

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



**RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE *Yarrowia lipolytica* EN
AUSENCIA DEL GEN CAT3**

POR

CLARA ALICIA QUIÑONES GONZÁLEZ

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

Enero, 2018



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

**RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE *Yarrowia lipolytica* EN
AUSENCIA DEL GEN *CAT3***

POR

CLARA ALICIA QUIÑONES GONZÁLEZ

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

Enero, 2018

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la paciencia e inteligencia necesaria para concluir este proyecto.

A mis padres por su infinito amor, apoyo y confianza en cada uno de los ciclos que he concluido y que están por iniciar; a mis hermanos por enseñarme que la distancia no existe y a Carlos mi compañero de aventuras intelectuales.

A mi asesor de tesis el Dr. Eduardo Campos por su inmenso apoyo y confianza en cada uno de los logros y dificultades de este proyecto.

Al Dr. Pikus y al Dr. Roberto Mercado por brindarle un poco de su tiempo y conocimiento a este proyecto.

Al laboratorio de Alimentos, en especial a la Dra. Blanca González y a la Biol. Berenice Trejo por todo su cariño y ayuda brindada.

Al laboratorio de Genética, en particular al Dr. Zacarías Jiménez por su disposición y buenos consejos.

A mi familia del CINSP: Alejandra Briones, Damaris Bustamante, Fabiola Fuentes, Gerardo Arredondo, Jacobo Cruz, Otoniel Roblero, Roberto García, Sandra Teniente y Wendy Flores a quienes llevaré siempre en mi corazón y recordaré en cada taza de café y rebanada de pastel y/o bísquet que me alimente.

A mis grandes amigas y confidentes Alejandra Woo, Celeste Alcaraz y Esther Ramírez, quienes durante estos dos años y medio estuvieron siempre al pendiente de mí.

A mis compañeros de maestría: Abad López, Gabriela Robles, Laura Heredia, María Rodríguez, Marvín Guillén y Natalia López por brindarme su amistad.

A quienes me formaron como maestra en ciencias: MsC. Alexandra Tijerina, Dra. Ana Laura de la Garza, Dra. Aurora de Jesús Garza, Dra. Elizabeth Solís, Dr. Heriberto Castro, Dr. Jesús Vázquez, Dr. Manuel Lomelí, Dr. Mario González y Dr. Rogelio Salas.

Al CONACYT por el apoyo económico brindado durante mis estudios de Maestría.

Al personal administrativo de la FASPyN y el CINSP por su apoyo en cada uno de los trámites escolares realizados y al velador “Don Felipe” por su disposición y amabilidad.

DEDICATORIA

A MI FAMILIA

José Luis Quiñones Herrera

Ma. Guadalupe Ernestina González Yáñez

José Luis Quiñones González

Francisco Quiñones González

Carlos Leobardo Badillo Alonso

Tabla de contenido	Página
1. RESUMEN	1
1.1 ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Definición del problema	4
2.2 Justificación	5
3. HIPÓTESIS.....	6
4. OBJETIVOS.....	6
4.1 Objetivo general.....	6
4.2 Objetivos específicos.....	6
5. ANTECEDENTES.....	7
5.1 Estrés oxidativo	7
5.2 Estrés oxidativo y biomoléculas.....	8
5.3 Estrés oxidativo y enfermedad	9
5.4 Respuesta celular frente al estrés oxidativo	11
5.5 Estrés oxidativo en levaduras.....	15
5.6 Regulación transcripcional de genes de la respuesta antioxidante	16
5.7 <i>Yarrowia lipolytica</i> : generalidades	17
5.8 Respuesta de <i>Y. lipolytica</i> frente al estrés oxidativo.....	18
5.9 Efecto de la delección de genes que codifican para catalasas	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1 Material biológico.....	22
6.2 Métodos.....	22
6.2.1 Diseño del estudio	22
6.2.2 Estrategia general de trabajo	22
6.3 Procedimiento experimental	23
6.3.1 Análisis <i>in silico</i> de la secuencia del gen <i>CAT3</i> y diseño de la estrategia para su delección	23
6.3.2 Diseño de oligonucleótidos.....	24
6.3.3 Preparación de medios de cultivos.....	25
6.3.3.1 Preparación de medio YPD.....	25

6.3.3.2 Preparación de medio LB.....	25
6.3.4 Preparación de pre-inóculos y ajuste de inóculos	25
6.3.5 Cultivo y preservación de células	26
6.3.5.1 Cultivo de <i>Y. lipolytica</i>	26
6.3.5.2 Cultivo de <i>E. coli/pCR2.1-TOPO/URA3</i>	26
6.3.6 Extracción de ácidos nucleicos	27
6.3.6.1 Extracción de DNA genómico (DNAg) de <i>Y. lipolytica</i>	27
6.3.6.2 Extracción de DNA plasmídico (DNAp) de <i>E.coli/pCR2.1-TOPO/URA3</i>	28
6.3.7 Construcción del cassette de interrupción a través de la reacción en cadena de la polimerasa de doble unión (DJ-PCR)	29
6.3.7.1 Primera reacción de DJ-PCR	30
6.3.7.2 Electroforesis en geles de agarosa	32
6.3.7.3 Purificación de las bandas de DNA por extracción orgánica.....	33
6.3.7.4 Segunda reacción de DJ-PCR	33
6.3.7.5 Tercera reacción de DJ-PCR: obtención del cassette de interrupción CAT3-URA3-CAT3.....	35
6.3.8 Generación de las mutantes de <i>Y. lipolytica</i>	37
6.3.8.1 Preparación de células litio competentes de <i>Y. lipolytica</i>	37
6.3.8.2 Transformación de células litio competentes de <i>Y. lipolytica</i>	37
6.3.8.3 Selección de células transformadas.....	38
6.3.9 Análisis genotípico de las células transformadas	39
6.3.9.1 Análisis por reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos	39
6.3.9.2 Análisis por patrón de restricción del cassette de interrupción	40
6.3.10 Análisis fenotípico.....	41
6.3.10.1 Morfología de la cepa mutante Ylcat3- Δ	41
6.3.10.2 Susceptibilidad de la cepa mutante Ylcat3- Δ al efecto del H ₂ O ₂	42
6.3.10.2.1 Análisis cualitativo.....	42
6.3.10.2.2 Análisis cuantitativo	43
6.3.10.2.3 Efecto del H ₂ O ₂ sobre el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3- Δ	43
6.4 Análisis estadístico	43

7. RESULTADOS.....	45
7.1 Análisis <i>in silico</i> del gen <i>CAT3</i> de <i>Y. lipolytica</i> y diseño de oligonucleótidos	45
7.2 Construcción del cassette de interrupción (CAT3-URA3-CAT3) y generación de la cepa mutante Ylcat3-Δ.....	47
7.3 Análisis genotípico de las posibles cepas mutantes Ylcat3-Δ	52
7.4 Análisis fenotípico de la cepa mutante Ylcat3-Δ.....	55
7.4.1 Dimorfismo de la cepa mutante Ylcat3-Δ	56
7.4.2 Susceptibilidad de la cepa mutante Ylcat3-Δ al agente oxidante (H ₂ O ₂)	58
7.4.3 Análisis cuantitativo del crecimiento y susceptibilidad la cepa mutante Ylcat3-Δ al H ₂ O ₂	59
7.4.3.1 Crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ	59
7.4.3.2 Efecto del H ₂ O ₂ sobre el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ	61
8. DISCUSIÓN.....	64
8.1 Estrés oxidativo	64
8.2 Análisis de la secuencia del gen <i>CAT3</i> en el genoma de <i>Y. lipolytica</i>	65
8.3 Estrategia para la delección del gen <i>CAT3</i>	65
8.4 Obtención de la cepa mutante Ylcat3-Δ	66
8.5 Análisis fenotípico de la cepa mutante Ylcat3-Δ.....	67
8.5.1 Dimorfismo fúngico de la cepa mutante Ylcat3-Δ.....	69
8.6 Susceptibilidad de la mutante Ylcat3-Δ al H ₂ O ₂	70
9. CONCLUSIÓN	75
10. PERSPECTIVAS	76
11. BIBLIOGRAFÍA	77

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Componentes de la primera reacción de DJ-PCR	31
2	Condiciones de la primera reacción de DJ-PCR	31
3	Componentes de la segunda reacción de DJ-PCR	34
4	Condiciones de la segunda reacción de DJ-PCR	35
5	Componentes de la tercera reacción de PCR	36
6	Condiciones de la tercera reacción de PCR	36
7	Componentes de una reacción convencional de PCR	39
8	Condiciones de una reacción convencional de PCR	40
9	Componentes de una reacción típica de digestión enzimática	41
10	Comparación de la secuencia de DNA que codifica para la proteína CAT3 de <i>Y. lipolytica</i> con catalasas de distintas especies de levaduras	45
11	Oligonucleótidos diseñados para las diferentes etapas de este trabajo	46
12	Combinación de oligonucleótidos para la caracterización genotípica de las cepas mutantes Ylcat3-Δ	52
13	Características morfológicas de la cepa mutante Ylcat3-Δ en ausencia y presencia del agente oxidante H ₂ O ₂	57
14	Comparación del crecimiento de las cepas mutante Ylcat3-Δ y P01a en medio YPD	60
15	Comparación del crecimiento de las cepas Ylcat3-Δ y P01a en el medio YPD adicionado con el agente oxidante H ₂ O ₂	62

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estrategia general de trabajo	23
2	Esquema de la construcción de un fragmento quimérico	29
3	Esquema de los productos de amplificación en la primera reacción de DJ-PCR	30
4	Esquema de los productos de amplificación en la segunda reacción de DJ-PCR	34
5	Esquema de la tercera reacción de DJ-PCR	35
6	Esquema general para la construcción del cassette de disrupción	47
7	Obtención de los productos clave para la construcción del cassette de disrupción	48
8	Productos de la segunda reacción de PCR	49
9	Obtención del cassette de disrupción	50
10	Análisis del cassette de disrupción	51
11	Crecimiento de las putativas mutantes Ylcat3- Δ en medio selectivo YNB (adicionado con leucina, glucosa y acetato de amonio)	52
12	Análisis genotípico mediante reacciones de PCR	54
13	Análisis del fragmento insertado en el locus correspondiente al gen CAT3 en la cepa mutante Ylcat3- Δ	55
14	Morfología celular de la cepa mutante Ylcat3- Δ	56
15	Efecto del H ₂ O ₂ sobre el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3- Δ	58
16	Análisis comparativo del crecimiento de las cepas mutante Ylcat3- Δ y P01a en medio YPD	61
17	Análisis comparativo del crecimiento de las cepas mutante Ylcat3- Δ y P01a en medio YPD adicionado con el agente oxidante	63

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAg	Ácido desoxirribonucleico genómico
DNAp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico
ATP	Adenosín trifosfato
aa	Aminoácidos
CAT3	Catalasa 3 (gen)
-Δ	Delección de gen
OD ₆₀₀	Densidad Óptica (longitud de onda 600 nm)
DE	Desviación estándar
RNS	Especies reactivas de nitrógeno (reactive nitrogen species)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
EO	Estrés oxidativo
GSH	Glutación en su estado reducido
GSSG	Glutación en su estado oxidado
GPx	Glutación peroxidasa
°C	Grados Celsius (centígrados)
g	Gramos
h	Hora
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
YNB	Medio de cultivo selectivo yeast nitrogen base (base nitrogenada de levadura)
YPD	Medio de cultivo yeast extract peptone dextrose (extracto de levadura, peptona y dextrosa)
LB	Medio de cultivo: Luria Bertani
T _m	Melting temperatura (temperatura de alineamiento de oligonucleótidos)
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mb	Millón de pares de bases
Min	Minuto
M	Molar
ng	Nanogramo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ID	Número de identificación
ORF	Open Reading Frame (marco abierto de lectura)
¹ O ₂	Oxígeno singlete (forma excitada del oxígeno molecular)
pb	Pares de bases
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
PEG	Polyethylene glicol (Polietilenglicol)
%	Porcentaje
pH	Potencial de hidrógeno
HO·	Radical hidroxilo

s	Segundos
SDS	Sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato sódico)
O ₂ ⁻	Superóxido
SOD	Superóxido dismutasa
PCR	Técnica reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
TA	Temperatura ambiente
<i>URA3</i>	Uracilo (gen)
pCR2.1-TOPO	Vector Invitrogen™
pCR4-TOPO	Vector Invitrogen™
V	Voltio
YI	<i>Yarrowia lipolytica</i>

1. RESUMEN

El estrés oxidativo (EO) es un desequilibrio entre especies reactivas de oxígeno y la actividad de moléculas antioxidantes. En *Y. lipolytica* (Yl) se han identificado 6 genes que codifican para enzimas de la respuesta antioxidante; de éstos, el gen *CAT3* es el que presenta los mayores cambios de expresión frente al EO, lo cual sugiere que la enzima codificada por este gen participa en la primera línea de defensa antioxidante en esta especie. Considerando lo anterior, en el presente trabajo se generó una cepa mutante de *Y. lipolytica* por delección del gen *CAT3*, con la intención de tener una cepa con una respuesta antioxidante disminuida.

La secuencia del gen *CAT3* se identificó en el genoma de *Y. lipolytica* (YALI0F30987g). La construcción del cassette de disrupción (*CAT3-URA3-CAT3*: 2878 pb), se realizó mediante la técnica de Double-Joint PCR y se integró por recombinación homóloga en el genoma de células litio competentes de *Y. lipolytica*. Las putativas mutantes se seleccionaron en base a su auxotrofia y la delección del gen *CAT3*, la inserción del cassette de disrupción en la orientación y locus correcto se comprobó por PCR y por digestión enzimática. Finalmente, las mutantes Ylcat3- Δ se sometieron a un análisis fenotípico.

La cepa mutante Ylcat3- Δ no mostró cambios en su dimorfismo, creciendo en forma de micelio o de levadura en respuesta a la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo. La morfología de las colonias fue similar al de la cepa parental y únicamente se observaron cambios en el tamaño de las colonias de la cepa mutante Ylcat3- Δ cuando las células se cultivaron en presencia de H₂O₂. Aunque en el análisis cualitativo se observó una disminución del crecimiento de la cepa mutante Ylcat3- Δ en presencia de H₂O₂ (5 mM), el análisis cuantitativo demostró que la cepa mutante Ylcat3- Δ presenta un crecimiento similar al de la cepa parental bajo condiciones normales y en presencia de H₂O₂. Los resultados indican que la delección del gen *CAT3* no modifica la respuesta antioxidante de *Y. lipolytica* al EO ocasionado por H₂O₂ posiblemente debido a que otros mecanismos implicados en la respuesta antioxidante estén ejerciendo un efecto compensatorio que protege a la célula del daño oxidativo provocado por el H₂O₂.

1.1 ABSTRACT

The oxidative stress defined as an unbalance between the production of reactive oxygen species and antioxidant defense. They have identified 6 antioxidant defense genes in *Yarrowia lipolytica* (YI), of these *CAT3* gene presents the highest expression levels as a response to oxidative stress suggesting its participation in the antioxidant defense first line in this specie. Hence, the aim of the present work was to generate a catalase 3 deficient mutant of *Y. lipolytica* (Ylcat3- Δ) with the intention to obtain a deficient strain in its antioxidant defense response.

The sequence of the *CAT3* gene was identified in *Y. lipolytica* genome (YALI0F30987g). The disruption cassette construction (CAT3-URA3-CAT3: 2878 pb) was generated by Double joint PCR (DJ-PCR) technique, the genetic construction was inserted via homologous recombination in lithium competent cells genome of *Y. lipolytica*. The auxotrophy and the *CAT3* gene deletion were used for the mutant cell selection, besides PCR and restriction enzyme reactions showed the integration of disruption cassette at the correct locus. The Ylcat3- Δ mutant were analyzed phenotypically.

The dimorphism of Ylcat3- Δ mutant was not affected by nitrogen source, used in the growth medium. In addition, its colony morphology was similar to the wild type, and only the size of the Ylcat3- Δ mutant colony was modified in presence of H₂O₂.

Although, in the qualitative analysis observed a decrease in the Ylcat3- Δ mutant growth in presence of H₂O₂ (5 mM), the quantitative analysis showed that Ylcat3- Δ mutant has the same growth rate that the wild type under normal conditions and in presence of H₂O₂. This suggest that in absence of the *CAT3* gene other mechanisms of the antioxidant defense protect the cell of oxidative damage induced by H₂O₂.

2. INTRODUCCIÓN

En organismos aerobios, la acumulación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el oxígeno singlete (1O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) generan el establecimiento del estrés oxidativo. Esta condición provoca daño a macromoléculas que conforman la estructura celular (DNA, lípidos, proteínas e hidratos de carbono) y altera diferentes procesos celulares que involucran el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas.

Las células eucariotas cuentan con un sistema de defensa antioxidante endógeno, cuya función es proteger a la célula del daño ocasionado por las ROS. La activación de este sistema estimula la transcripción de genes que codifican para enzimas involucradas en la respuesta antioxidante: catalasas, superóxido dismutasas, glutatión peroxidasas, etc. La enzima catalasa participa en la descomposición del H_2O_2 en agua y oxígeno a través de una reacción de óxido-reducción.

Se ha reportado que, cuando células de levadura son sometidas a condiciones de EO la actividad de la enzima catalasa incrementa, además, ha sido asociada con mecanismos responsables de la adaptación celular a ROS. El objetivo del presente estudio fue analizar los posibles cambios de la respuesta antioxidante de la levadura *Y. lipolytica*, en ausencia de un gen que codifica para la enzima catalasa 3. Para ello, se generó una mutante por delección del gen *CAT3* (catalasa 3), el cual presuntamente está implicado en la primera línea de defensa antioxidante de *Y. lipolytica*. El análisis de esta mutante incluyó: morfología microscópica (dimorfismo) en un medio rico en nutrientes (YPD) y en un medio mínimo (YNB), morfología macroscópica de la colonia y susceptibilidad al H_2O_2 .

2.1 Definición del problema

El estrés oxidativo se caracteriza por el desequilibrio entre especies reactivas de oxígeno y moléculas antioxidantes. El daño generado por el EO se presenta a nivel celular principalmente en biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e hidratos de carbono), lo cual altera la funcionalidad de las membranas, la producción de enzimas, la respiración celular, la regulación de expresión de genes, etc., e involucran el desarrollo de diversas enfermedades: aterosclerosis, neoplasias de diversa naturaleza, procesos neurodegenerativos, enfermedades respiratorias y el propio envejecimiento. Para hacer frente al daño ocasionado por el EO las células disponen de mecanismos de defensa antioxidante (no enzimático y enzimático) (Nimse y Pal, 2015).

Estudios de actividad enzimática en *Y. lipolytica* han identificado que la enzima catalasa es la que presenta mayor actividad frente al EO (Arinbasarova, Biryukova y Mendentsev, 2015). En el genoma de *Y. lipolytica* se han identificado 6 genes que presuntamente codifican para enzimas implicadas en la respuesta antioxidante: *CAT1*, *CAT2*, *CAT3*, *SOD1*, *SOD2* y *GPx*, y se ha reportado que la expresión del gen *CAT3* presenta los mayores cambios en respuesta a EO (Desentis-Desentis, 2015; Miranda-Roblero, 2016).

En el presente trabajo se generó un modelo celular de *Y. lipolytica*, el cual permitió analizar cambios en la respuesta antioxidante de esta especie en ausencia del gen *CAT3*.

2.2 Justificación

La generación de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres son un proceso normal durante el metabolismo celular, el cual está compensado por un complejo sistema antioxidante (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013). Sin embargo, un desequilibrio entre la cantidad de moléculas oxidantes y antioxidantes genera el establecimiento del EO (Jiménez-Rosales, Domínguez y Amaya-Chávez, 2010). Condición que se ha relacionado con enfermedades crónico degenerativas, las cuales son las principales causas de muerte tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, OMS) (Mena-Gómez, Cadena-Estrada y Troncoso-Pérez, 2014).

Numerosos estudios indican que aproximadamente el 60 % de la secuencia de los genes presentes en el genoma de levaduras son homólogos a los de una célula humana (Franssens, Bynens, Van den Brande, Vandermeeren, Verduyck, y Winderickx, 2013; Zhu y Jackson, 2015). Considerando que *Y. lipolytica* es una levadura dimórfica, no patógena y que su genoma se encuentra secuenciado, se ha considerado como un modelo celular que permite realizar estudios para determinar mecanismos de respuesta frente al EO.

Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que en respuesta al EO, el gen *CAT3* de *Y. lipolytica* presenta una mayor actividad, lo cual sugiere que la proteína codificada por este gen cumple una función importante en la respuesta celular antioxidante en este organismo (Desentis-Desentis, 2015; Miranda-Roblero, 2016). Para determinar el papel que la enzima catalasa 3 tiene en la respuesta antioxidante de *Y. lipolytica*, se generó una cepa mutante por delección del gen *CAT3* para generar un mayor conocimiento sobre el papel de este gen frente al EO.

3. HIPÓTESIS

La delección del gen *CAT3* aumenta la susceptibilidad de las células de *Y. lipolytica* frente al estrés oxidativo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar los posibles cambios en la respuesta antioxidante de *Y. lipolytica* en ausencia del gen *CAT3*.

4.2 Objetivos específicos

- Generar una mutante de *Y. lipolytica* por delección del gen *CAT3*.
- Analizar la capacidad dimórfica de *Y. lipolytica* ocasionada por la delección del gen *CAT3*.
- Evaluar la susceptibilidad de la mutante *Ylcat3-Δ* a diferentes concentraciones del agente oxidante H_2O_2 .

5. ANTECEDENTES

5.1 Estrés oxidativo

La respiración celular en organismos eucariotas es un proceso por el cual se genera energía a través de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria; éste y otros mecanismos (reacciones de fenton y beta-oxidación, actividad fagocítica y participación de enzimas [óxido nítrico sintasa, citocromo P450, xantina oxidasa y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato [NADP⁺, co-enzima]) producen diversos compuestos de los cuales alrededor del 5 % pueden ser tóxicos para la célula. Los principales agentes tóxicos que se producen se clasifican en 4 grupos, cada uno de éstos se identifica por el átomo principal que compone a la molécula: especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), especies reactivas de azufre (RSS) y especies reactivas de cloro (RCS). El desequilibrio entre la producción de estas moléculas y la actividad endógena del sistema antioxidante genera el establecimiento del estrés oxidativo (EO) (Jiménez-Rosales, et al., 2010; Lushchak, 2011; Sosa et al., 2013; Gutiérrez-Salinas et al., 2014; Pisoschi y Pop, 2015).

Las especies reactivas más abundantes en el organismo son las ROS y están representadas por radicales libres que son moléculas inestables que contienen uno o más electrones desapareados en su órbita externa (generan su estabilidad electroquímica a través de la captación de un electrón de moléculas estables) y por radicales no libres oxigenados como el peróxido de hidrogeno (H₂O₂), el superóxido (O₂^{•-}), el oxígeno singlete (¹O₂) y el radical hidroxilo (HO[•]) (Avello y Suwalsky, 2006; Pisoschi y Pop, 2015; Sosa et al., 2013; Amir y Ghobadi, 2016).

En particular la reactividad del H₂O₂ es muy baja, sin embargo, concentraciones altas en la mitocondria pueden ser potencialmente dañinas. Los niveles de H₂O₂ en células eucariotas pueden variar dependiendo del tejido o la condición de la célula. Este radical participa en reacciones catalizadas por

metales (Fe^{2+} y Cu^2) como en la reacción de Fenton que se descompone en el radical $\text{OH}\cdot$, el cual es capaz de atacar estructuras orgánicas (fosfolípidos de membrana, colesterol y proteínas). Así mismo, el H_2O_2 puede reaccionar con el grupo prostético (hemo) de diversas proteínas alterando su estructura o su función. Para la eliminación de este agente oxidante es necesaria la participación de enzimas como peroxidasas, glutatión peroxidasas, peroxirredoxinas y catalasas (Fernández, Da Silva-Grigoletto y Túnez-Fiñana, 2009; Sedlak y Musatov, 2017).

5.2 Estrés oxidativo y biomoléculas

Las ROS son capaces de reaccionar con diversas moléculas orgánicas provocando una alteración en su función y un daño a nivel celular y tisular. Las principales moléculas afectadas son el DNA, los lípidos, las proteínas y los hidratos de carbono (González-Torres, Betancourt-Rule y Ortiz-Muñiz, 2000).

Lípidos

Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares. Los radicales libres provocan la oxidación de los lípidos (peroxidación lipídica) de la membrana celular, lo cual altera su permeabilidad. A partir de esta oxidación se producen aldehídos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4HNE), los cuales generan modificaciones covalentes (en grupos funcionales) de macromoléculas (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013; Ayala, Muñoz y Argüelles, 2014; Pisoschi y Pop, 2015).

Proteínas

Las proteínas poseen grupos funcionales susceptibles a la oxidación que pueden sufrir modificaciones al exponerse ante agentes oxidantes; dependiendo de las ROS a las que estén expuestas, se genera un daño específico (oxidación catalizada por un metal, hierro-azufre o con hierro libre) o inespecífico (oxidación por radiación) (Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006). La oxidación puede originarse en los grupos sulfhidrilo y en proteínas constituidas por aminoácidos

como metionina, cisteína, fenilalanina, tirosina e histidina. Si la oxidación de las proteínas ocurre en la cadena lateral de su estructura se pueden generar daños a nivel funcional como la inhibición de la actividad enzimática (en caso de ser una enzima), el incremento de proteólisis, la alteración de la inmunogénesis y el plegamiento de proteínas (Hernández y Martin-Gil, 2009; Pisoschi y Pop, 2015).

Ácido desoxirribonucleico (DNA)

La molécula de DNA es uno de los principales blancos para los radicales libres, los cuales ocasionan un daño a nivel estructural a través de modificaciones en las secuencias de azúcares-fosfatos o en las bases nitrogenadas (purinas o pirimidinas), convirtiéndolas en moléculas inestables y altamente reactivas (Zorrilla, Eirez e Izquierdo, 2004; Hernández y Martin-Gil, 2009). El daño provocado al DNA puede dar lugar a la generación de mutaciones, carcinogénesis, pérdida de la expresión y/o síntesis de una proteína por daño a un gen específico (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013).

Hidratos de Carbono

Los niveles de ROS/RNS en la célula pueden generar la despolimerización de polisacáridos mediante la ruptura de sus enlaces glucosídicos, lo cual se ha descrito como un daño biológicamente importante en la estructura de los hidratos de carbono (Duan y Kasper, 2011). Este daño altera la función de cualquier receptor celular como aquellos relacionados con las respuestas hormonales y neurotransmisoras, las actividades de interleucinas y la formación de prostaglandinas (Amir y Ghobadi, 2016).

5.3 Estrés oxidativo y enfermedad

El estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de varias condiciones patológicas que se clasifican en dos grupos: el primero involucra aquellas enfermedades caracterizadas por pro-oxidantes que cambian el estado redox de un grupo tiol/disulfuro de una proteína y alteran la tolerancia a la glucosa, condición que se denomina “estrés oxidativo mitocondrial” (cáncer, diabetes

mellitus, cardiopatías, etc); el segundo grupo involucra a las enfermedades caracterizadas por una “condición inflamatoria oxidativa” que es generada por una mayor actividad de la enzima xantina oxidasa que induce la formación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (aterosclerosis, enfermedades crónicas inflamatorias, isquemia y lesiones por reperfusión) (Valko et al., 2007).

Cáncer

Las ROS causan daño al DNA generando ciertas alteraciones en los mecanismos de reparación de esta molécula. La oxidación del DNA por las especies reactivas genera 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, la cual se encuentra involucrada en la carcinogénesis. Por otra parte, los tratamientos oncológicos como la quimioterapia y/o la radioterapia participan en la generación de ROS, las cuales acentúan el daño causado por la misma condición (Viñas, Puig y Porta, 2012; Sosa et al., 2013).

Alzheimer

El sistema nervioso central es mayormente propenso al desarrollo de estrés oxidativo por poseer un alto consumo de oxígeno, un abundante contenido lipídico, un alto contenido en hierro y ácido ascórbico y una escasez relativa de enzimas antioxidantes, comparado con otros tejidos (Wang et al., 2014). La producción de ROS en el cerebro afectado de pacientes con la enfermedad de Alzheimer ocurre por diversos mecanismos, entre los que se puede citar la actividad de la enzima $NADP^+$ (en su forma oxidada) en las células de microglía, la hipoxia local de ciertas partes del cerebro, etc. Estas condiciones provocan una consecuente pérdida sináptica y neuronal acentuada especialmente en los ventrículos e hipocampo (Pareja-Galeano et al., 2012).

Diabetes

El estrés oxidativo favorece la oxidación lipídica y proteínica, incrementa la vía del polirol, la formación de productos terminales de glicación avanzada y la actividad de la proteína quinasa C, elementos que modulan funciones de la pared vascular y la resistencia a la insulina (Céspedes, 2014). El EO es responsable de

muchas de las complicaciones de esta enfermedad: cetoacidosis diabética, coma diabético y complicaciones microvasculares y macrovasculares (Pan et al., 2009; Montier, Ramos, Gómez, Pérez y Quintana, 2015).

Cardiopatías y aterosclerosis

El daño producido por las ROS se asocia con la lipoperoxidación de las membranas ocasionando la fragmentación de fosfolípidos, con pérdida de su integración. El EO puede causar una disfunción endotelial que promueve un ambiente pro-inflamatorio que incrementa la adhesión de moléculas y el desequilibrio de metabolitos del ácido araquidónico y moléculas quimio-tácticas, favoreciendo el desarrollo de patologías como aterosclerosis e hipertensión (Alonso, Pedroso, Moreno y Acosta, 2007).

5.4 Respuesta celular frente al estrés oxidativo

Sistema de defensa antioxidante

Las reacciones bioquímico-metabólicas normales de las células, la exposición a los agentes ambientales y el consumo de xenobióticos, resultan en la generación de ROS y RNS que favorecen el establecimiento del EO (Nimse y Pal, 2015).

La respuesta celular frente al EO comprende dos sistemas; el sistema no enzimático (exógeno) y el sistema enzimático (endógeno), y aunque el mecanismo de acción de estos dos sistemas difiere en cada especie, su presencia es universal en todos los organismos (Zamora, 2007). El sistema no enzimático está constituido por sustancias químicas o moléculas que se obtienen a través de la dieta como las vitaminas liposolubles (A y E) e hidrosolubles (C), las cuales cumplen con un papel fundamental en la membrana celular y el citosol. Asimismo, se encuentran los fitoquímicos, como los flavonoides (compuestos naturales presentes en plantas) los cuales se dividen en flavones (apigenina y luteolina), flavonoles (quercetina, kaempferol, miricetina y fisetina), flavanonas (hesperetina y naringenina), isoflavonas (genisteína y daidzeína), flavanonol

(taxifolina) y flavan-3-ols (catequina y epicatequina) (Kumar y Pandey, 2013). Todos estos compuestos tienen la capacidad de eliminar los radicales libres, inhibir la síntesis de óxido nítrico, reducir la peroxidación lipídica y proteger a la célula de la apoptosis (Sánchez-Rodríguez, Martín-Sanz, Cuadrado, Granizo y Sanz-Fernández, 2016). Otro componente del sistema antioxidante no enzimático es el glutatión (GSH), el cual es producido por las propias células; entre sus funciones están la permeabilidad de la membrana y el transporte de aminoácidos y además interviene en el proceso de apoptosis y síntesis de proteínas (Kumar y Pandey, 2013; Bonola, Irigoyen, Vera, Campero y Hamdan, 2014; Nimse y Pal, 2015).

El sistema de defensa enzimático presente en las células está compuesto por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT), las cuales disminuyen la lesión tisular causada por las ROS (Zamora, 2007; González, González, Heredia, Fernández y Ballesteros, 2013; Akin et al., 2015).

Superóxido dismutasa (SOD)

La SOD forma parte de una familia de metalo-enzimas que cataliza una reacción de óxido-reducción del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en H_2O_2 y oxígeno. Las enzimas SOD se clasifican en 3 grupos según el metal que presenten en su sitio activo: el grupo Cu-ZnSOD que contiene cobre y cinc; el grupo Fe-MnSOD que contiene hierro y magnesio y el grupo Ni-SOD que contiene níquel (González-Torres, Betancourt-Rule y Ortiz-Muñiz, 2002; Briones-Martin-Del-Campo, Orta-Zavalza, Juárez-Cepeda, Gutierrez-Escobedo, Cañas-Villamar, Castaño, y De Las Peñas, 2014). La mayoría de los organismos eucariotas contienen dos tipos de enzimas SOD: la enzima Fe-MnSOD localizada en la matriz mitocondrial y la enzima Cu-ZnSOD que se encuentra en el citosol y en el espacio inter-membranoso mitocondrial (Venereo, 2002). Por lo anterior, una deficiencia en Cu o Zn ocasionaría la inactividad de esta enzima y podría dar lugar al desarrollo de enfermedades como el déficit de atención con hiperactividad (niños)

y aquellas que comprometen al sistema inmune (Estrada-Carrasco et al., 2010; Russo, 2010).

Glutación peroxidasa (GPx)

La GPx Es una enzima selenio-dependiente que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y lipoperóxido (L-OOH) usando como agente reductor al glutación (GSH) en su estado reducido; para ello, el glutación es oxidado (GSSG) y posteriormente regresado a su estado original por la enzima glutación reductasa (González-Torres et al., 2000; Venereo, 2000). Esta enzima se clasifica en 3 grupos: la enzima GPx-c o forma celular que tiene mayor afinidad por el H₂O₂ que por el L-OOH; la enzima GPx-p o forma extracelular que presenta la misma afinidad por el H₂O₂ y el lipoperóxido y la enzima GPx-PH, que tiene una mayor afinidad por los lipoperóxidos. Las enzimas GPx se localizan en el citosol de eritrocitos y en lisosomas de neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune (Venereo, 2000; Nimse y Pal, 2015).

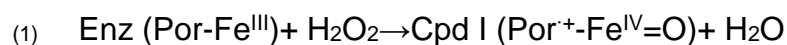
Las enzimas SOD y GPx requieren de nutrientes esenciales para su funcionamiento óptimo; por ejemplo, la expresión del gen que codifica para la enzima GPx depende de cantidades adecuadas de selenio y el consumo suficiente de riboflavina; la expresión del gen que codifica para SOD depende de un aporte adecuado de cobre y zinc (Zamora, 2007).

Catalasa (CAT)

La CAT es una enzima tetramérica compuesta por cuatro subunidades de 60 kDa. Las catalasas más abundantes tanto en células procariotas como en eucariotas son aquellas que contiene en su centro activo un grupo hemo y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺). Sin embargo, en células procariotas se pueden presentar catalasas que contienen magnesio en su centro activo (Mn-catalasa) (Zamocky, Furtmüller y Obinger, 2008). Las catalasas hemo se dividen en dos grupos: catalasas monofuncionales y peroxisomales, ambas conforman el sistema antioxidante CAT/SOD que mantiene un balance y protegen a biomoléculas como DNA, proteínas y lípidos del daño oxidativo (Beltrán-García, Ogura-Fujii, Manzo-Sánchez y Arias-Castro, 2006; Estrada-

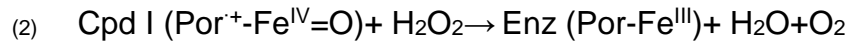
Carrasco et al., 2010). Además, las catalasas (hemo) funcionan como factores importantes en la inflamación, la mutagénesis y la prevención de apoptosis (Jamieson, 1998). A nivel molecular, se ha descrito que las catalasas se caracterizan por presentar una tasa de renovación extraordinariamente elevada (>40,000 moléculas por segundo) en humanos (González-Torres et al., 2000; Venereo, 2000; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

La enzima catalasa se encuentra a nivel celular en peroxisomas donde los niveles de ROS son altos, además, se puede encontrar en la mitocondria y en el citosol (Veal, Day y Morgan, 2007); los principales órganos en que se encuentra son en hígado, riñón, tejido conectivo y epitelios (Estrada-Carrasco et al., 2010). Esta enzima elimina al H₂O₂ a través de una reacción catalítica, la cual evita que se forme el radical hidroxilo, oxígeno singlete y otras moléculas reactivas. En dicha reacción catalítica ocurre una transferencia de electrones entre dos moléculas de H₂O₂, una de ellas funciona como donador y la otra como aceptor de electrones (Díaz, 2003; Alfonso-Prieto, Biarnés, Vidossich y Rovira, 2009). Este proceso sucede a través de dos pasos: en el primero la catalasa es oxidada por una molécula de H₂O₂ formando un compuesto intermediario llamado compuesto I, caracterizado por tener un grupo ferroxilo (hemo) con Fe^{IV} y radical catiónico de porfirina. Durante este primer paso se produce una molécula de agua.



Enz: enzima
Por: porfirina
Fe^{III} o Fe^{IV}: grupo hemo
Cpd I: compuesto I
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
H₂O: agua

En el segundo paso, el compuesto I es reducido por una segunda molécula de H₂O₂, regresando a la enzima a su estado inicial y produciendo una molécula de agua y oxígeno.



Enz: enzima
Por: porfirina
Fe^{III} o Fe^{IV}: grupo hemo
Cpd I: compuesto I
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
H₂O: agua
O₂: oxígeno molecular

En concentraciones altas de H₂O₂, la catalasa actúa sobre este oxidante generando H₂O y O₂; mientras, que en concentraciones bajas y en presencia de un donador de hidrógeno (etanol, metanol, fenol, etc.), la catalasa remueve al H₂O₂ a través de una oxidación de su sustrato (reacción de peroxidación) (Estrada-Carrasco et al., 2010).

5.5 Estrés oxidativo en levaduras

De la misma manera que en el resto las células eucariotas, las levaduras que crecen en un ambiente aerobio están expuestas a diferentes tipos de ROS y a otros factores como deficiencias en sus requerimientos nutricionales, temperaturas no óptimas, pH, presencia de alcoholes y metales pesados, etc., (Jiménez-Bremont, Rodríguez-Hernández y Rodríguez-Kessler, 2012). Las levaduras al igual que otros organismos eucariotas, cuentan con un complejo sistema que mantiene el equilibrio entre la generación y degradación de radicales en la célula, este balance bajo condiciones normales es generado por mecanismos de retroalimentación en los que participan algunas proteínas que funcionan como sensores al reconocer las moléculas oxidantes. La activación de estas proteínas estimula la transcripción de genes, entre ellos, los que codifican para enzimas involucradas en la respuesta antioxidante como catalasas, superóxido dismutasas, glutatión peróxidasas, etc. La respuesta que las células de levadura tienen frente a las moléculas oxidantes ha sido descrita en varios tipos de células, sin embargo, los mecanismos moleculares de señales de traducción y de respuesta adaptativa al estrés oxidativo han sido mejor estudiados en levaduras que en otras células eucariotas (Lushchak, 2010).

5.6 Regulación transcripcional de genes de la respuesta antioxidante

Las células eucariotas poseen un sistema que hace frente a las ROS, estas utilizan señales localizadas en el citosol las cuales tienden a migrar al núcleo para regular la expresión de genes en respuesta al estrés oxidativo (Lushchak, 2014). En esta regulación participan múltiples mecanismos que ocurren a nivel transcripcional y post-transcripcional, generando una adaptación a las nuevas condiciones y contrarrestando el posible daño a biomoléculas causado por el EO (Molina-Navarro et al., 2008). Durante la exposición al calor, a las ROS, a la inanición y al estrés osmótico, algunos genes son activados o reprimidos por una serie de factores de transcripción como los factores específicos de respuesta a estrés oxidativo (Yap1p y Skn7p), los factores de respuesta general al estrés (Msn2p y Msn4p) y factores como Hap1p y el multimérico Hap2, 3, 4, 5p; en respuesta a las ROS, la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes están raramente bajo el control de un solo factor de transcripción (Aung-Htut, Ayer, Breitenbach y Dawes, 2012).

Las enzimas del sistema antioxidante (SOD, CAT y GPx) cuentan con diferentes estrategias para eliminar a las ROS o reparar el daño en compartimentos específicos de la célula, por ejemplo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado dos catalasas: la catalasa peroxisomal codificada por el gen *CTA1* (catalasa A): situada en los peroxisomas e inducida por oxígeno y ácidos grasos y reprimida por glucosa; la catalasa T codificada por el gen *CCT1* situada en la matriz citoplasmática e inducida por oxígeno, calor, estrés osmótico y oxidativo así como por iones de cobre (Jamieson, 1998; Nishimoto, Furuta, Kataoka y Kishida, 2015).

Además, *S. cerevisiae* cuenta con dos enzimas SOD que son codificadas por los genes *SOD1* y *SOD2* y cuya expresión es inducida por el crecimiento celular en sustratos no fermentables, oxígeno o agentes generadores de superóxido como paraquat (herbicida). Esta especie también cuenta con 3 enzimas GPx (Gpx1-3), las cuales son reguladas por la glucosa en situaciones de inanición (*GPX1*) o por estrés oxidativo (*GPX2*). El gen *GPX3* esta reportado como un gen constitutivo, el cual no necesita una regulación adicional (Aung-Htut et al., 2012).

Mientras que en la levadura *Y. lipolytica* se han identificado 3 catalasas codificadas por los genes *CAT1*, *CAT2* y *CAT3*, dos superóxido dismutasas codificadas por los genes *SOD1* y *SOD2* y una enzima GPx codificada por el gen *GPX* (Desentis-Desentis, 2015).

5.7 *Yarrowia lipolytica*: generalidades

Yarrowia lipolytica es una levadura que fue nombrada originalmente como *Candida lipolytica*, sin embargo, con la observación de que algunas mezclas de cepas tenían la capacidad para formar ascosporas y ciclo sexual, el hongo fue reclasificado y llamado *Endomycopsis lipolytica*, después *Saccharomycopsis lipolytica*, y finalmente *Yarrowia lipolytica*. El nombre genérico de *Yarrowia* fue propuesto por Van Der Walt y Von Arx en 1980, en reconocimiento al género identificado por David Yarrowia (Pérez-Campo y Domínguez, 2001). *Y. lipolytica*, es un organismo no patógeno y dimórfico (condición que le permite crecer en forma de levadura o micelio). Su genoma está organizado en 6 cromosomas que contienen un alto contenido de GC (49.6-51.7 %) y el tamaño de su genoma es aproximadamente de 12.7-22.1 Mb (Liu, Ji y Huang, 2015). Como organismo aerobio *Y. lipolytica* es muy sensible a las concentraciones de oxígeno, lo cual se considera un factor importante para su crecimiento y metabolismo; la temperatura ideal para su crecimiento es 28 °C y no debe de exceder los 32-34 °C (Fickers, Marty y Nicaud, 2011). Esta levadura tiene la capacidad de metabolizar diversos residuos industriales y agroindustriales (hidrocarburos) tales como ácido cítrico y 2-cetoglutárico para la producción de proteínas, aceites y ácidos orgánicos (Jiménez-Bremont, Rodríguez-Hernández y Rodríguez-Kessler, 2012).

La levadura como modelo celular presenta ciertas limitaciones al no tener interacciones complejas como las que ocurren en organismos pluricelulares; a pesar de ello, comparte aspectos fundamentales con una célula eucariota; cerca del 60 % de sus secuencias genéticas (genes ortólogos) presentan homología con el genoma humano, y el 25 % de genes relacionados con enfermedades en humanos, presentan homología con secuencias de levadura (Franssens et al., 2013).

Debido a que el EO afecta múltiples mecanismos celulares que involucran la aparición de enfermedades, la supervivencia y la muerte celular, las levaduras como organismo unicelular se han convertido en un excelente modelo para el estudio del estrés oxidativo, con cuyo uso, procesos celulares y genéticos de interés como el desarrollo de patologías y la respuesta antioxidante generada por el daño al DNA, han sido dilucidados (Breitenbach Ralser, Perrone, Iglseeder, Rinnerthaler, y Dawes, 2013; Franssens et al., 2013; De la Torre-Ruiz, Pujol y Sundaran, 2015). Además, el trabajar con levaduras facilita la manipulación de técnicas básicas de biología y genética molecular. Se conoce que varios de los fenómenos fisiológicos y bioquímicos de la levadura son semejantes a los de otras células eucariotas, incluso a sistemas superiores como plantas y animales. *Y. lipolytica* se ha utilizado para el estudio del metabolismo de alcanos y ácidos grasos, la producción de proteínas recombinantes, el control del dimorfismo, la biogénesis de los peroxisomas, las vías generales de secreción, entre otras (Loira, Dulermo, Nicaud y Sherman, 2012).

5.8 Respuesta de *Y. lipolytica* frente al estrés oxidativo

En condiciones de estrés oxidativo, las células de *Y. lipolytica* incrementan su actividad enzimática antioxidante (catalasa y superóxido dismutasa); la protección en contra de las ROS es sistemática y no solamente es asegurada por las enzimas antioxidantes puesto que también participan enzimas que no están relacionadas directamente en la intercepción de radicales libres (Arinbasarova, Biryukova y Mendentsev, 2015).

En el estudio realizado por Lopes, Mota y Belo (2013), compararon la actividad de las enzimas antioxidantes en 2 especies de levaduras *Y. lipolytica* y *Pichia pastoris*; las células de ambas especies en fase de crecimiento exponencial fueron sometidas a EO ocasionado por agentes oxidantes (Paraquat, H₂O₂ y aire hiperbárico) en medio YPD y en una solución de buffer de fosfatos (PBS); en el primero, no hubo diferencias significativas entre la viabilidad de ambas cepas independientemente del factor de estrés, mientras que la exposición a los agentes oxidantes en buffer PBS, demostró que las células de

P. pastoris eran más susceptibles que las células de *Y. lipolytica* y que la actividad de la enzima catalasa de *Y. lipolytica* era mayor a la actividad de la catalasa de *P. pastoris*. Sugiriendo que en respuesta al estrés oxidativo la actividad de catalasa es mayor en *Y. lipolytica* que en *P. pastoris*.

En el estudio realizado por Biryukova y cols. (2006), células de *Y. lipolytica* fueron sometidas a condiciones de estrés oxidativo con agentes oxidantes (H_2O_2 , menadiona y juglona) con la finalidad de analizar los cambios en la actividad de enzimas de la respuesta antioxidante; catalasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y glucosa-6 fosfato deshidrogenasa. Sus resultados demuestran que durante la fase estacionaria, las células resisten más el EO que en la fase exponencial y que un pretratamiento de 60 min en fase logarítmica, con concentraciones no letales (H_2O_2 0.3 mM, menadiona 0.05 mM y juglona 0.005 mM) genera células más resistentes a concentraciones altas de agentes oxidantes. Como resultado de la adaptación de las células de *Y. lipolytica* al H_2O_2 , menadiona y juglona se incrementó la actividad de las enzimas antioxidantes, principalmente la actividad de la enzima catalasa aumentando su actividad 3.3 y 4.2 veces cuando la células estuvieron expuestas a un pretratamiento con H_2O_2 (0.3 mM) y menadiona (0.05 mM). Los autores concluyen que la tasa de supervivencia celular durante la fase exponencial es debido al pretratamiento con bajas concentraciones de oxidantes, lo cual activa varios mecanismos adaptativos basados en la actividad de las enzimas antioxidantes.

En el estudio realizado en el laboratorio de proteómica en el CINSP por Desentis-Desentis (2015), 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 (H_2O_2 y menadiona). En este estudio se demostró que el patrón de expresión de estos genes cambia en respuesta a los diferentes tratamientos y se determinó que el gen que presenta los mayores cambios en su expresión, bajo los diferentes tratamientos es el gen *CAT3* que codifica para la enzima catalasa 3. Estos resultados fueron confirmados posteriormente en el trabajo de

Miranda-Roblero (2016), quien analizó el efecto que el H₂O₂ 4.5 mM tiene sobre la expresión de los genes de respuesta antioxidante en células jóvenes (fase exponencial) y envejecidas (fase estacional). Los resultados demostraron que la expresión de los genes *CAT1*, *CAT2*, *CAT3*, *SOD1*, *SOD2* y *GPX* fue mayor en células jóvenes que en células envejecidas, en tiempos cortos (15 min) y en presencia del tratamiento con H₂O₂; se observó también que a tiempos largos (60 min) se presentó una sobreexpresión del gen *CAT3* tanto en células jóvenes como células envejecidas.

5.9 Efecto de la delección de genes que codifican para catalasas

Se ha reportado que modelos de cepas de levaduras deficientes en genes que codifican para la enzima catalasa son hipersensibles al H₂O₂. Jamieson (1998), sugiere que aquellas células con una o doble mutación en la secuencia de la enzima catalasa no pueden generar una respuesta adaptativa frente al H₂O₂.

En su estudio Izawa, Inoue y Kimura (1996), sometieron a EO a dos cepas de *S. cerevisiae* deficientes cada una en uno o dos de los genes (*CTA1* y *CTT1*) que codifican para las enzimas catalasas peroxisomal y citosólica. Los autores reportaron que el crecimiento de la cepa doble mutante (*ctt1-Δ-cta1-Δ*) de *S. cerevisiae* bajo condiciones normales mostraba el mismo crecimiento que aquellas cepas de *S. cerevisiae* deficientes en un solo gen (*CTT1* o *CTA1*). Mientras que en presencia de H₂O₂, la cepa doble mutante presentaba mayor susceptibilidad al H₂O₂ que aquellas deficientes en un solo gen. Los autores concluyen que bajo condiciones normales las enzimas catalasas no son esenciales en la levadura *S. cerevisiae*, pero sí lo son para generar una respuesta adaptativa al EO.

En el estudio realizado por Cuéllar-Cruz y cols. (2008), sometieron a células deficientes en la enzima catalasa A (codificada por el gen *CTA1*) de *Candida glabrata* a EO con H₂O₂. Las células mutantes *cta1-Δ* de *C. glabrata* fueron sembradas en medio YPD más la adición de agente oxidante (H₂O₂) y se observó que en concentraciones de H₂O₂ >4 mM se inhibía el crecimiento de las células

mutantes *cta1-Δ* de *C. glabrata*. Los autores concluyen que la enzima catalasa en la levadura *C. glabrata* es esencial para la supervivencia en condiciones de EO.

En otro estudio, Martins y English (2014) sometieron a dos cepas de *S. cerevisiae* deficientes en una de las enzimas catalasa: citosólica (codificada por el gen *CTT1*) y peroxisomal (codificada por el gen *CTA1*) a EO con H₂O₂ en diferentes medios de cultivo (YPD y en buffer de fosfato). Los autores demostraron que la cepa mutante *ctt1-Δ* de *S. cerevisiae* en medio YPD fue más sensible al H₂O₂ en comparación a la cepa mutante *cta1-Δ*. Mientras que, en presencia del buffer de fosfato ambas cepas mutantes (*ctt1-Δ* y *cta1-Δ*) de *S. cerevisiae* presentaban hipersensibilidad al H₂O₂. Los autores concluyen que la actividad del gen *CTT1* en la levadura *S. cerevisiae* es esencial para hacer frente al EO ocasionado por el H₂O₂, pero que la actividad de este gen se inhibe en presencia de un medio pobre en nutrientes (buffer de fosfato).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

La cepa de *Y. lipolytica* (YI) que se utilizó en el presente trabajo fue P01a (*Mat A*, *leu2* -270, *ura3* -302), la cual fungió como control en los experimentos y como fondo genético para la generación de la cepa mutante Ylcat3- Δ . Así mismo, la cepa *E.coli/pCR2.1-TOPO/URA3* se utilizó para obtener el gen marcador *URA3*, el cual sustituyó el ORF del gen *CAT3* en el cassette de interrupción. Ambas cepas pertenecen a la colección del Laboratorio de Proteómica del CINSP.

6.2 Métodos

6.2.1 Diseño del estudio

Es un estudio de carácter experimental que se realizó de julio de 2016 a septiembre de 2017.

El proceso experimental se llevó a cabo en los laboratorios de Proteómica, Genética y Biología Molecular, Bioquímica Nutricional y de Alimentos del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP), de la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

6.2.2 Estrategia general de trabajo

El cumplimiento de los objetivos del presente trabajo se realizó en 3 etapas principales (figura 1):

1. Análisis *in silico* de la secuencia del gen *CAT3* y diseño de la estrategia para su delección.
2. Construcción del cassette de interrupción y generación de mutantes Ylcat3- Δ .
3. Análisis genotípico y fenotípico de la cepa mutante Ylcat3- Δ .

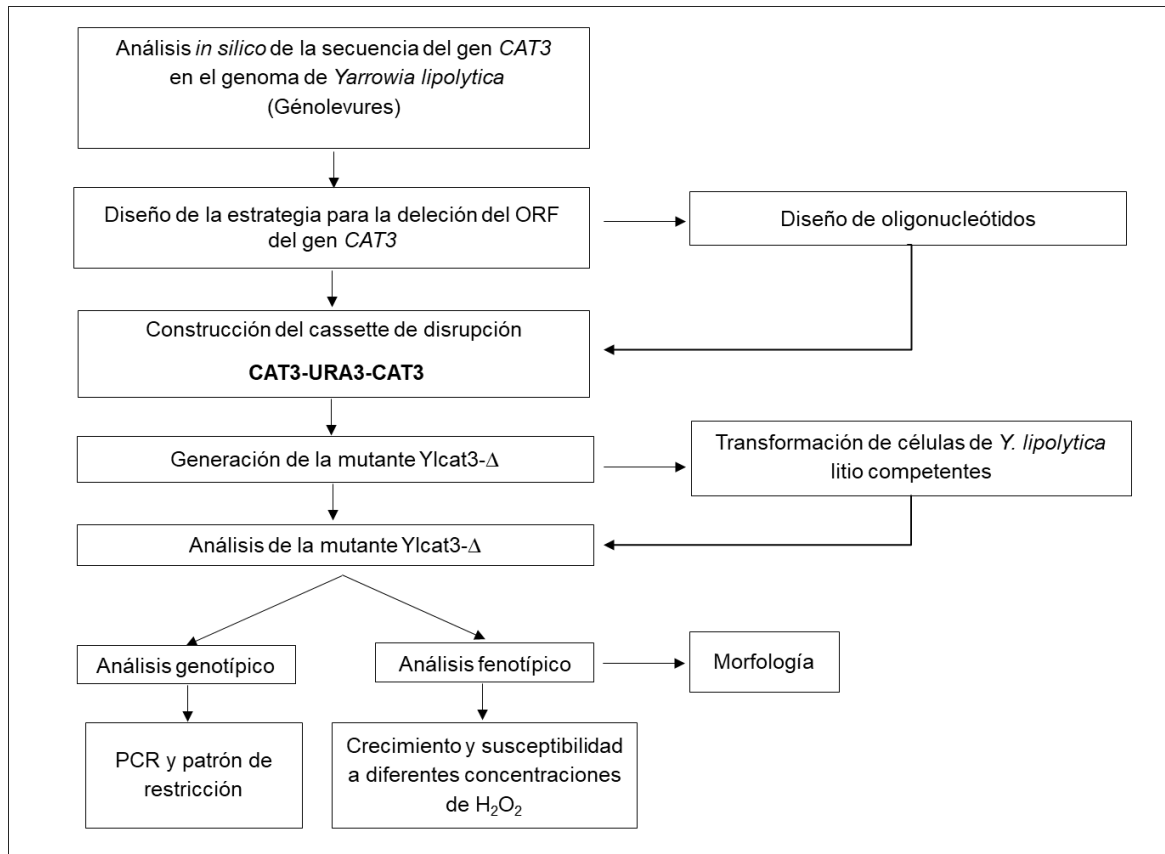


Figura 1. Estrategia general de trabajo

6.3 Procedimiento experimental

6.3.1 Análisis *in silico* de la secuencia del gen *CAT3* y diseño de la estrategia para su delección

La búsqueda *in silico* de secuencias del gen que presuntamente codifican para la enzima catalasa 3 en diferentes especies de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, *Sugiyamaella lignohabitans*, *Rasamsonia emersonii*, *Aspergillus rambellii* y *Candida tropicalis*) se realizó con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Posteriormente y haciendo uso de 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 identificada la secuencia del gen que presuntamente codifica para la enzima catalasa 3 en *Y. lipolytica* se realizó el diseño de oligonucleótidos específicos y quiméricos.

6.3.2 Diseño de oligonucleótidos

Para la construcción del cassette de interrupción (CAT3-URA3-CAT3) y el análisis de la cepa mutante Ylcat3- Δ , fue necesario diseñar una batería de oligonucleótidos, entre ellos un par de oligonucleótidos quiméricos.

Las características que se consideraron para el diseño de oligonucleótidos fueron: la longitud (18-24 pb), el contenido de GC (40-60 %) y que la diferencia de temperatura de fusión entre ambos oligonucleótidos no fuese >3 °C, evitando la auto complementariedad entre los pares de oligonucleótidos y la formación de estructuras secundarias (dímeros u horquillas). Un elemento que fue importante modificar durante el diseño de oligonucleótidos quiméricos fue la longitud de los mismos (~34-40 pb) debido a que éstos contienen la unión de dos secuencias de DNA que se pretende unir para dar lugar a una molécula quimérica (cassette de interrupción), construida con los extremos del gen que se desea deletar (*CAT3*) y del gen marcador que se quiere insertar (*URA3*).

Las características generales de los oligonucleótidos diseñados se analizaron con programas computacionales como: OligoCalc (Oligonucleotide Properties Calculator, <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) y OligoAnalyzer® tool IDT (Integrated DNA Technologies, <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Además, los oligonucleótidos fueron sometidos a un análisis virtual para comprobar su especificidad utilizando la herramienta Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) del NCBI.

6.3.3 Preparación de medios de cultivos

6.3.3.1 Preparación de medio YPD

Para el cultivo de la cepa P01a de *Y. lipolytica* se utilizó medio YPD (líquido o agar) compuesto por peptona (2 %), glucosa (2 %) y extracto de levadura (1 %) y cuando se requirió agar bacteriológico (2 %), los componentes se diluyeron en agua estéril. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C a 15 lb/pulg² de presión durante 15 min (Barth y Gaillardin, 1996).

6.3.3.2 Preparación de medio LB

El gen marcador *URA3* se obtuvo a partir de la cepa de *E. coli* que contiene al plásmido *pCR2.1-TOPO* el cual acarrea el gen *URA3*. Para ello se realizó un cultivo de esta cepa en medio LB: Luria Bertani (Miller Powder). El medio se preparó en forma líquida (27 mg/mL de LB Miller Powder) o con agar (37 mg/mL de LB-agar Miller Powder), diluido en agua milli Q y esterilizado en autoclave a 121 °C, a 15 lb/pulg² de presión durante 15 min; para preparar placas, el medio (LB agar) se suplementó con ampicilina (100 µg/mL) antes de vaciarlo a cajas Petri y cuando éste alcanzó una temperatura ambiente (TA). Mientras que, la adición de la ampicilina en medio LB líquido se realizó justo antes de depositar el inóculo.

6.3.4 Preparación de pre-inóculos y ajuste de inóculos

Los diferentes pre-cultivos se realizaron en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (SG 403A, SterilGARD III Advance) de la siguiente manera: una colonia de la cepa P01a de *Y. lipolytica* o *E.coli/pCR2.1-TOPO/URA3* se sembró en un matraz (250 mL) con 50 mL de medio YPD o LB líquido. El cultivo se incubó a 28 ó 37 °C en una incubadora (1575, SL Shel Lab) con agitación orbital (200 rpm) durante 12 ó 16 h.

Para estandarizar la cantidad de material biológico utilizado en los diferentes experimentos, se determinó la OD de los pre-cultivos con un espectrofotómetro

(UV-Visible Evolution 300, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 600 nm, para ello se tomó una alícuota de los pre-cultivos y se realizaron diluciones pertinentes con agua estéril que permitieran obtener una absorbancia (OD₆₀₀) entre 0.1-0.4.

La OD₆₀₀ de los cultivos se ajustó a 0.2 ó 1.0 según se requirió, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen inicial} = \frac{(\text{Volumen final})(\text{Concentración final})}{(\text{Concentración inicial})}$$

Donde:

Volumen final: Volumen deseado

Concentración final: OD₆₀₀ deseada (0.2 ó 1.0)

Concentración inicial: OD₆₀₀ obtenida en los pre-cultivos

6.3.5 Cultivo y preservación de células

La preparación de los diferentes cultivos para las cepas P01a y *E. coli/pCR2.1-TOPO/URA3* se realizaron en condiciones de esterilidad.

6.3.5.1 Cultivo de *Y. lipolytica*

El cultivo de la cepa de P01a de *Y. lipolytica* se realizó de la siguiente manera: a partir de una placa de YPD con agar, se tomó con un palillo de madera estéril, una colonia y se sembró en un volumen de 20 mL de YPD en un matraz con capacidad de 250 mL. El cultivo se incubó a 28 °C con agitación (200 rpm) durante 12 h. Para la preservación de la cepa P01a de *Y. lipolytica* se realizaron resiembras periódicas en placas Petri con medio YPD-agar, estas se incubaron a 28 °C por 12 h, finalmente, se conservaron a 4 °C.

6.3.5.2 Cultivo de *E. coli/pCR2.1-TOPO/URA3*

El cultivo de la cepa de *E. coli/pCR2.1-TOPO/URA3* se realizó de la siguiente manera: se tomó con un palillo de madera estéril una colonia de una placa (conservada a 4 °C) con medio LB/ampicilina y se sembró en 20 mL de medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL) en un matraz de 250 mL, el cultivo se

incubó a 37 °C con agitación (200 rpm) durante 16 h. Para la preservación de la cepa de *E.coli/pCR2.1-TOPO/URA3* se realizaron resiembras periódicas en placas con medio LB-agar adicionadas con ampicilina (100 µg/mL), estas se incubaron a 37 °C por 16 h, finalmente, se conservaron a 4 °C.

6.3.6 Extracción de ácidos nucleicos

6.3.6.1 Extracción de DNA genómico (DNAg) de *Y. lipolytica*

La pared de las levaduras está conformada por polisacáridos complejos (β -glucanos, manoproteínas y quitina) resistentes a los métodos convencionales de lisis. Para la extracción de los ácidos nucleicos de *Y. lipolytica* se utilizó el método descrito por Hoffman y Winston (1987) que combina la ruptura mecánica con perlas de vidrio y detergentes, eliminación de proteínas con fenol-cloroformo y precipitación con acetato de sodio y etanol.

A partir de un cultivo en fase de crecimiento logarítmico (12 h) de la cepa P01a, se tomaron 1.5 mL del cultivo celular, se depositaron en un tubo de polipropileno para microcentrifuga (capacidad de 1.5 mL). Para la obtención del paquete celular, el tubo se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min a TA en una microcentrifuga (5415D, Eppendorf®); el sobrenadante se eliminó por decantación. A partir de este momento, todo el proceso se realizó a 4 °C.

El paquete celular se resuspendió en 100 µL de agua estéril y se homogenizó con agitación vigorosa (vortex), durante 1 min. A la suspensión celular obtenida se le adicionaron 200 µL de perlas de vidrio estériles (0.45 a 0.52 mm de diámetro), 400 µL de solución de buffer de lisis TSNT (Tris HCl 50 mM, EDTA [pH 8] 50 mM, SDS 1 % y NaCl 50 mM) y 400 µL de fenol-cloroformo (v/v). Posteriormente, el tubo se agitó vigorosamente con un vortex por intervalos de 1 min agitación/hielo (3 periodos). Subsecuentemente, el tubo se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a TA y la fase acuosa obtenida se transfirió a un tubo nuevo.

Para precipitar los ácidos nucleicos, a la fase acuosa se le adicionó acetato de sodio 3 M pH 5.4 (10 % del volumen recuperado de la fase acuosa) y 1 mL de etanol absoluto frío, lo anterior se mezcló por inversión y se incubó a -20 °C por

1 h. Después, el tubo se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a TA y el sobrenadante se eliminó por decantación. El precipitado obtenido se lavó con 500 µL de etanol al 70 % (etanol + agua) y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min a TA; el sobrenadante se eliminó por decantación y la muestra se dejó secar a TA por 10 min, con el tubo abierto. Finalmente, los ácidos nucleicos se resuspendieron en 50 µL de agua estéril, se cuantificaron utilizando el equipo Nanodrop (2000 UV-Visible, Thermo Scientific) y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

6.3.6.2 Extracción de DNA plasmídico (DNAP) de *E. coli/pCR2.1-TOPO/URA3*

Durante la extracción del DNA plasmídico (minipreps) se aíslan plásmidos circulares (DNA extracromosómico) provenientes de células bacterianas. Este proceso se realizó por la técnica de lisis alcalina con NaOH y el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), dichos agentes provocan lisis celular y liberación de los plásmidos.

A partir de un cultivo en fase de crecimiento logarítmico (16 h) de la cepa de *E. coli/pCR2.1-TOPO/URA3*, se tomó 1.5 mL de cultivo celular y se colocó en un tubo de polipropileno (1.5 mL), el cual se centrifugó (12,000 rpm) a TA durante 30 s; el sobrenadante se eliminó por decantación. El paquete celular bacteriano obtenido se resuspendió en 100 µL de solución I fría (glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM y EDTA 10 mM) y se homogenizó con agitación vigorosa (vortex), durante 30 s. Luego, se adicionaron 200 µL de solución II (NaOH 0.2 N y SDS 1 %); se mezcló por inversión (5 veces) e incubó en hielo de 3 a 5 min. Posteriormente, se agregaron 150 µL de solución III fría (acetato de potasio 3 M y ácido acético al 11.5 %) y se mezcló con agitación vigorosa (vortex) en posición invertida durante 2 min; inmediatamente se colocó en hielo molido (4 °C) durante 3-5 min. Después, el tubo se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a TA; la fase acuosa se recuperó y se transfirió a un tubo nuevo.

Para realizar la precipitación, a la fase acuosa se le adicionó 1 mL de etanol absoluto frío y se dejó reposar por 2 min a TA. Luego, se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min a TA; el sobrenadante se eliminó por decantación. Enseguida, se

añadieron 500 µl de etanol al 70 % (etanol + agua) y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a TA, el sobrenadante se eliminó por decantación. Para eliminar los remanentes de etanol en la muestra, se dejó el tubo abierto por 10 min. El DNAp se resuspendió con 50 µl de agua estéril y se cuantificó con el equipo Nanodrop (2000 UV-Visible, Thermo Scientific). Finalmente, se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6.3.7 Construcción del cassette de interrupción a través de la reacción en cadena de la polimerasa de doble unión (DJ-PCR)

La técnica Double-Joint PCR (DJ-PCR por sus siglas en inglés) consiste en generar moléculas de DNA recombinante a través de tres reacciones consecutivas de PCR (figura 2), una batería de oligonucleótidos previamente diseñados y una enzima Taq DNA polimerasa de alta fidelidad; esta última se usa con el objetivo de disminuir la inserción errónea de nucleótidos durante la replicación.

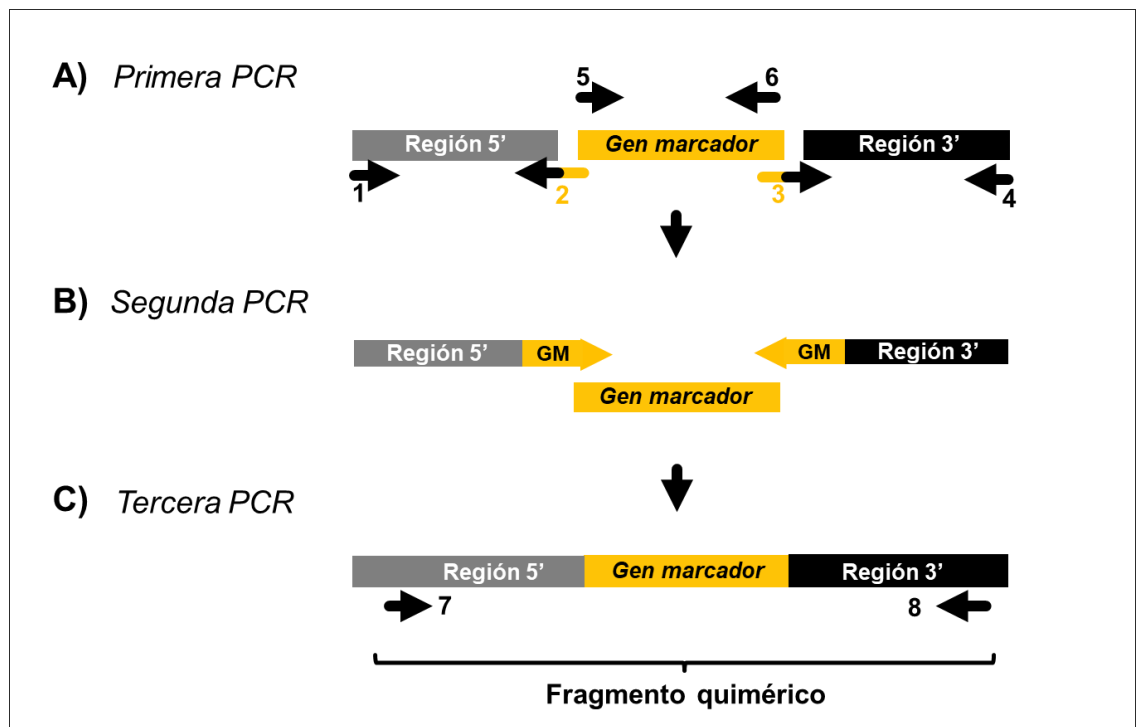


Figura 2. Esquema de la construcción de un fragmento quimérico. A) Primera PCR: amplificación de los componentes con oligonucleótidos específicos (1, 4, 5 y 6) y quiméricos (2 y 3). B) Segunda PCR: regiones quiméricas generadas durante una primera PCR funcionan como oligonucleótidos específicos. C) Amplificación del producto quimérico con oligonucleótidos anidados (7 y 8). GM: gen marcador.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en tubos de polipropileno (200 μ L) utilizando un termociclador (Sprint Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation) o un termociclador de gradiente de temperatura (Maxygen Gradient®; AXYGEN), este último para optimizar las condiciones térmicas de los oligonucleótidos en las diferentes reacciones.

6.3.7.1 Primera reacción de DJ-PCR

Los extremos del cassette **CAT3-URA3-CAT3** se obtuvieron durante una primera reacción de DJ-PCR a partir de DNAg de la cepa P01a, combinando los oligonucleótidos quiméricos y los oligonucleótidos específicos (figura 3) para cada una de las regiones 5' y 3'.

El gen marcador *URA3* clonado previamente en el vector pCR2.1-TOPO en el laboratorio de Desarrollo y Diferenciación de Hongos, CINVESTAV-Irapuato, Guanajuato, México, se obtuvo a partir de DNAp (*E. coli/pCR2.1-TOPO/URA3*) y por medio de reacciones de PCR usando los oligonucleótidos universales T3 y T7 (Invitrogen™) y la enzima Taq DNA polimerasa de alta fidelidad (Platinum® Invitrogen™) (figura 3).

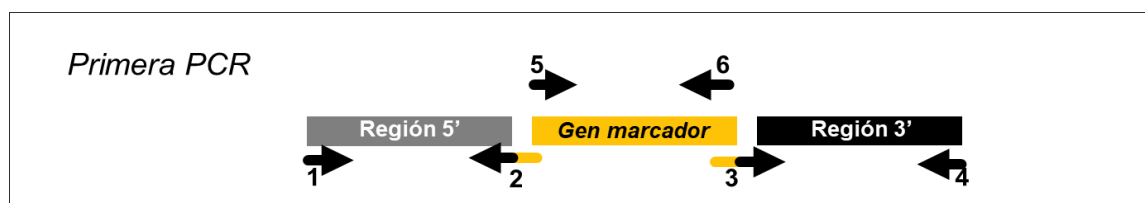


Figura 3. Esquema de los productos de amplificación en la primera reacción de DJ-PCR. Amplificación de los componentes del fragmento quimérico con oligonucleótidos específicos de regiones 5' y 3' del gen *CAT3* (1 y 4), quiméricos (2 y 3) y universales T3 y T7 (5 y 6).

Los componentes necesarios para amplificar las regiones 5' y 3' y el gen marcador *URA3* en las diferentes reacciones de PCR se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Componentes de la primera reacción de DJ-PCR

Reactivo	Volumen (μL)
Agua estéril	14.3
Buffer 10X	2.5
MgSO ₄ 50 mM	1
dNTP mix 10 mM	1
Oligonucleótido <i>sentido</i> [10 mM/μL]	2
Oligonucleótido <i>antisentido</i> [10 mM/μL]	2
DNA _p o DNA _g [1000 ng/μL]	2
DNA Taq polimerasa de alta fidelidad Platinum (5U/μL)	0.2
Volumen total	25

Las condiciones que se emplearon para amplificar las regiones 5' y 3' y el gen marcador *URA3*, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de la primera reacción de DJ-PCR

Etapa	Fases de la PCR	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Desnaturalización inicial	1	94	5
2	Desnaturalización	35	94	1
	Alineamiento		54-59	1
	Extensión		68	1-3
3	Extensión final	1	68	10
4	Conservación		4	∞

El análisis de los tres productos (regiones 5' y 3' del gen *CAT3* y el correspondiente al gen *URA3*) de la primera reacción de DJ-PCR se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.7 %, a partir de las bandas correspondientes a dichos productos se recuperaron del gel de agarosa y se colocaron en un tubo de polipropileno (1.5 mL) para su purificación mediante extracción orgánica. Finalmente, el DNA de cada producto se cuantificó y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6.3.7.2 Electroforesis en geles de agarosa

La comprobación de la correcta amplificación de los fragmentos esperados (en cuanto a su tamaño) por la técnica de DJ-PCR se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis, la cual consiste en la separación de fragmentos de DNA a través de un gel de agarosa (Sambrook y Russell, 2006).

La preparación del gel de agarosa (0.7 a 2.5 %) consistió en lo siguiente: en una balanza de precisión (BL1500, Startorius®) se pesaron entre 0.7 a 2.5 g de agarosa (dependiendo de la concentración requerida) y se depositaron en un matraz que contenía 100 mL de Buffer TAE 1X, (Tris-Acetato 40 mM y EDTA 1 mM). Para facilitar la disolución de la agarosa, el matraz se colocó en una placa de calentamiento (pc-420, Corning Stirrer®); una vez disuelta la agarosa se vaciaron 20 mL en un tubo de polipropileno de fondo cónico (50 mL) y se agregó 1 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL), se mezcló por inversión y se depositó en un molde que contenía un peine de plástico para formar los pocillos donde se depositaron las muestras. La agarosa se dejó gelificar de 20 a 30 min a TA, después se depositó en la cámara de electroforesis (GCHMU-102, CBS Scientific©) equipada con una fuente de poder (Power-Pac 300, BIO RAD®) y se cubrió con buffer TAE 1X.

Los productos de cada reacción de PCR se mezclaron con buffer de carga (0.25 % de azul de bromofenol y 40 % de sacarosa) y se depositaron en cada uno de los pocillos utilizando una micropipeta. Finalmente, la electroforesis se llevó a cabo aplicando una corriente de 20 V durante 5 min y posteriormente 80 V durante 40 min. Los geles de cada reacción se visualizaron en un sistema de fotodocumentación GelDoc-It™ (Imaging System; UVP) y el tamaño de los productos se estimó utilizando el marcador de peso molecular 1 Kb Promega© (compuesto de Blue/Orange 6X Loading Dye y 1 Kb DNA Ladder, proporción 1:1).

6.3.7.3 Purificación de las bandas de DNA por extracción orgánica

Los productos de cada reacción de DJ-PCR, correspondientes al gen *URA3* y fragmentos quiméricos (regiones 5' y 3'), se analizaron en geles de agarosa al 0.7 %. Las bandas correspondientes a cada producto se cortaron del gel de agarosa con un bisturí y se depositaron en tubos cónicos de polipropileno (1.5 mL), después se adicionó un volumen de fenol igual al peso del fragmento de agarosa recuperado y se mezcló por inversión. La mezcla se incubó a -20 °C durante 30 min, para propiciar una adecuada congelación de los fragmentos de agarosa. Transcurrido el tiempo, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min a TA. La fase acuosa recuperada se colocó en tubos nuevos de polipropileno (1.5 mL) y para precipitar el DNA se agregó acetato de sodio 3 M, pH 5.4 (10 % del volumen recuperado) y 1 mL de etanol absoluto frío. Los tubos se incubaron a -20 °C durante 1 h y posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min a TA; el sobrenadante se eliminó por decantación. Después, al precipitado se le adicionó 500 µL de etanol al 70 % (etanol + agua), se centrifugó (12,000 rpm) durante 5 min a TA y el sobrenadante se eliminó por decantación. Para eliminar los remanentes de etanol, la muestra se dejó secar (con el tubo abierto) por 10 min a TA. Finalmente, el DNA se resuspendió en 30 µL de agua estéril, se cuantificó y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6.3.7.4 Segunda reacción de DJ-PCR

Los productos purificados correspondientes a la región quimérica 5', el gen marcador *URA3* y la región quimérica 3', se sometieron a una segunda reacción de PCR en donde fungieron como cadenas molde y oligonucleótidos. Las regiones quiméricas al tener un pequeño fragmento del gen marcador se hibridaron con la secuencia correspondiente al gen *URA3* (cadena molde) (figura 4), generándose la unión: región 5'+*URA3* y región 3'+*URA3*.

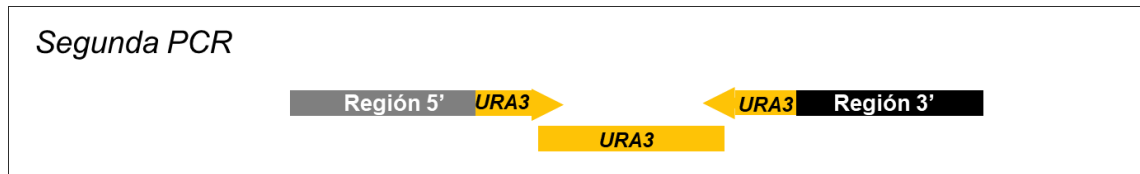


Figura 4. Esquema de los productos de amplificación en la segunda reacción de DJ-PCR. Las regiones quiméricas (5' y 3') cumplen la función de oligonucleótidos al hibridarse con la cadena molde del gen marcador en una segunda reacción de PCR.

La segunda reacción de DJ-PCR se realizó en un volumen final de 25 μL con los componentes que se describen en la tabla 3. Los tres fragmentos purificados (región quimérica 5', gen marcador *URA3* y región quimérica 3') se incorporaron a esta segunda reacción en una proporción 1:3:1, respectivamente. La cantidad total de DNA que se debe de incluir por los tres fragmentos es entre ~100 a 1000 ng.

Tabla 3. Componentes de la segunda reacción de DJ-PCR

Reactivo		Volumen (μL)
Agua estéril		15.3
Buffer 10X		2.5
MgSO ₄ 50 mM		1
dNTP mix 10 mM		1
Proporción 1:3:1	Región 3' (105 ng)	1
	URA3 (310 ng)	3
	Región 5' (105 ng)	1
Taq DNA Polimerasa de alta fidelidad, Platinum (5 U/ μL)		0.2
Volumen total		25

Las condiciones de PCR que se emplearon en esta segunda reacción se describen en la tabla 4; éstas fueron adaptadas de protocolos establecidos por Yang y cols. (2004), Yu y cols. (2004) y Hammond y cols. (2011). Los productos de esta segunda reacción de PCR se analizaron por electroforesis (gel de agarosa 0.7 %) y se identificó por tamaño utilizando el marcador de peso molecular 1 Kb. Estos productos se emplearon en una tercera reacción sin la necesidad de ser purificados.

Tabla 4. Condiciones de la segunda reacción de DJ-PCR

Etapa	Fases de la PCR	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Desnaturalización inicial	1	94	2
2	Desnaturalización	20	94	1
	Alineamiento		59	2
	Extensión		68	3
3	Extensión final	1	68	10
4	Conservación		4	∞

6.3.7.5 Tercera reacción de DJ-PCR: obtención del cassette de interrupción CAT3-URA3-CAT3

La tercera reacción de DJ-PCR se llevó a cabo en un volumen final de 100 µL utilizando los oligonucleótidos anidados diseñados especialmente para esta etapa, ya que determinan el tamaño final del cassette de interrupción (figura 5).

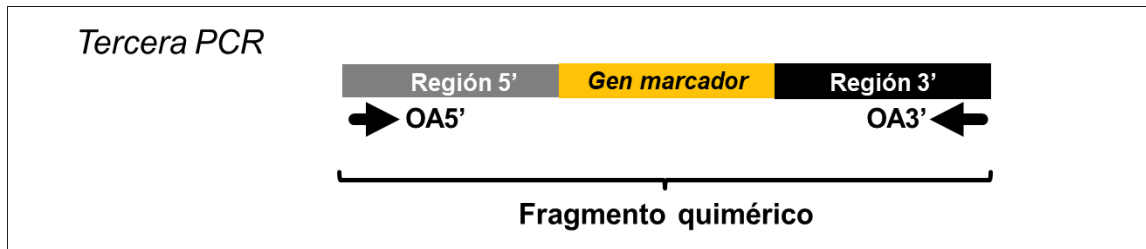


Figura 5. Esquema de la tercera reacción de DJ-PCR. Amplificación del cassette de interrupción con oligonucleótidos anidados: OA5' (oligonucleótido anidado 5') y OA3' (oligonucleótido anidado 3').

Para esta tercera reacción, los productos obtenidos de la segunda reacción de DJ-PCR fungieron como cadena molde. Los elementos que se utilizaron para llevar a cabo esta reacción se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Componentes de la tercera reacción de PCR

Reactivo	Volumen (μL)
Agua estéril	57.6
Buffer 10X	10
MgSO ₄ 50 mM	4
dNTP mix 10 mM	4
Oligonucleótido anidado <i>sentido</i> [10 mM/μL]	8
Oligonucleótido anidado <i>antisentido</i> [10 mM/μL]	8
Productos de segunda DJ-PCR	8
DNA Taq polimerasa de alta fidelidad, Platinum (5U/μL)	0.4
Volumen total	100

Las condiciones que se utilizaron en la tercera reacción de PCR se muestran en la tabla 6. El producto final obtenido (cassette de disrupción) se analizó por electroforesis (gel de agarosa al 0.7 %) y se identificó por tamaño utilizando el marcador de peso molecular 1 Kb; la banda correspondiente a la construcción quimérica se recuperó utilizando un bisturí, se purificó, cuantificó y almacenó a -20 °C hasta su uso.

Tabla 6. Condiciones de la tercera reacción de PCR

Etapa	Fases de la PCR	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Desnaturalización inicial	1	94	5
2	Desnaturalización	35	94	1
	Alineamiento		60	1
	Extensión		68	3
3	Extensión final	1	68	10
4	Conservación		4	∞

Finalmente, el producto se sometió a una reacción de PCR con oligonucleótidos específicos que amplificarán un extremo (5' o 3') del gen *CAT3* y gen marcador (*URA3*), para comprobar la generación del cassette de disrupción.

6.3.8 Generación de las mutantes de *Y. lipolytica*

Después de la obtención de la construcción genética (CAT3+URA3+CAT3), el siguiente paso fue transformar células de *Y. lipolytica* por el método de choque térmico; las condiciones que se emplearon fueron adaptadas del protocolo descrito por Davidow y cols. (1985).

6.3.8.1 Preparación de células litio competentes de *Y. lipolytica*

A partir de cultivos celulares de *Y. lipolytica* incubados a 28 °C durante toda la noche (12 h) se inocularon 50 mL de medio YPD con una cantidad calculada que permitiera obtener una OD₆₀₀ inicial de 0.2. Los cultivos se incubaron a 28 °C con agitación (200 rpm) durante 14 h (hasta obtener una OD₆₀₀ de 1.0). Posteriormente, los cultivos se trasvasaron a tubos cónicos de polipropileno (50 mL) y, para cosechar las células, se centrifugaron a 3,500 rpm durante 5 min a TA (centrifuga J-40, SOLBAT®); después se recuperó el paquete celular, eliminando el sobrenadante.

Enseguida, el paquete celular se sometió a dos lavados, resuspendiendo con 5 mL de buffer TE, pH 7.5 (Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM); en cada uno de los lavados se centrifugó a 3,500 rpm por 5 min a TA. El paquete celular obtenido se resuspendió en 1.5 mL de buffer de acetato de litio, pH 6 (buffer TE [pH 7.5], acetato de litio 0.1 M) y se incubó a 28°C con agitación a 70 rpm durante una hora. Después, el tubo que contenía las células litio competentes se incubó a 4 °C en un recipiente con hielo molido.

6.3.8.2 Transformación de células litio competentes de *Y. lipolytica*

Para la transformación, 100 µL de células litio competentes (recién preparadas) se trasvasaron a tubos de polipropileno fríos (2 mL), enseguida se adicionaron entre 500-1000 ng de DNA correspondientes al cassette de disrupción y 10 µL de DNA de esperma de salmón (5 mg/mL) (Invitrogen™) previamente desnaturalizado (95°C, 5 min), los componentes se mezclaron suavemente (con movimientos circulares) y se incubaron a 28 °C, sin agitación, durante 30 min. Luego, se agregaron 700 µL de Polietilenglicol (PEG) al 40 %

(PEG 4000, CARBOWAX™ (50 % w/v), TE 10X y buffer de acetato de litio 10X, pH 6) y se incubó durante 1 h a 28 °C con agitación a 70 rpm. Transcurrido el tiempo, las células se sometieron a un choque térmico a 37 °C durante 10 min en una placa de calentamiento (Dry-Bath, Thermolyne™) e inmediatamente se colocaron en hielo molido (4° C) durante 15 min; posteriormente se adicionaron 800 µL de buffer TE (pH 7.5). Después, las células se recuperaron por centrifugación (5415D, Eppendorf®) a 4,000 rpm durante 2 min a TA; el sobrenadante se eliminó por decantación y las células se resuspendieron en 230 µL de buffer TE, pH 7.5. Este procedimiento se realizó por duplicado, por lo que al final se obtuvieron dos tubos cada uno de ellos con 230 µL de células transformadas. Para la siembra de estas células, se prepararon 4 placas selectivas de medio mínimo YNB (17 mg/mL) con agar (8 mg/mL) adicionadas con leucina (0.26 mg/mL), glucosa (8 mg/mL) [fuente de carbono] y sulfato de amonio (5 mg/mL) [fuente de nitrógeno]: dos de ellas contenían 150 µL de células transformadas (cada una), mientras que cada una de las dos placas restantes contenía 80 µL de células. Éstas se sembraron en condiciones de esterilidad por el método de siembra por extensión, se depositaron en la superficie del agar utilizando un asa bacteriológica y se extendieron uniformemente (se dejó secar por 15 min). Finalmente, las placas se incubaron en forma invertida a 28 °C durante 5 días.

6.3.8.3 Selección de células transformadas

Para la selección de las posibles mutantes, se consideró su capacidad de crecimiento en el medio selectivo (YNB + leucina, sin uracilo). Aquellas colonias que lograron crecer se inocularon en tubos cónicos de polipropileno (15 mL) que contenían 4 mL de medio mínimo YNB adicionado con leucina (0.26 mg/mL), glucosa (8 mg/mL) y sulfato de amonio (5 mg/mL), y se incubaron a 28 °C con agitación (200 rpm) durante 18-24 h. Posteriormente, se extrajo el DNAg de las células cultivadas (posibles mutantes *Ylcat3-Δ*) y se analizaron mediante

reacciones de PCR y con enzimas de restricción con el fin de comprobar la correcta integración del cassette de disrupción en el genoma de *Y. lipolytica*.

6.3.9 Análisis genotípico de las células transformadas

6.3.9.1 Análisis por reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos

Para determinar si en las clonas que crecieron en medio selectivo (YNB+leucina, sin uracilo) se había insertado el cassette de disrupción (CAT3-URA3-CAT3) en el locus correcto del genoma de *Y. lipolytica*, se realizaron dos análisis: el primero consistió en realizar reacciones de PCR convencionales con oligonucleótidos específicos diseñados sobre regiones que no habían sido manipuladas en la secuencia del gen *CAT3* y la combinación de estos últimos con oligonucleótidos diseñados en la secuencia correspondiente al ORF del gen *URA3*. En la tabla 7 se describen los componentes empleados en este análisis.

Tabla 7. Componentes de una reacción convencional de PCR

Reactivo	Volumen (μL)
Agua estéril	6.9
Buffer 5X	2.5
Oligonucleotido <i>sentido</i> [10 mM/μL]	1
Oligonucleotido <i>antisentido</i> [10 mM/μL]	1
My Taq DNA polimerasa (5 U/μL)	0.1
DNAg [1000 ng/μL]	1
Volumen total	12.5

Las condiciones que se utilizaron para cada una de las reacciones de PCR se muestran en la tabla 8. Todas las reacciones se realizaron en tubos de polipropileno (200 μL), y la presencia de los productos obtenidos se determinó por electroforesis en geles de agarosa (2.5 %).

Tabla 8. Condiciones de una reacción convencional de PCR

Etapa	Fases de la PCR	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Desnaturalización inicial	1	95	5
2	Desnaturalización	35	95	1
	Alineamiento		59	1
	Extensión		72	4
3	Extensión final	1	72	10
4	Conservación		4	∞

6.3.9.2 Análisis por patrón de restricción del cassette de disrupción

Adicional al análisis genotípico por PCR, la cepa mutante *Ylcat3-Δ* fue sometida a un segundo análisis con enzimas de restricción. Para ello, se realizó un análisis *in silico* con el programa NEBcutter (New England BioLabs, <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) para identificar sitios específicos de enzimas de restricción dentro de las secuencias de los productos amplificados por PCR con oligonucleótidos específicos: el cassette de disrupción (cepa mutante *Ylcat3-Δ*) y la secuencia correspondiente al locus del gen *CAT3* y sus extremos (presente en la cepa parental P01a).

Los productos de PCR se sometieron a reacciones de digestión enzimática con la enzima BamHI en un volumen final de 20 μ L en un tubo de polipropileno (200 μ L) a una temperatura de 37 °C durante 1.5 h. Los componentes que se utilizaron para estas reacciones se describen en la tabla 9. Los productos de este análisis se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % y se visualizaron con un sistema de fotodocumentación GelDoc-It™.

Tabla 9. Componentes de una reacción típica de digestión enzimática

Reactivo	Volumen (µL)
Agua estéril	15.9
Buffer E 10X	2
BSA acetilado [10 µg/µL]	0.1
Fragmento quimérico (500 ng)	1
BamHI [10 U/µL]	1
Volumen total	20

6.3.10 Análisis fenotípico

Una vez que se comprobó la correcta inserción del cassette de disrupción en el genoma de *Y. lipolytica*, se analizó la morfología y la capacidad de crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ, en condiciones normales (cultivos en YPD) y en presencia del agente oxidante (YPD + H₂O₂).

6.3.10.1 Morfología de la cepa mutante Ylcat3-Δ

La capacidad de diferenciación (dimorfismo) de la cepa mutante Ylcat3-Δ se evaluó mediante la siembra de ésta en un medio rico en nutrientes (YPD) y en un medio mínimo (YNB+ leucina).

Para documentar el dimorfismo de la cepa mutante Ylcat3-Δ se realizaron cultivos (OD₆₀₀ inicial de 0.2) en medio YPD (control) y medio mínimo YNB adicionado con leucina y/o uracilo (según auxotrofia de la cepa), glucosa [fuente de carbono] y acetato de amonio [fuente de nitrógeno]. Los cultivos se incubaron a 28 °C con agitación vigorosa (200 rpm) durante 12-20 h (tiempo óptimo para el crecimiento micelial) (Guevara-Olvera, Calvo-Mendez y Ruiz-Herrera, 1993). La diferenciación celular se observó sin tinción alguna usando la técnica de microscopía en contraste de fase en un microscopio trinocular invertido (AE21, Motic), utilizando el objetivo 40X. Las células se consideraron micelio si éstas se presentaban en forma de filamentos alargados y levaduras cuando se observaba una estructura esférica u ovoide.

La identificación de los posibles cambios en la morfología de las colonias se realizó a través de la evaluación de los siguientes parámetros: forma, contorno, elevación, tamaño, textura, apariencia y pigmentación, tanto en medio YPD como en YPD más la adición de H₂O₂ 5 mM. Para ello, células de la cepa mutante Ylcat3-Δ y parental se sembraron por el método de siembra por estría en medio YPD-agar con o sin la adición del agente oxidante. Después de 72 h de incubación, la morfología de colonias aisladas se documentó a través de fotografías.

6.3.10.2 Susceptibilidad de la cepa mutante Ylcat3-Δ al efecto del H₂O₂

El análisis de la susceptibilidad de la cepa mutante Ylcat3-Δ al efecto del H₂O₂ se realizó a través de experimentos cualitativos y cuantitativos que permitieran evaluar el efecto de este compuesto sobre el crecimiento de la cepa mutante; los resultados se compararon con los obtenidos en la cepa parental (P01a).

6.3.10.2.1 Análisis cualitativo

El análisis cualitativo de la cepa mutante Ylcat3-Δ se realizó por medio de diluciones seriadas de un cultivo de esta cepa, las cuales se sembraron por el método de dilución en serie por goteo en placa (plate-serial dilution spotting) como lo describe Sherman, (2002). Para ello, se realizaron los cálculos necesarios para obtener las concentraciones deseadas de H₂O₂ (1.0, 3.0, 4.5, 5.0 y 10 mM) en 25 mL de medio YPD-agar. Los elementos (YPD-agar + agente oxidante) se mezclaron en un tubo de polipropileno de 50 mL y se vertieron en cajas Petri.

A partir de inóculos de ambas cepas (mutante Ylcat3-Δ y P01a) en medio YPD se realizaron diluciones seriadas 1:10, las cuales fueron preparadas de la siguiente manera: de cultivos en fase de crecimiento logarítmico con una OD₆₀₀ ajustada a 1.0 se tomaron 100 μL de cultivo y se transfirieron a un tubo de polipropileno (1.5 mL) que contenía 900 μL de agua estéril; los elementos se

homogenizaron vigorosamente con vortex; este proceso se repitió secuencialmente para preparar cada una de las diluciones (hasta 1×10^{-6}), de cada una de éstas se sembraron 3 μ L sobre las placas adicionadas con las diferentes concentraciones del agente oxidante; las gotas de la dilución se dejaron secar durante 15 min a TA; una vez sembradas, las placas se incubaron a 28 °C por 72 h en posición invertida cubriéndolas con papel aluminio para protegerlas de la exposición de la luz. Para documentar los cambios del crecimiento de las colonias se tomó una fotografía cada 24 h con un sistema de fotodocumentación (GelDoc-It Imaging System, UVP).

6.3.10.2.2 Análisis cuantitativo

Para determinar las posibles diferencias cuantitativas en el crecimiento de la cepa mutante *Ylcat3-Δ*, con respecto a la parental, se monitoreó la densidad óptica (OD_{600}) de los cultivos con o sin la adición de H_2O_2 a diferentes tiempos. Durante esta etapa, cultivos de la cepa P01a en medio YPD, con y sin la adición del agente oxidante, fueron considerados como control.

6.3.10.2.3 Efecto del H_2O_2 sobre el crecimiento de la cepa mutante *Ylcat3-Δ*

Para analizar de manera cuantitativa la susceptibilidad de la cepa mutante *Ylcat3-Δ*, se monitoreó su crecimiento (OD_{600}) en presencia de H_2O_2 (5 mM) a diferentes tiempos. Para ello se realizaron cultivos (OD_{600} inicial de 0.2) de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* y parental, en matraces de 250 mL que contenían 50 mL de medio YPD con o sin la adición del agente oxidante, los cultivos se incubaron a 28 °C con agitación orbital (200 rpm). Los resultados fueron documentados con lecturas de OD_{600} cada 24 h hasta las 192 h de incubación; realizando diluciones que permitieran obtener una absorbancia en un rango de 0.1-0.4.

6.4 Análisis estadístico

Los experimentos del análisis cuantitativo se realizaron por triplicado y fueron procesados con el software SPSS V. 23.0 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, NY: IBM Corp.). Para realizar las comparaciones de

crecimiento entre cepas (mutante y parental) en los diferentes tiempos de incubación, los valores de OD₆₀₀ se sometieron a un análisis de normalidad con la prueba de Kolmogorov Smirnov. Después, los datos (OD₆₀₀) se transformaron al logaritmo natural (Ln) para llevar a cabo el análisis descriptivo y la prueba ANOVA factorial de medidas repetidas (ajustada con el método de Bonferroni), para conocer la igualdad o diferencia de las varianzas de cada uno de los grupos de este estudio se realizó el test de Levene. Las diferencias se consideraron significativas cuando el *valor P* obtenido fue <0.05. Finalmente, los datos obtenidos se graficaron en el software estadístico GraphPad Prism V. 7.0 (GraphPad Software, Inc.).

7. RESULTADOS

7.1 Análisis *in silico* del gen *CAT3* de *Y. lipolytica* y diseño de oligonucleótidos

El análisis *in silico* permitió corroborar, en el genoma de *Y. lipolytica*, la secuencia correspondiente al gen *CAT3*. Esta secuencia se localiza en el cromosoma F y tiene un tamaño de 1705 pb, su etiqueta de identificación es YAL10F30987g y presuntamente codifica para la enzima catalasa 3 (492 aa).

La putativa proteína codificada por el gen *CAT3* tiene un porcentaje de identidad del 65-73% con catalasas de otras especies de levadura: *Saccharomyces cerevisiae*, *Sugiyamaella lignohabitans*, *Rasamsonia emersonii*, *Aspergillus rambellii* y *Candida tropicalis* (tabla 10).

Tabla 10. Comparación de la secuencia de DNA que codifica para la proteína *CAT3* de *Y. lipolytica* con catalasas de distintas especies de levaduras

Especie	Identidad (%) YAL10F30987p
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Catalasa A (494 aa) CDO56802.1*	73 (353/484)**
<i>Sugiyamaella lignohabitans</i> , Catalasa A (498 aa) XP_018737456.1*	70 (338/485)**
<i>Rasamsonia emersonii</i> , Catalasa (567 aa) XP_013331976.1*	69 (328/477)**
<i>Aspergillus rambellii</i> , Catalasa (791 aa) KKK26461.1*	68 (326/477)**
<i>Candida tropicalis</i> , Catalasa (485 aa) BAD77828.1*	65 (315/486)**

Secuencias obtenidas de NCBI. *ID número de identificación en GenBank. **Porcentaje de identidad de aminoácido: No. residuos idénticos/No. residuos comparados.

Una vez que se identificó y analizó la secuencia del gen *CAT3*, se diseñaron oligonucleótidos específicos y oligonucleótidos quiméricos, estos últimos con una longitud entre 36 y 37 pb compuestos de: 17 a 18 pb homólogas con la secuencia del gen *CAT3* y de 18 a 20 pb homólogas con el gen marcador (*URA3*). En la tabla 11 se muestran las principales características de los oligonucleótidos diseñados para la construcción del cassette de interrupción (*CAT3-URA3-CAT3*) y el análisis genotípico de las putativas mutantes obtenidas.

Tabla 11. Oligonucleótidos diseñados para las diferentes etapas de este trabajo

Nombre	Secuencia 5'→3'	Tm (°C)	Etapas de uso
1	CAT-F3' GCTTCCAGTAGTGGCAATATGCGTG	59	Amplificación de la región 5' del cassette de disrupción y comprobación de la mutante
	CAT-R5' CATCCTGAGACCATCCTTGTCGG		Amplificación de la región 3' del cassette de disrupción y comprobación de la mutante
2	CAT-QF * <u>GAGAGAGAAGCCAAGATAC</u> GTGTGTTAGCGTTGTAGT	59	Amplificación de la región 3' del cassette de disrupción (CAT3 y Ext 5'URA3)
	CAT-QR GAGTCAGACAGATACTC <u>GTCCTCGGCGTTTCGCTACC</u> *		Amplificación de la región 5' del cassette de disrupción (CAT3 y Ext 3'URA3)
3	CAT3-F ** <u>GTCCGTCCTCGCTCTAACACGTTG</u>	60	Amplificación del cassette de disrupción
	CAT3-R ** <u>GGTCTTTTCGCTTGGGCTTGATACG</u>		
4	URA3-F interno GGCCTGCGAGCTGGTGCCGAGG	59	Comprobación de la presencia del gen marcador y orientación del cassette de disrupción en la cepa mutante
	URA3-R interno CCTCGGCACCAGCTCGCAGGCC		

*Los fragmentos en **itálicas y negritas** corresponden a la secuencia nucleotídica del gen marcador *URA3* (ID: YALI0E30635g). **Secuencias correspondientes a los oligonucleótidos anidados. 1) Oligonucleótidos que amplifican la región 5' y 3' del cassette de disrupción. 2) Oligonucleótidos quiméricos. 3) Oligonucleótidos anidados. 4) Oligonucleótidos que amplifican al gen marcador *URA3*.

7.2 Construcción del cassette de interrupción (*CAT3-URA3-CAT3*) y generación de la cepa mutante *Ylcat3-Δ*

La construcción del cassette de interrupción se realizó por medio de la técnica de DJ-PCR. En la figura 6, se muestra el esquema general y cada una de las diferentes etapas de la técnica de DJ-PCR.

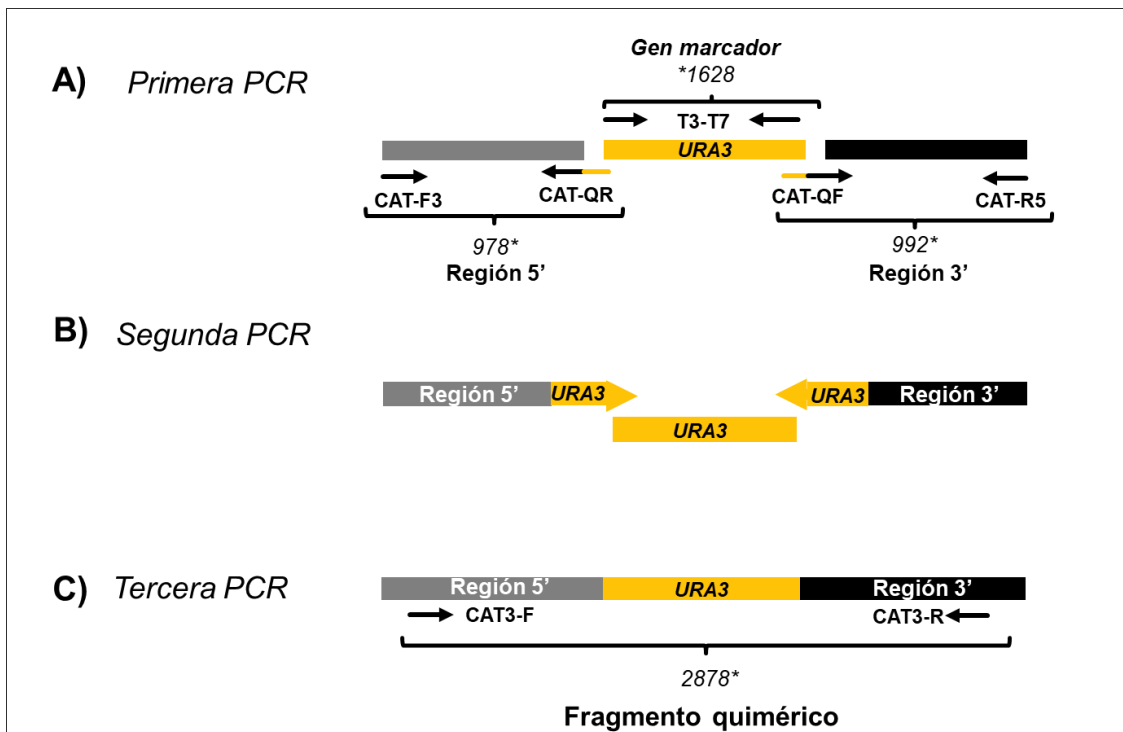


Figura 6. Esquema general para la construcción del cassette de interrupción. A) Primera reacción de DJ-PCR: amplificación de las regiones 5' y 3' con los oligonucleótidos quiméricos y específicos, y amplificación del gen marcador *URA3* con los oligonucleótidos universales. B) Segunda reacción de DJ-PCR: hibridación de las regiones 5' y 3' del gen *CAT3* con el gen marcador (*URA3*). C) Tercera reacción de DJ-PCR: amplificación del cassette de interrupción (*CAT3-URA3-CAT3*) con los productos de la segunda reacción y los oligonucleótidos anidados. *Los tamaños de banda se representan en pares de bases (pb).

En la primera reacción de DJ-PCR se amplificaron los fragmentos correspondientes a las regiones 5' y 3' del gen *CAT3* y el gen marcador *URA3*; la región 5' (978 pb) se amplificó con los oligonucleótidos CAT-F3' y CAT-QR; la región 3' (992 pb) se amplificó con los oligonucleótidos CAT-QF y CAT-R5'; la región correspondiente al gen *URA3* (1628 pb), que previamente había sido clonada en el vector pCR 2.1 TOPO, se obtuvo por amplificación con los oligonucleótidos universales T3 y T7 (Invitrogen®) y sirvió

como hebra molde para la segunda reacción de DJ-PCR. Los productos obtenidos de la primera reacción de DJ-PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7 % (figura 7). Después de haber comprobado el tamaño esperado de los productos de DJ-PCR, éstos se recuperaron del gel de agarosa y se purificaron utilizando un método de extracción orgánica.

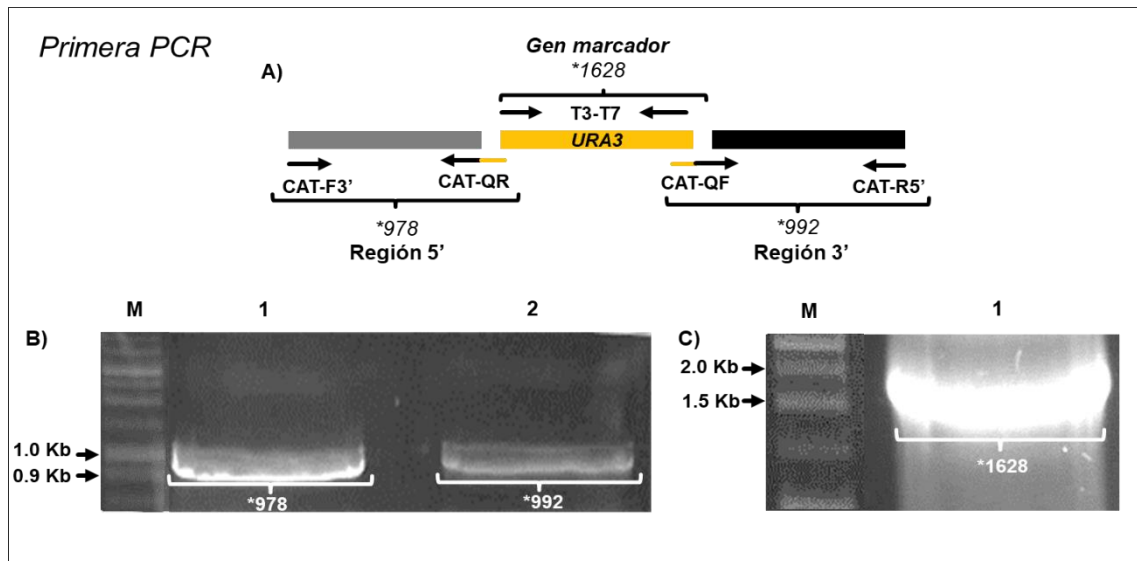


Figura 7. Obtención de los productos clave para la construcción del cassette de interrupción. A) Esquema de la primera reacción de DJ-PCR. B) Productos amplificados de las regiones 5' (1) y 3' (2) del gen *CAT3* y detectados mediante la técnica de electroforesis (gel de agarosa al 0.7 %). C) Producto amplificado correspondiente al gen marcador *URA3* (1) y detectado por la técnica de electroforesis (gel de agarosa al 0.7 %). (M) Marcador de peso molecular 1 Kb. *Los tamaños de banda se representan en pares de bases (pb).

Para la segunda reacción por DJ-PCR, los fragmentos purificados: región 5', *URA3* y región 3', se mezclaron en una proporción 1:3:1 (105:310:105 ng, respectivamente) acumulando una cantidad de DNA total por los tres fragmentos de ~500 ng. Los fragmentos correspondientes a las regiones 5' y 3' del gen *CAT3* fungieron como oligonucleótidos en esta segunda reacción de DJ-PCR. Una pequeña cantidad (~5 µl) de esta segunda PCR se analizó en un gel de agarosa al 0.7 %. La purificación de los productos remanentes de esta PCR no fue necesaria (figura 8).

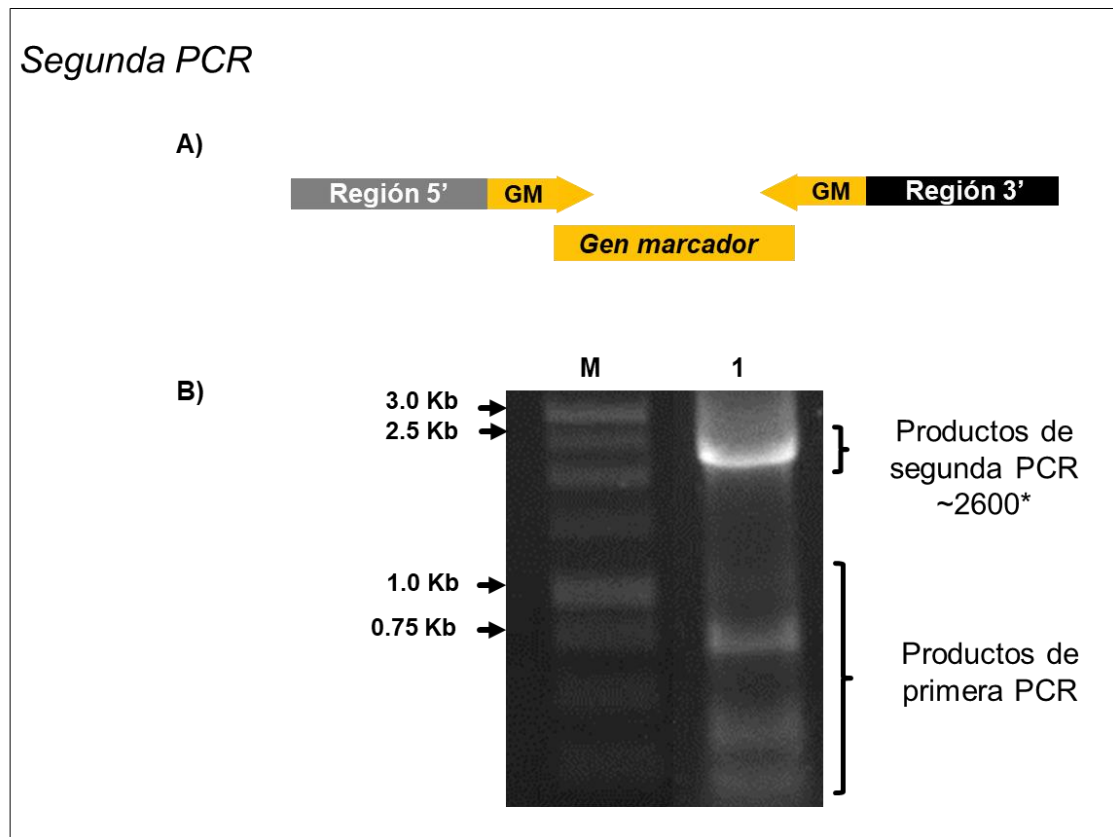


Figura 8. Productos de la segunda reacción de PCR. A) Esquema de los productos de la segunda reacción de DJ-PCR. B) Análisis de los productos obtenidos de la segunda reacción de PCR y productos remanentes de la primera reacción de PCR (1) a través de la técnica de electroforesis (gel de agarosa al 0.7 %). (M) Marcador de peso molecular 1Kb. *El tamaño de las bandas se presentan en pares de bases (pb).

La tercera reacción de DJ-PCR se realizó con 8 μ L del producto de la segunda reacción y con los oligonucleótidos anidados CAT3-F y CAT3-R. El tamaño del amplicón obtenido fue de 2878 pb, correspondiente al cassette de disrupción (CAT3-URA3-CAT3); el tiempo de elongación para esta reacción fue de acuerdo al tamaño esperado de la construcción genética (3 min). El producto final se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.7 %, luego se recuperó y purificó (figura 9).

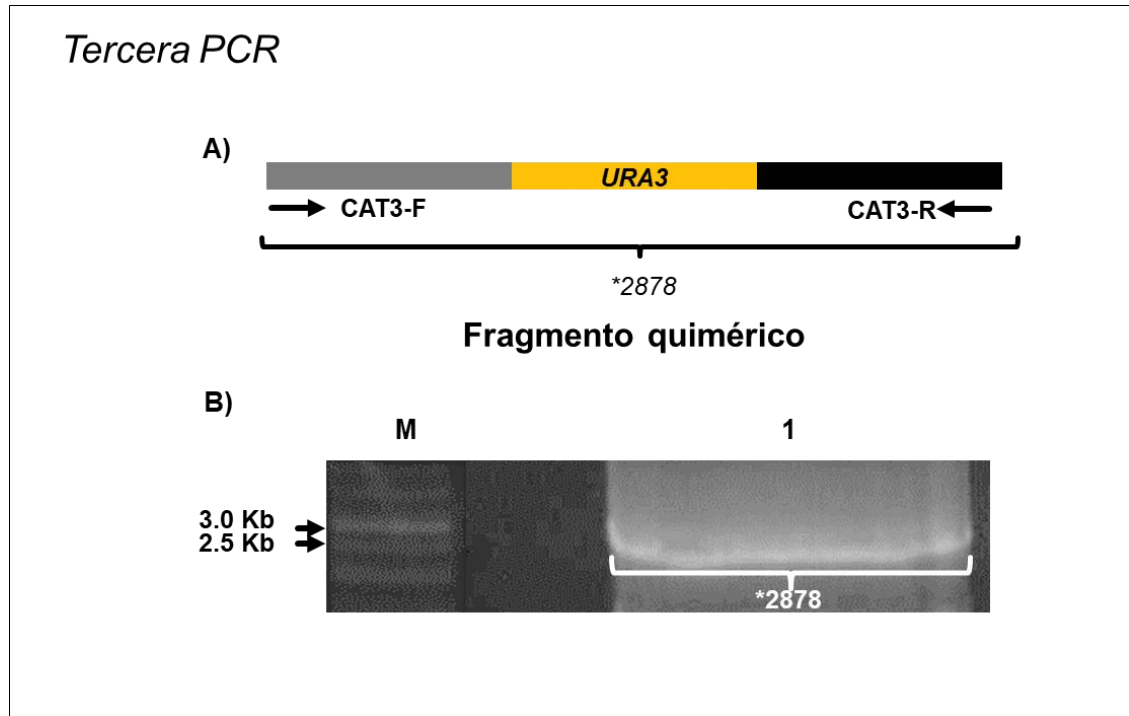


Figura 9. Obtención del cassette de interrupción. A) Esquema del producto de la tercera reacción de DJ-PCR obtenido con los oligonucleótidos anidados. B) Análisis de la construcción genética a través de la técnica de electroforesis (gel de agarosa al 0.7 %): (1) cassette de interrupción amplificado con los oligonucleótidos anidados. (M) Marcador de peso molecular 1Kb. *El tamaño de la banda se presenta en pares de bases (pb).

Para comprobar la presencia del gen marcador en el cassette de interrupción se realizó un análisis a través de la técnica de PCR con los oligonucleótidos CAT3-F y URA3-R interno; amplificando un fragmento de 1436 pb. El producto obtenido se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 % (figura 10).

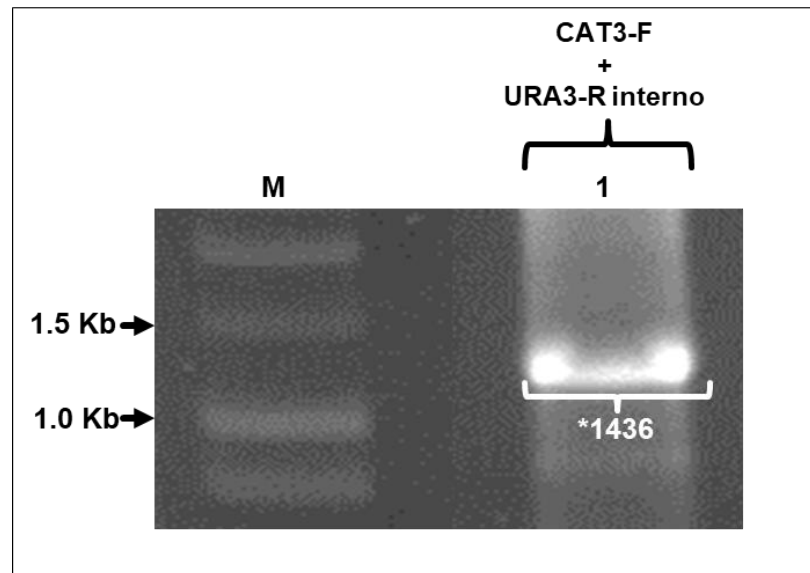


Figura 10. Análisis del cassette de disrupción. Amplificación del fragmento correspondiente a la región 5'+URA3 (1) de la construcción genética con los oligonucleótidos CAT3-F y URA3-R interno (gel de agarosa al 0.7 %). (M) Marcador de peso molecular 1 Kb. *El tamaño de banda se presenta en pares de bases (pb).

Para la generación de la mutante *Ylcat3-Δ*, células litio-competentes de *Y. lipolytica* se transformaron por choque térmico para introducir el DNAg correspondiente a la construcción genética (2878 pb) en el genoma de *Y. lipolytica*. Cinco días después de la transformación, se observó el crecimiento de 8 colonias en las diferentes placas con medio selectivo (YNB con agar) adicionado con leucina, glucosa [fuente de carbono] y acetato de amonio [fuente de nitrógeno] (figura 11A); las colonias se recuperaron de la placa y se sembraron en medio mínimo YNB (líquido) adicionado con leucina, glucosa y acetato de amonio (figura 11B).

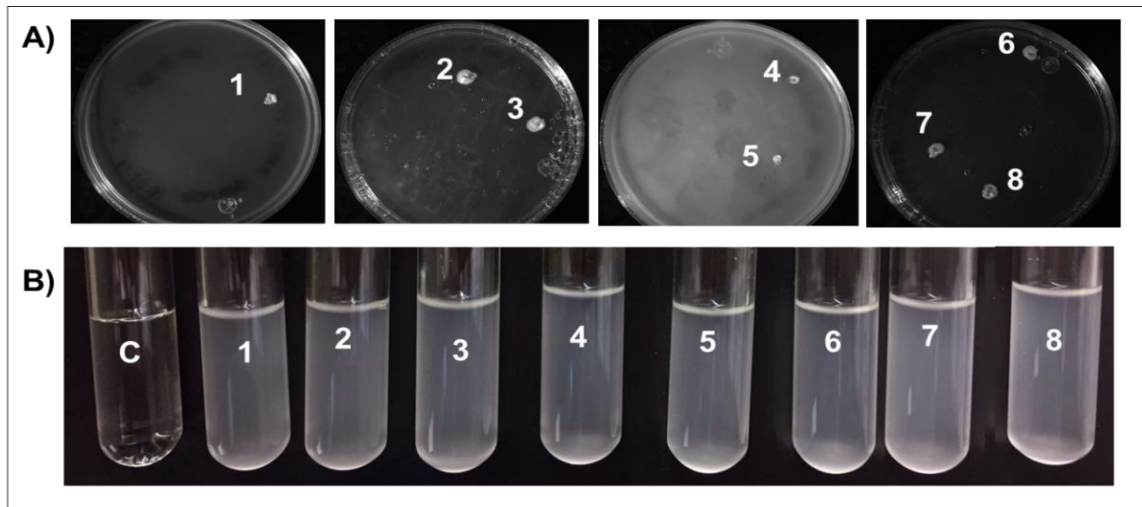


Figura 11. Crecimiento de las putativas mutantes *Ylcat3-Δ* en medio selectivo YNB (adicionado con leucina, glucosa y acetato de amonio). A) Crecimiento de colonias en placas de medio selectivo obtenidas como producto de la transformación de la cepa P01a (Mat A, *leu2* -270, *ura3* -302) con el cassette de disrupción (*CAT3-URA3-CAT3*), después de 5 días de la transformación. B) Cultivos en medio selectivo líquido: 1-8 putativas mutantes y (c) cepa control P01a; las putativas mutantes se sembraron en medio mínimo YNB (adicionado con leucina), la cepa control por su parte se sembró en medio mínimo YNB adicionado solo con leucina. Los cultivos se incubaron a 28 °C con agitación (200 rpm) durante 24 h.

7.3 Análisis genotípico de las posibles cepas mutantes *Ylcat3-Δ*

Para llevar a cabo el análisis genotípico de las posibles mutantes, se extrajo el DNAg de las células correspondientes a los cultivos de las 8 colonias recuperadas. El DNAg obtenido fungió como hebra molde en las reacciones de PCR que se realizaron con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos específicos descritas en la tabla 12.

Tabla 12. Combinación de oligonucleótidos para la caracterización genotípica de las cepas mutantes *Ylcat3-Δ*

Oligonucleótidos	T _m (°C)	Tamaños de amplicones (pb)	
		P01a	<i>Ylcat3-Δ</i>
CAT-F3' + URA3-R interno	60	No	1757
URA3-F interno + CAT-R5'	60	No	1824
CAT-F3' + CAT-R5'	59	3680	3560

La presencia del cassette de disrupción en el genoma de las posibles mutantes *Ylcat3-Δ*, se comprobó mediante reacciones de PCR con la

combinación de los oligonucleótidos CAT-F3' y URA3-F interno, amplificando un fragmento de 1757 pb; y la combinación de los oligonucleótidos CAT-R5' y URA3-R interno, obteniendo un amplicón de 1824 pb. Los productos de las diferentes PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7 %. Como resultado de este análisis, se demostró que solo en tres clonas (2, 5 y 7), de las 8 que crecieron en las placas con medio selectivo (YNB+leucina), se había insertado la construcción genética (figura 12A). Para los siguientes análisis se decidió utilizar la clona 2 debido a la presencia de bandas únicas con ambas combinaciones de oligonucleótidos.

En la figura 12B se presenta un segundo análisis de reacciones de PCR con DNAg de la clona 2 y la cepa P01a (control), el cual permitió corroborar la presencia del gen marcador *URA3* en el genoma de la mutante (clona 2) y la ausencia de éste en la cepa parental (P01a). En este análisis se utilizaron los oligonucleótidos CAT-F3' y URA3-F interno, amplificando un fragmento de 1757 pb; y los oligonucleótidos CAT-R5' y URA3-R interno obteniendo un amplicón de 1824 pb. Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2.5 %.

La clona 2 y la cepa P01a se sometieron a una tercera reacción de PCR con los oligonucleótidos CAT-F3' y CAT-R5'. Este análisis permitió corroborar, a través de tamaños de bandas, la presencia del cassette de interrupción (3560 pb) en la cepa mutante y la ausencia de la construcción genética en la cepa P01a (3680 pb); el tamaño del fragmento de la cepa parental corresponde al ORF del gen *CAT3* y sus extremos. Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7 % (figura 12C).

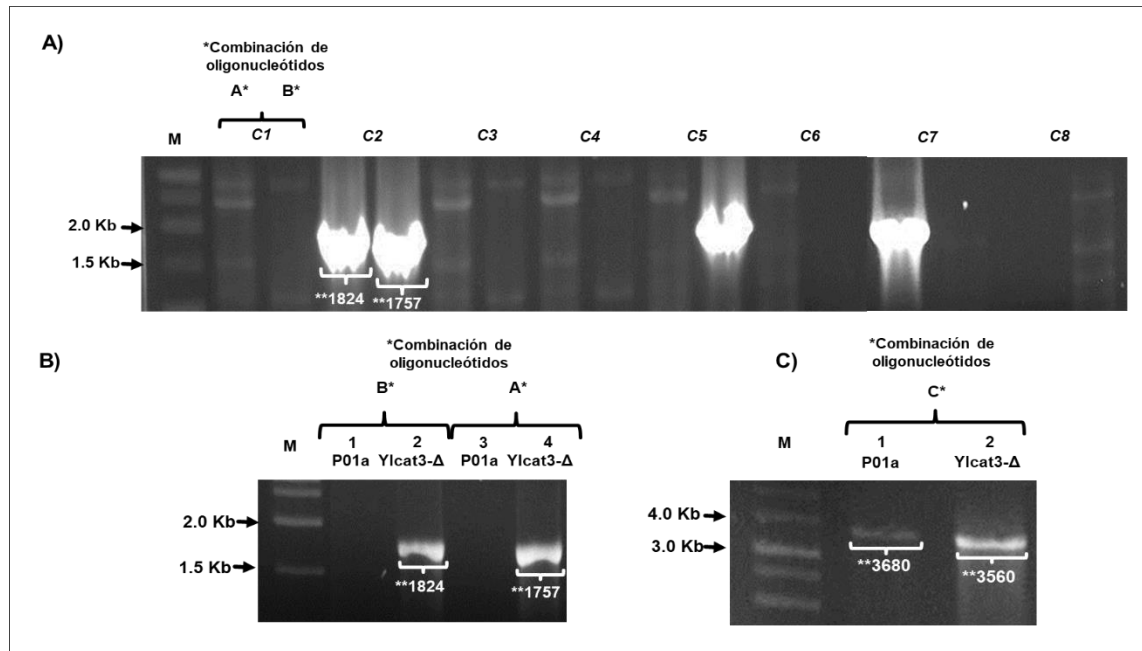


Figura 12. Análisis genotípico mediante reacciones de PCR. A) Análisis de la presencia del cassette de interrupción en las 8 clonas con la combinación de oligonucleótidos *A y B (gel de agarosa al 0.7 %). B) Análisis de la inserción del gen *URA3* en el locus correspondiente al gen *CAT3* con la combinación de oligonucleótidos *A y B en la cepa mutante *Ylcat3-Δ* (clona 2) (2 y 4) y en la cepa *P01a* (1 y 3) (gel de agarosa al 2.5 %). C) Análisis de la presencia de la construcción genética en el genoma de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* (2) y de la cepa *P01a* (1) con los oligonucleótidos específicos *C (gel de agarosa al 0.7 %). (M) Marcador de peso molecular 1 Kb. *Combinación de oligonucleótidos: A. *URA3-F* interno + *CAT-R5'*; B. *CAT-F3'* + *URA3-R* interno; C. *CAT-F3'* + *CAT-R5'*. **Los tamaños de bandas se presentan en pares de bases (pb).

Adicionalmente al análisis genotípico por PCR con los oligonucleótidos específicos, con el cual se comprobó la correcta inserción del cassette de interrupción, los productos obtenidos con los oligonucleótidos *CAT-R5'* y *CAT-F3'* (cassette de interrupción en la cepa mutante *Ylcat3-Δ* y ORF del gen *CAT3* y sus extremos en la cepa parental) se purificaron y se sometieron a reacciones de digestión enzimática. Para ello, se realizó previamente un análisis *in silico* que mostró los posibles sitios de restricción con la enzima *Bam*HI en cada una de las secuencias correspondientes a las bandas obtenidas: cepa *P01a* con dos sitios de restricción y cepa mutante *Ylcat3-Δ* sin ningún sitio de restricción (figura 13A).

Los productos de las diferentes reacciones de digestión enzimática se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % (figura 13B).

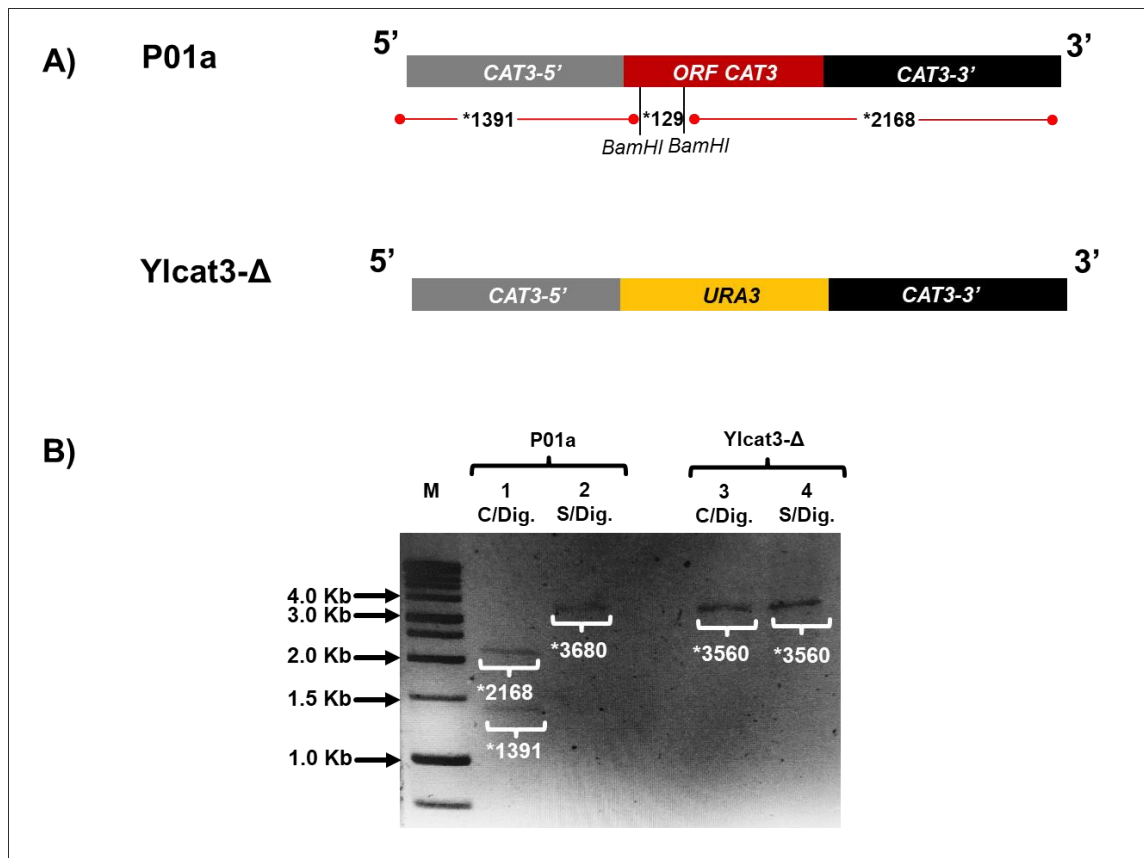


Figura 13. Análisis del fragmento insertado en el locus correspondiente al gen *CAT3* en la cepa mutante *Ylcat3-Δ*. A) Esquema del patrón de restricción con la enzima *Bam*HI de las cepas mutante *Ylcat3-Δ* y parental. B) Análisis de los productos de digestión con la enzima *Bam*HI, en la cepa mutante (3 y 4) y en la parental (1 y 2) (gel de agarosa al 1.5 %). (M) Marcador de peso molecular 1 Kb. *Los tamaños de bandas se presentan en pares de bases (pb). C/Dig: con digestión; S/Dig: sin digestión.

7.4 Análisis fenotípico de la cepa mutante *Ylcat3-Δ*

El análisis fenotípico comprendió: la evaluación del dimorfismo, la morfología de colonia y la susceptibilidad de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* al estrés oxidativo ocasionado por el H_2O_2 . En todos los experimentos realizados se incluyó a la cepa P01a como control y para fines comparativos.

7.4.1 Dimorfismo de la cepa mutante *Ylcat3-Δ*

Para determinar si la eliminación del gen *CAT3* modifica la capacidad de diferenciación (dimorfismo) de *Y. lipolytica*, la cepa mutante *Ylcat3-Δ* y la parental se cultivaron (P01a) en un medio rico en nutrientes (YPD) y en un medio mínimo en nutrientes (YNB) (ver 6.3.10.1). En la figura 14 se muestra la morfología celular de ambas cepas. Los resultados muestran que tanto el crecimiento de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* como el de la cepa P01a en medio mínimo (YNB) fue en forma de micelio, mientras que en presencia del medio YPD el crecimiento de ambas cepas fue en forma de levadura.

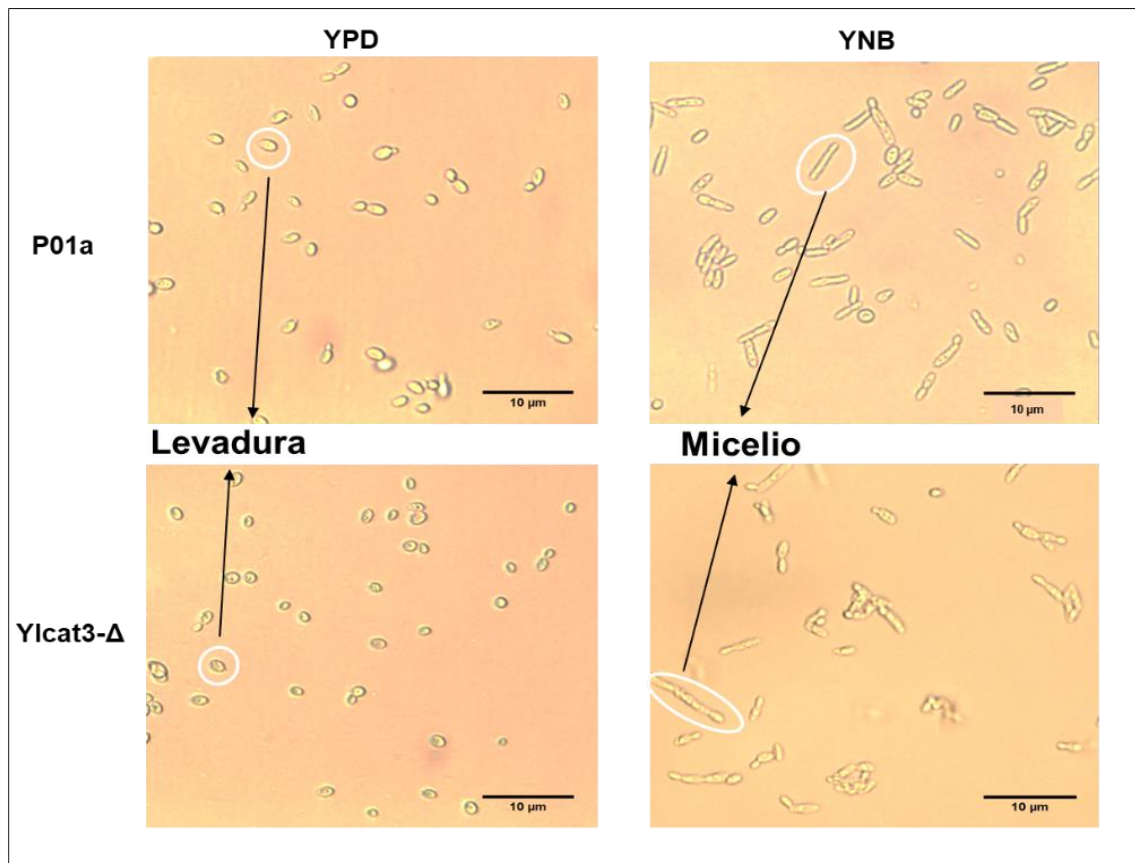






Figura 14. Morfología celular de la cepa mutante *Ylcat3-Δ*. Las imágenes corresponden a células cultivadas en medio YPD y medio mínimo YNB (adicionado con leucina y/o uracilo, según auxotrofia de la cepa), durante 12 h (medio YPD) y 24 h (medio YNB). Las células se observaron con la técnica de microscopía en contraste de fases en un microscopio trinocular invertido utilizando el objetivo 40X; estimación del tamaño de las células a través de una barra de escala, 10 μm.

Para analizar los posibles cambios en la morfología de colonia de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* y parental, ambas cepas se cultivaron por el método de siembra

por estría en placas con medio YPD-agar con y sin la adición de H₂O₂ (5 mM). En la tabla 13 se describen los resultados obtenidos del análisis morfológico de las colonias de cada una de las cepas después de 72 h de incubación. Los resultados de este análisis demuestran que la morfología de colonia de la cepa mutante Ylcat3-Δ sembrada en medio YPD con agar no presentó cambios con respecto a la morfología que se presenta en la colonia de la cepa P01a (control). Sin embargo, bajo la exposición al agente oxidante (H₂O₂) ambas cepas modificaron características como: la forma (irregular) y la textura (rugosa) y en particular en la cepa mutante Ylcat3-Δ se modificó el tamaño, el cual fue pequeño con respecto al tamaño de la cepa parental, indicando que el crecimiento de la cepa mutante sufre un retraso en su crecimiento en presencia del H₂O₂.

Tabla 13. Características morfológicas de la cepa mutante Ylcat3-Δ en ausencia y presencia del agente oxidante H₂O₂

*Características	Colonias en YPD sin agente oxidante		Colonias en YPD + H ₂ O ₂ (5 mM)	
	P01a	Ylcat3-Δ	P01a	Ylcat3-Δ
				
Forma	Circular	Circular	<i>Irregular</i>	<i>Irregular</i>
Contorno	Ondulada	Ondulada	Ondulada	Ondulada
Elevación	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
Tamaño	Normal	Normal	Normal	<i>Pequeña</i>
Textura	Lisa	Lisa	<i>Rugosa</i>	<i>Rugosa</i>
Apariencia	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
Pigmentación	Crema	Crema	Crema	Crema

*La morfología de la colonia mutante Ylcat3-Δ se evaluó con respecto a las características que se presentaron en la colonia P01a (control).

7.4.2 Susceptibilidad de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* al agente oxidante (H_2O_2)

La susceptibilidad de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* al H_2O_2 se evaluó por el método de dilución en placa. Para ello, se realizó la siembra de las cepas mutante *Ylcat3-Δ* y P01a (control) en placas adicionadas con diferentes concentraciones de H_2O_2 (1.0, 3.0, 4.5, 5.0 y 10 mM); como control, las dos cepas se sembraron en una placa con medio YPD-agar. Los resultados evidenciaron que el crecimiento de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* en la placa con medio YPD sin la adición del agente es similar al crecimiento de la cepa P01a. Además, se observó que la concentración 10 mM de H_2O_2 fue letal para ambas cepas, puesto que no se observó crecimiento después de las 72 h de incubación; la concentración 5 mM de H_2O_2 mostró tener un efecto inhibitorio del crecimiento de ambas cepas a las 24 h, limitando el crecimiento de ambas cepas aún después de las 72 h de incubación; la concentración 4.5 mM de H_2O_2 afectó el crecimiento de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* de una manera menos agresiva en comparación con la concentración 5 mM; las concentraciones 1 y 3 mM de H_2O_2 retrasaron el crecimiento de la cepa mutante *Ylcat3-Δ*, pero estas concentraciones no impidieron que se continuara con la duplicación celular de ambas cepas (figura 15).

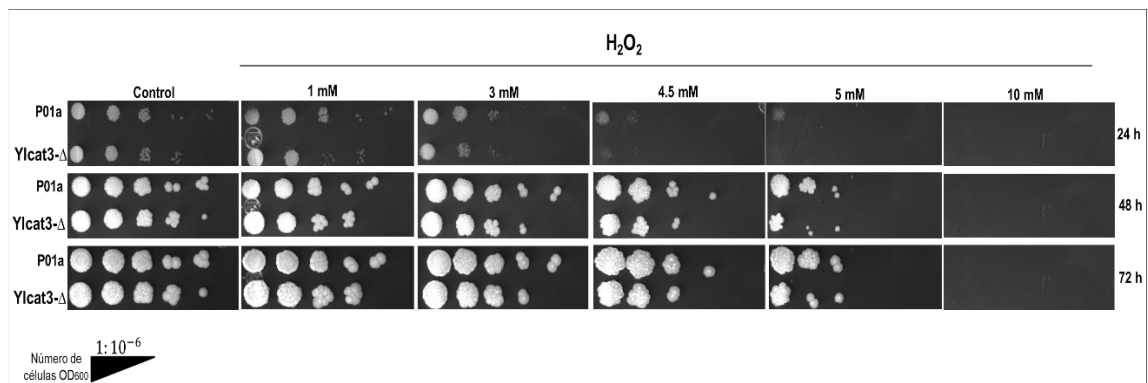


Figura 15. Efecto del H_2O_2 sobre el crecimiento de la cepa mutante *Ylcat3-Δ*. Crecimiento de las cepas en medio YPD agar adicionadas con diferentes concentraciones de H_2O_2 (1.0-10 mM), incubadas de 24 a 72 h a 28 °C y protegidas de la exposición de la luz, para documentar los resultados se tomaron fotografía cada 24 horas.

7.4.3 Análisis cuantitativo del crecimiento y susceptibilidad la cepa mutante Ylcat3-Δ al H₂O₂

El análisis cuantitativo consistió en comparar el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ y P01a en presencia de H₂O₂ (5 mM). Para ello, ambas cepas se sembraron en medio líquido YPD con o sin la adición del agente oxidante y se incubaron a 28 °C con agitación (200 rpm); el monitoreo del crecimiento se determinó en base a los valores obtenidos de la OD₆₀₀ de los cultivos cada 24 h, hasta las 192 h de cultivo.

7.4.3.1 Crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ

En la tabla 14 se presentan los resultados de las comparaciones del crecimiento de las cepas mutante Ylcat3-Δ y P01a en medio YPD sin la adición del agente oxidante. Se realizó un análisis de comparaciones por pares del crecimiento de ambas cepas a diferentes tiempos de incubación. Los resultados indican que no existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) del crecimiento entre ambas cepas (Ylcat3-Δ y P01a) a las 24, 48, 72, 96, 120, 168 y 192 h de incubación en medio YPD; solo se observa una diferencia significativa ($P = 0.009$) del crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ con respecto a la parental, a las 144 h de incubación.

Tabla 14. Comparación del crecimiento de las cepas mutante Ylcat3-Δ y P01a en medio YPD

Tiempo de incubación (h)	Comparación entre cepas	*Media OD ₆₀₀ (Ln)	**DE	Valor-P ^b	95% de intervalo de confianza ^b	
					Límite inferior	Límite superior
24	Ylcat3-Δ	1.510	0.062	0.415	-0.185	0.077
	P01a	1.564	0.095			
48	Ylcat3-Δ	2.087	0.034	0.568	-0.168	0.093
	P01a	2.125	0.068			
72	Ylcat3-Δ	2.102	0.082	0.307	-0.198	0.063
	P01a	2.170	0.179			
96	Ylcat3-Δ	2.189	0.052	0.237	-0.209	0.052
	P01a	2.267	0.178			
120	Ylcat3-Δ	2.222	0.061	0.075	-0.249	0.012
	P01a	2.341	0.228			
144*	Ylcat3-Δ	2.257	0.053	0.009*	-0.305	-0.044
	P01a	2.431	0.213			
168	Ylcat3-Δ	2.485	0.081	0.553	-0.091	0.170
	P01a	2.446	0.239			
192	Ylcat3-Δ	2.353	0.050	0.057	-0.258	0.004
	P01a	2.480	0.223			

*Los valores de OD corresponden a los valores del promedio de la OD₆₀₀ (Ln) de tres experimentos independientes.

**DE: desviación estándar.

b. Comparación por pares ajustado por Bonferroni.

En la figura 16 se observan los resultados del análisis de los datos (media y desviación estándar [DE]) referentes al crecimiento (OD₆₀₀ [Ln]) de las cepas mutante Ylcat3-Δ y P01a, en los diferentes tiempos de incubación en medio YPD. El análisis muestra que el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ a las 24, 48, 72, 96, 120 y 192 h es ligeramente menor con respecto al crecimiento de la cepa P01a, sin embargo, estos resultados no fueron estadísticamente significativos. A las 144 h de incubación se observa que el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ (Media=2.257, DE=0.053) es significativamente menor ($P=0.009$) con respecto al crecimiento de la cepa P01a (Media=2.431, DE=0.213). Finalmente, a las 168 h de incubación se observa un incremento en el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ con respecto al crecimiento medio de la cepa P01a, pero este resultado no fue estadísticamente significativo.

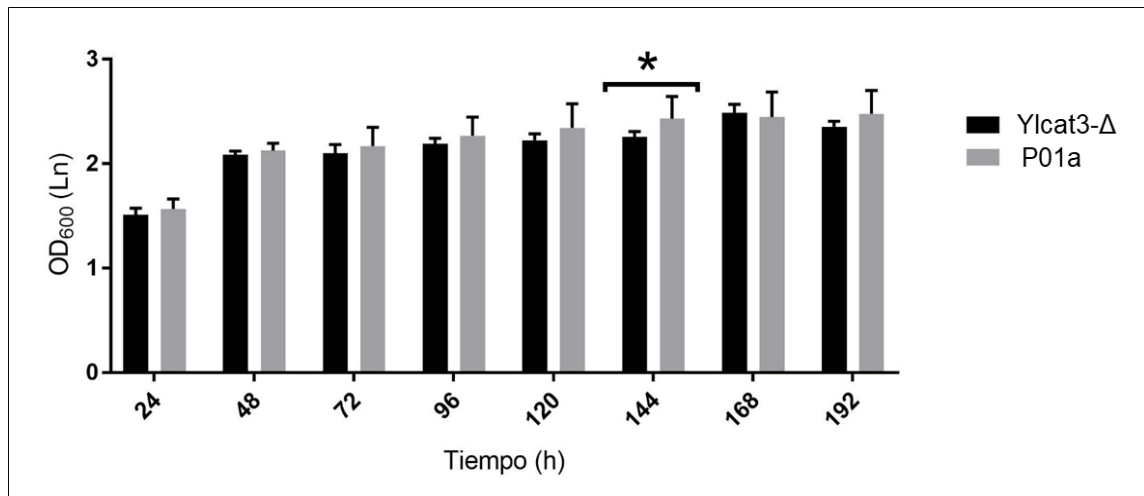


Figura 16. Análisis comparativo del crecimiento de las cepas mutante Ylcat3-Δ y P01a en medio YPD. Cada columna representa la media y desviación estándar del crecimiento de ambas cepas. *Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) del crecimiento. Los datos que se presentan son el promedio de tres experimentos independientes.

7.4.3.2 Efecto del H₂O₂ sobre el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ

En la tabla 15 se presenta el análisis de las comparaciones por pares del crecimiento de las cepas mutante Ylcat3-Δ y P01a en medio YPD adicionado con el agente oxidante en los diferentes tiempos de incubación; aunque se observa un crecimiento ligeramente menor de la cepa mutante, los resultados demuestran que no existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) del crecimiento entre ambas cepas a las 24, 48, 72, 96, 120, 168 y 192 h de incubación. No obstante, a las 144 h se observa una disminución significativa ($P = 0.000$) del crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ en medio YPD adicionado con H₂O₂ (5 mM).

Tabla 15. Comparación del crecimiento de las cepas mutante Ylcat3-Δ y P01a en medio YPD adicionado con el agente oxidante H₂O₂

Tiempo de incubación (h)	Comparación entre cepas	*Media OD ₆₀₀ (Ln)	**DE	Valor-P ^b	95% de intervalo de confianza	
24	Ylcat3-Δ	1.498	0.070	0.874	-0.120	0.102
	P01a	1.507	0.049			
48	Ylcat3-Δ	2.122	0.092	0.696	-0.089	0.133
	P01a	2.100	0.134			
72	Ylcat3-Δ	2.219	0.051	0.803	-0.125	0.097
	P01a	2.233	0.129			
96	Ylcat3-Δ	2.248	0.085	0.649	-0.136	0.085
	P01a	2.274	0.128			
120	Ylcat3-Δ	2.297	0.042	0.444	-0.154	0.068
	P01a	2.340	0.127			
144*	Ylcat3-Δ	2.327	0.116	0.000*	-0.313	-0.091
	P01a	2.529	0.132			
168	Ylcat3-Δ	2.438	0.172	0.975	-0.112	0.109
	P01a	2.439	0.166			
192	Ylcat3-Δ	2.481	0.142	0.935	-0.115	0.106
	P01a	2.486	0.146			

*Los valores de OD corresponden a los valores del promedio de la OD₆₀₀ (Ln) de tres experimentos independientes.

**DE: desviación estándar.

b. Comparación por pares ajustado por Bonferroni.

En la figura 17 se observan los resultados del análisis de los datos (media y desviación estándar [DE]) referentes al crecimiento (OD₆₀₀ [Ln]) de las cepas mutante Ylcat3-Δ y P01a en los diferentes tiempos de incubación en medio YPD adicionado con H₂O₂ 5 mM. El análisis indica que el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ a las 24, 72, 96, 120, 168 y 192 h es menor con respecto al crecimiento de la cepa P01a (diferencias no significativas). A las 48 h de incubación se observó un incremento en el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ con respecto al crecimiento de la cepa P01a, sin embargo este resultado no fue estadísticamente significativo. Mientras que a las 144 h de incubación se observa que el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ es significativamente ($P=0.000$) menor (Media=2.327, DE=0.116) con respecto al crecimiento de la cepa P01a (Media=2.529, DE=0.132).

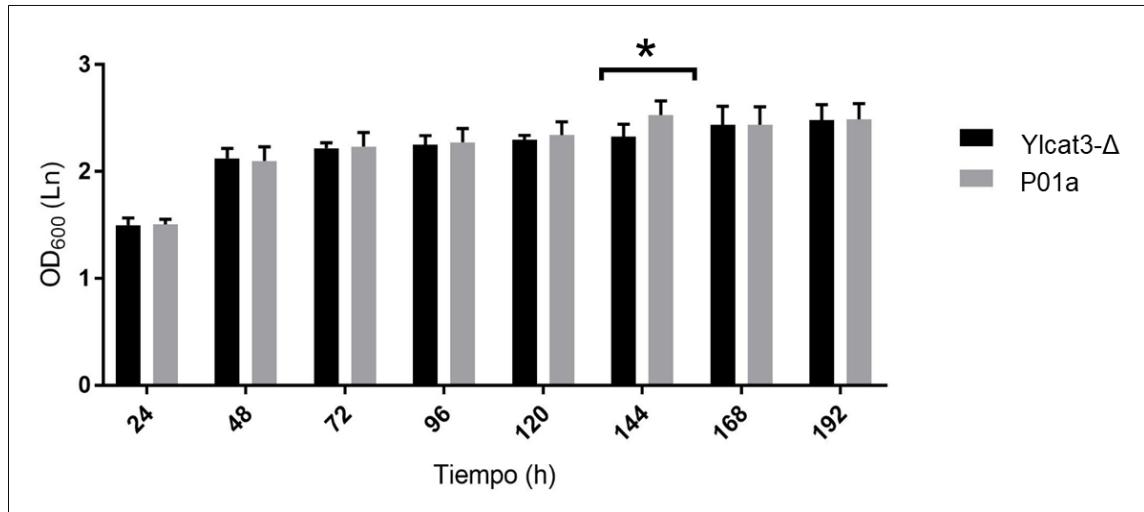


Figura 17. Análisis comparativo del crecimiento de las cepas mutante Ylcat3-Δ y P01a en medio YPD adicionado con el agente oxidante. Cada columna representa la media y desviación estándar del crecimiento de ambas cepas. *Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) del crecimiento. Los datos que se presentan son el promedio de tres experimentos independientes.

8. DISCUSIÓN

8.1 Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el oxígeno singlete (1O_2), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) son productos del metabolismo celular; las concentraciones bajas a moderadas de estas moléculas son fundamentales en numerosas vías de señalización de diferentes procesos fisiológicos. Sin embargo, una producción excesiva y exposición constante a estos agentes oxidantes establecen un estado deletéreo denominado estrés oxidativo, el cual produce un daño a nivel estructural y funcional (metabólico y biológico) de la célula que conduce al desarrollo de patologías crónico degenerativas (Izawa, et al., 1996; Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013; Gutiérrez-Salinas et al., 2014; Poprac et al., 2017).

Para contrarrestar los efectos provocados por el estrés oxidativo, los organismos cuentan con un sistema de defensa antioxidante enzimático complejo que responde frente a moléculas oxidantes a través de la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes (catalasas, glutatión peroxidasas y superóxido dismutasas), las cuales pueden reparar el daño ocasionado por las ROS (Sigler, et al., 1999; Arinbasarova et al., 2015; Nimse y Pal, 2015). *Y. lipolytica* es un modelo celular que ha sido utilizado para el estudio del EO y en estudios previos se ha observado que el gen *CAT3* (identificado y analizado previamente por Desentis-Desentis, 2015) de esta levadura presenta una mayor actividad frente al estrés oxidativo (Desentis-Desentis, 2015; Miranda-Roblero, 2016). El gen *CAT3* fue de interés debido a que presenta mayores cambios en su expresión en presencia de diferentes agentes oxidantes como el ácido gálico, la menadiona y el H_2O_2 , en comparación con otros genes de la respuesta antioxidante (*CAT1*, *CAT2*, *CAT3*, *SOD1*, *SOD2* y *GPx*). Para profundizar en el conocimiento de la importancia que tiene la proteína codificada por este gen, se

procedió en este trabajo a la generación de una cepa mutante de *Y. lipolytica* por delección del gen *CAT3*, deficiente en su respuesta antioxidante.

8.2 Análisis de la secuencia del gen *CAT3* en el genoma de *Y. lipolytica*

En la primera parte de este trabajo se llevó a cabo el análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *CAT3* de *Y. lipolytica*, la cual presentó una homología del 65-73 % con catalasas de otras especies de levadura, en particular con catalasas A (peroxisomales) de las levaduras *S. cerevisiae* y *S. lignohabitans*.

Además, se llevó a cabo un análisis de la secuencia nucleotídica del ORF del gen *CAT3* (1705 pb) más extremos de éste (1000 pb) en el genoma de *Y. lipolytica*. Este análisis permitió el diseño de oligonucleótidos sobre las regiones adyacentes con las cuales se construyó el cassette de disrupción.

Y. lipolytica presenta una mayor cantidad de genes que presuntamente codifican para catalasas (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*) en comparación con otros organismos eucariotas que solo presentan dos genes: *S. cerevisiae* (*CTT1* y *CTA1*) (Nishimoto, et al., 2016), *Debaryomyces hansenii* (*DhCTA1* y *DhCTT1*) (Segal-Kischinevzky et al., 2011); o aquellos que solo presentan un gen: los humanos (*CAT*) (Forsberg, Lyrenäs, Morgenstern y de Faire, 2001) *Candida glabrata* (*CTA1*) (De Las Peñas et al., 2015) y *Schizosaccharomyces pombe* (*CTT1*) (Paulo et al., 2014).

8.3 Estrategia para la delección del gen *CAT3*

La estrategia que se consideró en el presente trabajo consistió en generar el cassette de disrupción a través de la técnica de PCR doble unión (DJ-PCR), la cual ofrece diversas ventajas sobre los procedimientos convencionales de biología molecular. Esta técnica emplea la recombinación homóloga y el diseño de oligonucleótidos de gran tamaño (quiméricos) que flanquean sitios del gen marcador con regiones homólogas del gen de interés.

La construcción del cassette de disrupción por la técnica de DJ-PCR requiere de un menor tiempo en comparación con las técnicas convencionales, además,

permite obtener el tamaño exacto del fragmento de interés (cassette de disrupción) y una mayor cantidad de éste. Esta técnica ha sido empleada por diferentes grupos de investigadores para la delección de varios genes en diferentes especies de levaduras: *S. cerevisiae* (Amberg, Botstein y Beasley, 1995) *Aspergillus nidulans* (Yang et al., 2004; Yu et al., 2004), *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium graminearum* (Yu et al., 2004), *Candida lusitanae* (El-Kirat-Chatel, Dementhon y Thierry, 2011) y *Neurospora crassa* (Hammond et al., 2011).

8.4 Obtención de la cepa mutante Ylcat3-Δ

En el presente trabajo, células de *Y. lipolytica* en fase de crecimiento logarítmico se sometieron a un pre-tratamiento con acetato de litio y transformación a través de un choque térmico. Las células transformadas se sembraron en un medio selectivo y después de 5 días se observó el crecimiento de 8 putativas mutantes. Para confirmar la presencia de la construcción genética en el genoma de las mutantes, se realizó un análisis genotípico a través de reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos, como lo indican en su estudio Amberg y cols. (1995) y Hammond y cols. (2011); con el resultado de este primer análisis se observó que solo una putativa mutante había integrado el cassette de disrupción correctamente; a esta clona se le realizó un segundo análisis por PCR para corroborar la inserción del gen marcador (*URA3*) en el locus correspondiente al gen *CAT3*. Después, se realizó un tercer análisis por PCR que confirmó la presencia de la construcción genética en el genoma de la mutante Ylcat3-Δ y la ausencia de esta construcción en el genoma de la cepa P01a. Los productos obtenidos de esta tercera reacción de PCR se sometieron a un análisis adicional a través de reacciones de digestión con la enzima BamHI; este análisis confirmó la presencia de la construcción genética en la cepa mutante y la ausencia de ésta en la cepa P01a mediante la comparación del patrón de restricción de ambas cepas.

8.5 Análisis fenotípico de la cepa mutante *Ylcat3-Δ*

El crecimiento de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* en medio YPD se analizó cualitativamente y cuantitativamente.

Los resultados del análisis cualitativo mostraron que el crecimiento en medio YPD-agar de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* no se vio afectado por la ausencia del gen *CAT3*, pues se observa un crecimiento similar al de la cepa P01a (control). Estos resultados son similares a los reportados en cepas mutantes (*ctt1-Δ* y *cta1-Δ*), por delección de genes que codifican para las enzimas catalasas citósolica (*CTT1*) y/o peroxisomal (*CTA1*), de *S. cerevisiae* (Kwolek-Mirek, Bartosz y Spicket, 2011) y (*cta1-Δ*) de *Candida glabrata* (Cuéllar-Cruz et al., 2008), indicando que el crecimiento de tales mutantes en medio YPD-agar no se ve afectado por la ausencia de estos genes al compararse con el crecimiento de la cepa wild type.

Izawa y cols., (1996) indican en su estudio que la enzima catalasa no es esencial para las levaduras bajo condiciones normales y que la eliminación de las ROS generadas del metabolismo celular es por otros mecanismos de la respuesta antioxidante. En nuestro trabajo es posible que al eliminar el gen *CAT3* en *Y. lipolytica* otros genes que codifican para la enzima catalasa (*CAT1* y *CAT2*) presentes en esta levadura desarrollen una respuesta antioxidante compensatoria.

Aunque, en el análisis cualitativo se observan diferencias en el crecimiento de la cepa mutante (menor a la cepa parental), los resultados del análisis cuantitativo indican que no existe una diferencia significativa del crecimiento durante la fase estacionaria entre la cepa mutante *Ylcat3-Δ* y P01a en medio YPD (líquido). Estos resultados son similares a los reportados en cepas mutantes (*ctt1-Δ* y *cta1-Δ*) de *S. cerevisiae* (Izawa et al., 1996) y (*ctt1-Δ*) de *S. pombe* (Mutoh, Nakagawa y Yamada, 1999) deficientes en genes que codifican para las enzimas catalasas citosólica (*CTT1*) y peroxisomal (*CTA1*), ya que al igual que en nuestro estudio no se encontraron diferencias en el crecimiento entre las cepas mutantes y wild type. Según Mutoh y cols. (1999) una respuesta a este comportamiento es que los niveles de H_2O_2 generados *in vivo* durante el

crecimiento aerobico son bajos y por lo tanto el crecimiento de las células deficientes en la enzima catalasa no se ve afectado.

En nuestro estudio observamos que a las 144 h de incubación (fase de crecimiento estacionaria) se presenta una disminución del crecimiento de la cepa mutante Ylcat3- Δ en comparación con la cepa P01a. En organismos nematodos se han reportado resultados similares, por ejemplo en su estudio Petriv y Rachubinski (2004) demuestran que la eliminación de la enzima catalasa peroxisomal causa una disminución de la viabilidad celular durante la senescencia en *Caenorhabditis elegans*. En nuestro estudio, se observó un incremento del crecimiento de la cepa mutante Ylcat3- Δ a las 168 h, sin embargo, no fue significativo; Petriv y Rachubinski (2004) y Curtis y cols. (2012) explican que en ausencia de la enzima catalasa los niveles de carbonilación de proteínas aumentan, activando vías de señalización que involucran la participación de otras enzimas antioxidantes y generando una homesotaxis celular que conlleva a una adaptación de las ROS y a una mayor viabilidad celular.

Contrario a lo observado en el presente estudio y en otras especies de levadura, como *S. cerevisiae* (Van Zandycke, Sohler y Smart, 2002) y *Hansenula polymorpha* (Kawałek, Lefevre, Veenhuis y Van der Klei, 2013) deficiente en la enzima catalasa peroxisomal (*cta1- Δ* y *cat- Δ* , respectivamente), se ha encontrado que durante la senescencia el crecimiento de las cepas mutantes es similar al de la cepa wild type. Kawałek y cols. (2013), mencionan que la viabilidad de la cepa mutante *cat- Δ* de *H. polymorpha* depende de la fuente de carbono o nitrógeno que se esté utilizando, debido a que ciertas fuentes generan una mayor o menor producción de ROS. Por ejemplo, durante el crecimiento celular en presencia de metilamina y glucosa la cepa mutante *cat- Δ* de *H. polymorpha* muestra una viabilidad durante su senescencia similar al de la cepa wild type, esto es debido a que las oxidasas que se localizan en los peroxisomas no están involucradas en el metabolismo del carbono y nitrógeno por lo cual no se generan grandes cantidades de ROS, sin embargo en presencia de metanol, sulfato de amonio y glicerol, la viabilidad de la cepa mutante *cat- Δ* de *H. polymorpha*

disminuye debido a que estas fuentes involucran la participación de enzimas oxidasas que generan una mayor producción de H₂O₂. Los autores sugieren que en respuesta a niveles altos de ROS se activa el factor de transcripción Yap1 y como consecuencia de esto se incrementan los niveles de las enzimas citocromo c peroxidasa y superóxido dismutasa cuya actividad prolonga la viabilidad celular. Esto podría explicar lo que ocurre en nuestro estudio donde utilizamos medio YPD que contiene glucosa (2 %) como fuente de carbono y observamos una disminución en la viabilidad de la cepa mutante Ylcat3-Δ a las 144 h de incubación y un incremento de su viabilidad (no significativo) a las 168 h.

8.5.1 Dimorfismo fúngico de la cepa mutante Ylcat3-Δ

El dimorfismo es la capacidad que tienen algunos organismos eucariotas (levaduras) de generar variaciones en su fisionomía lo que les permite adaptarse a las condiciones ambientales, *Y. lipolytica* es capaz de presentar dimorfismo celular en respuesta a la fuente de carbono y de nitrógeno.

Los resultados del análisis de la morfología celular muestran que el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ en medio YPD se presenta en forma de levadura, lo cual es acorde a lo que reportan Pérez-Campo y Domínguez (2001) y Ruiz-Herrera y Sentandreu (2002) en su estudio, quienes destacan que bajo condiciones normales y en presencia de un medio rico en nutrientes (YPD) las células de *Y. lipolytica* crecen en forma de levadura, mientras que el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ cultivada en medio mínimo (YNB) se presenta en forma de micelio, lo cual es similar a lo reportado por Ruiz-Herrera y Sentandreu (2002).

En su estudio Rodríguez y Domínguez (1984) observaron que en la levadura *Saccharomycopsis lipolytica* (*Y. lipolytica*) se incrementaba la formación de micelios en presencia de N-acetilglucosamina como fuente de carbono. En el presente trabajo se adicionó al medio mínimo (YNB) glucosa (fuente de carbono) y se observó un crecimiento micelial en la cepa mutante Ylcat3-Δ. La adición de esta fuente de carbono (glucosa) fue similar a la utilizada por Ruiz-Herrera y

Sentandreu (2002) en su estudio, en el cual reportan que la glucosa es mejor fuente de carbono que la N-acetilglucosamina para la formación de micelios.

Así mismo, la fuente de nitrógeno es un factor importante para la transición de levadura a micelio. En su estudio Pérez-Campo y Domínguez (2001), reportan que la adición de aminoácidos como lisina y prolina (fuente de nitrógeno) presentan una baja eficiencia en la formación de micelios en la levadura *Y. lipolytica*. De igual forma Ruiz-Herrera y Sentandreu (2002) destacan que la adición de glutamato y/o glutamina como fuente de nitrógeno presentan un efecto antagónico durante la formación de micelios, y enfatizan que con sales de amonio hay una mayor formación de micelios. En el presente estudio se adicionó al medio YNB acetato de amonio como fuente de nitrógeno; en este medio, en combinación con la glucosa se obtuvo un crecimiento micelial de la cepa mutante Ylcat3- Δ . Sin embargo, Ruiz-Herrera y Sentandreu destacan que la combinación de glucosa y acetato de amonio ejercen un efecto antagónico entre ellos, lo cual puede disminuir la formación de micelios.

Pérez-Campo y Domínguez (2001), en su estudio mencionan que el pH no es un elemento importante que influye en la transición de levaduras a micelios. No obstante, Ruiz-Herrera y Sentandreu (2002), reportan que a un pH ácido (<3) no hay formación de micelios en comparación con un pH neutro. En el presente trabajo no se tomó en cuenta este elemento, pero se observó un crecimiento en forma de micelio de la cepa mutante Ylcat3- Δ .

Con los resultados obtenidos en este análisis concluimos que la capacidad dimórfica de la cepa mutante Ylcat3- Δ no se ve afectada, dado que ésta puede crecer en forma micelial en un medio pobre en nutrientes (YNB) y en forma de levadura en un medio rico en nutrientes (YPD).

8.6 Susceptibilidad de la mutante Ylcat3- Δ al H₂O₂

El H₂O₂ es un agente oxidante comúnmente empleado en estudios referentes al estrés oxidativo debido a que sus efectos citotóxicos son bien conocidos y predecibles. A nivel celular, este agente oxidante se origina a partir de la ruptura

catalítica del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual es generado por la reducción parcial del oxígeno durante la respiración aerobia (Veal et al., 2007; Lushchak, 2010). Para evaluar la susceptibilidad de la cepa mutante Ylcat3- Δ al H_2O_2 , ésta se sometió a un análisis cualitativo y cuantitativo, contrastando su respuesta con la cepa parental.

Dentro del análisis fenotípico cualitativo se evaluó la morfología de colonia de la cepa mutante Ylcat3- Δ en medio YPD adicionado con H_2O_2 5 mM; los resultados se visualizaron después de 72 h de incubación e indicaron que la exposición al agente oxidante modificó la forma, la textura y el tamaño de esta cepa. Algunos autores, Spencer, Phister, Smart y Greetham (2014) y Vivancos y cols., (2006) mencionan que bajo ciertas condiciones de EO se pueden interrumpir varios procesos biológicos incluyendo el crecimiento normal de la célula. Esto puede ser una explicación a la disminución del tamaño observado en la colonia de la cepa mutante Ylcat3- Δ , el cual se observa de un tamaño más pequeño en comparación con la cepa P01a (control), indicando que el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3- Δ se retrasa en presencia del agente oxidante. Para corroborar los resultados obtenidos de una manera más controlada, se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo que evaluó la susceptibilidad de la cepa mutante Ylcat3- Δ al H_2O_2 5 mM, basado en su velocidad de crecimiento bajo EO.

Los resultados del análisis cualitativo (medio YPD-agar) indican que la cepa mutante Ylcat3- Δ presentó un retraso del crecimiento en presencia de concentraciones bajas de H_2O_2 (1-3 mM), mientras que concentraciones mayores 4.5-5 mM limitaron en mayor medida el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3- Δ en comparación con el crecimiento de la cepa parental. Las concentraciones altas de H_2O_2 (10 mM) fueron letales para ambas cepas.

Los resultados obtenidos en este análisis son similares al estudio reportado por Cuéllar-Cruz y cols. (2008), en la cepa *C. glabrata*; los autores reportan que las cepas mutantes (*cta1- Δ*) de *C. glabrata*, por delección del gen que codifica para la enzima catalasa peroxisomal, muestran una disminución en el crecimiento cuando se sometieron al efecto del H_2O_2 (1-2 mM), mientras que en

concentraciones mayores de H₂O₂ (4 mM) se presentó una inhibición en el crecimiento de la cepa mutante (*cta1-Δ*) de este organismo. Además, los autores mencionan que la delección del gen *CTA1* en *C. glabrata* genera células más sensibles al H₂O₂. Posiblemente esto se deba a que en esta levadura patógena solo cuenta con un gen que codifica para la enzima catalasa. En *Y. lipolytica* se han identificado tres genes (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*) que codifican para enzimas catalasas, por lo que al deletar el gen *CAT3* para generar la mutante Ylcat3-Δ, posiblemente otros genes (*CAT1* y *CAT2*) puedan estar aumentando su actividad transcripcional y de esta manera ejercer un efecto compensatorio en la actividad de catalasas en respuesta al EO. En su estudio Grant, Perrone y Dawes (1998), mencionan que el glutatión (GSH) y la enzima catalasa tiene un papel fundamental en la protección contra el H₂O₂; sin embargo, destacan la participación del glutatión en la célula debido a que cepas mutantes de *S. cerevisiae* deficientes en el gen que codifica para el GSH son más sensibles que aquellas cepas mutantes de *S. cerevisiae* deficientes en las enzimas catalasas citosólica (*CTT1*) y peroxisomal (*CTA1*).

Para determinar de una manera más controlada la susceptibilidad de la cepa mutante Ylcat3-Δ al efecto del agente oxidante H₂O₂ (5 mM), se realizó un análisis cuantitativo. Los resultados obtenidos indican que la delección del gen *CAT3* no afecta el crecimiento de la cepa mutante Ylcat3-Δ debido a que presenta un crecimiento similar al de la cepa parental, sin diferencia significativa. Estos resultados fueron similares a los reportados en cepas mutantes (*cta1-Δ* y *ctt1-Δ*) de *S. cerevisiae* (Izawa, et al., 1996; Martins y English, 2014) deficientes en genes que codifican para catalasas citosólica (*CTT1*) y peroxisomal (*CTA1*), donde se indica que el crecimiento de las cepas mutantes (*cta1-Δ* y *ctt1-Δ*) fue similar al crecimiento de la cepa wild type. Otros autores han demostrado que cepas mutantes (*cta1-Δ*) de *S. cerevisiae* presentan un crecimiento significativamente menor con respecto al crecimiento de la cepa wild type en presencia del H₂O₂ (Bayliak, Semchyshyn y Lushchak, 2006). En el presente estudio se encontró una disminución significativa del crecimiento a las 144 h en la cepa mutante Ylcat3-Δ, sin embargo el crecimiento se recuperó a las 168 y

192 h de incubación. Hemos mencionado que *Y. lipolytica* cuenta con 3 genes que presuntamente codifican para la enzima catalasa por lo cual creemos que el EO inducido por el H₂O₂ en la cepa mutante Ylcat3-Δ, pueda estar generando señales que involucran la expresión de otros genes que codifican para enzimas catalasas (*CAT1* y *CAT2*), protegiendo a la célula del daño provocado por este agente oxidante. Martins y English (2014) y Bayliak y cols., (2006) reportan que la participación de otros genes que codifican para la enzima catalasa en cepas mutantes (*cta1-Δ* y *ctt1-Δ*) de *S. cerevisiae* en respuesta a la exposición endógena o exógena de H₂O₂, depende de la composición nutricional del medio en que se encuentren las células. En su estudio Martins y English (2014), destacan que hay una mayor adaptación al agente oxidante cuando las cepas mutantes de *S. cerevisiae* se encuentran en un medio rico en nutrientes. En el presente estudio utilizamos el medio YPD (rico en nutrientes), por lo cual suponemos que la cepa mutante Ylcat3-Δ pudiera estar teniendo una adaptación al agente oxidante mediada por la actividad de los genes *CAT1* y *CAT2* y por esa razón tenga un crecimiento igual al de la cepa parental. Mesquita y cols., (2010) y Ludovico y Burhans, (2014), reportan que en ausencia del gen *CTA1*, en la levadura *S. cerevisiae*, y durante una restricción calórica los niveles de H₂O₂ incrementan, activando con ello algunos factores de transcripción (Yap1) que regulan genes que codifican para enzimas antioxidantes. Martins y English (2014) y Komalpriya y cols., (2015) mencionan además que los niveles de glutatión y enzimas como la tiorredoxina peroxidasa aumentan en la célula, mientras que que otros autores indican que el metabolismo es capaz de provocar un cambio eficaz de la ruta metabólica de la glucólisis a vía de la pentosa para generar una adaptación y un frente al daño oxidativo (Grant, 2008; Mullarky y Cantley, 2015).

Los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental y bajo las concentraciones utilizadas del agente oxidante demuestran que, la delección del gen *CAT3* no genera células mayormente susceptibles al EO inducido por el H₂O₂ [5 mM]. Debido a esto, se rechaza la hipótesis postulada al inicio de esta investigación: la delección del gen *CAT3* aumenta la susceptibilidad de las células de *Y. lipolytica* frente al estrés oxidativo.

Es posible que la regulación de otros genes de la respuesta antioxidante este compensando la función del gen *CAT3*.

CONCLUSIÓN

La técnica DJ-PCR descrita en el presente trabajo y la cual permitió la construcción del fragmento quimérico, ofrece ventajas sobre las técnicas convencionales de biología molecular.

El análisis fenotípico mostró que:

- El dimorfismo de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* no se ve afectado, pues esta puede crecer en forma de levadura o micelio en respuesta a la presencia del nutriente adicionado al medio de cultivo.
- El tamaño de colonia de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* se modifica en presencia de H_2O_2 5 mM (no así en la cepa parental), mientras que otros parámetros de la morfología de la colonia no se ven afectados.
- Los análisis cualitativo y cuantitativo mostraron que el crecimiento de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* bajo condiciones normales (medio YPD) es similar al crecimiento de la cepa P01a.
- Aunque el crecimiento de la cepa mutante *Ylcat3-Δ* en medio YPD (análisis cualitativo) adicionado con H_2O_2 5 mM disminuye en comparación con el crecimiento de la cepa P01a, el análisis cuantitativo mostró que no hay diferencias significativas en el crecimiento entre ambas cepas en respuesta al H_2O_2 5 mM.
- La delección del gen *CAT3*, no generó células de *Y. lipolytica* mayormente susceptibles al EO ocasionado por la adición de H_2O_2 5 mM.

9. PERSPECTIVAS

Para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de respuesta antioxidante de la cepa mutante Ylcat3- Δ se propone:

- Analizar el patrón de expresión de otros genes de la respuesta antioxidante (*CAT1*, *CAT2*, *GPx*, *YAP1* y *GSH*).
- Analizar moléculas con potencial actividad oxidante/antioxidante.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Akın, M., Ayoglu, H., Okyay, D., Ayoglu, F., Gür, A., Can, M., ... Turan, I. (2015). Efectos del mantenimiento de varias anestésias sobre los niveles séricos de selenio, cobre, cinc y hierro y la capacidad antioxidante. *Brazilian journal of anesthesiology (edición en español)*, 65(1), 51–60. doi:10.1016/j.bjanes.2014.04.001
- Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P. & Rovira, C. (2009). The molecular mechanism of the catalase reaction. *American chemical society*, 33(131), 11751–11761. doi:10.1021/ja9018572
- Alonso Rodríguez, D., Pedroso Filiberto, E., Moreno Téllez, E. & Acosta Valdez, M. A. (2007). Estrés oxidativo en las cardiopatías congénitas cianóticas. *Revista Argentina de cardiología*, 75(3), 189–190. ISSN:1850-3748
- Amberg, D. C., Botstein, D. & Beasley, E. M. (1995). Precise gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* by double fusion polymerase chain reaction. *Yeast*, 11(13), 1275–1280. doi:10.1002/yea.320111307
- Amir Aslani, B. & Ghobadi, S. (2016). Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life sciences*, 146, 163–173. doi:10.1016/j.lfs.2016.01.014
- Arinbasarova, A. Y., Biryukova, E. N. & Mendentsev, A. G. (2015). Antistress systems of the yeast *Yarrowia lipolytica* (Review). *Applied biochemistry and microbiology*, 51(2), 135–142. doi:10.1134/S0003683815020027
- Aung-Htut, M. T., Ayer, A., Breitenbach, M., & Dawes, I. W. (2012). Oxidative Stresses and Ageing. In M. Breitenbach, S. M. Jazwinski, & P. Laun (Eds.), *Aging research in yeast* (pp. 13–54). New York: Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-007-2561-4_2
- Avello, M. & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, (249) 161–162. doi:10.4067/S0718-04622006000200010
- Ayala, A., Muñoz, M. F. & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 1–32. doi:10.1155/2014/360438
- Barth, G., & Gaillardin, C. (1996). *Yarrowia lipolytica*. In K. Wolf (Ed.), *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook* (pp. 313–388). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-79856-6_10
- Bayliak, M., Semchyshyn, H. & Lushchak, V. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* is strain-specific. *Biochemistry (Moscow)*, 71(9), 1013–1020. doi:10.1134/S0006297906090100
- Beltrán-García, M. J., Ogura-Fujii, T., Manzo-Sánchez, G. & Arias-Castro, C. (2006). Catalasas de hongos fitopatógenos: ¿Factores de virulencia y resistencia a los fungicidas?. *Revista mexicana de fitopatología*, 24(1), 50–58. ISSN:0185-3309
- Biryukova, E. N., Medentsev, A. G., Arinbasarova, A. Y. & Akimenko, V. K. (2006). Tolerance of the yeast *Yarrowia lipolytica* to oxidative stress. *Microbiology*, 75(3), 243–247. doi:10.1134/S0026261706030015
- Bonola Gallardo, I. F., Irigoyen Camacho, M. E., Vera Robles, L. I., Campero Celis, A. & Hamdan Partida, A. (2014). Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Ciencias clínicas*, 15(1), 2–8. doi:10.1016/j.cc.2015.06.002

- Breitenbach, M., Ralser, M., Perrone, G., Iglseider, B., Rinnerthaler, M. & Dawes, I. (2013). Oxidative stress and neurodegeneration: the yeast model system. *Frontiers in Bioscience*, 1(18), 1174–1193. doi:10.2741/4171
- Briones-Martin-Del-Campo, M., Orta-Zavalza, E., Juárez-Cepeda, J., Gutierrez-Escobedo, G., Cañas-Villamar, I., Castaño, I. & De Las Peñas, A. (2014). The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Revista Iberoamericana de micología*, 31(1), 67–71. doi:10.1016/j.riam.2013.09.012
- Cárdenas-Rodríguez, N. y Pedraza-Chaverri, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química*, 17(2), 164–173. ISSN:0187-893X
- Céspedes Miranda, E. (2014). Control glucémico y daño oxidativo a biomoléculas en diabéticos. *Revista cubana endocrinología*, 25(2), 46–56. ISSN:1561-2953
- Cuéllar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Cañas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castaño, I. & De Las Peñas, A. (2008). High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryotic cell*, 7(5), 814–825. doi:10.1128/EC.00011-08
- Curtis, J. M., Hahn, W. S., Long, E. K., Burrill, J. S., Arriaga, E. A. & Bernlohr, D. A. (2012). Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 23(8), 399–406. doi:10.1016/j.tem.2012.05.008
- Davidow, L. S., Apostolakos, D., O'Donnell, M. M., Proctor, A. R., Ogrydziak, D. M., Wing, R. A., ... DeZeeuw, J. R. (1985). Integrative transformation of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Current genetics*, 10(1), 39–48. doi:10.1007/BF00418492
- De la Torre-Ruiz, M., Pujol, N., & Sundaran, V. (2015). Coping With Oxidative Stress. The Yeast model. *Current drug targets*, 16(1), 2–12. doi:10.2174/1389450115666141020160105
- De las Peñas, A., Juárez-Cepeda, J., López-Fuentes, E., Briones-Martin-del-Campo, M., Gutiérrez-Escobedo, G. & Castaño, I. (2015). Local and regional chromatin silencing in *Candida glabrata*: consequences for adhesion and the response to stress. *FEMS yeast research*, 15(6), 1-9. doi:10.1093/femsyr/fov056
- Desentis Desentis, M. F. (2015). *Expresión de genes que codifican para enzimas de la respuesta antioxidante de Yarrowia lipolytica, condiciones de estrés oxidativo* (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL.
- Díaz-Acosta, A. E. & Membrillo-Hernández, J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 9(1), 34–44. ISSN:1405-888X
- Díaz, A. (2003). La estructura de las catalasas. *Revista de educación bioquímica*, 22(2), 76–84. ISSN:1665-1995
- Duan, J., & Kasper, D. L. (2011). Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology*, 21(4), 401–409. doi: 10.1093/glycob/cwq171
- El-Kirat-Chatel, S., Dementhon, K., & Thierry, N. (2011). A two-step cloning-free PCR-based method for the deletion of genes in the opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitanae*. *Yeast*, 28(4), 321–330. doi: 10.1002/yea.1836
- Estrada-Carrasco, C., Flores-Terrazas, J., Floriano-Sánchez, E., Castro-Marín, M., López-Silvestre, J., ... N., C.-R. (2010). Regulación de enzimas antioxidantes como marcadores tumorales de la prostata. *Revista mexicana de urología*, 70(3), 157–163.
- Fernández, J. M., Da Silva-Grigoletto, M. E. y Túnez-Fiñana, I. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Revista andaluza de medicina del deporte*, 2(1), 19–34. ISSN:1888-7546

- Fickers P., Marty A., Nicaud JM. (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol Advance*, 29(6):632-44. doi: 10.1016/j.biotechadv.
- Forsberg, L., Lyrenäs, L., Morgenstern, R. y de Faire, U. (2001). A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free radical biology and medicine*, 30(5), 500–505. doi:10.1016/S0891-5849(00)00487-1
- Franssens, V., Bynens, T., Van den Brande, J., Vandermeeren, K., Verduyckt, M. & Winderickx, J. (2013). The benefits of humanized yeast models to study parkinson's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 1–10. doi:10.1155/2013/760629
- Guevara-Olvera L., Calvo-Mendez C. & Ruiz-Herrera J. (1993). The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of general microbiology*, 139(3):485-93. doi: 10.1099/00221287-139-3-485
- González-Torres, M. C., Betancourt-Rule, M. & Ortiz-Muñiz, R. (2002). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1) 3–9. ISSN:0185-5751
- González, G. A., González Madariaga, Y., Heredia Ruiz, D., Fernández Caraballo, D. & Ballesteros Hernández, M. (2013). Enzimas antioxidantes en la hiperglicemia e hiperlipidemia inducida por sacarosa en ratas Wistar . *Revista médica electrónica*, 35(2) 95–104. ISSN:1684-1824
- Grant, C. M. (2008). Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *Journal of biology*, 7(1), 1-4. doi:10.1186/jbiol63
- Grant, C. M., Perrone, G. & Dawes, I. W. (1998). Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 253(3), 893–898. doi:10.1006/bbrc.1998.9864
- Gutiérrez-Salinas, J., Mondragón-Terán, P., García-Ortíz, L., Hernández-Rodríguez, S., Ramírez-García, S. & Núñez-Ramos, N. R. (2014). Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Revista de especialidades médico-quirúrgicas*, 19(4), 446–454.
- Hammond, T. M., Xiao, H., Rehard, D. G., Boone, E. C., Perdue, T. D., Pukkila, P. J. & Shiu, P. K. T. (2011). Fluorescent and bimolecular-fluorescent protein tagging of genes at their native loci in *Neurospora crassa* using specialized double-joint PCR plasmids. *Fungal genetics and biology*, 48(9), 866–873. doi:10.1016/j.fgb.2011.05.002
- Hernández, S. M. A. & Martin-Gil, F. J. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libre) y los antioxidantes. *Gaceta medica de Bilbao*, 106(3)106–113. doi:10.1016/S0304-4858(09)74661-X
- Hoffman, C. & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2–5), 267–272. doi:10.1016/0378-1119(87)90131-4
- Izawa, S., Inoue, Y. & Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical journal*, 320(1), 61–67. doi:10.1042/bj3200061
- Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16), 1511–1527. doi:10.1002/(SICI)1097-0061

- Jiménez-Rosales, A., Domínguez García, V. & Amaya-Chávez, A. (2010). El papel del estrés oxidativo en la disfunción endotelial de la aterosclerosis. *Ciencia ergo-sum.*, 17(3), 258–268. ISSN:1405-0269
- Jiménez-Bremont, J. F., Rodríguez-Hernández, A. A., & Rodríguez-Kessler, M. (2012). development and dimorphism of the yeast *Yarrowia lipolytica*. In J. Ruiz-Herrera (Ed.), *Development and dimorphism of Yarrowia lipolytica a dimorphic fungi. Their importance as models for differentiation and fungal pathogenesis.* (pp. 58–66). Irapuato, Guanajuato: Centro de investigación y de estudios avanzados del IPN: Bentham ebooks. doi:10.2174/97816080536431120101
- Kawalek, A., Lefevre, S. D., Veenhuis, M. & van der Klei, I. J. (2013). Peroxisomal catalase deficiency modulates yeast lifespan depending on growth conditions. *Aging (Albany NY)*, 5(1), 67–83. doi:10.18632/aging.100519
- Komalapriya, C., Kaloriti, D., Tillmann, A. T., Yin, Z., Herrero-de-Dios, C., Jacobsen, M. D., ... Romano, M. C. (2015). Integrative model of oxidative stress adaptation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Plos one*, 10(9), 1-32. doi:10.1371/journal.pone.0137750
- Kumar, S. & Pandey, A. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013, 1–16,162750. doi:10.1155/2013/162750
- Kwolek-Mirek, M., Bartosz, G. & Spickett, C. M. (2011). Sensitivity of antioxidant-deficient yeast to hypochlorite and chlorite. *Yeast*, 28(8), 595–609. doi:10.1002/yea.1889
- Liu, H.-H., Ji, X.-J. & Huang, H. (2015). Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnology advances*, 33(8), 1522–1546. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.07.010
- Loira, N., Dulermo, T., Nicaud, J.-M. & James Sherman, D. (2012). A genome-scale metabolic model of the lipid-accumulating yeast *Yarrowia lipolytica*. *BMC systems biology*, 6(35) 1–9. doi:10.1186/1752-0509-6-35.
- Lopes, M., Mota, M. & Belo, I. (2013). Comparison of *Yarrowia lipolytica* and *Pichia pastoris* cellular response to different agents of oxidative stress. *Applied biochemistry and biotechnology*, 170(2) 448–458. doi:10.1007/s12010-013-0205-3
- Ludovico, P. & Burhans, W. C. (2014). Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police. *FEMS Yeast research*, 14(1), 33–39. doi:10.1111/1567-1364.12070
- Lushchak, V. I. (2010). Oxidative stress in yeast. *Biochemistry (Moscow)*, 75(3), 281–296. doi:10.1134/S0006297910030041
- Lushchak, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative biochemistry and physiology part C: toxicology y pharmacology*, 153(2), 175–190. doi:10.1016/j.cbpc.2010.10.004
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164–175. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016
- Martins, D. & English, A. M. (2014). Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. *Redox biology*, 2(2014), 308–313. doi:10.1016/j.redox.2013.12.019
- Mena-Gómez, I., Cadena-Estrada, J. & Troncoso-Pérez, D. (2014). Intervención de Enfermería en una familia mexicana con factores de riesgo para enfermedades crónico-degenerativas. *Enfermería universitaria*, 11(2), 67–72. doi:10.1016/S1665-7063(14)72667-3

- Mesquita, A., Weinberger, M., Silva, A., Sampaio-Marques, B., Almeida, B., Leão, C., ... Ludovico, P. (2010). Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity. *Proceedings of the national academy of sciences*, 107(34), 15123–15128. doi:10.1073/pnas.1004432107
- Miranda-Roblero, H. O. (2016). *El envejecimiento modifica la expresión de genes de la respuesta antioxidante en Y. lipolytica* (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, NL.
- Molina-Navarro, M. M., Castells-Roca, L., Bellí, G., García-Martínez, J., Marín-Navarro, J., Moreno, J., ... Herrero, E. (2008). Comprehensive Transcriptional Analysis of the Oxidative Response in Yeast. *Journal of biological chemistry*, 283(26), 17908–17918. doi:10.1074/jbc.M800295200
- Montier Iglesias, A., Ramos Arencibia, A. L., Gómez García, M. L., Pérez Cardoso, J. J. & Quintana Pérez, Q. (2015). Estrés oxidativo en la diabetes mellitus papel de la vitamina E y antioxidantes endógenos. *Revista de ciencias médicas de pinar del río*, 19(5),973–985. ISSN:1561-3194
- Mullarky, E., & Cantley, L. C. (2015). Diverting glycolysis to combat oxidative stress. In K. Nakao, N. Minato, & S. Uemoto (Eds.), *Innovative medicine: basic research and development* (pp. 3–23). Tokyo: Springer Japan ebook. doi:10.1007/978-4-431-55651-0_1
- Mutoh, N., Nakagawa, C. & Yamada, K. (1999). The role of catalase in hydrogen peroxide resistance in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Canadian journal of microbiology*, 45(2), 125–129. doi:10.1139/w98-216
- Nimse, S. B. & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, 5(35), 27986–28006. doi:10.1039/C4RA13315C
- Nishimoto, T., Furuta, M., Kataoka, M. & Kishida, M. (2015). Important Role of Catalase in the Cellular Response of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Exposed to Ionizing Radiation. *Current microbiology*, 70(3), 404–407. doi:10.1007/s00284-014-0733-2
- Nishimoto, T., Watanabe, T., Furuta, M., Kataoka, M. & Kishida, M. (2016). Roles of catalase and trehalose in the protection from hydrogen peroxide toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocontrol science*, 21(3), 179–182. doi:10.4265/bio.21.179
- Pan, H. Z., Zhang, L., Guo, M. Y., Sui, H., Li, H., Wu, W. H., ... Chang, D. (2009). The oxidative stress status in diabetes. *Acta diabetológica*, 47(1) 71–76. doi:10.1007/s00592-009-0128-1
- Pareja-Galeano, H., Brioché, T., Sanchís-Gomar, F., Escrivá, C., Dromant, M., Gómez-Cabrera, M. C. & Viña, J. (2012). Efecto del ejercicio físico sobre las alteraciones cognitivas y el estrés oxidativo en un modelo transgénico APP/PSN1 para la enfermedad de Alzheimer. *Revista española de geriatría y gerontología*, 47(5), 198–204. doi:10.1016/j.regg.2012.05.004
- Paulo, E., García-Santamarina, S., Calvo, I. A., Carmona, M., Boronat, S., Domènech, A., ... Hidalgo, E. (2014). A genetic approach to study H₂O₂ scavenging in fission yeast – distinct roles of peroxiredoxin and catalase. *Molecular microbiology*, 92(2), 246–257. doi:10.1111/mmi.12548
- Pérez-Campo, F. M. & Domínguez, A. (2001). Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*. *Current microbiology*, 43(6), 429–433. doi:10.1007/s002840010333
- Petriv, O. & Rachubinski, R. (2004). Lack of peroxisomal catalase causes a progeric phenotype in *Caenorhabditis*. *The journal of biological chemistry*, 279(19), 19996–20001. doi: 10.1074/jbc.M400207200

- Pisoschi, A. M. & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55–74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J. & Valko, M. (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 38(7), 592–607. doi:10.1016/j.tips.2017.04.005
- Rodriguez, C. & Domínguez, A. (1984). The growth characteristics of *Saccharomycopsis lipolytica*: morphology and induction of mycelium formation. *Canadian journal of microbiology*, 30(5), 605–612. doi:10.1139/m84-090
- Ruiz-Herrera, J. & Sentandreu, R. (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology*, 178(6), 477–483. doi:10.1007/s00203-002-0478-3
- Russo, A. J. (2010). Decreased serum Cu/Zn SOD associated with high copper in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Journal of central nervous system disease*, 2, 9–14. doi:10.4137/JCNSD.S4553
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Molecular Cloning: a laboratory manual. In J. Sambrook & D. W. Russell (Eds.), *Agarose gel electrophoresis* (pp. 94–99). New York: Cold Spring Harbor. doi:10.1101/pdb.prot4027
- Sánchez-Rodríguez, C., Martín-Sanz, E., Cuadrado, E., Granizo, J. J. & Sanz-Fernández, R. (2016). Protective effect of polyphenols on presbycusis via oxidative/nitrosative stress suppression in rats. *Experimental gerontology*, 83(Suplemento C), 31–36. doi:10.1016/j.exger.2016.07.005
- Sánchez-Valle, V. & Méndez-Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedades. *Revista de investigación médica sur*, 20(3)161–168.
- Sedlak, E. & Musatov, A. (2017). Inner mechanism of protection of mitochondrial electron-transfer proteins against oxidative damage. Focus on hydrogen peroxide decomposition. *Biochimie*, 142(Supplement C), 152–157. doi:10.1016/j.biochi.2017.09.003
- Segal-Kischinevzky, C., Rodarte-Murguía, B., Valdés-López, V., Mendoza-Hernández, G., González, A. & Alba-Lois, L. (2011). The euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii* has two catalase genes encoding enzymes with differential activity profile. *Current microbiology*, 62(3), 933–943. doi:10.1007/s00284-010-9806-z
- Sherman, F. . (2002). Getting started with yeast. In C. Guthrie & G. R. Fink (Eds.), *Methods in enzymology* (pp. 3–41). New York. doi: 10.1016/S0076-6879(02)50954-X
- Sigler, K., Chaloupka, J., Brozmanová, J., Stadler, N. & Höfer, M. (1999). Oxidative stress in microorganisms—I. *Folia microbiologica*, 44(6), 587–624. doi:10.1007/BF02825650
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. & Lleonart, M. E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews*, 12(1), 376–390. doi:10.1016/j.arr.2012.10.004
- Spencer, J., Phister, T. G., Smart, K. A. & Greetham, D. (2014). Tolerance of pentose utilising yeast to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *BMC research notes*, 7, 151. doi:10.1186/1756-0500-7-151
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry y cell biology*, 39(1), 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001

- Van Zandycke, S. M., Sohler, P. J. & Smart, K. A. (2002). The impact of catalase expression on the replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mechanisms of ageing and development*, 123(4), 365–373. doi:10.1016/s0047-6374(01)00382-7
- Veal, E. A., Day, A. M. & Morgan, B. A. (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular cell*, 26(1), 1–14. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.016
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista cubana de medicina militar*, 31(2) 126–133. ISSN:1561-3046
- Viñas, G., Puig, T. y Porta, R. (2012). Estrés oxidativo en pacientes con cáncer: dos caras de una misma moneda. *Medicina clínica*, 139(4), 171–175. doi:10.1016/j.medcli.2011.11.021
- Vivancos, A. P., Jara, M., Zuin, A., Sansó, M. & Hidalgo, E. (2006). Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways. *Molecular genetics and genomics*, 276(6), 495–502. doi:10.1007/s00438-006-0175-z
- Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. & Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta (BBA) - molecular basis of disease*, 1842(8), 1240–1247. doi:10.1016/j.bbadis.2013.10.015
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C. P. C., ... A., O. S. (2004). Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic cell*, 3(5), 359–362. doi:10.1128/EC.3.5.1359-1362.2004
- Yu, J.-H., Hamari, Z., Han, K.-H., Seo, J.-A., Reyes-Domínguez, Y. & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology*, 41(11), 973–981. doi:10.1016/j.fgb.2004.08.001
- Zamocky, M., Furtmüller, P. G. y Obinger, C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants y redox signaling*, 10(9), 1527–1548. doi:10.1089/ars.2008.2046
- Zamora S., J. D. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de nutrición*, 34(1)17–26. ISSN:0717-7518
- Zhu, Q. & Jackson, E. N. (2015). Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications. *Current opinion in biotechnology*, 36, 65–72. doi:10.1016/j.copbio.2015.08.010
- Zorrilla García, A. E., Eirez Izquierdo, M. & Izquierdo Expósito, M. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*, 23(1)51–57. ISSN:1561-301

RESUMEN CURRICULAR

Clara Alicia Quiñones González

Candidata para la obtención del grado de

Maestría en Ciencias en Nutrición

Tesis:

RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE *Yarrowia lipolytica* EN AUSENCIA
DEL GEN *CAT3*

Campo de estudio: Investigación básica.

Datos personales:

Lugar de nacimiento: Torreón, Coahuila de Zaragoza

Fecha: 20 de septiembre de 1992

Nombre de padre: José Luis Quiñones Herrera.

Nombre de madre: Ma. Guadalupe Ernestina González Yáñez

Formación académica:

Egresada en de la licenciatura en Nutrición por la Universidad Juárez del Estado de Durango (2015).

Participación en congresos:

“Un modelo para determinar actividad oxidante/antioxidante de compuestos naturales: mutante *CAT3* de *Yarrowia lipolytica*” en la modalidad de cartel, en el VII Congreso de Nutriología, octubre 2016. Monterrey, NL.

“Mutante *CAT3* de *Yarrowia lipolytica* como modelo en la determinación de moléculas oxidantes/antioxidantes” en la modalidad de cartel, en el Sexto Congreso de Biotecnología Quorum ITESM, marzo 2017. Querétaro, Qro.

“Mutante *CAT3* de *Yarrowia lipolytica* como modelo en la determinación de moléculas oxidantes/antioxidantes” en la modalidad de cartel, XVII Reunión Internacional de Ciencias Médicas-Campus León, abril 2017. León, Gto.

“Mutante *CAT3* de *Yarrowia lipolytica*: modelo para identificar compuestos antioxidantes” en la modalidad de cartel, XXIX Congreso Nacional de Investigación en Medicina, octubre 2017. Monterrey, NL.

Distinciones:

Medalla al mérito académico “Benito Pablo Juárez García” por la Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED) marzo 2015, Durango, Dgo.

Tercer lugar en la modalidad de cartel “Mutante *CAT3* de *Yarrowia lipolytica* como modelo en la determinación de moléculas oxidantes/antioxidantes” en la modalidad de cartel, en el sexto congreso de biotecnología Quorum ITESM, marzo 2017. Querétaro, Qro.