

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS DE LA
RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE *Yarrowia lipolytica*, BAJO
CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO**

POR

MARÍA FERNANDA DESENTIS DESENTIS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

DICIEMBRE, 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN
SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO**



**EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS DE LA
RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE *Yarrowia lipolytica*, BAJO
CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO**

POR

MARÍA FERNANDA DESENTIS DESENTIS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO

DICIEMBRE, 2015

AGRADECIMIENTOS

A mis papás por permitirme estar en donde estoy, por impulsarme a seguir a delante, por su sustento en todo momento y cada situación, a mis hermanos por su motivación.

Al Dr. Eduardo por ser un tutor en toda la extensión de la palabra.

A mis amigas, en especial a Fer por siempre estar ahí, por todos sus consejos y a Denise por escucharme tanto.

A Irais por todas las cosas que compartimos y afrontamos juntas, a Guadalupe por acogerme, por tanta ayuda y orientación, a José por guiarme, pero sobre todo por su oído atento.

A mis becarios Damaris, Oscar, Ale, Wendy, Katy y Mely por su arduo trabajo, paciencia y deseo de aprender. A Fafu por alentarme y a Heriberto por toda su ayuda para la realización de mi estancia de investigación.

A todos los maestros de la maestría por sus enseñanzas, al Dr. Zacarias por su tiempo, a la Dra. Ana Laura por su disposición y recomendaciones y en particular al Dr. Manuel por todas sus atenciones y la Dra. Blanca por su compromiso y apoyo.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por contribuir en mi formación académica y por todas las atenciones brindadas durante este proceso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo económico, sobre todo en la experiencia de movilidad.

A mis padres

Eduardo Desentis Reyes

Susana Desentis García

Por su amor y apoyo incondicional

TABLA DE CONTENIDO

Página

LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS.....	iv
NOMENCLATURA.....	vi
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 Definición del problema.....	2
2.2 Justificación.....	3
3. HIPÓTESIS.....	3
4. OBJETIVOS.....	4
4.1 Objetivo general.....	4
4.2 Objetivos específicos.....	4
5. ANTECEDENTES.....	5
5.1 Características generales de las células eucariotas.....	5
5.2 Estrés oxidativo.....	5
5.3 Sistema de defensa antioxidante.....	9
5.4 <i>Yarrowia lipolytica</i> como modelo experimental.....	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
6.1 Material biológico.....	16
6.2 Métodos.....	16
6.2.1 <i>Diseño del estudio</i>	16
6.2.2 <i>Estrategia general de trabajo</i>	17

6.3 Procedimiento experimental.....	18
6.3.1 Preparación de los medios de cultivo.....	18
6.3.2 Inoculación.....	18
6.3.3 Ajuste de inóculo según densidad óptica (OD).....	18
6.3.4 Preparación de soluciones stock.....	19
6.4 Establecimiento de las condiciones de estrés oxidativo.....	21
6.4.1 Determinación de los tiempos de incubación para alcanzar la fase de crecimiento exponencial.....	21
6.4.2 Determinación de la concentración de los agentes oxidantes y agente antioxidante a utilizar.....	22
6.5 Obtención y procesamiento del material genético.....	24
6.5.1 Preparación de muestras sometidas a condiciones de estrés oxidativo.....	24
6.5.2 Extracción de los ácidos nucleicos.....	24
6.5.3 Ajuste de concentración de ácidos nucleicos.....	25
6.5.4 Tratamiento con DNasa.....	26
6.5.5 Síntesis de cDNA.....	26
6.6 Análisis de la expresión de genes.....	28
6.6.1 Búsqueda in silico de secuencias de genes que codifican para enzimas antioxidantes de <i>Y. lipolytica</i>	28
6.6.2 Diseño de oligonucleótidos.....	28
6.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	29
6.6.4 Electroforesis en geles de agarosa.....	30
6.7 Análisis estadístico.....	31
7. RESULTADOS.....	32
7.1 Determinación de las condiciones de estrés oxidativo.....	32
7.1.1 Establecimiento de los tiempos de incubación para alcanzar fase de crecimiento exponencial.....	32
7.1.2 Determinación de la concentración a utilizar de los agentes oxidantes y agente antioxidante.....	33

7.2	Análisis de la expresión de genes.....	38
7.2.1	<i>Identificación in silico de secuencias de genes que codifican para enzimas antioxidantes de Y. lipolytica y diseño de oligonucleótidos específicos.....</i>	38
7.2.2	<i>Análisis por RT-PCR.....</i>	40
7.2.2.1	<i>Análisis de la expresión de los genes SOD, CAT y GPX en células de Y. lipolytica sometidas a tratamiento con agentes oxidantes.....</i>	41
7.2.2.2	<i>Análisis de la expresión de los genes SOD, CAT y GPX en células de Y. lipolytica sometidas a tratamiento con ácido gálico.....</i>	42
7.2.2.3	<i>Análisis de la expresión de genes según enzima antioxidante.....</i>	44
7.2.2.4	<i>Análisis de la expresión del gen de actina de Y. lipolytica.....</i>	48
8.	DISCUSIÓN.....	51
8.1	Estrés oxidativo.....	51
8.2	Agentes oxidantes y antioxidantes.....	52
8.3	Genes de respuesta antioxidante en <i>Y. lipolytica</i>	55
9.	CONCLUSIONES.....	60
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
1	Genes relacionados con el efecto del estrés oxidativo y la defensa antioxidante en ratones.	11
2	Componentes de la reacción 1 para la síntesis de cDNA.	27
3	Componentes de la reacción 2 para la síntesis de cDNA.	27
4	Componentes de la reacción de PCR.	29
5	Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación de fragmentos específicos de los genes <i>SOD</i> , <i>CAT</i> , <i>GPX</i> de <i>Y. lipolytica</i> .	30
6	Lista de los oligonucleótidos específicos diseñados para los genes <i>CAT1</i> , <i>CAT2</i> , <i>CAT3</i> , <i>SOD1</i> , <i>SOD2</i> , <i>GPX</i> y <i>ACT</i> de <i>Y. lipolytica</i> .	39

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Cadena de transporte de electrones.	6
2	Capacidad antioxidante de diversos compuestos.	10
3	Cromosomas presentes en <i>Y. lipolytica</i> .	14
4	Estrategia general de trabajo.	17
5	Diagrama del procedimiento experimental para el análisis de la expresión de genes.	23
6	Curva de crecimiento de la cepa P01A de <i>Y. lipolytica</i> .	33
7	Efecto del H ₂ O ₂ sobre el crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> .	34
8	Efecto de la menadiona en el crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> .	35
9	Efecto del ácido gálico en el crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> tratada con 5 mM de H ₂ O ₂ .	36
10	Efecto del ácido gálico en el crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> tratadas con 0.15 mM de menadiona.	37

11	Efecto del ácido gálico en el crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> .	38
12	Productos de las reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados sobre DNA genómico.	40
13	Expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes de <i>Y. lipolytica</i> bajo tratamiento con 4.5 mM de H ₂ O ₂ y 0.1 Mm de menadiona.	42
14	Expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes de <i>Y. lipolytica</i> bajo tratamiento con 2 mM de ácido gálico.	43
15	Expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes de <i>Y. lipolytica</i> bajo tratamientos combinados con 4.5 mM de H ₂ O ₂ +2 mM de ácido gálico y con 0.1 mM de menadiona+2mM de ácido gálico.	44
16	Expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes <i>SOD</i> y <i>GPX</i> de <i>Y. lipolytica</i> en relación al tratamiento control YPD.	45
17	Expresión de genes que codifican para enzimas catalasas de <i>Y. lipolytica</i> en relación al tratamiento control YPD.	46
18	Comparación de los niveles de expresión de los genes que codifican para las enzimas <i>SOD</i> , <i>GPX</i> , <i>CAT1</i> , <i>CAT2</i> y <i>CAT3</i> de <i>Y. lipolytica</i> bajo diferentes tratamientos con agentes oxidantes y antioxidantes.	47
19	Comparación de los niveles de expresión del gen que codifica para actina en <i>Y. lipolytica</i> bajo tratamiento con agentes oxidantes y antioxidantes.	48
20	Expresión del gen de actina de <i>Y. lipolytica</i> en relación al tratamiento control YPD.	49

NOMENCLATURA

<i>ACT</i>	Actina
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trifosfato
<i>CAT</i>	Catalasa
GC	Guanina – citosina
dNTPs	Deoxinucleótidos
<i>GPX</i>	Glutación peroxidasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO [·]	Hidroxilo
HOCl	Ácido hipocloroso
HOO [·]	Perhidroxilo
JNK	Cinasas c-Jun-N-terminal
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
NES	Señal de exportación nuclear
NF-Kb	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras de las células B activadas
ng	Nanogramo
NO	Óxido nítrico
O ₂ ^{·-}	Superóxido
¹ O ₂	Oxígeno singlete
OD	Densidad óptica
ONOO [·]	Peroxinitrito
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
p38 MAPK	Proteína cinasa p38 activada por mitógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
RO	Alcoxilo
ROO-	Peroxilo
ROOH	Hidroperóxido
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SAPK	Proteínas cinasas activadas por estrés
<i>SOD</i>	Superóxido dismutasa
TA	Temperatura ambiente
UA	Unidades arbitrarias
seg	Segundos
μl	Microlitro

1. RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno se generan principalmente como producto del metabolismo aeróbico; el desequilibrio entre su generación y degradación conduce al estrés oxidativo. Para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo los sistemas biológicos han desarrollado mecanismos de defensa antioxidante endógenos y exógenos. En este trabajo se analizaron los cambios en la expresión de genes que codifican para las enzimas superóxido dismutasa (*SOD*), catalasa (*CAT*) y glutatión peroxidasa (*GPX*) en células de *Y. lipolytica* expuestas a condiciones de estrés oxidativo y en presencia de un antioxidante.

Se determinó por el método de dilución en serie que los agentes oxidantes H_2O_2 y menadiona en concentraciones 4.5 mM y 0.1 mM, respectivamente, provocaron condiciones de estrés oxidativo inhibiendo el crecimiento de las células, sin provocar su muerte; el presunto agente antioxidante ácido gálico en concentración 2 mM no reduce el crecimiento de *Y. lipolytica*.

Para los análisis de expresión de genes que presuntamente participan en la respuesta antioxidante de *Y. lipolytica*, cultivos en fase de crecimiento exponencial de esta levadura se sometieron al efecto de los agentes oxidantes y antioxidante. Por RT-PCR se determinaron los niveles de expresión de los genes *SOD1*, *GPX*, *CAT1*, *CAT2*, *CAT3* y *ACT* y se analizaron los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos.

El patrón de expresión de los genes que participan en la defensa a condiciones de estrés oxidativo en *Y. lipolytica* cambia en respuesta a los diferentes tratamientos. Los niveles de expresión de los genes *SOD*, *CAT1* y *GPX* disminuyen en todos los tratamientos utilizados, mientras que el gen *CAT2* incrementa su expresión en el tratamiento con menadiona y disminuye en el resto de los tratamientos y el gen *CAT3* aumenta su expresión en los tratamientos combinados y en el tratamiento con menadiona.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Definición del problema

Debido a que el estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio entre la generación y la degradación de especies reactivas de oxígeno, los mecanismos celulares de eliminación de estas moléculas son fundamentales para la prevención del daño que ocasionan. En el sistema de defensa antioxidante donde participan sustancias endógenas y exógenas, se ha planteado el uso de antioxidantes provenientes de alimentos como coadyuvantes para lograr el equilibrio de óxido-reducción celular.

Las células eucariotas responden al estrés oxidativo mediante diferentes mecanismos que implican la activación de vías de respuesta del sistema de defensa antioxidante, ya sea por modificación de proteínas preexistentes (modificaciones postraduccionales) o a través de la inducción de la expresión de genes que codifican para enzimas que participan en el sistema de defensa antioxidante. Aunque se han realizado numerosos estudios al respecto en diferentes especies, existe poca información sobre la forma específica en la que *Yarrowia lipolytica* responde a condiciones de estrés oxidativo.

En el presente trabajo se pretende dilucidar los mecanismos moleculares de la respuesta de *Y. lipolytica* a condiciones de estrés oxidativo mediante el análisis de la expresión de genes implicados en dicha respuesta.

2.2. Justificación

En estudios anteriores se ha relacionado al estrés oxidativo con enfermedades crónicas degenerativas, mismas que representan un problema de salud pública a nivel global por el incremento exorbitante en su prevalencia.

Se ha considerado que las levaduras constituyen modelos experimentales preferidos para el estudio del estrés oxidativo por su elevada tasa de crecimiento, fácil manipulación, disponibilidad de la secuenciación completa de su genoma, la presencia de genes homólogos a los de humanos y a la conservación de procesos celulares básicos. En *Y. lipolytica* no existe información referente a la expresión de genes en respuesta a condiciones de estrés oxidativo.

3. HIPÓTESIS

Como respuesta a condiciones de estrés oxidativo *Y. lipolytica*, presenta cambios en la expresión de los genes que codifican para las enzimas del sistema de defensa antioxidante endógeno (superóxido dismutasa (*SOD*), catalasa (*CAT*), glutatión peroxidasa (*GPX*)).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar los cambios en la expresión de genes que codifican para las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en células *de Y. lipolytica* expuestas a condiciones de estrés oxidativo y en presencia de un antioxidante.

4.2 Objetivos específicos

- Establecer las concentraciones de los agentes oxidantes (H_2O_2 , menadiona) necesarias para producir condiciones de estrés oxidativo en *Y. lipolytica*.
- Diseñar oligonucleótidos específicos para los genes que codifican para las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa de *Y. lipolytica* a través de búsqueda *in silico*.
- Analizar los patrones de expresión de los genes que codifican para las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en células de *Y. lipolytica* sometidas a condiciones de estrés oxidativo.
- Analizar el efecto de agentes antioxidantes sobre la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes de *Y. lipolytica* sometida a condiciones de estrés oxidativo.

5. ANTECEDENTES

5.1 Características generales de las células eucariotas

Las células eucariotas pueden clasificarse en 3 tipos: células animales, vegetales y hongos. Las células eucariotas cuentan con un núcleo definido y su citoplasma se organiza en organelos limitados por membranas biológicas; entre estos organelos se encuentran las mitocondrias las cuales le confieren a las células eucariotas la capacidad de desarrollar un metabolismo de tipo aeróbico, en el que se utiliza oxígeno para la oxidación de los diferentes sustratos (azúcares o grasas) con el fin de obtener energía (Karp, 2009).

5.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo puede ser definido como un desequilibrio entre la producción y la degradación de ROS (Wahlqvist, 2013; Rowe, Dedtyareva, Doetsh, 2008; Ramos Ibarra, Batista González, Gómez Meda, Zamora Pérez, 2006).

En organismos aeróbicos el oxígeno es esencial para la vida, la mayoría de las oxidaciones a nivel intracelular resultan en la transferencia de 2 electrones en NADH o FADH₂, que se oxidan posteriormente en la cadena de transporte de electrones. La cadena de transporte de electrones es un proceso metabólico que tiene lugar en la membrana interna de las mitocondrias. En este proceso 4 complejos enzimáticos (Complejo I: NADH: ubiquinona oxidorreductasa, Complejo II: succinato: ubiquinona oxidorreductasa, Complejo III: ubiquinol: ferrocitocromo c oxidorreductasa, Complejo IV: citocromo c oxidasa) transportan electrones a la ATP sintasa con la producción final de energía en forma de adenosin trifosfato (ATP) (Fomusi Ndisang, 2010). La figura 1 muestra los complejos enzimáticos que participan en la cadena de transporte de electrones.

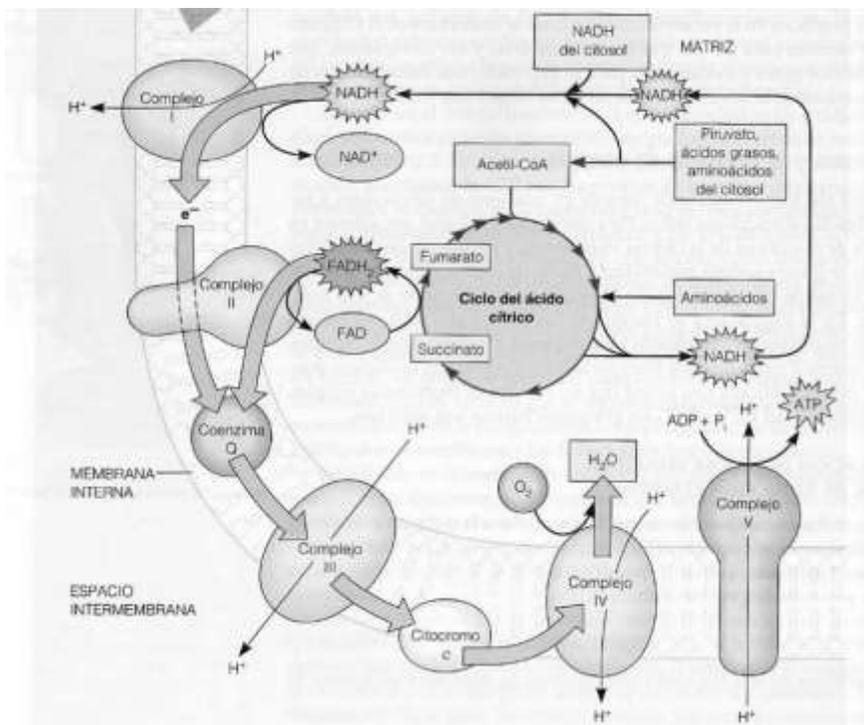


Figura 1. Cadena de transporte de electrones (Mathews 2006).

A nivel atómico, los electrones ocupan regiones espaciales conocidas como orbitales; la estructura del átomo será termodinámicamente estable si en cada orbital existe un máximo de 2 electrones apareados. Los radicales libres son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones no apareados en su orbital externo. Los radicales libres son muy inestables, por lo que presentan una reactividad química enorme que les concede la posibilidad de interactuar rápidamente con otros átomos o moléculas. Cuando los radicales libres entran en contacto con alguna molécula tienden a ceder su electrón (reductor) no apareado o aceptar (oxidante) un electrón con la finalidad de estabilizar su último orbital, estas interacciones dan lugar a una serie de reacciones con la formación de nuevos radicales libres. Cuando 2 radicales libres combinan sus electrones no apareados pueden unirse entre sí covalentemente y la cascada de generación de nuevos radicales libres se detiene (Sepúlveda Reis, Araújo Veloso, Teixeira Mattos, Purish, Nogueira-Machado, 2008).

El término especies reactivas de oxígeno (ROS), se utiliza para designar de modo colectivo a los radicales de oxígeno que se comportan como oxidantes. Entre las formas moleculares de éstos se encuentran el superóxido (O_2^-), perhidroxilo (HOO^-), hidroxilo (HO^-), peroxilo (ROO^-) y alcoxilo (RO^-); existen otras formas intermedias que no son radicales entre las que figuran el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e hidroperóxido orgánico ($ROOH$) (Ojaimi, Kinugawa, Recchia, Hintze, 2010).

El radical hidroxilo reacciona fácilmente con la mayoría de las biomoléculas como lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos (Chang, Chuang, 2010) y el superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico (NO) para generar peroxinitrito ($ONOO^-$), un oxidante fuerte (Brieger, Schiavonea, Miller, Krausea, 2012) que también reacciona con la mayoría de las biomoléculas (Chang, Chuang, 2010; Ceriello, Testa, 2009).

En células eucariotas, la cadena de transporte de electrones es la principal fuente endógena de ROS, otras fuentes endógenas de radicales libres son el proceso de plegamiento de proteínas, la formación de enlaces disulfuro en el retículo endoplasmático, el metabolismo de las drogas o xenobióticos por las enzimas del citocromo P450 y los neutrófilos, macrófagos y eosinófilos (Brieger et al., 2012; Chang, Chuang, 2010; Kawahito, Kitahata, Oshita, 2009; Rahman, 2007).

Ya que las ROS se involucran en un proceso metabólico esencial en organismo aeróbicos, su generación es habitual y si bien la producción de ROS se da en condiciones normales en altas concentraciones éstas son capaces de dañar estructuras celulares incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Barbosa, Bressan, Zulet, Martínez, 2008; Rahman, 2007).

El exceso de ROS induce a la peroxidación de lípidos degradando los ácidos grasos poliinsaturados incorporados en las membranas biológicas a radicales peroxilo (Ojaimi et al., 2010; Shanmugam, Ramakrishna, Mallikarjuna, Reddy, 2009; Ramos Ibarra et al., 2006).

El daño que ocurre en proteínas consiste en la oxidación de los grupos R de los aminoácidos; los aminoácidos oxidados con más frecuencia son la fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina. Esta reacción resulta en la formación de proteínas carboniladas en las que incrementa la glicosilación, haciéndolas más susceptibles a la proteólisis, la desnaturalización o induciendo la pérdida de su actividad biológica. Por otra parte, la oxidación del ácido desoxirribonucleico (DNA) produce bases modificadas lo cual se asocia con el desarrollo de mutaciones o pérdida de la expresión de algunos genes específicos (Ramos Ibarra et al., 2006).

Además, en organismos superiores el estrés oxidativo produce un aumento de la expresión de citocinas pro-inflamatorias y la activación de diversas vías de transducción de señales entre las que se encuentran, el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (Alfadda, Sallam, 2012), las proteínas cinasas activadas por estrés (SAPK), las cinasas c-Jun-N-terminal (JNK) (Fomusi Ndisang, 2010) y la proteína cinasa p38 activada por mitógenos (p38 MAPK) (Rodríguez-Rodríguez et al., 2009; Acharya, Ghaskadbi, 2010; Lopes, Oliveira, Soares Fortunato, 2008; Sengupta, Ukil, Dimitrova, Agrawal, 2009).

El daño a biomoléculas, la inducción de la expresión de citocinas proinflamatorias y la activación de vías de señalización por el estrés oxidativo son mecanismos que se han relacionado con el proceso de envejecimiento y con algunas situaciones patológicas como cáncer, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, obesidad y diabetes (Pitocco et al., 2010).

Algunos agentes son capaces de generar condiciones de estrés oxidativo entre ellos se encuentra el H_2O_2 que es un compuesto químico con características de un líquido altamente polar, muy inestable que se descompone en una reacción exotérmica a oxígeno y agua y es capaz de comportarse como oxidante o reductor (Scandalios, 2005) y la menadiona que es una quinona citotóxica cuya reducción resulta en la formación de una quinona y superóxido (O_2^-) (Osorio, 2003).

5.3 Sistema de defensa antioxidante

Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir reacciones de oxidación entre otras moléculas. En los sistemas biológicos, para contrarrestar los efectos de ROS existen una gran variedad de sustancias de naturaleza enzimática y no enzimática que constituyen el sistema de defensa antioxidante. Para delimitar el sistema de defensa antioxidante, sus moléculas se dividen en 2 grupos, aquellas que se sintetizan de forma endógena y aquellas que se obtienen a través de fuentes externas, es decir exógenas (Wahlqvist, 2013; Acharya, Ghaskadbi, 2010; Sepúlveda Reis et al., 2008).

Los antioxidantes de origen dietético actúan como eliminadores de ROS, estabilizando la reactividad de radicales libres al unirse a ellos; entre estas biomoléculas se encuentra el tocoferol, el ácido ascórbico, los carotenoides, flavonoides y polifenoles (Brieger et al., 2010; Sepúlveda Reis et al., 2008). La medición de la capacidad de absorción de radicales oxígeno por el método ORAC permite la puntuación de la capacidad antioxidante de alguna molécula de interés a través de su comparación con un análogo de vitamina E, el ácido 6 hidroxil 2, 5, 7, 8-tetra metilcroman-2 carboxílico (Trolox) que es utilizado como unidad equivalente para la medida de fuerza antioxidante (Ishimoto, Tai, Yoshimura, Amakura, Yoshida, 2012). En la figura 2 se puede observar la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) de diversos compuestos.

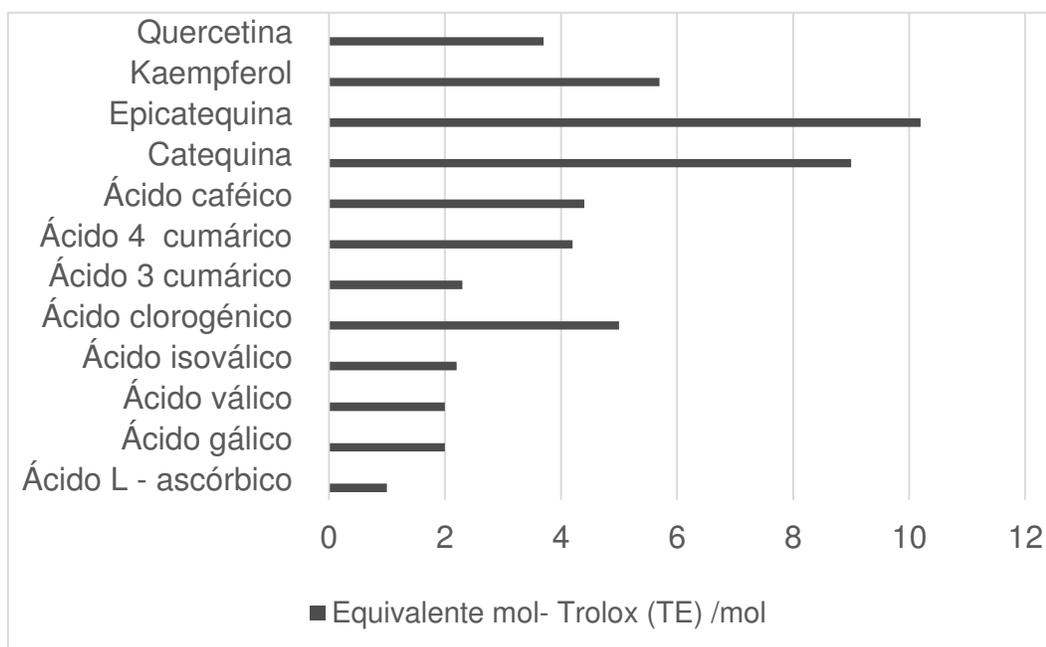


Figura 2. Capacidad antioxidante de diversos compuestos (Ishimoto et al., 2012).

Uno de los agentes antioxidantes exógenos más ampliamente utilizado es el ácido gálico, este agente posee en su estructura química 3 grupos hidroxilo que pueden donar hidrogeno para la reducción del H_2O_2 (Wu et al., 2011). En modelos murinos se ha observado que el ácido gálico incrementa los niveles de glutatión (Chiu-Yuan et al., 2013) y que disminuye la peroxidación lipídica (Mohammad et al., 2014, Harikesh et al., 2014).

Por otro lado, tanto en células procariotas como en eucariotas el mecanismo de acción del sistema de defensa antioxidante endógeno consiste en reacciones enzimáticas en donde participan 3 enzimas principalmente la superóxido dismutasa (Sod), catalasa (Cat) y glutatión peroxidasa (Gpx) (Lushchak, 2006).

Sod cataliza la dismutación del superóxido en oxígeno y H_2O_2 pudiendo tener como cofactor a distintos metales entre ellos el cobre, zinc, manganeso o hierro (Brieger et al., 2012). Cat, cataliza la descomposición del H_2O_2 en oxígeno y agua utilizando como cofactor al manganeso y Gpx cataliza la reacción de oxidación del glutatión, para ello utiliza H_2O_2 y al selenio como cofactor.

En ratones se han descrito 84 genes relacionados con el efecto del estrés oxidativo y la defensa antioxidante (Somaio Neto et al., 2013). En la tabla 1 se muestra la clasificación de estos genes con base a la familia a la que pertenecen según su función.

Tabla 1. Genes relacionados con el efecto del estrés oxidativo y la defensa antioxidante en ratones.

Familia	Número de genes	Genes investigados
Glutación peroxidasas	10	<i>GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX5, GPX6, GPX7, GPX8, GSTK1, GSR.</i>
Peroxirredoxinas	8	<i>EHD2, PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX4, PRDX5, PRDX6, PRDX1RS1.</i>
Peroxidasas	16	<i>AASS, APC, CAT, CTSB, DUOX1, EPX, LPO, MPO, PTGS1, PTGS2, RAG2, RGD1560658 (SERPINB1B), RGD1565187 (KIF9), SLC41A3, TMOD1, TPO.</i>
ROS	16	<i>CCS, CYBA, FMO2, IL19, IL22, NCF2, NOS2, NOX1, NOX4, NOXA1, NOXO1, RECQL4, SCD1, SOD1, SOD2, SOD3.</i>
Estrés oxidativo	22	<i>ALS2, APOE, ERCC2, ERCC6 GAB1, IDH1, MPP4, NQO1, NUDT15, NXN, PARK7, PPP1R15B, PRNP, PSMB5, SRXN1, TXNIP, TXNRD1, TXNRD2, TXNRD3, UCP3, XPA, ZMYND17.</i>
Acarreadores de oxígeno	12	<i>AQR, LOC367198 (ATR), CYGB, DNM2, FANCC, HBQ1, SLB (IFT172), MB, NGB, SLC38A1, VIM, XIRP1.</i>

Fuente: Somaio et al., 2013.

En términos generales cuando las levaduras se encuentran en condiciones de estrés oxidativo, el factor de transcripción Yap1 (Nrf2, en humanos) (Brieger et al., 2012), induce la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes incluyendo eliminadores de ROS y proteínas que contrarrestan la ruptura oxidativa, entre las que se encuentran Gsh1, Gsh2, Trx2, Sod1 y Sod2 (Belfield, Queenan, Rao, Kitamura, Walworth, 2014). En estudios realizados en el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* se ha visto la participación de otros factores de transcripción (Skn7p, Msn2p, Msn4p) en la respuesta adaptativa al estrés oxidativo (Farrugia, Balzan, 2012).

Yap1 se localiza en el citoplasma y en condiciones normales activa la transcripción de más de 70 genes (Rowe, Degtyarevaa, Doetsch, 2012); sin embargo, puede cambiar su localización al núcleo celular, proceso que se ha relacionado con la presencia de estrés oxidativo (Rowe et al., 2008). Este factor de transcripción puede detectar a los oxidantes a través de la formación de enlaces disulfuro reversibles con residuos de cisteína; se ha considerado que Cys598 y Cys629 son esenciales para la translocación nuclear de Yap1 en respuesta a H₂O₂ (Kuge et al., 2001).

El modelo de oxidación indica que la oxidación de residuos de cisteína, produce un cambio de conformación en donde se inhibe la interacción Yap1-Crm1, por el encubrimiento de la señal de exportación nuclear (NES). (Kuge et al., 2001; Coleman, Epping, Ateggerda, Moye-Rowley, 1999), lo anterior resulta en la acumulación en el núcleo de Yap1 y consecuentemente en la activación de la transcripción de genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo (Sha, Martins, Laubenbacher, Mendes, Shulaev, 2013; Rowe et al., 2008).

Otro factor de transcripción que se relaciona con el estrés oxidativo es Skn7; su papel se ha descrito como parte de los componentes de la señalización en respuesta al estrés osmótico (Sha et al., 2013).

5.4 *Yarrowia lipolytica* como modelo experimental

Yarrowia lipolytica, es un hongo dimórfico capaz de crecer en forma de levadura o micelio (Richard, Kerrest, Lafontaine, Dujon, 2005) dependiendo de las condiciones de crecimiento en las que se encuentre (Cabrales Arellano, 2012). Este microorganismo puede utilizar para su crecimiento compuestos hidrófobos, incluyendo aceites y ácidos grasos (Lopes et al., 2013) y se ha considerado como una levadura oleaginosa debido a su capacidad de acumular más del 70% de su masa seca en forma de lípidos (Loira, Dulermo, Nicaud, Sherman, 2012).

Los metabolitos de *Y. lipolytica* se han considerado importantes en el desarrollo industrial (Loira et al., 2012); la lipasa, el ácido cítrico, los compuestos aromáticos y los lípidos microbianos de este microorganismo son algunos de ellos (Lopes et al., 2013).

El proceso de secreción de proteínas en *Y. lipolytica* es diferente a *S. cerevisiae*; en *Y. lipolytica* tiene un rendimiento 4.5 veces superior en comparación con *S. cerevisiae*, además, éste último tiende a hiperglucosilar las proteínas que secreta, mientras que *Y. lipolytica* tiene la capacidad de realizar modificaciones co-traduccionales de manera similar a lo realizado por las células de mamíferos (Cheng, Ogrydziak, 1987). Entre las proteínas que *Y. lipolytica* tiene la capacidad de secretar se encuentran varias enzimas proteasas, lipasas, RNAasas, fosfatasas y estereasas (Celińska, Celińska, 2013; Cabrales Arellano, 2012; Bulani, Moleleki, Albertyn, Moleleki, 2012).

El uso de levaduras como modelo experimental inició en 1844 con los hallazgos respecto al ciclo celular por el laboratorio Carlsberg. En 1940 comienza el uso de estos microorganismos en procesos de gran impacto en el ámbito industrial como la producción de antibióticos y enzimas, procesos de fermentación de la cerveza y pan y en el caso de algunas especies como agentes de biocontrol de plagas y de otros compuestos bioactivos que pueden ser tóxicos para los humanos, como los alcaloides. Además, su empleo como modelo experimental en 1990 permitió la identificación del blanco celular de la

rapamicina; este descubrimiento admite el uso de levaduras como modelos experimentales para la identificación de formas de acción de compuestos clínicamente relevantes (Enserink, 2012).

En las levaduras la fácil manipulación y la elevada tasa de crecimiento con requerimientos nutricionales mínimos representan algunas de las ventajas de su uso como modelos experimentales. En condiciones nutricionales apropiadas una levadura puede duplicarse cada 90 minutos (Cabralés Arellano, 2012).

Y. lipolytica se ha considerado un excelente modelo de estudio debido a diferentes características; en cuestiones relacionadas con la contaminación ambiental tiene la capacidad de reducir el anillo aromático del trinitrotolueno, es capaz de degradar hasta en un 68% el contenido de aceites contaminantes en 10 días en derrames marítimos, se ha considerado que podría ser útil en la bioabsorción de metales pesados, su proteasa extracelular es utilizada como agente coagulador de la leche y constituye un excelente sistema para la expresión de proteínas heterólogas (Cabralés Arellano, 2012).

El consorcio francés Genolevures secuenció completamente el genoma de *Y. lipolytica* el cual se encuentra distribuido en 6 cromosomas y tiene un tamaño de 20.5 Mb, consta de 6073 secuencias codificantes y un contenido de guanina-citosina (GC) del 49%. En la figura 3 se observan los 6 cromosomas presentes en *Y. lipolytica* (Cabralés Arellano, 2012).

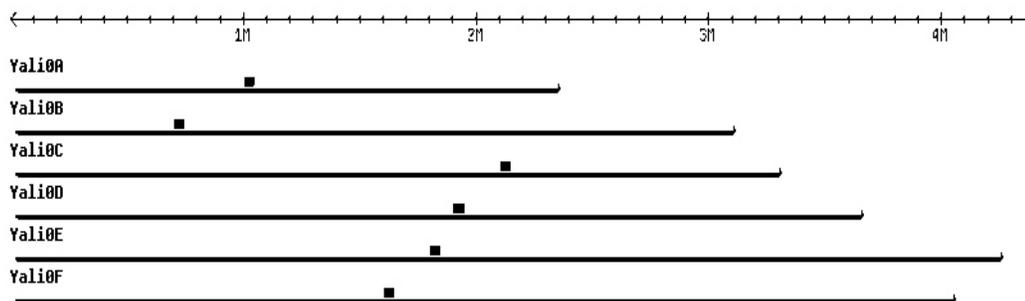


Figura 3. Cromosomas presentes en *Y. lipolytica* (Genolevures).

En el ámbito científico, las levaduras han servido como modelo experimental, en investigaciones dirigidas al entendimiento de diversos procesos metabólicos (Loira et al., 2012), en la utilización de sustratos hidrofóbicos, la biogénesis mitocondrial y peroxisomal, señalización por pH, ciclo celular, autofagia, polaridad celular, secreción de proteínas, interacciones genéticas, cambios transcripcionales, interacción de proteínas, reparación del daño del DNA, entre otros (Pereira, Bessa, Soares, Leáo, Saraiva, 2012; Enserink, 2012).

Las células de levaduras se han utilizado como modelos de experimentación preferidos para el estudio del estrés oxidativo y sus efectos. Estos microorganismos, son fácil y eficientemente manipulables genéticamente, por técnicas de genética clásica (Kerscher, Durstewitz, Casaregola, Gaillardin, Brandt, 2001) y molecular mientras que conserva procesos celulares básicos que son característicos en células eucariotas entre ellos aquellos implicados en la respuesta al estrés oxidativo (Farrugia, Balzan, 2012). Alrededor del 60% de los genes de levaduras muestran homología con el humano y el 25% de los genes relacionados con enfermedades humanas tienen una estrecha homología con levaduras (Franssens et al., 2013; Farrugia, Balzan, 2012).

La evidencia científica refiere que el mecanismo de mayor acción en *S. cerevisiae* es el glutatión reducido (GSH), seguido por la acción enzimática de catalasas (Sá et al., 2013). En estudios en los que se han cuantificado la actividad de las enzimas antioxidantes (Sod, Gsh, Cat) bajo condiciones de estrés oxidativo inducido con H₂O₂, dicloruro de 1, 1- dimetil- 4, 4'-bipiridilo y por presión de aire, se pudo observar una respuesta antioxidante más potente en *Y. lipolytica* que en otras levaduras (*Pichia pastoris*). Como respuesta celular a condiciones de estrés oxidativo *Y. lipolytica* presenta un incremento en la actividad de Sod y Cat (Lopes, Mota, Belo, 2013). Se ha observado que el tratamiento de células de *Y. lipolytica* con H₂O₂ ocasiona un incremento en la actividad de Cat y que el tratamiento con menadiona aumenta la actividad de Sod (Arinbasarova et al., 2015).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la cepa P01A del hongo *Yarrowia lipolytica*; el cual es un microorganismo aeróbico no patógeno que tiene la capacidad de utilizar como fuente de carbono, grasas e hidrocarburos. Además se ha utilizado como modelo biológico para el estudio de la secreción de proteínas recombinantes, metabolismo del carbono, utilización de sustratos hidrófobos y biogénesis de peroxisomas.

6.2. Métodos

6.2.1. Diseño del estudio

El presente estudio es de tipo experimental con temporalidad de Julio de 2014 a Agosto de 2015.

Los procesos experimentales se realizaron en los laboratorios de Proteómica, Genética y Biología Molecular, Alimentos y Bioquímica del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP) de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.2.2. Estrategia general de trabajo

Para el cumplimiento de los objetivos del presente trabajo, el desarrollo del mismo se realizó en 3 etapas:

1. Establecimiento de las condiciones de estrés oxidativo en *Y. lipolytica*.
2. Obtención y procesamiento del material genético.
3. Análisis de expresión de los genes.

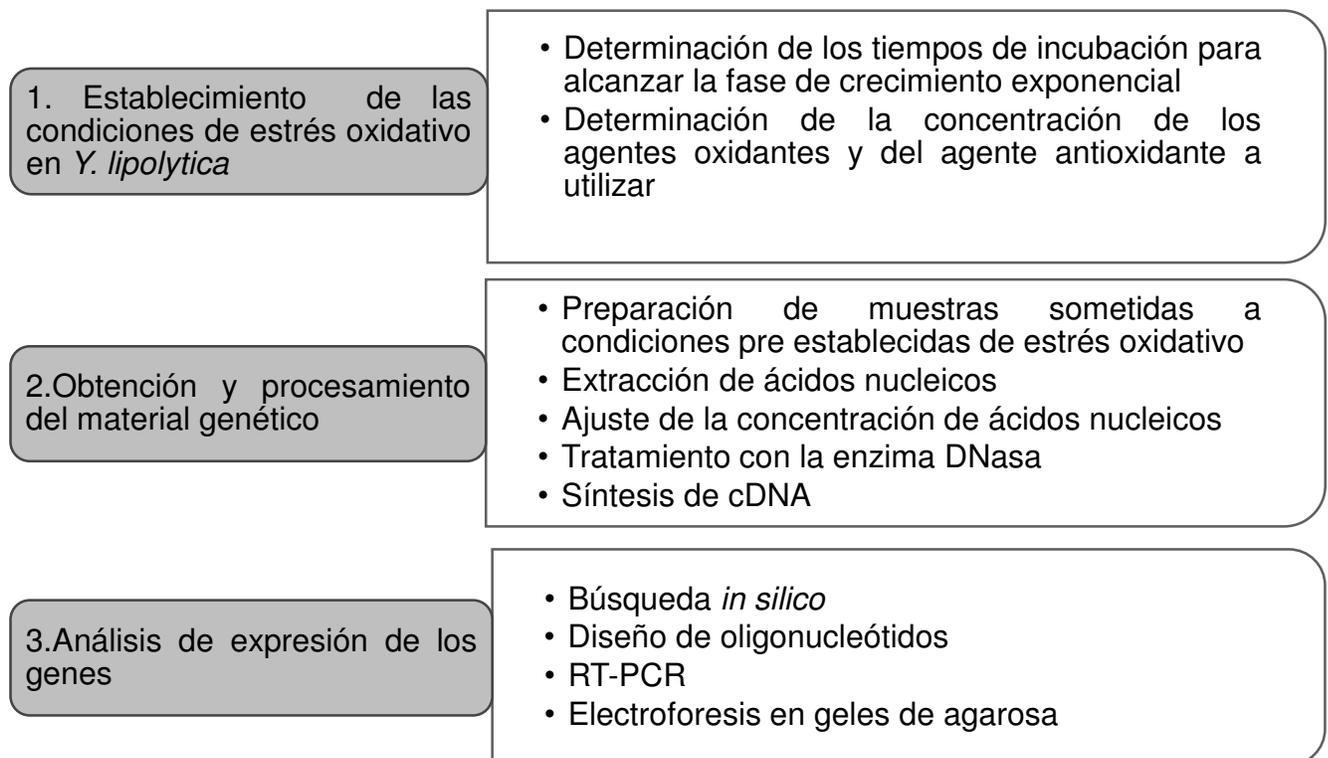


Figura 4. Estrategia general de trabajo.

6.3. Procedimiento experimental

6.3.1. Preparación de los medios de cultivo

Para el cultivo de la cepa PO1A de *Y. lipolytica* se utilizó medio YPD líquido (extracto de levadura 1% caseína 2%, glucosa anhidra 2%). Este medio se preparó disolviendo 10 g de extracto de levadura (US Biological), 20 g de caseína (Dibico) y 20 g de glucosa anhidra (Dibico) en agua desionizada, la mezcla se llevó a un volumen final de 1000 ml y posteriormente se esterilizó por calor húmedo en autoclave (121 °C y 15 lb/pulg² de presión durante 15 min). Para la preparación de medio YPD sólido, a la mezcla anterior se adicionó el 2% de agar bacteriológico (10 g; Dibico), antes de su esterilización.

6.3.2. Inoculación de precultivos

Los inóculos se prepararon en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar (SG 403A, SterilGARD III Advance). Una colonia de la cepa P01A de *Y. lipolytica* (colección celular del Laboratorio de Proteómica del CINSP) se sembró en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio YPD líquido y se colocaron en una incubadora con sistema de agitación orbital (Modelo 1575, SL Shel Lab) a 28 °C, con agitación rotatoria a 200 rpm durante toda la noche.

6.3.3. Ajuste de inóculo según densidad óptica (OD)

Para estandarizar la cantidad de material biológico utilizado en los diferentes experimentos se determinó la densidad óptica (OD) de los pre cultivos líquidos de la cepa PO1A de *Y. lipolytica*. Se tomó una alícuota de cultivos líquidos incubados durante toda la noche a 28 °C, 200 rpm y se determinó la OD en un espectrofotómetro (UV-Visible Evolution 300, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 600 nm, realizando con agua destilada estéril las diluciones pertinentes para que su absorbancia estuviera entre 0.1-0.4.

La OD₆₀₀ de los cultivos se ajustó a 1.0 o a 0.2 según se indique aplicando la siguiente fórmula:

$$Volumen\ inicial = \frac{Volumen\ final \times Concentración\ final}{Concentración\ inicial}$$

Donde:

Volumen final = Volumen deseado

Concentración final = Concentración deseada (1.0 ó 0.2)

Concentración inicial = Densidad óptica obtenida de precultivos a 600 nm

6.3.4. Preparación de soluciones stock

Las soluciones utilizadas se almacenaron a temperatura ambiente después de su preparación a menos que se indique otra condición.

Solución de menadiona

La solución stock de menadiona (C₁₁H₈O₂, PM: 172 g) se preparó a una concentración 20 mM; para ello se pesaron 0.0344 g de menadiona cristalina (Sigma-Aldrich) en una balanza analítica (BL120S, Sartorius), se disolvió y aforó a 10 ml con etanol absoluto (Bio Basic, Canada).

Solución de ácido gálico

La solución stock de ácido gálico (C₇H₆O₅, PM: 170.12 g) se preparó a una concentración 200 mM; para ello, se pesaron 0.3 g de ácido gálico (3,4,5 ácido trihidroxibenzoico, Sigma-Aldrich) en una balanza analítica, se disolvió y se aforó a 4 ml con etanol absoluto. El tubo que contenía ácido gálico se cubrió con aluminio para protegerlo de la luz y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Buffer de lisis: para la preparación buffer de lisis se añadieron los reactivos en las siguientes proporciones: tritón X-100 2%, 10 mM de tris HCl (pH 8), SDS 1%, 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, mezclando 2 ml de tritón (Research Organics), 10 ml de tris HCl (Research Organics), 1 g de SDS (Bio-Rad), 1 ml de NaCl (Bio-Rad) y 200 µl de EDTA (Bio-Rad) y llevando la reacción a un volumen de 100 ml con agua desionizada por un sistema de filtración Water Pro PS, LABCONCO.

Solución fenol-cloroformo (1:1): para la preparación de la mezcla fenol cloroformo 1:1, en un tubo de polipropileno de fondo cónico se colocaron 25 ml de fenol saturado pH 8 (Bio Basic, Canada) y 25 ml de cloroformo (CTR, Scientific), la mezcla se homogenizó por inversión y se guardó a 4 °C hasta su uso.

Acetato de sodio 3 M: para lograr una solución con una concentración 3 M de acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$, PM: 82.03), se pesaron 12.3 g de acetato de sodio (CTR, Scientific) y se disolvió y aforó a 50 ml con agua desionizada esteril.

Buffer TAE 50 X: para la preparación de buffer TAE 50 X se pesaron 242 g de Tris base y se disolvió con 57.1 ml de ácido acético (CTR, Scientific) y 100 ml de de una solución 0.5 M de EDTA (pH 8), los componentes se mezclaron con ayuda de un agitador magnético y se aforó a un volumen de un litro con agua desionizada.

Buffer TAE 1X: para la preparación de un litro de buffer TAE 1X, se tomaron 20 ml de TAE 50 X y se llevaron a un volumen de 1000 ml con agua desionizada, en un probeta de 1000 ml.

6.4. Establecimiento de las condiciones de estrés oxidativo

6.4.1. Determinación de los tiempos de incubación para alcanzar la fase de crecimiento exponencial

Una curva típica de crecimiento celular se compone de 4 fases: adaptación, crecimiento exponencial, fase estacionaria y declive o muerte. Para establecer el tiempo de incubación requerido para que las células de la cepa PO1A de *Y. lipolytica* alcanzaran la fase de crecimiento exponencial, fue necesario realizar curvas de crecimiento. Para ello, se preparó un inóculo sembrando una colonia de la cepa P01A de *Y. lipolytica* en 50 ml de medio YPD líquido y se incubó toda la noche a 28°C con agitación a 200 rpm. Posteriormente se determinó la densidad óptica (OD₆₀₀) del cultivo y ésta se ajustó a 0.2. La cantidad de inóculo calculado se añadió a matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio YPD líquido y se incubó a 28°C con agitación a 200 rpm por 72 h.

El crecimiento de los cultivos se monitoreó mediante la lectura de la OD₆₀₀, a partir de alícuotas de 1 ml de los cultivos obtenidos cada 2 h durante las primeras 12 h, cada 6 h hasta las 24 h y finalmente cada 24 h hasta las 72 h de incubación. Para la lectura de OD se realizaron las diluciones pertinentes para que la lectura de absorbancia estuviera en un rango de 0.1 a 0.4.

6.4.2. Determinación de la concentración de los agentes oxidantes y agente antioxidante a utilizar

El efecto de los agentes oxidantes y antioxidante sobre el crecimiento de la cepa PO1A de *Y. lipolytica* se analizó utilizando el método de dilución en serie en placas de YPD adicionadas con diferentes concentraciones de los agentes.

Para establecer la concentración necesaria para que los agentes oxidantes fueran capaces de producir condiciones de estrés oxidativo en la cepa PO1A de *Y. lipolytica*, se probaron concentraciones de 1 a 10 mM de H₂O₂ y de 0.0025 a 0.2 mM de menadiona.

Así mismo, se realizaron ensayos con concentraciones de 2 a 10 mM de ácido gálico para determinar su efecto como potencial agente antioxidante.

Para la preparación de placas, se calculó la cantidad necesaria de los diferentes agentes para lograr las concentraciones deseadas en 25 ml de medio YPD agar. Se colocaron 25 ml de medio YPD agar (antes de su gelificación, aproximadamente entre 45-50 °C) en un tubo de polipropileno de fondo cónico, se agregó la cantidad calculada de agente oxidante/antioxidante, la mezcla se homogenizó por inversión, se vertió en una caja de Petri y se dejó gelificar a temperatura ambiente.

A partir de una alícuota de cultivo cuya OD₆₀₀ había sido ajustada a 1.0, se realizaron diluciones en serie 1:10 (100 µl cultivo+900 µL agua destilada estéril) hasta tener un dilución de 1×10^{-6} , mezclando vigorosamente con vórtex para obtener la homogenización de cada dilución. De cada una de estas diluciones se sembraron 3 µl en las placas adicionadas con diferentes concentraciones de los agentes (H₂O₂, menadiona y ácido gálico). Las placas se cubrieron con papel aluminio para protegerlas de la exposición a la luz y se incubaron en posición invertida a 28 °C por 72 h. Para documentar cambios de crecimiento y/o morfología de las colonias bajo los diferentes tratamientos, se tomaron fotografías de las placas cada 24 h con un sistema de fotodocumentación (Gel Doc-It Imaging System, UVP).

Para el análisis de expresión de genes se realizó el procedimiento experimental que de manera esquemática se describe en la figura 5.

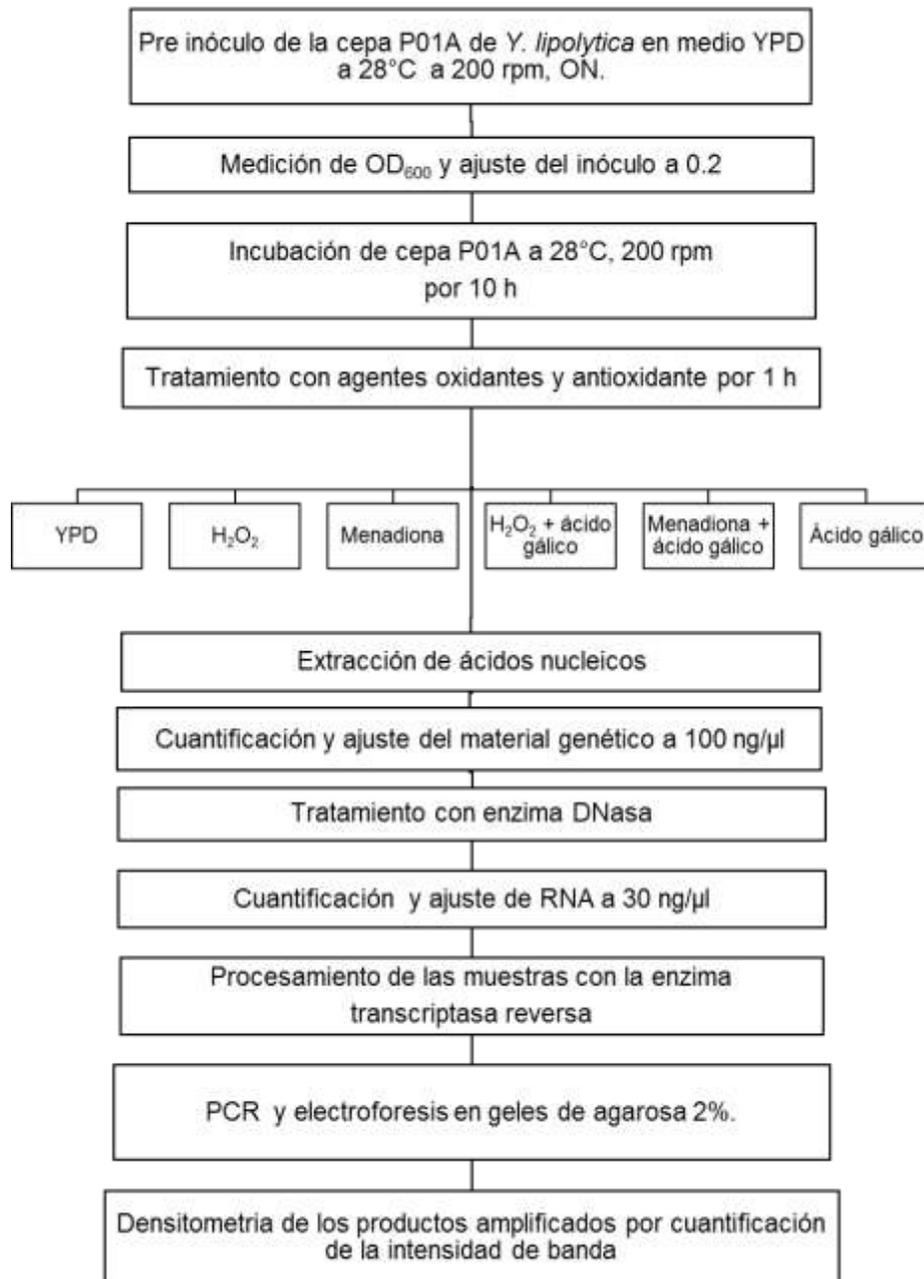


Figura 5. Diagrama del procedimiento experimental para el análisis de la expresión de genes.

6.5. Obtención y procesamiento del material genético

6.5.1. Preparación de muestras sometidas a condiciones de estrés oxidativo

Para el tratamiento de las muestras para la obtención de material genético, se realizó un pre inóculo sembrando una colonia de la cepa PO1A de *Y. lipolytica* en 50 ml de medio YPD líquido y se dejó incubar toda la noche a 28 °C con agitación a 200 rpm.

Se determinó la OD₆₀₀ del inóculo y se ajustó a 0.2 con la fórmula correspondiente (ver apartado 6.4.3), la cantidad calculada fue añadida a matraces Erlenmeyer que contenían 50 ml de medio YPD líquido y se incubaron a 28 °C con agitación a 200 rpm por 10 h. Después, se añadieron a los diferentes cultivos las cantidades requeridas de cada agente para lograr las siguientes concentraciones: 4.5 mM de H₂O₂, 0.1 mM de menadiona y 2 mM de ácido gálico, así como tratamientos conjuntos de 4.5 mM de H₂O₂ y 2 mM de ácido gálico y de 0.1 mM de menadiona y 2 mM de ácido gálico, los cultivos se incubaron 1 h con los agentes oxidantes/antioxidantes y se procedió a la cosecha de células para la obtención de material genético.

6.5.2. Extracción de los ácidos nucleicos

Para la extracción de los ácidos nucleicos se utilizó el método de fenol-cloroformo modificado por Hoffman y Wiston (1987), en el cual se incorpora la utilización de perlas de vidrio para la ruptura mecánica de las células. Para lograr la lisis celular se requieren métodos mecánicos ya que la pared celular de las levaduras al estar compuesta de polisacáridos es resistente a los métodos convencionales de lisis química.

De los cultivos celulares preparados en las condiciones previamente descritas se tomaron 3 ml en tubos para microcentrifuga (1.5 ml de capacidad) y se centrifugaron durante 2 min a 12,000 rpm (microcentrifuga 5415D, Eppendorf), el sobrenadante se eliminó por decantación y las células cosechadas se resuspendieron en 100 µl de agua bidestilada.

A partir de este momento, todo el proceso se realizó a 4°C utilizando una hielera con hielo molido y agua. A cada paquete celular se agregaron aproximadamente 250 µl de perlas de vidrio, 400 µl de buffer de lisis y 400 µl de fenol-cloroformo y se sometieron a 3 periodos hielo/agitación con vórtex (1 min/1 min). Los tubos se centrifugaron por 10 min a 12,000 rpm, se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 400 µl) utilizando una micropipeta y se colocó en un tubo nuevo.

Para precipitar los ácidos nucleicos, al sobrenadante recuperado se le añadieron 50 µl de acetato de sodio 3 M resuspendiendo delicadamente y 1 ml de etanol absoluto frío, las muestras se mezclaron por inversión y se incubaron al menos por 20 min a -20 °C. Después se centrifugaron por 10 min a 12,000 rpm; el sobrenadante se eliminó por decantación y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 70%; se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm, el sobrenadante se eliminó por decantación y el exceso se eliminó por aspiración con micropipeta; las muestras se dejaron secar por 5 min a temperatura ambiente y pasado este tiempo, los ácidos nucleicos se resuspendieron con 50 µl de agua bidestilada. Los tubos se etiquetaron y almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.5.3. Ajuste de la concentración de los ácidos nucleicos.

La concentración de los ácidos nucleicos obtenidos se determinó midiendo su OD a 260 nm utilizando el equipo Nanodrop 2000 UV-Visible, Thermo Scientific.

Las muestras fueron ajustadas realizando las diluciones correspondientes, a fin de que todas tuvieran la misma concentración de ácidos nucleicos, partiendo de la lectura de OD con menor valor (aproximadamente 100 ng/µl).

6.5.4. Tratamiento con DNasa

Para eliminar el DNA y recuperar únicamente el RNA, las muestras de ácidos nucleicos extraídos (mezcla de DNA y RNA) fueron tratadas con la enzima DNasa (PureLink, Invitrogen).

De las muestras de ácidos nucleicos previamente ajustadas se tomaron 8 μ l y se colocaron en un tubo de polipropileno de 200 μ l, se agregó 1 μ l de buffer de reacción de DNasa I 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM de $MgCl_2$, 500 mM de KCl, (Invitrogen)), y se agregó 1 μ l de la enzima DNasa PureLink (Invitrogen). La reacción se incubó por 1 h a 37 °C, después se agregó 1 μ l más de la enzima y se incubó por 1 h a 37 °C. Posteriormente, para inactivar la enzima, se agregó 1 μ l de 25 mM de EDTA y se incubó durante 10 min a 65 °C. Los tubos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Las muestras tratadas con la enzima DNasa (RNA) fueron ajustadas a una concentración de 30 ng/ μ l realizando la diluciones pertinentes con agua bidestilada (Pisa). Para su cuantificación se utilizó el equipo Nanodrop 2000.

6.5.5. Síntesis de cDNA

La enzima transcriptasa reversa es una enzima de tipo DNA-polimerasa que tiene como función sintetizar DNA utilizando como molde RNA monocatenario. Para la síntesis de cDNA se utilizó el sistema de transcripción reversa GoScript de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. El proceso consiste en 2 reacciones y se realiza a 4 °C (hielo molido). Para llevar a cabo la primera reacción, los reactivos se centrifugaron antes de usar; en un tubo de polipropileno de 1.5 ml se mezclaron el RNA, los oligonucleótidos aleatorios y el agua libre de RNasa (tabla 2); la mezcla se incubó a 70°C por 5 min y se enfrió durante 5 min en hielo. Cada tubo se centrifugó por 10 seg y se mantuvo en hielo hasta que la segunda reacción se añadiera.

Tabla 2. Componentes de la reacción 1 para la síntesis de cDNA.

Reactivo	Volumen (μl)
RNA	4
Oligonucleótidos aleatorios (0.5 μ g /reacción)	1
Volumen final: 5.0	

En la segunda reacción se realizó una mezcla de los componentes listados en la tabla 3 (volumen final=15 μ l) y ésta se añade al tubo en donde se realizó la reacción 1, obteniendo un volumen final de reacción de 20 μ l. La mezcla se incubó a 25 °C por 5 min, a 42 °C por 1 h y finalmente a 70 °C por 15 min. Los tubos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Tabla 3. Componentes de la reacción 2 para la síntesis de cDNA.

Reactivo	Volumen (μl)
Agua libre de RNAsa	7.0
Buffer de reacción Go Script 5X	4.0
MgCl ₂ (2.56 mM)	2.0
Mezcla de dNTPs (concentración final 0.5 mM de cada dNTP)	1.0
Transcriptasa reversa GoScript	1.0
Volumen final: 15.0	

6.6. Análisis de la expresión de genes

6.6.1. Búsqueda *in silico* de secuencias de genes que codifican para enzimas antioxidantes de *Y. lipolytica*

Se realizó búsqueda *in silico* de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en diferentes especies de hongos, en bancos de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); posteriormente, utilizando como anzuelo las secuencias obtenidas, se buscaron secuencias homólogas en el genoma de *Y. lipolytica* en la base de datos del consorcio francés Génolevures (<http://genolevures.org>).

Una vez identificadas las secuencias de los genes que presuntamente codifican para las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (*SOD*), catalasa (*CAT*) y glutatión peroxidasa (*GPX*) en *Y. lipolytica*, se procedió al diseño de oligonucleótidos específicos para realizar el análisis de expresión de estos genes por RT-PCR.

6.6.2. Diseño de oligonucleótidos

En el diseño de oligonucleótidos es importante considerar características como número de nucleótidos, contenido de guanina-citosina, temperatura de alineamiento, así como evitar la auto complementariedad entre los pares de oligonucleótidos y en el fragmento mismo.

Con ayuda del programa OligoCalc (Oligonucleotide Properties Calculator, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>); se corroboraron las características generales de los oligonucleótidos específicos diseñados para las regiones codificantes de genes involucrados en el sistema de defensa antioxidante enzimático de *Y. lipolytica*.

6.6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos específicos de DNA es posible mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction). Utilizando esta técnica se amplificaron fragmentos específicos de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Cada reacción de PCR se preparó en un tubo de polipropileno de 200 μl de capacidad integrando los siguientes componentes: 13 μl de agua bidestilada, 0.5 μl de MgCl_2 , 5 μl de mezcla de deoxinucleótidos (Bioline), 2 μl de cada oligonucleótido directo/reverso (Alpha DNA), 0.5 μl de la enzima DNA Taq polimerasa (Bioline) y 2 μl de los productos de la reacción de transcripción reversa (cDNA) o DNA genómico (Tabla 4) cuando se estandarizaron las condiciones de amplificación para los diferentes pares de oligonucleótidos.

Tabla 4. Componentes de la reacción de PCR.

Reactivo	Volumen (μl)
Agua bidestilada	13.0
MgCl_2 , 50 mM	0.5
Mezcla de dNTPs, 10 mM con buffer de la enzima DNA Taq polimerasa	5.0
Oligonucleótido directo 1 μM	2.0
Oligonucleótido reverso 1 μM	2.0
Enzima DNA Taq polimerasa (5 U/ μl)	0.5
cDNA	2.0
Volumen final: 25.0	

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Sprint Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation), con las condiciones que se indican en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación de fragmentos específicos de los genes *SOD*, *CAT* y *GPX* de *Y. lipolytica*.

Etapa	Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de ciclos
1	Desnaturalización	95	5	1
2	Desnaturalización	95	1	} 30
	Alineamiento	60	1	
	Extensión	72	1	
3	Extensión final	72	10	1
4	Conservación	4	Infinito	

Al finalizar la reacción de PCR se analizaron los productos amplificados por electroforesis en geles de agarosa.

6.6.4. Electroforesis en geles de agarosa

El análisis de los productos amplificados mediante la reacción de PCR, se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Para la preparación del gel, se pesaron 2 g de agarosa (Bioline) en una balanza de precisión (BL1500, Sartorius), la agarosa se colocó en un matraz y se aforó a 100 ml con buffer TAE 1X; el matraz se puso en una placa de calentamiento (PC 420D, Corning Stirrer) para facilitar la disolución de la agarosa, se tomaron 22 ml de agarosa ya disuelta en tubo de polipropileno de 50 ml de fondo cónico y se agregó 1 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml; Bio-Rad), se homogenizó por inversión y se vertió en un molde con peine de plástico para la formación de pozos y se dejó gelificar. Posteriormente, se colocó en la cámara de electroforesis equipada con una fuente de poder (Power-pac 300, Bio-Rad) y se cubrió con TAE 1X.

De los productos de PCR, 12 μ l se mezclaron con 2 μ l de buffer de carga Orange 6X (10 mM Tris HCl pH 7.6, 0.15% orange G, 0.03% xileno FF cianol, glicerol 60% y 60 mM de EDTA; BioLabs-New England) y se depositaron en los pozos del gel con ayuda de una micropipeta.

Para la separación de las bandas se aplicó una corriente eléctrica de 90 V por 40 min y posteriormente el gel se visualizó con luz UV en un sistema de fotodocumentación UVP. El tamaño de las bandas correspondiente a los productos amplificados se identificó por comparación con el marcador de peso molecular HyperLadder IV (Bioline) y posteriormente, utilizando funciones del equipo se seleccionó el área de cada banda de producto amplificado para la determinación de su densidad.

6.7. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos fueron procesados con el software SPSS V.17.0 (SPSS, Inc Chicago Illinois). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba análisis de varianza (ANOVA), con la prueba LDS (Least Significant Difference) de Fisher y las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p obtenido fue menor a 0.05.

Para el análisis de la expresión de genes, los datos de intensidad de banda de cada gen obtenidos a partir de 3 experimentos independientes fueron promediados y los valores fueron utilizados para la realización de pruebas de estadística descriptiva y ANOVA. Para la realización de las gráficas el valor promedio de expresión obtenido del tratamiento control (YPD) se consideró como el 100% de expresión y a partir de este se obtuvieron valores porcentuales de expresión para cada uno de los genes analizados.

7. RESULTADOS

7.1. Determinación de las condiciones de estrés oxidativo

7.1.1. Establecimiento de los tiempos de incubación para determinar la fase de crecimiento exponencial

El crecimiento celular de las levaduras se divide en 4 fases: la primera es la fase de adaptación, en ella la célula reconoce las condiciones de crecimiento y sintetiza moléculas como RNA y enzimas, la segunda fase es la denominada fase de crecimiento exponencial que se caracteriza por la duplicación de las células y por ende con una tasa de crecimiento incrementada, en la tercera fase disminuye la tasa de crecimiento como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos, esta fase es conocida como fase estacionaria y por último, en la cuarta fase, ocurre el declive o muerte celular.

Para determinar el patrón de crecimiento de la cepa PO1A de *Y. lipolytica*, se realizaron curvas de crecimiento. Para ello, se monitoreó la densidad óptica de cultivos celulares en YPD durante 72 h. Los datos obtenidos indican que la cepa P01A de *Y. lipolytica* se encuentra en fase de adaptación durante las primeras 5 h, que la fase de crecimiento exponencial se presenta entre las 6 y 16 h de incubación y que las células alcanzan su fase estacionaria después de 23 h de incubación (figura 6).

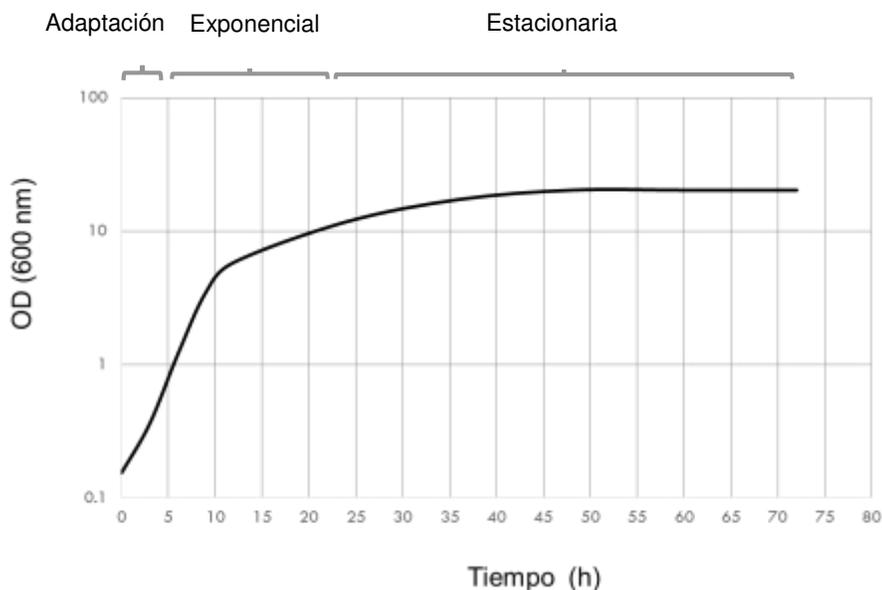


Figura 6. Curva de crecimiento de la cepa P01A de *Y. lipolytica* (Inóculo inicial $OD_{600}=0.2$). Las células fueron incubadas a 28°C, con agitación a 200 rpm; la OD de los cultivos se determinó en los diferentes tiempos marcados.

7.1.2. Determinación de la concentración a utilizar de los agentes oxidantes y agente antioxidante

Para examinar el efecto de diferentes concentraciones de los agentes sobre el crecimiento de la cepa P01A de *Y. lipolytica* se utilizó el método de dilución en serie; en este procedimiento se sembraron células de *Y. lipolytica* en placas de YPD adicionadas con los diferentes agentes oxidantes y antioxidante en distintas concentraciones.

Se probaron concentraciones entre 1 y 10 mM de H_2O_2 y se observó que la concentración 3 mM de H_2O_2 retrasó el crecimiento celular, la concentración 5 mM tuvo un efecto inhibitorio agresivo limitando prácticamente en su totalidad el crecimiento de las células y que la concentración 10 mM es letal para *Y. lipolytica* (figura 7). Los resultados del método de dilución en serie indican que la concentración 4.5 mM de H_2O_2 afecta el crecimiento celular de *Y. lipolytica* pero permite que continúe la duplicación celular, lo que podría implicar mecanismos de adaptación que permiten la sobrevivencia de las células.

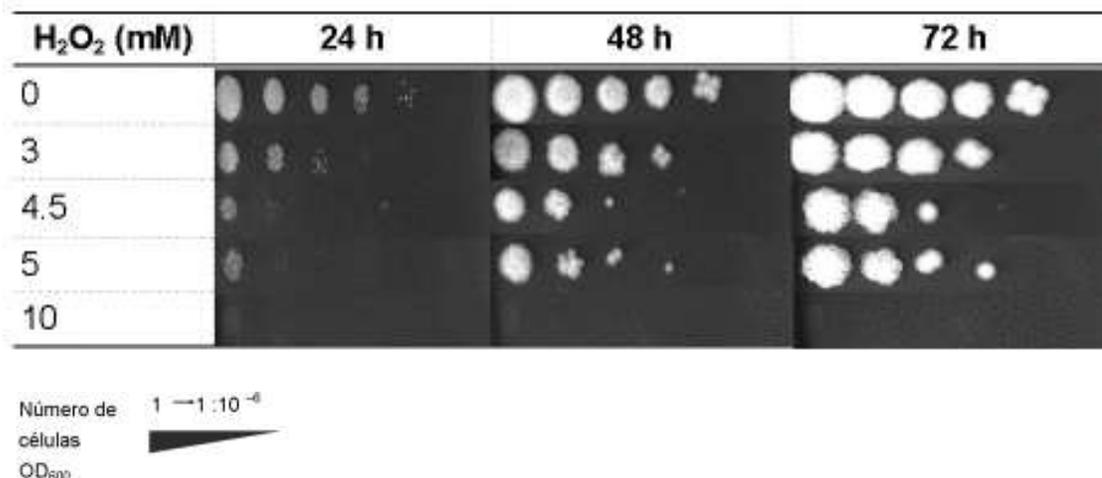


Figura 7. Efecto del H₂O₂ sobre el crecimiento de *Y. lipolytica*. Se realizaron diluciones en serie de células de la cepa P01A a 28°C con agitación a 200 rpm a la mitad de su fase logarítmica (OD₆₀₀ 1.0) y fueron sembradas en placas adicionadas con H₂O₂ en concentraciones de 3 a 10 mM e incubadas a 28°C por 72 h. Las placas se fotografiaron cada 24 h.

Para preparar la solución de menadiona se utilizó como diluyente etanol, así que éste se incluyó como control para determinar que su presencia no afectara el crecimiento de las células. Considerando lo reportado en la literatura, las concentraciones de menadiona probadas oscilaron entre 0.0025 y 0.2 mM (Wu, et al., 2011). Los resultados obtenidos (figura 8) muestran que el etanol por sí mismo no afecta el crecimiento celular, que concentraciones desde 0.1 mM de menadiona afectan de manera importante el crecimiento de la cepa y que la menadiona inhibe casi por completo el crecimiento de *Y. lipolytica* a una concentración de 0.2 mM. En este trabajo, el efecto esperado de los agentes oxidantes era la represión moderada del crecimiento celular y la concentración 0.1 mM de menadiona produjo este resultado.

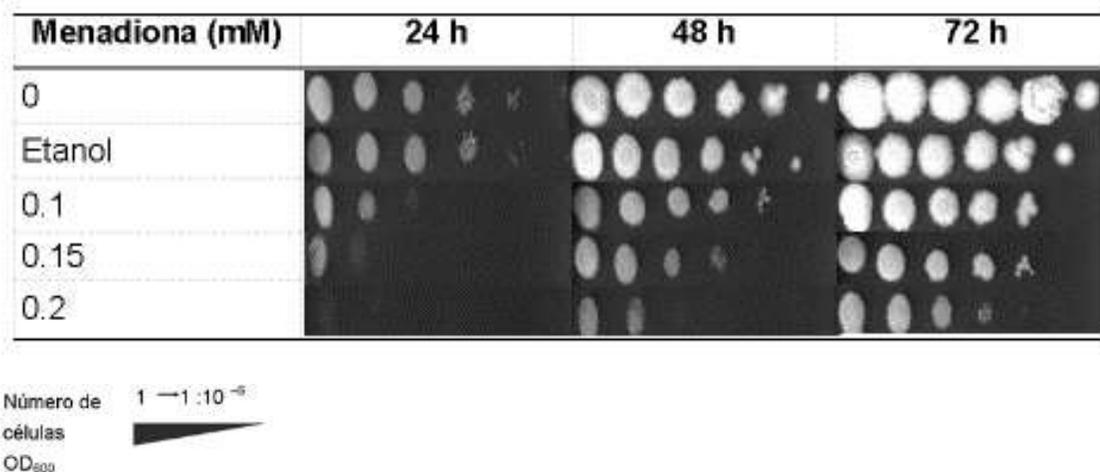


Figura 8. Efecto de la menadiona en el crecimiento de *Y. lipolytica*. Se siguieron las mismas condiciones experimentales descritas en la Figura 6, utilizando placas de YPD adicionadas con concentraciones de 0.0025 a 0.2 mM de menadiona.

Se ha planteado que los agentes antioxidantes pueden contrarrestar los efectos del estrés oxidativo, por ello en el presente trabajo el ácido gálico fue usado como agente antioxidante.

Utilizando como base los medios de cultivo adicionados con una concentración 5 mM de H₂O₂ (la cual es capaz de ocasionar condiciones de estrés oxidativo e inhibir de forma importante el crecimiento de la cepa P01A de *Y. lipolytica*) se probaron las concentraciones 2, 5 y 10 mM de ácido gálico para determinar su posible efecto antioxidante, esperando que se inhibiera el efecto ocasionado por el H₂O₂.

Los resultados obtenidos (figura 9) indican que en células de *Y. lipolytica* tratadas con 5 mM H₂O₂, el ácido gálico en una concentración 2 mM no tiene efecto sobre el crecimiento celular mientras que dosis más elevadas (5 y 10 mM) muestran un efecto inhibitorio adicional, además, en ninguna de las concentraciones probadas el ácido gálico inhibió el efecto del H₂O₂.

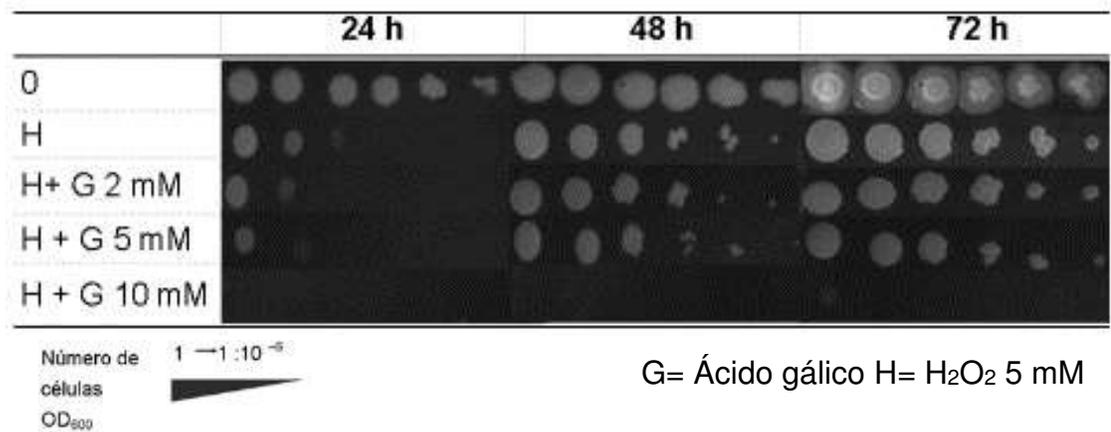


Figura 9. Efecto del ácido gálico en el crecimiento de células de *Y. lipolytica* tratada con 5 mM de H₂O₂. Se realizaron diluciones en serie de células de P01A en fase logarítmica (OD₆₀₀ de 1.0) y fueron sembradas en placas adicionadas con 5 mM de H₂O₂ y con concentraciones 2, 5 y 10 mM de ácido gálico. Las placas fueron incubadas a 28°C por 72 h y se fotografiaron cada 24 h.

En experimentos similares, para probar el efecto del ácido gálico en células sometidas a tratamiento con menadiona, se partió de una concentración 0.15 mM de menadiona y se probaron las concentraciones 2, 5 y 10 mM de ácido gálico (Figura 10). Los resultados indican que una concentración 2 mM de ácido gálico no retrasa el crecimiento celular, pero que en las placas con concentraciones 5 y 10 mM el ácido gálico tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento de las células, similar a lo observado en las células tratadas con H₂O₂ y ácido gálico.

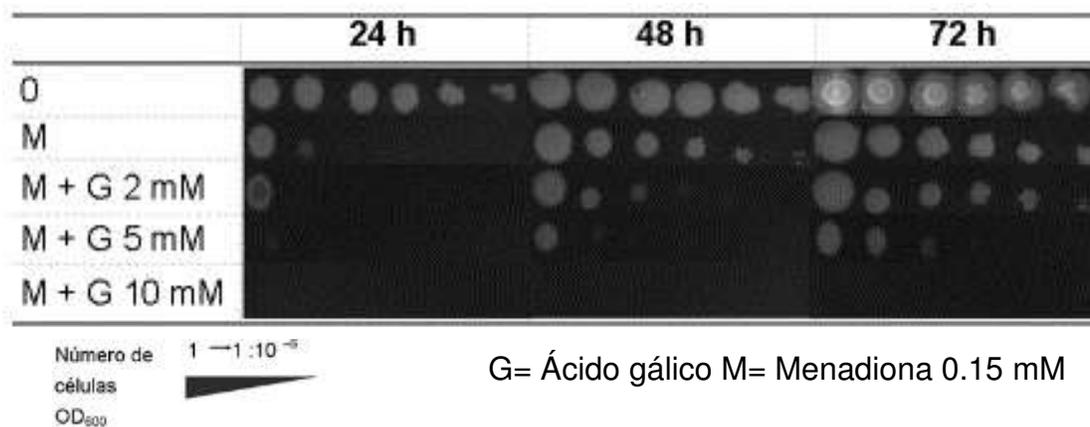


Figura 10. Efecto del ácido gálico en el crecimiento de células de *Y. lipolytica* tratadas con 0.15 mM de menadiona. Se realizaron diluciones en serie de células de P01A en fase logarítmica (OD₆₀₀ de 1.0) y fueron sembradas en placas adicionadas con 0.15 mM de menadiona y con concentraciones de 2, 5 y 10 mM de ácido gálico. Las placas fueron incubadas a 28°C por 72 h y se fotografiaron cada 24 h.

Considerando que en los resultados obtenidos no se observa un potencial efecto antioxidante del ácido gálico, sino un aparente efecto inhibitorio en los tratamientos combinados (H₂O₂+ácido gálico, menadiona+ácido gálico), se decidió probar el efecto de diferentes concentraciones de ácido gálico sobre el crecimiento de *Y. lipolytica*. Se probaron concentraciones entre 2 y 10 mM y los resultados obtenidos muestran que el ácido gálico también tiene un efecto inhibitorio del crecimiento de *Y. lipolytica*; este efecto es dependiente de la dosis (figura 11). Es posible observar que la dosis 2 mM de ácido gálico no afecta el crecimiento de las células y que el efecto inhibitorio comienza a apreciarse en concentraciones de 4 mM y que este agente por sí mismo es letal para las células en una concentración 10 mM.

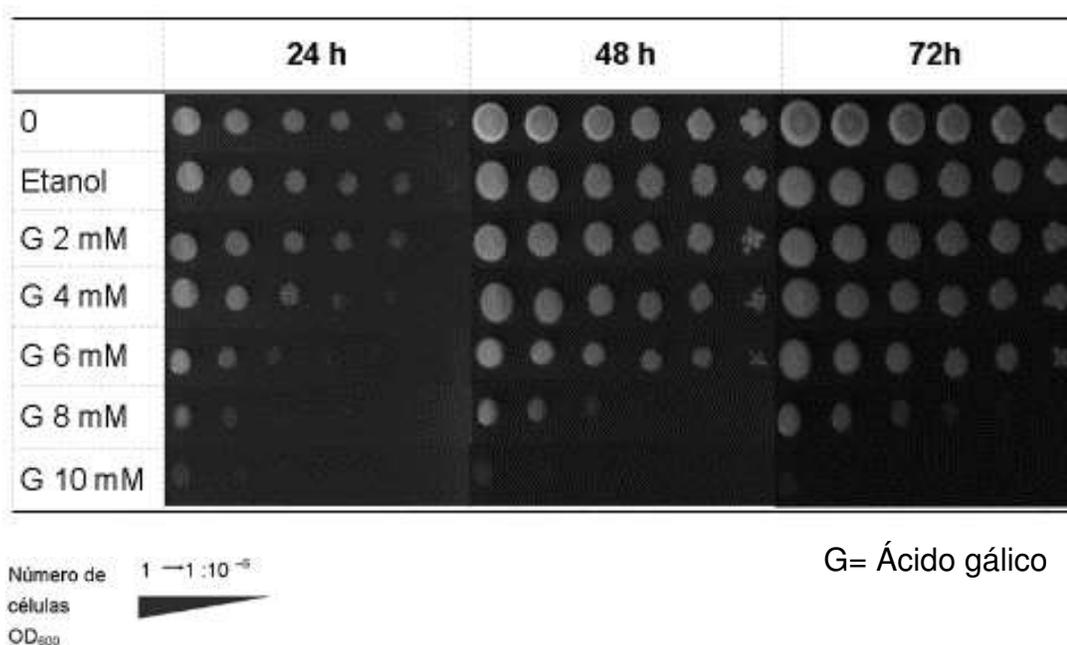


Figura 11. Efecto del ácido gálico en el crecimiento de *Y. lipolytica*. Diluciones seriadas ($1:10^{-6}$) de células de la cepa PO1A de *Y. lipolytica* en placas de YPD adicionadas con ácido gálico en concentraciones de 2 a 10 mM e incubadas 28°C por 72 h.

7.2. Análisis de la expresión de genes

7.2.1. Identificación *in silico* de secuencias de genes que codifican para enzimas antioxidantes de *Y. lipolytica* y diseño de oligonucleótidos específicos.

El análisis *in silico* permitió la identificación de genes que presuntamente participan en el sistema de defensa antioxidante de *Y. lipolytica*. Se identificaron 3 genes que presuntamente codifican para enzimas catalasas, 2 para superóxido dismutasa y 1 para glutatión peroxidasa. En la tabla 6 se muestra la etiqueta (clave de identificación) de cada uno de estos genes en las bases de datos.

El gen que codifica para superóxido dismutasa en *Y. lipolytica* (*SOD1*) codifica para una proteína homóloga a CuSOD de *S. cerevisiae*, cuya actividad representa del 90 al 99% del total de la actividad de las enzimas Sod de este organismo y se localiza en el citoplasma. Las 3 catalasas analizadas (Cat1, Cat2, Cat3) se localizan en el citoplasma; los genes *CAT1* y *CAT2* tienen homología

con genes que codifican para catalasas de *S. cerevisiae* y el gen *CAT3* presenta homología con el gen que codifica para esta enzima en *Emericella nidulans*. Solo se encontró una secuencia altamente homóloga al gen que codifica para glutatión peroxidasa en *S. cerevisiae*, cuya enzima se localiza en el citoplasma.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para las regiones codificantes de genes implicados en el sistema de defensa antioxidante de *Y. lipolytica*. Se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos para catalasas, 2 para superóxido dismutasa y uno para glutatión peroxidasa; como gen constitutivo se consideró utilizar el gen de actina (*ACT*) y también se diseñó un par de oligonucleótidos para este gen.

Tabla 6. Lista de los oligonucleótidos específicos diseñados para los genes *CAT1*, *CAT2*, *CAT3*, *SOD1*, *SOD2*, *GPX* y *ACT* de *Y. lipolytica*.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Gen	nt	pb	Temp (°C)
CAT1F	CCACCACCGTGCGATTTTCTACC	YALI0E34265g	23	539	58.8
CAT1R	CATGGTCTGAAGGGAAACGGTCC		23		58.8
CAT2F	CCATGCAAAGGGAGGAGGAGCC	YALI0E34749g	22	623	60.4
CAT2R	CCGTCCACGAGGGGTAATCCC		21		60.2
CAT3F	CAAGACCTTCACTCGATTCTCCACC	YALI0F30987g	25	425	59.3
CAT3R	CGTCATTGGTGAGGTTCTTGATGCC		25		59.3
SOD1F	CACTGGA ACTTCTGCTCCGTCCC	YALI0F30877g	23	547	60.3
SOD1R	CTGGACGTCCTTCGCTCCTCC		22		60.4
SOD2F	CTTCGAGGAGATTCCAAGGTCTCC	YALI0E12133g	24	390	59.1
SOD2R	CTTGAGAGAGTCGGCATGGCC		21		58.3
GPXF	CCGCTTTCTACAACCTCGCTCC	YALI0E02310g	22	411	58.6
GPXR	CGACGTTACCGTGCTTATCAACC		23		57.1
ACTF	CCACGGGCCAGCAAGCGAATCAATCC	YALI0D08272g	26	580	64.3
ACTR	GGTCATCTTCTCTCGGTTGGA CTGGG		27		52.8

nt.=Número de nucleótidos

pb=Pares de bases

Temp.=Temperatura de alineamiento

La especificidad de los oligonucleótidos se corroboró realizando reacciones de PCR sobre DNA genómico de *Y. lipolytica*. En la figura 12 se puede observar que el tamaño del producto amplificado en cada una de las reacciones corresponde al esperado para los diferentes pares de oligonucleótidos.

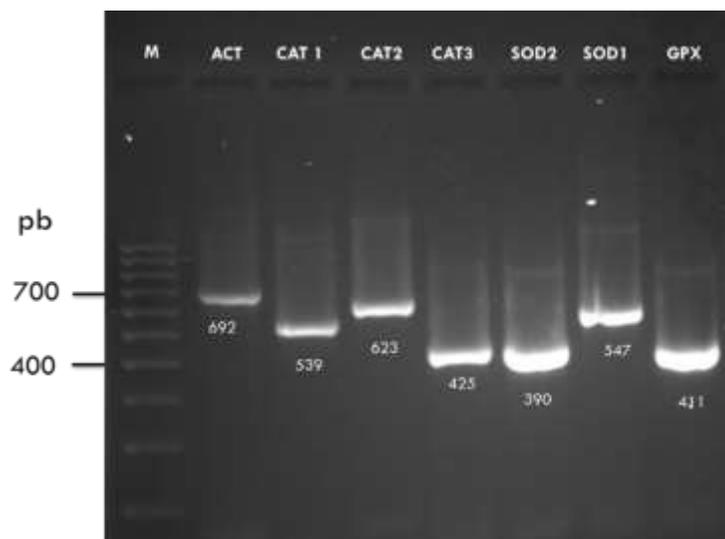


Figura 12. Productos de las reacciones de PCR sobre DNA genómico utilizando los oligonucleótidos diseñados para los diferentes genes. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, marcador HyperLadder IV.

7.2.2. Análisis por RT-PCR

Para analizar los cambios en la expresión de genes que codifican para las enzimas antioxidantes de *Y. lipolytica*, en 3 experimentos independientes se pre incubó una colonia de la cepa PO1A de *Y. lipolytica* y posteriormente en matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio de cultivo YPD se incubaron concentraciones ajustadas de la cepa P01A (OD=0.2) a 28°C, con agitación a 200 rpm por 10 h, posteriormente concentraciones pre establecidas de los agentes se adicionaron de la siguiente manera: 4.5 mM de H₂O₂, 0.1 mM de menadiona, 2 mM de ácido gálico, 4.5 mM de H₂O₂+2 mM de ácido gálico, 0.1 mM de menadiona+2 mM de ácido gálico, las células se incubaron con los agentes por 1 hora y se procedió a la extracción de los ácidos nucleicos (ver apartado 6.5).

La concentración del material genético obtenido de cada una de las muestras fue ajustada (100 ng/ μ l) y el material genético fue tratado con la enzima DNasa, posteriormente el RNA se ajustó a una concentración similar para todas las muestras (30 a 40 ng/ μ l) y se sometió a la acción de la enzima transcriptasa reversa. Para las reacciones de PCR el producto de la reacción con la enzima transcriptasa se utilizó como template y se usaron los oligonucleótidos específicos diseñados sobre las secuencias de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes de *Y. lipolytica*.

La presencia de productos de PCR se comprobó por electroforesis en geles de agarosa al 2%; posteriormente con el equipo de fotodocumentación UVP se visualizaron los geles y se capturaron las imágenes. A partir de las imágenes capturadas se delimitó cada banda y se obtuvieron los valores de densitometría para cada una de ellas, para así cuantificar relativamente los productos obtenidos por RT-PCR. Los valores de densidad de los productos de RT-PCR de 3 experimentos independientes de cada gen fueron promediados y analizados con el programa estadístico SPSS, utilizando la prueba estadística ANOVA y la prueba LDS.

7.2.2.1 *Análisis de la expresión de los genes SOD, CAT y GPX en células de Y. lipolytica sometidas a tratamiento con agentes oxidantes*

El efecto de los agentes oxidantes se analizó comparando los datos de densitometría obtenidos de cada gen contra los del tratamiento control (YPD) con los de las células que estuvieron bajo el efecto de H₂O₂ y menadiona.

Los resultados muestran que en el tratamiento con H₂O₂ se reduce la expresión de los genes que codifican para enzimas antioxidantes, la disminución más importante es la de la expresión del gen *CAT2* (28.8%), seguido de *SOD1* (28.5%) (figura 13-A); por otro lado en el tratamiento con menadiona se reduce la expresión de los genes *SOD1*, *GPX* y *CAT1* (7.3, 12, 23.5% respectivamente),

mientras que se incrementa la expresión de *CAT2* (16.1%) y de *CAT3* (4.7%) (figura 13-B).

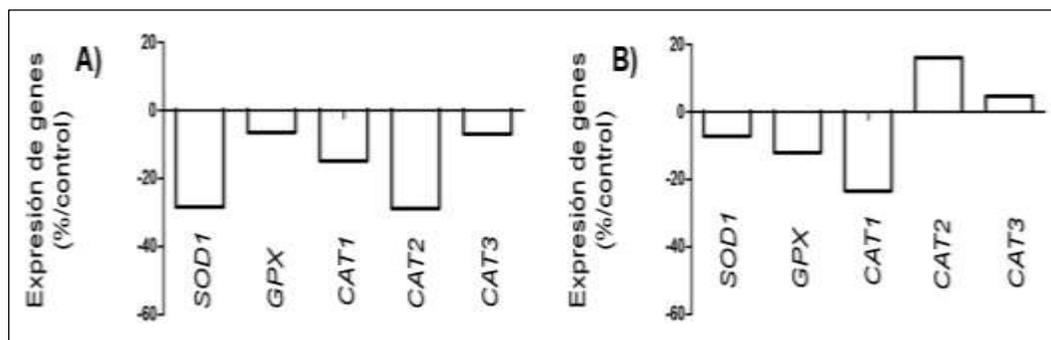


Figura 13. Expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes de *Y. lipolytica* bajo condiciones de estrés oxidativo. Cada columna representa el porcentaje de expresión de los diferentes genes con respecto al tratamiento control (YPD). A) 4.5 mM de H₂O₂ B) 0.1 mM de menadiona. La línea cero representa la expresión de los genes en el grupo control, las barras por debajo de cero indican represión y por encima, sobreexpresión de los genes.

7.2.2.2 Análisis de la expresión de los genes *SOD*, *CAT* y *GPX* en células de *Y. lipolytica* sometidas tratamiento con ácido gálico

En el tratamiento con ácido gálico se observa un patrón de expresión muy similar al obtenido con H₂O₂, ya que se reduce la expresión de todos los genes analizados (figura 14), los genes cuya expresión se encuentra más disminuida son *CAT1* y *SOD1*, con una reducción del 41.7 y 37.5%, respectivamente. Los genes *GPX* y *CAT2* disminuyen su expresión 25.2 y 20.7%, respectivamente y el gen que reduce menos su expresión es *CAT3* (5.2%).

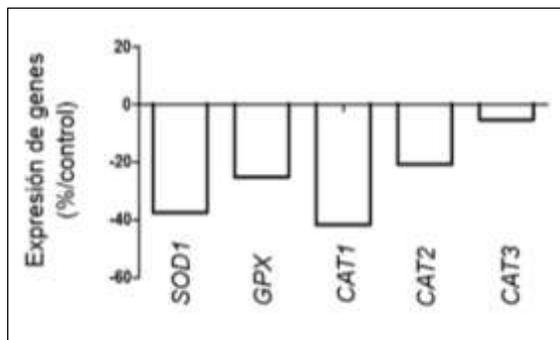


Figura 14. Expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes de *Y. lipolytica* bajo tratamiento con 2 mM de ácido gálico. Cada columna representa el porcentaje de expresión de los diferentes genes con respecto al tratamiento control (YPD). Para una descripción más detallada, ver leyenda de la figura 13.

En los tratamientos combinados H₂O₂+ácido gálico (GH) y menadiona+ácido gálico (GM), los resultados indican que a excepción del gen *CAT3*, la expresión del resto de los genes se reduce.

En el tratamiento combinado GH (figura 15-A) se observa una disminución del 43% aproximadamente en la expresión de los genes *CAT1* y *CAT2*; en *SOD1* y *GPX* los cambios de expresión son menores (5 y 3% de disminución, respectivamente), mientras que la expresión del gen *CAT3* se ve ligeramente aumentada (5%).

Por otra parte, el tratamiento combinado GM (figura 15-B) induce una respuesta diferente en los genes analizados. Bajo estas condiciones, los porcentajes de disminución de los genes *SOD1*, *GPX* y *CAT1* tienen valores entre 20 y 25% con respecto al grupo control (YPD); la expresión del gen *CAT2* disminuye 5% y la expresión de *CAT3* incrementa un 10%.

Comparando los perfiles de expresión en los tratamientos combinados GH *versus* GM (figura 15) se observa que en este último, el porcentaje de disminución de la expresión de *SOD1* y *GPX* es mayor, mostrando valores de 25 y 20%, mientras que el tratamiento GH muestra valores de 5 y 3%, respectivamente.

En el tratamiento combinado GM, los porcentajes de disminución de *CAT1* y *CAT2* son menores (25 y 5%) a los observados en la combinación GH (43%). Aunque en ambos tratamientos se observa un aumento en la expresión del gen *CAT3*, la expresión de este gen el doble en el tratamiento con GM en comparación con el tratamiento con GH.

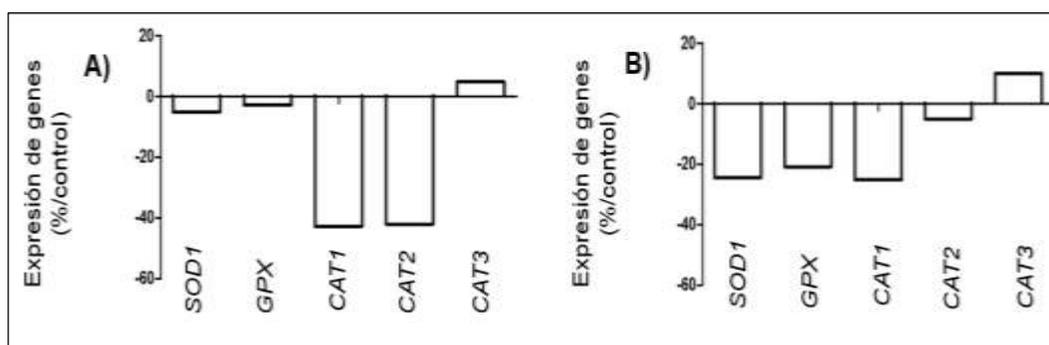


Figura 15. Expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes de *Y. lipolytica* bajo tratamientos combinados 4.5 mM de H₂O₂+2 mM de ácido gálico y 0.1 mM de menadiona+2 mM de ácido gálico. Cada columna representa el porcentaje de expresión de los diferentes genes con respecto al tratamiento control (YPD). A) H₂O₂ + ácido gálico, B) Menadiona+ácido gálico. Para una descripción más detallada, ver leyenda de la figura 13.

7.2.2.3 Análisis de la expresión de genes según enzima antioxidante

Utilizando el mismo proceso de análisis de los datos, también se comparó el patrón de expresión de cada uno de los genes cuando las células fueron sometidas a los diferentes tratamientos.

En todos los tratamientos, los genes *SOD1*, *GPX* y *CAT1* comparados con el tratamiento control (YPD) muestran una expresión disminuida. La expresión de *SOD1* y *GPX* disminuye más en el tratamiento con ácido gálico, incluso en *GPX* son estadísticamente diferentes a los datos observados con otros tratamientos (YPD y GH).

Los niveles de expresión de *SOD1* (figura 16-A) muestran valores de inhibición similares (entre 24 y 38%) en los tratamientos con H_2O_2 , el tratamiento combinado GM y con ácido gálico, mientras que el gen *GPX* (figura 16-B) con el tratamiento con ácido gálico y con GM, los niveles de reducción alcanzan el 20%, H_2O_2 también disminuye la expresión de *GPX*, pero solo un 6% con respecto al tratamiento control (YPD).

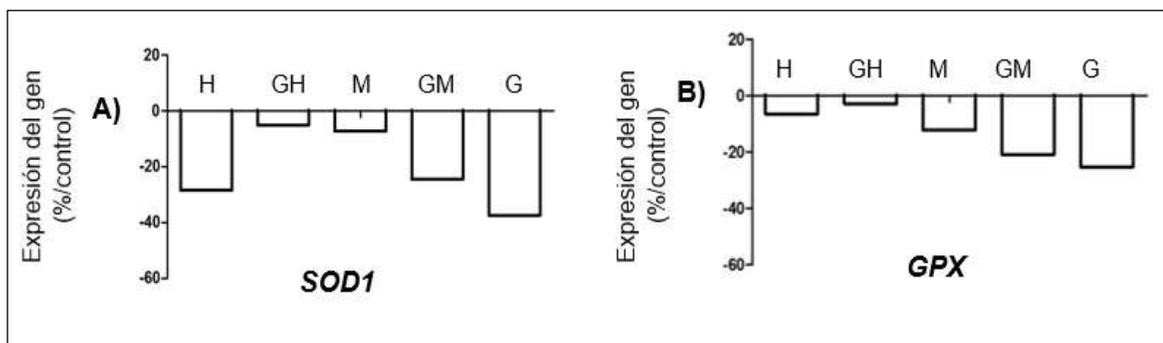


Figura 16. Expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes *SOD* y *GPX* de *Y. lipolytica* en relación al tratamiento control YPD. Cada columna representa el porcentaje de expresión de los genes en cada uno de los tratamientos utilizados (H=4.5 mM de H_2O_2 , GH=4.5 mM de H_2O_2 +2 mM de ácido gálico, M=0.1 mM de menadiona, GM=0.1 mM de menadiona+2 mM de ácido gálico, G=2 mM de ácido gálico) en relación con el tratamiento control.

En el análisis de los genes que codifican para catalasas se puede observar que la expresión de *CAT1* (figura 17-A) en los tratamientos menadiona y GM fue muy similar (23-25%) y fue menor en los tratamientos GH y ácido gálico con una disminución en la expresión de entre 41 y 43%, respectivamente.

Los resultados del gen *CAT2* (figura 17-B) muestran una sobreexpresión con el tratamiento con menadiona (16%), mientras que en el resto de los tratamientos la expresión es menor que en el tratamiento con YPD, los tratamientos con H_2O_2 y GH presentan diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento con menadiona (H_2O_2 $p=0.040$ y GH $p=0.011$) y son los tratamientos en los que más disminuye la expresión del gen (28 y 42%, respectivamente), seguidos por el tratamiento con ácido gálico (20.7%) que según los resultados obtenidos parece afectar la expresión de genes en *Y. lipolytica* de forma similar al H_2O_2 ; finalmente

el tratamiento combinado GM es en el que menos disminuye la expresión de *CAT2* (5%) probablemente por un efecto conjunto entre la menadiona y el ácido gálico donde posiblemente el ácido gálico contrarreste el efecto de la menadiona.

Los valores porcentuales de expresión del gen *CAT3* (figura 17-C) se modificaron poco bajo los diferentes tratamientos, la expresión del gen disminuyó con los tratamientos con H₂O₂ y ácido gálico un 7 y 5%, respectivamente y en el resto de los tratamientos la expresión aumentó (4-10%).

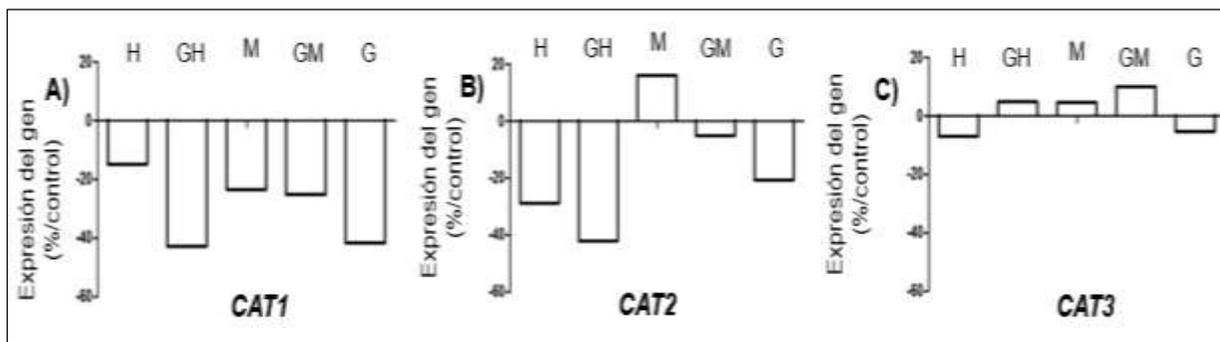


Figura 17. Expresión de genes que codifican para enzimas catalasas de *Y. lipolytica* en relación al tratamiento control YPD. Cada columna representa el porcentaje de expresión de los genes en cada uno de los tratamientos utilizados (H= 4.5 mM de H₂O₂, GH=4.5 mM de H₂O₂+2 mM de ácido gálico, M=0.1 mM de menadiona, GM=0.1 mM de menadiona+2 mM de ácido gálico, G=2 mM de ácido gálico) en relación con el tratamiento control.

En la figura 18 se muestran los valores promedio y el error estándar de los niveles de expresión de los genes bajo los diferentes tratamientos, así como imágenes representativas de la electroforesis en geles de agarosa 2% de los productos amplificados por RT-PCR de los diferentes genes analizados.

De manera general, los datos muestran que el tratamiento conjunto de GH disminuye más la expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* (43%) que el tratamiento con H₂O₂ (15 y 28 %) y que la expresión *GPX* y *SOD1* se reduce más en el tratamiento conjunto GM (20-25%) que en el tratamiento con menadiona (12 y 7%) lo que podría indicar un efecto complementario entre ambos agentes en los tratamientos combinados. Los únicos genes cuyos niveles de expresión son estadísticamente diferentes con los diferentes tratamientos, son *GPX* y *CAT2*; en

GPX hay diferencias entre el tratamiento con ácido gálico y el tratamiento control (YPD) ($p=0.029$) y entre el tratamiento con ácido gálico y GH ($p=0.048$). En el caso de *CAT2* el tratamiento con menadiona es estadísticamente diferente al tratamiento con H_2O_2 ($p=0.040$) y al tratamiento GH ($p=0.011$), el gen *CAT2* es el que presenta mayor número de cambios de expresión con los diferentes tratamientos.

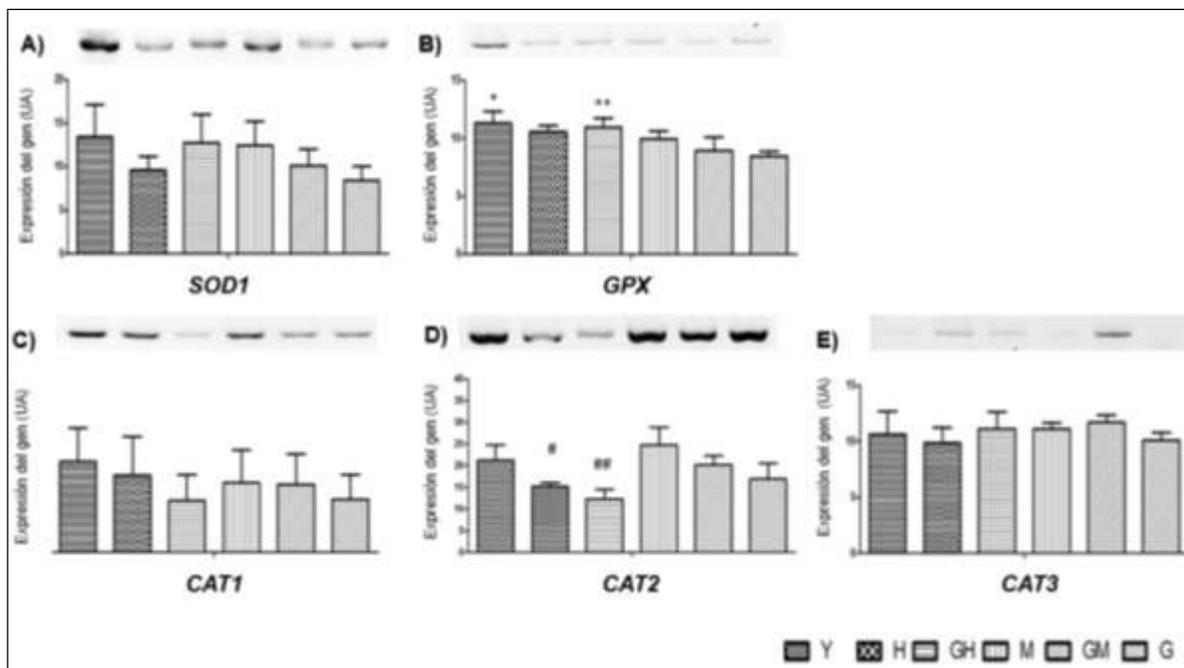


Figura 18. Comparación de los niveles de expresión de los genes que codifican las enzimas *SOD1*, *GPX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* de *Y. lipolytica* bajo diferentes tratamientos con agentes oxidantes y antioxidantes. Cada columna representa el promedio de expresión y error estándar de cada gen bajo los diferentes tratamientos (Y=YPD, H=4.5 mM de H_2O_2 , GH=4.5 mM de H_2O_2 +2 mM de ácido gálico, M=0.1 mM de menadiona, GM=0.1 mM de menadiona+2 mM de ácido gálico, G=2 mM de ácido gálico), en la parte superior de cada gráfica se muestra una imagen representativa de los productos amplificados por RT-PCR. En donde la expresión de *GPX* con el tratamiento con ácido gálico es estadísticamente diferente al tratamiento con YPD * $p=0.029$ y a H_2O_2 +ácido gálico ** $p=0.048$ y la expresión de *CAT2* es diferente en el tratamiento con H_2O_2 # $p=0.040$ y con el tratamiento con H_2O_2 +ácido gálico ## $p=0.011$ con respecto al tratamiento con menadiona.

7.2.2.4 Análisis de la expresión del gen de actina de *Y. lipolytica*.

En el diseño de este trabajo se planteó la utilización del gen de actina (*ACT*) como gen constitutivo para la comparación del patrón de expresión de los diferentes genes; el gen de actina ha sido ampliamente utilizado en diferentes organismos como parámetro de normalidad en la expresión de genes y proteínas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que existen variaciones en la expresión del gen que codifica para actina cuando *Y. lipolytica* es sometida a diferentes agentes. En la figura 19 se muestra la comparación de los niveles de expresión del gen *ACT* obtenidos en presencia de agentes oxidantes, antioxidantes y la combinación de éstos, se puede observar los valores de expresión obtenidos en los diferentes de los genes bajo distintos tratamientos y el error estándar de cada uno de ellos, en la parte superior se muestra una imagen representativa de la electroforesis en geles de agarosa 2% de los productos amplificados por RT-PCR, en la banda que corresponde al tratamiento con ácido gálico se observa menos densidad que en el resto de las bandas que representan los productos amplificados con el resto de los tratamientos, esta variación se reprodujo en la serie de experimentos realizados.

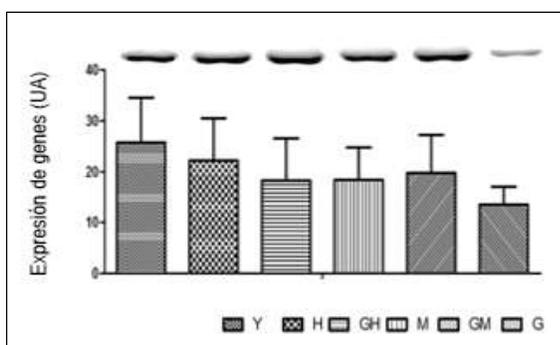


Figura 19. Comparación de los niveles de expresión del gen que codifica para actina en *Y. lipolytica* bajo tratamiento con agentes oxidantes y antioxidantes. Cada columna representa el promedio de expresión y error estándar del gen de actina con los siguientes tratamientos: (Y=YPD, H=4.5 mM de H_2O_2 , GH=4.5 mM de H_2O_2 +2 mM de ácido gálico, M=0.1 mM de menadiona, GM=0.1 mM de menadiona+2 mM de ácido gálico, G=2 mM de ácido gálico), en la parte superior de cada gráfica se muestra una imagen representativa de los productos amplificados por RT-PCR.

También se compararon los niveles de expresión del gen *ACT* bajo los diferentes tratamientos con el tratamiento control (YPD), en la figura 20 se muestra el patrón de expresión del gen de *ACT* con los diferentes tratamientos utilizados y se puede observar que en todos los tratamientos hubo menor expresión de éste en relación con la expresión obtenida en células incubadas en medio YPD; con el tratamiento con H₂O₂ existe una reducción de la expresión del 14% y en el tratamiento con menadiona y los tratamientos combinados GH y GM la expresión se reduce entre el 23 y 30%; la expresión del gen *ACT* con el tratamiento con ácido gálico se reduce un 48% y al comparar los niveles de expresión de éste tratamiento con el tratamiento control existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$).

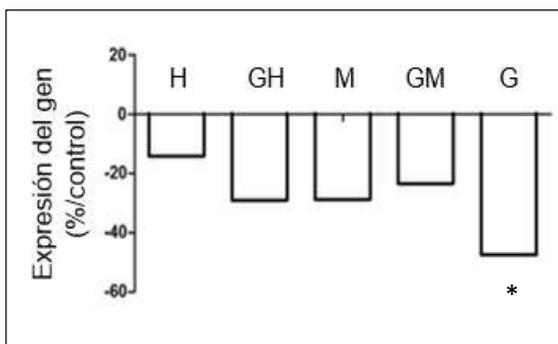


Figura 20. Expresión del gen de actina de *Y. lipolytica* en relación al tratamiento control YPD. Cada columna representa el porcentaje de expresión en cada uno de los tratamiento utilizados (H=4.5 mM de H₂O₂, GH=4.5 mM de H₂O₂+2 mM de ácido gálico, M=0.1 mM de menadiona, GM=0.1 mM de menadiona+2 mM de ácido gálico, G=2 mM ácido gálico) en relación con el tratamiento control. La expresión de *ACT* con el tratamiento con ácido gálico es estadísticamente diferente al tratamiento con YPD * $p = < 0.01$.

En levaduras se ha descrito que pueden existir cambios en los niveles de expresión de genes que no sufren alteración en otros modelos experimentales. La actina del citoesqueleto de las levaduras es un blanco importante de ROS, cuando hay daño en la secuencia ASC1 se produce un hiperensamblado en los filamentos de actina que tiene como consecuencia defectos morfológicos e incremento en la sensibilidad de la actina al estrés oxidativo (Farrugia, Balzan, 2012).

La disminución de la dinámica de la actina y la desestabilización del citoesqueleto es inducida por proteínas Sla1p y End3p que provocan acumulación de ROS y muerte celular por activación de la vía Ras/cAMP quinasa (Farrugia, Balzan, 2012).

Debido a los cambios en los niveles de expresión de actina obtenidos bajo los diferentes tratamientos y los datos inconsistentes sobre la susceptibilidad de la actina a ROS, en este trabajo se determinó utilizar como parámetro de normalidad el tratamiento control que fue en el que las células se encontraron en medio de cultivo YPD que es el medio utilizado para el crecimiento de *Y. lipolytica*.

Con respecto a la normalización de datos de densitometría en el análisis de expresión de genes Nailis et al., (2006), han propuesto la utilización de varios genes constitutivos en *C. albicans*; para esta levadura ellos sugieren utilizar los genes *ACT1*, *PMA1*, *RIP*, *RPP2B* y *LSC2*.

8. DISCUSIÓN

8.1. Estrés oxidativo

Como producto del metabolismo normal de la célula se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) como superóxido, peróxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete, entre otros. Bajo condiciones fisiológicas estas ROS participan en la regulación de la señalización y comunicación celular, así como de la expresión genética; sin embargo, cuando existe un desequilibrio entre la producción y degradación de ROS se produce un fenómeno conocido como estrés oxidativo (Scandalios, 2005).

El estrés oxidativo puede causar daño en compuestos celulares e incluso detener la progresión del ciclo y de la división de la célula ocasionando la muerte celular (Papadakis, 2014; Scandalios, 2005).

En organismos superiores, en la escala evolutiva, el estrés oxidativo se ha asociado a fenómenos como el envejecimiento y su presencia se ha involucrado en el desarrollo de patologías como enfermedad de Parkinson, cáncer, obesidad, enfermedades cardiovasculares y diabetes (Pitocco et al., 2010).

Para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo, los organismos han desarrollado mecanismos de defensa antioxidante entre los que se encuentra la modulación de la expresión de genes que participan en diferentes vías relacionadas con la supervivencia de la célula. En la levadura *Y. lipolytica* se ha descrito el efecto de diferentes factores que ocasionan estrés oxidativo (pH, H₂O₂, presión de aire, temperatura, etc.) y se ha observado que tal efecto tiene una repercusión en la actividad de las enzimas del sistema de defensa antioxidante como Cat, Sod y Gpx, entre otros (Lopes et al., 2013; Arinbasarova, 2015; Biryukova, 2007), pero se desconoce cuál es el efecto de que estos agentes tienen sobre la regulación de los genes que codifican para tales enzimas.

8.2. Agentes oxidantes y antioxidantes

La concentración de los agentes oxidantes juega un papel clave en la respuesta celular que producen. En este trabajo se utilizaron 2 agentes que causan estrés oxidativo: H_2O_2 y menadiona; estos agentes tienen diferentes formas de actuar y por ende la célula responde de forma diferente ante cada uno de ellos.

Por el método de dilución en serie se observó que la concentración 4.5 mM de H_2O_2 retrasó el crecimiento de las células, este mismo efecto se obtuvo con la menadiona en una concentración de 0.1 mM; mientras que concentraciones mayores de H_2O_2 y menadiona inhibieron casi por completo el crecimiento celular.

En estudios con *S. cerevisiae* y *Candida oleophila* se han utilizado concentraciones similares de H_2O_2 y menadiona para inducir condiciones de estrés oxidativo (Wu et al., 2011; Liu et al., 2012; Sá et al. 2013).

Arinbasarova et al., (2015), observaron que en células de *Y. lipolytica* en fase de crecimiento exponencial una concentración de 50 mM de H_2O_2 mostraba efectos letales y que 0.5 mM de menadiona también era letal ya que la tasa de supervivencia de la células tras los tratamientos, fue menor al 1%. Anteriormente Biryukova et al., (2007) utilizaron como tratamiento no letal 60 min de exposición a los agentes en concentraciones 0.5 mM de H_2O_2 y 0.05 mM de menadiona en *Y. lipolytica*. Por otro lado, Kavitha y Chandra (2014), demuestran que en la levadura *Ashbya gossypii* concentraciones de 10 mM y 25 mM de H_2O_2 no detienen el crecimiento celular, pero observan que el crecimiento disminuye con la concentración 10 mM del agente, en este trabajo la concentración de menadiona que se consideró adecuada para utilizar fue 0.0025 mM.

Los resultados obtenidos sugieren que las células de *Y. lipolytica* al someterse a concentraciones 4.5 mM de H_2O_2 y 0.1 mM de menadiona se encuentran desarrollando mecanismos de defensa y adaptación a las condiciones de estrés oxidativo producidas.

Con la intención de contrarrestar los efectos causados por los agentes oxidantes (H_2O_2 y menadiona), se utilizó al ácido gálico como potencial agente antioxidante. Contrario a lo esperado, los resultados indican que el ácido gálico produce un efecto similar al H_2O_2 y se comporta de manera dependiente de la dosis; la concentración 2 mM no afecta el crecimiento de la célula, sin embargo la concentración 10 mM es letal para *Y. lipolytica*.

En el trabajo realizado por Wu et al. (2011) en células de *S. cerevisiae* se observa que el H_2O_2 y la menadiona en concentraciones de 4 mM y 0.1 mM respectivamente, detienen el crecimiento celular y que el ácido gálico en concentración 2 mM contrarresta el arresto celular ocasionado por estos agentes.

En modelos murinos la dosis 0.8 a 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico se considera terapéutica. Sin embargo en células de glioblastoma, el efecto de este agente es dependiente de la dosis ya que al evaluar el efecto de concentraciones de 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ hubo una disminución de la supervivencia celular de 12 y 45% respectivamente (Paolini et al. 2015). De la misma manera en fibroblastos de pulmón se ha demostrado que el ácido gálico puede inducir apoptosis en una forma dependiente del tiempo y de la dosis a través de mecanismos que asocian a la vía de señalización JNK dependiente de p53, la disfunción mitocondrial y el incremento de Ca^{2+} (Chiu-Yuan et al., 2013). En el caso de estos 2 últimos mecanismos, el ácido gálico no solo provoca una pérdida del potencial de membrana mitocondrial sino que también ocasiona la liberación del citocromo c al citosol lo que ocasiona la activación de las denominadas enzimas caspasas; en este proceso se han involucrado específicamente a las caspasas 3 y 9 que conducen a muerte celular (Russell et al., 2012). El ácido gálico puede tener efectos antioxidantes o prooxidantes dependiendo de la dosis en la que se encuentre, sus efectos como molécula favorecedora de la oxidación pueden relacionarse incluso con la muerte celular.

8.3. Genes de respuesta antioxidante en *Y. lipolytica*

Las levaduras tienen genes de respuesta antioxidante similares a los genes involucrados en dicha respuesta en organismos superiores. En el genoma de *Y. lipolytica* se identificaron secuencias de genes que presuntamente codifican para las enzimas antioxidantes Sod, Cat y Gpx.

Las células de la cepa P01A de *Y. lipolytica* fueron tratadas con agentes oxidantes (H_2O_2 , menadiona), con ácido gálico como presunto agente antioxidante y con tratamientos combinados de ambos agentes en las concentraciones previamente establecidas.

Los resultados muestran que la expresión de todos los genes analizados se reduce en el tratamiento con H_2O_2 ; la mayor disminución se observa en los genes *CAT2* y *SOD1* con una reducción del 28% respecto al tratamiento control (células incubadas en medio YPD). De igual forma, se observó que la menadiona redujo la expresión de *SOD1*, *GPX* y *CAT1* entre un 7 a 23.5% pero a diferencia de lo observado en el tratamiento con H_2O_2 , en el tratamiento con menadiona la expresión de *CAT2* y *CAT3* se incrementó un 16% y 4% respectivamente.

La disminución en los niveles de expresión de los genes *CAT2* y *SOD* por efecto del H_2O_2 es congruente con lo reportado Bayliak et al., (2014) quienes trataron células de *S. cerevisiae* con 10 mM de H_2O_2 y observaron una disminución del 50 y 70% en la actividad de las enzimas Sod y Cat, respectivamente. Sin embargo, Arinbasarova et al., (2015) utilizando tratamientos con 0.5 mM de H_2O_2 y 0.05 mM de menadiona por 60 min sobre células de *Y. lipolytica*, observaron que en respuesta al tratamiento con H_2O_2 hubo un incremento en la actividad de Cat ($93.0 \pm 0.5 H_2O_2 / 28.0 \pm 1.3$ control), mientras que la actividad de Sod es similar a la obtenida en el grupo control ($6.5 \pm 0.7 H_2O_2 / 4.2 \pm 0.45$ control). En el tratamiento con menadiona, la actividad de ambas enzimas aumentó de 4 a 6 veces, con respecto al grupo control; la actividad de Cat fue de 120.0 ± 1.6 versus 28.0 ± 1.3 del tratamiento control y la actividad de Sod fue de 21.6 ± 2.3 versus 4.2 ± 0.45 del tratamiento control. Resultados similares concernientes a la suplementación exógena de H_2O_2 y menadiona y al

efecto que ocasionan al incrementar la actividad de Cat, Sod y Gpx han sido reportados en otras especies como *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *A. niger* (Lee et al., 1995; Kreiner Harvey y McNeil, 2002).

En un estudio más reciente Kavitha y Chandra, (2014) reportan que cuando las células de *A. gossypii* se sometieron a 25 mM de H₂O₂ y 0.0025 mM de menadiona la actividad (U/mg de proteína) de las enzimas Cat y Sod se incrementó después de 2 y 3 días de tratamiento con los agentes oxidantes. El efecto del H₂O₂ predominó sobre la actividad de Cat (428±28.8 H₂O₂ / 294±13.6 control); mientras que el efecto de la menadiona afecta más la actividad de Sod (62±0.6 menadiona / 3.5±0.15 control), la actividad de Gpx también incremento con ambos tratamientos al 3 día pero el efecto más drástico se obtuvo con H₂O₂ (6.8±1.1 control, 27.2±2.1 H₂O₂ y 11.7±0.1 menadiona). Además, la expresión de los genes *SOD1* y *CTT1* (que codifica para una catalasa peroxisomal) de *A. gossypii* también aumentaron en respuesta al tratamiento con los agentes oxidantes en los días 2 y 3 mostrando la misma tendencia: la expresión de *CTT1* bajo tratamiento con H₂O₂ fue de 1.03±0.03 *versus* 0.50±0.03 del tratamiento control y la expresión de *SOD1* bajo tratamiento con menadiona fue de 0.50±0.0 *versus* 0.20±0.0 del tratamiento control. Los resultados sugieren un efecto diferencial entre ambos agentes oxidantes, posiblemente el efecto del H₂O₂ es mayor sobre Cat y el efecto de la menadiona predomina sobre Sod.

Cuando células de *Y. lipolytica* se sometieron al efecto del ácido gálico se observó un perfil de expresión parecido al obtenido con el tratamiento con H₂O₂, la reducción más acentuada se observa en la expresión de los genes *CAT1* y *SOD1*; sin embargo, en los tratamientos combinados GH y GM la expresión de *CAT3* incrementó y la del resto de los genes se redujo.

En estudios realizados con células de leucemia promielocítica (HL-60RG) se ha sugerido que posiblemente exista un flujo del H₂O₂ extracelular hacia dentro de la célula tras el tratamiento con ácido gálico, lo que resulta en incremento del H₂O₂ intracelular, mismo que se ha relacionado con la capacidad del ácido gálico de inducir apoptosis (Inoue et al., 2000). Además, se ha sugerido que dosis

elevadas de ácido gálico podrían incrementar los niveles de miR-17 y reducir la actividad antioxidante mitocondrial así como incrementar los niveles de miR-421 y con esto disminuir la capacidad de reparación de daño celular (Paolini et al. 2015).

Es posible que concentraciones 2 mM de ácido gálico no afecten el crecimiento y morfología de *Y. lipolytica* pero que tengan efectos oxidantes que induzcan cambios en la expresión de genes en respuesta al estrés oxidativo, por lo que sería interesante probar si en células pre condicionadas con ácido gálico se contrarresta la respuesta ocasionada con H₂O₂ y menadiona y si tratamientos combinados de agentes antioxidantes modifican el patrón de expresión de los genes analizados.

Los niveles de expresión de los genes *SOD1*, *GPX* y *CAT1* de *Y. lipolytica* disminuyeron con respecto al tratamiento control (YPD) en todos los tratamientos utilizados.

Los diferentes cambios en los niveles de expresión de los 3 genes *CAT* se puede explicar en la base de que tanto en *Y. lipolytica* como en *S. cerevisiae* se ha demostrado que los genes parálogos son diferencialmente regulados (Mentel et al., 2005). Desafortunadamente, debido a cuestiones técnicas no se pudo determinar la expresión del gen *SOD2* y solo se determinó la expresión de *SOD1*.

En células de *S. cerevisiae* se ha demostrado que 0.5 mM de menadiona por 60 min incrementa la actividad de CuZn Sod (Sá et al. 2013) y Lopes et al. (2009) demostraron que en *Y. lipolytica* la actividad de Sod se incrementa bajo tratamiento con H₂O₂, menadiona y juglone, pero este mismo grupo en 2013 describe que la falta de inducción de Sod después del tratamiento con agentes oxidantes podría asociarse a la represión de esta enzima por peroxidasas, lo que revela la incapacidad de la célula a adaptarse a condiciones de estrés oxidativo. De la misma manera Thorpe et al., (2013) proponen que dependiendo de las condiciones *in vivo* la actividad de Sod puede aumentar o disminuir el daño ocasionado por ROS y que la sobreexpresión de *SOD* ha mostrado extender la

duración de la vida celular pero reducir el tiempo de replicación de células de *S. cerevisiae*.

En células de *P. involutus* tratadas con 50 μM de cadmio la actividad de Sod fue estimulada a las 3 h, inhibida tras 6 h de tratamiento y nuevamente estimulada después de 24 h, lo que sugiere que el tiempo de exposición al agente oxidante podría jugar un papel crucial en la respuesta de esta enzima (Ott et al., 2002). Por otro lado, en *S. pombe* se han observado cambios rápidos en los niveles de mRNA y de proteínas en respuesta a otro tipo de estrés producido por calor formando un pico inicial a los 15 min y un último pico a los 60 min (Lackner et al., 2012). En el presente trabajo, el tiempo de exposición de las células a los diferentes agentes (solos y combinados) fue de 60 min y aunque Lopes et al., (2009) describen un incremento en la actividad de la enzima Sod después de 60 min de tratamiento, es importante considerar la variabilidad de la respuesta celular en la expresión de genes, con respecto al tiempo de exposición a los agentes oxidantes y antioxidantes.

En términos generales los niveles de expresión del gen *CAT2* muestran mayor número de cambios con los tratamientos utilizados. En el tratamiento con menadiona la expresión del gen *CAT2* se incrementa mientras que con el resto de los tratamientos disminuye, en comparación con el tratamiento control; el tratamiento combinado GM es en el que menos disminuye la expresión de *CAT2* posiblemente por un efecto compensatorio en donde el ácido gálico podría contrarrestar los efectos de la menadiona.

Otro aspecto a considerar es que en este trabajo, para el análisis de la expresión de genes, las células fueron incubadas en medio YPD, sin embargo Lopes et al. (2013) describen que al tratar células de *Y. lipolytica* con 50 mM de H_2O_2 por 3 h, observan un incremento de Sod y Cat, en donde la respuesta fue mayor en células incubadas en PBS en comparación con aquellas incubadas en medio YPD. En estudios con levaduras se ha sugerido que es necesario que el H_2O_2 sobrepase la capacidad de desintoxicación del GSH, para que se induzca un respuesta de Cat (Ott et al., 2002). Además Liu J, et al. (2012) utilizando

2', 7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (como indicador de la presencia de ROS intracelular) en células de *Candida oleophila* tratadas con 50 mM de H₂O₂ por 20, 40 y 60 min, demostraron que dosis de los agentes condicionantes de estrés oxidativo menores a las letales, no incrementan la acumulación de ROS en las células, por lo que sería importante comprobar si las condiciones utilizadas en este trabajo para inducir estrés oxidativo en *Y. lipolytica* utilizadas son capaces de aumentar los niveles de ROS a nivel intracelular.

Lopes et al., (2013) expusieron células de *Y. lipolytica* y de *P. pastoris* a estrés inducido por paraquat, calor y H₂O₂ y observaron que en *Y. lipolytica* la enzima más activa fue la catalasa seguida de superóxido dismutasa; en los experimentos realizados por este grupo se encontró que la actividad de las catalasas incrementa cuando las células se someten a tratamiento con H₂O₂ y refieren resultados similares en células de *P. pastoris*, *C. albicans*, *A. niger* y *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae* la respuesta al estrés oxidativo parece centrarse en la alteración de los niveles de glutatión y en la actividad de catalasa (Ctt1), aunque también se ha observado un incremento en la actividad de CuZn Sod cuando se adiciona propóleo como agente antioxidante a células sometidas a tratamiento con 0.5 mM de menadiona y 2 mM de H₂O₂ por 60 min (Sá et al., 2012), lo que demuestra que la respuesta en los mecanismos de defensa antioxidante a condiciones de estrés oxidativo es diferente en cada levadura.

La respuesta al estrés oxidativo involucra diferentes mecanismos y secuencias de DNA como genes blanco, algunos de ellos involucrados en la reparación y replicación del DNA, en ciclo y división celular, en la biosíntesis de la pared y en la integridad de la membrana celular (Sha et al., 2013), por lo que es necesario dilucidar hacia qué vías se inclina la modulación de la expresión de genes de manera global y qué genes son los que requieren una regulación más precisa.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo significan un acercamiento para comprender los mecanismo de la respuesta celular antioxidante de *Y. lipolytica* a nivel de expresión de los genes implicados en dicha respuesta y aunque difieren de los efectos descritos por los agentes utilizados, es necesario considerar que los reportes al respecto se centran en la actividad de las enzimas. Con las condiciones probadas, es difícil deducir si los resultados demuestran el inicio de la respuesta a los diferentes agentes, si la célula se encuentra en un estado de adaptación o si la respuesta ha finalizado, por lo que resulta interesante saber cómo cambia el patrón de expresión de las enzimas antioxidantes a diferentes tiempos. Cabe señalar que las células utilizadas se encontraban en fase de crecimiento logarítmico y sería importante conocer de qué forma responde la célula al estrés oxidativo en distintas fases de crecimiento.

Por último, se debe tener en cuenta que es posible que la expresión de genes difiera de la síntesis de proteínas y aún más de la actividad de éstas, conocer la forma en la que actúan las enzimas antioxidantes es fundamental para comprender como se comporta *Y. lipolytica* bajo condiciones de estrés oxidativo.

9. CONCLUSIONES

En el genoma de *Y. lipolytica* se identificaron secuencias que presuntamente codifican para enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

La expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes de *Y. lipolytica* cambia dependiendo de las condiciones de estrés oxidativo al que se someta a las células. Los agentes oxidantes H₂O₂ y menadiona provocan una respuesta diferente en las células de *Y. lipolytica*, y el ácido gálico tiene efectos dependientes de la dosis.

En general, los tratamientos con H₂O₂ y ácido gálico producen un patrón de expresión similar ya que en ambos se reduce la expresión de todos los genes analizados. La expresión de los genes *SOD1*, *GPX* y *CAT1* disminuye con todos los tratamientos utilizados, mientras que la expresión del gen *CAT3* incrementa en los tratamientos combinados GH y GM y en el tratamiento con menadiona. La expresión del gen *CAT2* se ve incrementada en el tratamiento con menadiona pero se reduce en el resto de los tratamientos, la disminución más acentuada en la expresión de este gen se observa en los tratamientos con H₂O₂ y el tratamiento combinado GH.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharya, J.D., Ghaskadbi, S.S. (2010). Islets and their antioxidant defense. *Landes Bioscience*, 2, 225-235.
- Alfadda, A.A., Sallam, R.M. (2012). Review article reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*, 936486.
- Arinbasarova, A.Y., Biryukova, E.N., Medentsev, A.G. (2015). Antistress systems of the yeast *Yarrowia lipolytica* (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51, 135-142.
- Barbosa, K.B.F., Bressan, J., Zulet, M.A., Martínez, J.A. (2008). Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. *An Sist Sanit Navar*, 31, 259-280.
- Bayliak, M.M., Burdyliuk, N.I., Izers'ka, L.I., Lushchak V.I. (2014). Concentration-dependent effects of *Rhodiola rosea* on longterm survival and stress resistance of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of Yap1 and Msn2/4 regulatory proteins. *International Dose-Response Society*, 1559-3258
- Belfield, C., Queenan, C., Rao, H., Kitamura, K., Walworth, N.C. (2014). The oxidative stress responsive transcription factor Pap1 confers DNA damage resistance on checkpoint-deficient fission yeast cells. *PLoS ONE*, 9, e89936.
- Biryukova, E.N., Medentsev, A.G., Arinbasarova, A.Y., Akimenko, V.K. (2007). Adaptation of the yeast *Yarrowia lipolytica* to heat shock. *Microbiology*, 76, 158-163.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J., Krausea, K. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 142, w13659.
- Bulani, S.I., Moleleki, L., Albertyn, J., Moleleki, N. (2012). Development of a novel rDNA based plasmid for enhanced cell surface display on *Yarrowia lipolytica*. *AMB Express*, 2, 27.
- Cabrales Arellano, C.P. (2012). *Expresión de un proteína CRY1 de Bacillus thuringiensis en la levadura Yarrowia lipolytica*. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. Tesis
- Celińska, E., Celińska, W.G. (2013). A novel multigene expression construct for modification of glycerol metabolism in *Yarrowia lipolytica*. *microbial cell factories*, 12, 102.
- Ceriello, A., Testa, R. (2009). Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes. *Diabetes care*, 32, 5232-6.

- Chang, Y.C., Chuang, L.M. (2010). The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am J Transl Res*, 2, 316-331.
- Cheng, S., Ogrydziak, D.M. (1987). Processing and secretion of the *Yarrowia lipolytica* RNase. *J Bacteriol*, 169, 1433-1440.
- Chiu-Yuan, C., Kun-Chieh, C., Tsung-Ying, Y., Hsiang-Chun, L., Shih-Lan, H. (2013). Gallic acid induces a reactive oxygen species-provoked c-Jun NH2-terminal kinase-dependent apoptosis in lung fibroblasts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 613950.
- Coleman, S.T., Epping, E.A., Ateggerda, S.M., Moye – Rowley, W.S. (1999). Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. *Mol Cell Biol*, 19, 8302–8313.
- Enserink, J.M. (2012). Chemical genetics: budding yeast as a platform for drug discovery and mapping of genetic pathways. *Molecules*, 17, 9258-9273.
- Farrugia, G., Balzan, R. (2012). Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Front Oncol*, 2, 64.
- Fomusi Ndisang, J. (2010). Role of heme oxygenase in inflammation, insulin-signalling, diabetes and obesity. *Mediators Inflamm*, 1-18.
- Franssens, V., Bynens, T., Van den Brande, J., Vandermeeren, K., Veuyck, M., Winderickx, J. (2013). The benefits of humanized yeast models to study Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 760629.
- Génolevures. (2015). Genomic exploration of the hemiascomycete yeasts. Recuperado de Genomic exploration of the hemiascomycete yeasts: <http://www.genolevures.org/>
- Ishimoto, H., Tai, A., Yoshimura, M.O., Amakura, Y., Yoshida, T. (2012). Antioxidante properties of functional polyphenols and their metabolites assessed by an ORAC assay. *Biosci. Biotechno. Biochem*, 76, 395 – 399.
- Inoue, M., Sakaguchi, N., Isuzugawa, K., Tani, H., Ogihara, Y. (2000) Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23, 1153–1157.
- Karp, G. (2009). *Biología celular y molecular*. México: Mc Graw Hill
- Kavitha, S., Chandra, T.S. (2014). Oxidative stress protection and glutathione metabolism in response to hydrogen peroxide and menadione in riboflavinogenic fungus *Ashbya gossypii*. *Appl Biochem Biotechnol*, 174, 2307-2325.

- Kawahito, S., Kitahata, H., Oshita, S. (2009). Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J Gastroenterol*, 15,4137 – 4142.
- Kerscher, S., Durstewitz, G., Casaregola, S., Gaillardin, C., Brandt, U. (2001). The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica* comparative and functional genomics. *Comp Funct Genom*, 2, 80–90.
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y., Nomoto, A. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol*, 21, 6139.
- Kreiner, M., Harvey, L. M., McNeil, B. (2002). Oxidative stress response of a recombinant *Aspergillus niger* to exogenous menadione and H₂O₂ addition. *Enzymology and Microbial Technology*, 30, 346–353.
- Lackner, D.H., Schmidt, M.W., Wu, S., et al. (2012). Regulation of transcriptome, translation, and proteome in response to environmental stress in fission yeast. *Genome Biol*, 13:R25.
- Lee, J., Dawes, I. W., Jung, H. (1995). Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione. *Microbiology*, 141, 3127–3132.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Hershkovitz, V., Tian, S., Farrell, R. (2012). Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS Microbiol Ecol*, 80, 578–590.
- Loira, N., Dulermo, T., Nicaud, J., Sherman, D.J. (2012). A genome-scale metabolic model of the lipid-accumulating yeast *Yarrowia lipolytica*. *BMC Systems Biology*, 6,35.
- Lopes, J.P., Oliveira, S.M., Soares Fortunato, J. (2008). Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células β-pancreáticas relação com as complicações da diabetes mellitus tipo 2. *Acta Med Port*, 21, 293-302.
- Lopes, M. Gomes, N. Mota, M., Belo, I. (2009). *Yarrowia lipolytica* growth under increased air pressure: influence on enzyme production. *Appl Biochem Biotechnol*, 159, 46-53.
- Lopes, M., Mota, M., Belo, I. (2013). Comparison of *Yarrowia lipolytica* and *Pichia pastoris* cellular response to different agents of oxidative Stress. *Appl Biochem Biotechnol*, 170, 448–458.

Lushchak, V.I. (2006). Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *ABP*, 53, 679–684.

Mathews. (2006). *Bioquímica*. México: Person

Maurya, H., Mangal, V., Gandhi, S., Prabhu, K., Ponnudurai, K. (2014). Prophylactic antioxidant potential of gallic acid in murine model of sepsis. *International Journal of Inflammation*, 580320.

Mentel, M, et al. (2005) Triplicate genes for mitochondrial ADP/ATP carriers in the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica* are regulated differentially in the absence of oxygen. *Mol Genet Genomics*, 273, 84-91.

Mohammad, B., Sadeghi, N., Dianat, M., Samarbafzadeh, A. (2014). Effects of gallic acid and cyclosporine a on antioxidant capacity and cardiac markers of rat isolated heart after ischemia/reperfusion. *Iran Red Crescent Med J*, 16, 6.

Nailis, H., Coenye, T., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Nelis, H. (2006). Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7, 25.

National Center for Biotechnology Information. (2015). Basic Local Alignment Search Tool. Recuperado de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Northwestern University. (2015). Oligo calc: oligonucleotide properties calculator. Recuperado de Oligo calc: oligonucleotide properties calculator:<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

Ojaimi, C., Kinugawa, S., Recchia, F.A., Hintze, T.H. (2010). Oxidant-NO dependent gene regulation in dogs with type I diabetes: impact on cardiac function and metabolism. *Cardiovascular Diabetology*, 9, 1- 10.

Osorio, H., Carvalho, E., del Valle, M., Günther Sillero, M.A. Moradas-Ferreira, P., Sillero, A. (2003). H₂O₂, but not menadione, provokes a decrease in the ATP and an increase in the inosine levels in *Saccharomyces cerevisiae*, an experimental and theoretical approach. *Eur. J. Biochem.* 270, 1578–1589

Ott, T. Fritz, E. Polle, A. Schützendübel, A. (2002). Characterisation of antioxidative systems in the ectomycorrhiza-building basidiomycete *Paxillus involutus* (Bartsch) Fr. And its reaction to cadmium. *FEMS Microbiology Ecology*, 42, 359-366.

Palabiyik, B., Jafari Ghods, F., Onay Ucar, E. (2013). Effects of glucose sensing/signaling on oxidative stress response in glucose repression mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Genet*, 12, 5046-5056.

- Paolini, A. Curti, V. Pasi, F. Mazzini, G., Nano, R., Capelli, E. (2015). Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via adenosine-dependent epigenetic regulation mediated by miRNAs. *International Journal of Oncology*, 46, 1491- 1497.
- Papadakis, M.A., Workman, C.T. (2014). Oxidative stress response pathways: Fission yeast as archetype. *Crit Rev Microbiol*. 1040-841
- Pereira, C., Bessa, C., Soares, J., Leão, M., Saraiva, L. (2012). Contribution of yeast models to neurodegeneration. *J Biomed Biotechnol*, 1620, 941232.
- Pitocco, D., Zaccardi, F., Di Stasio, E., Romitelli, F., Santini, S.A., Zuppi, C. Ghirlanda, G. (2010). Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud*, 7,15.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*, 2, 219–236.
- Ramos Ibarra, M.L., Batista González, C.M., Gómez Meda, B.C., Zamora Pérez, A.L. (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Inv Salud*, 8, 7- 15.
- Richard, G., Kerrest, A., Lafontaine, I., Dujon, B. (2005). Comparative genomics of hemiascomycete yeasts: genes involved in DNA Replication, Repair, and Recombination. *Microbiol Mol Biol Rev*, 22, 4.
- Rodríguez-Rodríguez, E., Perea, J.M., López-Sobaler, A.M., Ortega, R.M. (2009). Obesidad, resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipocinas: importancia de la dieta y el ejercicio físico. *Nutr Hosp*, 24, 415-421.
- Rowe, L.A., Dedtyareva, N., Doetsh, P.W. (2008). DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med*, 45, 1167–1177.
- Rowe, L.A., Degtyareva, N., Doetsch, P.W. (2012). Yap1: A DNA damage responder in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mech Ageing Dev*, 133,147-156.
- Russell, L.H., Mazzi, E., Badisa, R.B., Zhu, Z., Agharahimi, M., Oriaku, E.T. Goodman, C.B. (2012). Autoxidation of gallic acid induces ROS-dependant death in human prostate cancer LNCaP cells. *Anticancer Res*; 32, 5.
- Sá, R.A., De Castro, F.A.V., Eleutherio, E.C.A., De Souza, R., Silva, J.F.M., Pereira, M.D. (2013). Brazilian propolis protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 993-1000.
- Scandalios, J.G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, 38, 995-1014.

- Sengupta, U., Ukil, S., Dimitrova, N., Agrawal, S. (2009). Expression-based network biology identifies alteration in key regulatory pathways of type 2 diabetes and associated risk/complications. *PLoS ONE*, 4, 1 – 17.
- Sepúlveda Reis, J., Araújo Veloso, C., Teixeira Mattos, R., Purish, S., Nogueira-Machado, J.A. (2008). Estresse Oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 52, 1096 – 1105.
- Sha, W., Martins, A.M., Laubenbacher, R., Mendes, P., Shulaev, V. (2013). The genome-wide early temporal response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by cumene hydroperoxide. *PLoS ONE*, 8, e74939.
- Shanmugam, K.R., Ramakrishna, C.H., Mallikarjuna, K., Reddy, K.S. (2009). Perturbation in kidney lipid metabolic profiles in diabetic rats with reference to alcoholic oxidative stress. *Indian J Nephrol*. 19, 101 – 6.
- Shusuke, K., Minetaro, A., Asako, M., Kazuhiro, M., Shingo, I., Inoue, Y., Akio, N. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol*, 21, 18.
- Somaio Neto, F., Tsutomu Ikejiri, A., Bertolotto, P.R., Bertolotto Chaves, J.C., Teruya, R., Fagundes, D.J. (2012). Gene expression related to oxidative stress in the heart of mice after intestinal ischemia. *Arq Bras Cardiol*. 102,165-73.
- Thorpe, G.W., Reodica, M., Davies, M.J., Heeren, G., Jarolim, S., Pillay, B., Breitenbach, M., Higgins, V.J., Dawes, I.W. (2013). Superoxide radicals have a protective role during H₂O₂ stress. *Molecular Biology of the Cell*, 24.
- Wahlqvist, M.L. (2013). Mini Review Antioxidant relevance to human health. *Asia Pac J Clin Nutr*, 22, 171 – 176.
- Wu, MJ., O'Doherty, PJ., Fernandez, HR., Lyons, V. Roger, PJ. Dawes, IW. Higgins, VJ., (2011). An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 11, 379–38

RESUMEN CURRICULAR

María Fernanda Desentis Desentis

Candidata para la obtención del grado de Maestría en Ciencias en Nutrición

Tesis: EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS DE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE *Yarrowia lipolytica*, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Campo de estudio: Investigación básica

Datos personales: Nacida en México, Distrito Federal el 05 de octubre de 1987, hija de Susana Desentis García y Eduardo Desentis Reyes.

Educación: Egresada en 2010 de la Licenciatura en Dietética y Nutrición por la Escuela de Dietética y Nutrición del ISSSTE.

Diplomado de Educador en Diabetes en 2012 por la Universidad Iberoamericana.

Estancia de investigación en 2015 en el laboratorio de Nutrigenómica y Nutrición personalizada de la Universidad de las Islas Baleares.

Participación en congresos:

“Celular response of *Yarrowia lipolytica* to oxidative stress conditions” en la modalidad de cartel, el V Congreso de Especies Reactivas del Oxígeno en Biología y Medicina, marzo 2015. Tequesquitengo, Morelos.

“Celular response of *Yarrowia lipolytica* to oxidative stress conditions” en el XXVIII Congreso Nacional de investigación en medicina, octubre 2015 Monterrey, Nuevo León.