de *S. cerevisiae* complementada con las dos catalasas de *D. hansenii* muy probablemente presente una gran resistencia al estrés oxidativo, superior a la presente en las complementadas de forma simple. Se recomienda a su vez que las nuevas transformantes sean generadas con plásmidos de integración (Yip), ya que esto implicaría una mayor estabilidad del gen, lo cual es útil en el laboratorio a largo plazo, ya que las cepas no perderán la actividad.

## IX. CONCLUSIONES

La cepa complementada *Sc acat::DhCTT* resultó ser más resistente al estrés oxidativo mediado por peróxido en la fase de crecimiento exponencial, que la cepa silvestre de *S. cerevisiae*; también mostró una mayor ventaja de crecimiento en medio de cultivo con etanol como fuente de carbono, sobre todas las demás cepas, y su actividad específica en diferentes medios sugiere que es regulada como su homóloga en *S. cerevisiae*.

La cepa complementada *Sc acat::DhCTA* presentó un incremento en la resistencia a peróxido, en comparación con la cepa silvestre de *S. cerevisiae*, sólo en ausencia de sal. Lo cual respalda resultados anteriores y sugiere que la función de la catalasa A de *D. hansenii* no media el estrés a nivel general. Además los resultados obtenidos sugieren que la catalasa *DhCTA* en *S. cerevisiae* es regulada de forma diferente a su homóloga.

La composición de aminoácidos de las catalasas de *D. hansenii*, comparadas con las de *S. cerevisiae*, sugiere que las catalasas de la levadura eurihalina tienen adaptaciones moleculares a un ambiente halino.

Los resultados de este estudio sugieren que futuras investigaciones en las catalasas de *D. hansenii* pueden evidenciar la existencia de nuevos mecanismos que puedan simultáneamente proveer resistencia al estrés osmótico y al oxidativo. Específicamente la catalasa T de *D. hansenii* se postula para ser un gen candidato para mediar estrés oxidativo tanto exógeno como endógeno.

## X. REFERENCIAS

1. Aebi, H., 1984. **Catalase in vitro**. *Methods Enzymol.*, 105, pp.121–126. Disponible en: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10018913812/en/>
2. Aguirre, J. *et al.*, 2005. **Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes**. *Trends in microbiology*, 13(3), pp.111 –118. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15737729>.
3. Apel, K. & Hirt, H., 2004. **Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction**. *Annual review of plant biology*, 55, pp.373–99. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377225>.
4. Arfi, K. *et al.*, 2002. **Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis***. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(4), pp. 503–10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11954798>.
5. Borelli, B. M., Ferreira, E. G., Lacerda, I. C. a., Franco, G. R., & Rosa, C. a. 2006. **Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(11), 1115–1119. doi:10.1007/s11274-006-9151-3
6. Botstein, D. & Fink, G.R., 1988. **Yeast: an experimental organism for modern biology**. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4858), pp.1439–43. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3287619>.
7. Botstein, D., Chervitz, S. a, & Cherry, J. M. (1997). **Yeast as a model organism**. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5330), 1259–60. Consultado de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3039837&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Bradford, M.M., 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–54. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.
9. Breuer, U. & Harms, H., 2006. ***Debaryomyces hansenii*--an extremophilic yeast with biotechnological potential**. *Yeast (Chichester, England)*, 23(6), pp.415–37. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16652409>.
10. Brioukhanov, a *et al.*, 2000. **Protection of *Methanosarcina barkeri* against oxidative stress: identification and characterization of an iron superoxide dismutase**. *Archives of microbiology*, 174(3), pp.213–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11041352>.
11. Butinar L, Santos S, Spencer-Martins I, Oren A, Gunde- Cimerman N. 2005. **Yeast diversity in hypersaline habitats**. *FEMS Microbiol Lett* 244: 229–234.

12. Buzzini P, Martini A. 2001. **Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts.** *Med Mycol* 39: 479–482.
13. Castillo-Díaz, R.A., 2013. **Expresión del gen *DhCTT1* de *Debaryomyces hansenii* en una mutante acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae*.** Tesis de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
14. Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P.C., 2004. **Diversity of structures and properties among catalases.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61(2), pp.192–208. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14745498>.
15. Cherry, J., Adler, C. & Ball, C., 1998. **SGD: *Saccharomyces* Genome Database.** *Nucleic acid research*, 26(1), pp.73–79. Disponible en: <http://nar.oxfordjournals.org/content/26/1/73.short>.
16. Dalton, H., Board, R. & Davenport, R., 1984. **The yeasts of British fresh sausage and minced beef.** *Antonie van Leeuwenhoek*, 50, pp.227–248. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02342134>.
17. Davenport RR. 1980. **In Biology and activities of yeasts**, Skinner FA, Passmore SM, Davenport RR (eds). Academic Press: London; 215–230.
18. Diccionario de la Real Academia de la lengua Española. **Levadura.** 23<sup>a</sup>. Edición (Por publicarse: 2014) Disponible en: <http://lema.rae.es/drae/?val=levadura>
19. Dictionary.com Unabridged. **Yeast. (n.d.)**. Consultado Noviembre, 2013, de: Dictionary.com website: <http://dictionary.reference.com/browse/yeast>
20. Dismukes, G.C. *et al.*, 2001. **The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), pp.2170–5. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=30111&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
21. Dröge, W., 2002. **Free radicals in the physiological control of cell function.** *Physiological reviews*, 82(1), pp.47–95. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773609>.
22. Dujon, B. *et al.*, 2004. **Genome evolution in yeasts.** *Nature*, 430(6995), pp.35–44. Disponible en: <http://www.nature.com/nature/journal/v430/n6995/pdf/nature02579.pdf>
23. Ferreira & Biljoen, 2003. **Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese.** *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), pp.131–140. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503002526>.
24. Finkel, T., 2003. **Oxidant signals and oxidative stress.** *Current opinion in cell biology*, 15(2), pp.247–254. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067403000024>.

25. Flores, M. *et al.*, 2004. **Effect of *Debaryomyces spp.* on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages.** *Meat science*, 68(3), pp.439–46. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062412>.
26. Foreman, J. *et al.*, 2003. **Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth.** *Nature*, 422(6930), pp.442–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660786>.
27. Gerschman, R. *et al.*, 1954. **Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common.** *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 119, pp.623–626. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11683139>.
28. Gómez-Quiroz, L., Cuevas-Bahena D. B., 2008. **Superóxido dismutasa.** En M. Konigsberg-Fainstein, ed. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* Ciudad de México: Manual Moderno, pp. 169-182.
29. González-Hernández, J. & Peña, A., 2002. **Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila).** *Rev Latinoam Microbiol*, 44. Disponible en: [http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2002/mi02-3\\_4g.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2002/mi02-3_4g.pdf).
30. Grant, C., Perrone, G. & Dawes, I., 1998. **Glutathione and Catalase Provide Overlapping Defenses for Protection against Hydrogen Peroxide in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochemical and biophysical research communications*, 253(3), pp.893 – 898. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9918826>.
31. Guerzoni, M.E., Lanciotti, R. & Marchetti, R., 1993. **Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods.** *International journal of food microbiology*, 17(4), pp.329–41. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8466806>
32. Halliwell, B. & Gutteridge, J., 1984. **Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.** *Biochemical Journal*, 219, pp.1–14. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1153442/>.
33. Hansberg W., Konigsberg M., 2008. **El dioxígeno y sus especies reactivas.** En M. Konigsberg-Fainstein, ed. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* Ciudad de México: Manual Moderno, pp. 25-46.
34. Hansen, T. & Tempel, T., 2001. ***Saccharomyces cerevisiae* as a starter culture in Mycella.** *International Journal of Food Microbiology*, pp.101–111. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501005773>.
35. Izawa, S., Inoue, Y. & Kimura, A., 1996. **Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochem. J*, 320, pp.61 – 67. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1217898&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

36. Jansson, B., Jörnvall, H., Rydberg, U., Terenius, L., & Vallee, B. L. (1994). **Toward a molecular basis of alcohol use and abuse.** *Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag*
37. Konigsberg-Fainstein, M., 2008. **Cadena respiratoria mitocondrial.** En M. Konigsberg-Fainstein, ed. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* Ciudad de México: Manual Moderno, pp. 49-59.
38. Kroll, J.S. *et al.*, 1995. **Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all!** *Microbiology (Reading, England)*, 141 (Pt 9), pp.2271-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7496539>.
39. Lane, N., 2012. **The Evolution of Oxidative Stress.** *Principles of Free Radical Biomedicine.*, 1, pp.1-17. Disponible en: [http://www.nick-lane.net/Lane evolution of oxidative stress.pdf](http://www.nick-lane.net/Lane%20evolution%20of%20oxidative%20stress.pdf).
40. Lanyi, J., 1974. **Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria.** *Bacteriological Reviews*, 38(3), pp.272-90. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=413857&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
41. Leclercq-Perlat M-N, Corrieu G, Spinnler H-E. 2004. **Comparison of volatile compounds produced in model cheese medium deacidified by *Debaryomyces hansenii* or *Kluyveromyces marxianus*.** *J Dairy Sci* 87: 1545-1550.
42. Legras, J.-L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., & Karst, F. (2007). **Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history.** *Molecular ecology*, 16(10), 2091-102. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x
43. Lépingle, A., Casaregola, S. & Neuvéglise, C., 2000. **Genomic Exploration of the *Hemiascomycetous* Yeasts: 14. *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*.** *FEBS letters*, 487, pp.82-86. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579300022857>
44. McCord, J. & Fridovich, I., 1969. **Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein).** *Journal of Biological chemistry.* Disponible en: <http://www.jbc.org/content/244/22/6049.short>.
45. McGovern, P. E. (2003) **Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture** (Princeton Univ. Press, Princeton).
46. McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R., Wang, C. (2004). **Fermented beverages of pre- and proto-historic China.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(51), 17593-8. doi:10.1073/pnas.0407921102
47. Medeiros, M., 2008. **Daño al DNA.** En M. Konigsberg-Fainstein, ed. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* Ciudad de México: Manual Moderno, pp. 119-134.

48. Mittler, R., 2002. **Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.** *Trends in plant science*, 7(9), pp.405–410. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138502023129>.
49. Moradas-Ferreira, P. *et al.*, 1996. **The molecular defences against reactive oxygen species in yeast.** *Molecular microbiology*, 19(4), pp.651–8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8820636>.
50. Nakase T, Suzuki M, Phaff HJ, Kurtzman CP. 1998. **26. *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij Nom. Cons. In The Yeasts — A Taxonomic Study,** Kurtzman CP, Fell JW (eds). Elsevier: Amsterdam; 157–173. En referencia 14
51. Noriega-Samaniego, D., 2012. **Complementación heteróloga de una mutante acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae* con el gen de la catalasa de *Debaryomyces hansenii*.** Tesis de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
52. Norkrans, B., 1968. **Studies on marine occurring yeasts: respiration, fermentation and salt tolerance.** *Archiv für Mikrobiologie*, 372, pp.358–372. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00425641>.
53. Ostergaard, S., Olsson, L., & Nielsen, J. (2000). **Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 34–50. doi:10.1128/MMBR.64.1.34-50.2000.Updated
54. Peraza-Reyes L., 2008. **Catalasa.** En M. Konigsberg-Fainstein, ed. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* Ciudad de México: Manual Moderno, pp. 169-182.
55. Petersen, K.M., Westall, S. & Jespersen, L., 2002. **Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaced-ripened cheeses.** *Journal of dairy science*, 85(3), pp.478–86. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11949849>.
56. Petrova, V.Y. *et al.*, 2004. **Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria.** *The Biochemical journal*, 380(Pt 2), pp.393–400. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1224190&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
57. Prista, C. & Almagro, A., 1997. **Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*.** *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), pp.4005–4009. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/63/10/4005.short> [Accessed January 4, 2014].
58. Rankine, B.C., 1964. **Hydrogen sulphide production by yeasts.** *Science of Food and Agriculture*, 15(12), pp.872–877.
59. Reyes-Becerril, M. *et al.*, 2008. **Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress.** *Aquaculture*, 280(1-4), pp.39–44. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848608002548>

60. Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A., 2000. **EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software**. *Trends in genetics*, 16(6), pp.2–3. Disponible en: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:EMBOSS:+The+European+Molecular+Biology+Open+Software#0>
61. Romanos, M. a, Scorer, C. a & Clare, J.J., 1992. **Foreign gene expression in yeast: a review**. *Yeast (Chichester, England)*, 8(6), pp.423–88. Consultado Noviembre 2013 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1502852>.
62. Rosa, C. & Peter, G., 2006. **The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts** C. Rosa & G. Péter, eds., Berlín, Alemania: Springer-Verlag. Disponible en: [http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:The+ yeast +handbook.+Biodiversity+and+ecophysiology+of+yeasts#1](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:The+yeast+handbook.+Biodiversity+and+ecophysiology+of+yeasts#1)
63. Roth V. 2006 **Doubling Time calculator** URL: <http://www.doubling-time.com/compute.php>
64. Schafer, F. & Buettner, G., 2001. **Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple**. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11), pp.1191–1212. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584901004804>.
65. Schnell, S. & Chappell, M., 2006. **The mechanism distinguishability problem in biochemical kinetics: the single-enzyme, single-substrate reaction as a case study**. *Comptes rendus biologiques*, 329(1), pp.51–61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16399643>.
66. Schüller, C. & Brewster, J., 1994. **The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene**. *The EMBO Journal*, 13(18), pp.4382–4389. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC395365/>.
67. Segal-Kischinevsky, C. *et al.*, 2011. **The euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii* has two catalase genes encoding enzymes with differential activity profile**. *Current microbiology*, 62(3), pp.933–43. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21061125>.
68. Serrano, R., 1996. **Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses**. *International review of cytology*, 165, pp.1–52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900956>.
69. Sherman, D.J. *et al.*, 2009. **Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes**. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), pp.D550–4. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2686504&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
70. Sievers, F. *et al.*, 2011. **Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega**. *Molecular systems biology*, 7(539), p.539. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3261699&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

71. Stahl, W., Sies, H., 2012. **Oxidative stress.** *Institut für Biochemie und Molekularbiologie I*, p.1. Disponible en: [http://www.osti.gov/energycitations/product.biblio.jsp?osti\\_id=5112369](http://www.osti.gov/energycitations/product.biblio.jsp?osti_id=5112369).
72. Strand, M. *et al.*, 1993. **Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair.** *Nature*, 365(6443), pp.274–276. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/365274a0>.
73. Tilbury RH. 1980. **In Biology and activities of Yeasts**, Skinner FA, Passmore SM, Davenport RR (eds). Academic Press: London; 153–176.
74. Valko, M. *et al.*, 2004. **Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence.** *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1-2), pp.37–56. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15646026>.
75. Valko, M. *et al.*, 2007. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), pp.44–84. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905>.
76. Van den Tempel, T. & Jakobsen, M., 2000. **The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu.** *International Dairy Journal*, 10(4), pp.263–270. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694600000534>.
77. Wang, D.Y., Kumar, S. & Hedges, S.B., 1999. **Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi.** *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 266(1415), pp.163–71. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1689654&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
78. Willekens, H. *et al.*, 1997. **Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defense in C3 plants.** *The EMBO journal*, 16(16), pp.4806–16. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1170116&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
79. Wong, B. *et al.*, 1982. **Bone infection caused by *Debaryomyces hansenii* in a normal host: a case report.** *Journal of clinical microbiology*, 16(3), pp.545–8. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=272406&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
80. Xiong, J. & Bauer, C.E., 2002. **Complex evolution of photosynthesis.** *Annual review of plant biology*, 53, pp.503–21. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12221987>.
81. Yamamoto, Y. & Osanai, S., 2002. **Extrinsic allergic alveolitis induced by the yeast *Debaryomyces hansenii*.** *European Respiratory Journal*, 20(5), pp.1351–

1353. Disponible en:  
<http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.02.00030402>.
82. Zamocky, M., 2008. **Evolution of catalases from bacteria to humans.** *Antioxidants & redox signalling*, 10(9), pp.1527–1548. Disponible en:  
<http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/ars.2008.2046>.
83. Zentella, M. & Piña, E., 2008. **Daño a proteínas.** En M. Konigsberg-Fainstein, ed. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* Ciudad de México: Manual Moderno, pp. 97–118.
84. Zenteno-Savin T. Saldaña-Balmor Y., 2008. **Daño a lípidos.** En M. Konigsberg-Fainstein, ed. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* Ciudad de México: Manual Moderno, pp. 135-146.