

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



**ESTRÉS OXIDATIVO EN *Yarrowia lipolytica* CULTIVADA CON  
DIFERENTES FUENTES DE CARBONO**

**POR**

**LIC. NUT. SANDRA LUCÍA LESLY RODRÍGUEZ TENIENTE**

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

**DICIEMBRE, 2018**



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



**T E S I S**

**ESTRÉS OXIDATIVO EN *Yarrowia lipolytica* CULTIVADA CON  
DIFERENTES FUENTES DE CARBONO**

**POR**

**LIC. NUT. SANDRA LUCÍA LESLY RODRÍGUEZ TENIENTE**

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

**DIRECTOR DE TESIS  
DR. EN C. EDUARDO CAMPOS GÓNGORA**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

**DICIEMBRE, 2018**



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



**T E S I S**

**ESTRÉS OXIDATIVO EN *Yarrowia lipolytica* CULTIVADA CON  
DIFERENTES FUENTES DE CARBONO**

**POR**

**LIC. NUT. SANDRA LUCÍA LESLY RODRÍGUEZ TENIENTE**

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

**CO-DIRECTOR DE TESIS**

**DR. EN C. BLANCA EDELIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

**DICIEMBRE, 2018**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
2.1. Justificación	5
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>6</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
4.1. Objetivo general	6
4.2. Objetivos específicos	7
<b>5. ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
5.1. Estrés oxidativo	7
5.2. Daño a macromoléculas	7
Lípidos de membrana	7
Proteínas	8
Ácidos nucleicos (ADN y ARN)	8
Hidratos de carbono	9
5.3. Patologías relacionadas a estrés oxidativo	9
5.4. Especies Reactivas de Oxígeno	13
5.4.1. Formación de EROs	14
5.5. Antioxidantes	14
5.6. Estrés oxidativo y alimentación	15
5.6.1. Ácidos grasos	16
5.6.1.1. Ácidos grasos monoinsaturados	17
5.6.1.2. Ácidos grasos poliinsaturados	17
5.6.1.2. Ácidos grasos saturados	18
5.7. LEVADURAS COMO MODELO DE ESTUDIO	19
5.7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Y. lipolytica</i>	19
5.7.2. Respuesta de las levaduras a diferentes fuentes de carbono	20
5.7.3. Levaduras y EO	20
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
6.1. Material químico	22
6.2. Material biológico	22

<b>6.3. Métodos</b>	<b>22</b>
6.3.1. Diseño del estudio	22
6.3.2. Estrategia general	23
6.3.3. Preparación del preinóculo	24
6.3.4. Eliminación de reservas de glucosa y preparación de	25
6.3.5. Preparación de medio YP adicionado con diferentes FC	25
6.3.6. Preparación de medio YNB adicionado con diferentes FC	26
6.3.7. Curvas de crecimiento en medios YP	26
6.3.8. Curvas de crecimiento en medios YNB	27
6.3.9. Detección de Especies Reactivas de Oxígeno	27
<b>6.4. Análisis estadísticos</b>	<b>28</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
7.1. Crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> en YP con diferentes FC	30
7.2. Crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> en YNB con diferentes FC	34
7.3. Cuantificación de la generación de EROs en medios de cultivo YNB	36
7.4. Morfología de <i>Y. lipolytica</i> cultivada con diferentes FC	39
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>52</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación en el crecimiento de *Y. lipolytica* cultivada en medio YP con glucosa contra los medios adicionados con ácidos grasos .....33

Tabla 2. Comparación en el crecimiento de *Y. lipolytica* cultivada en medio YNB con glucosa contra los medios adicionados con ácidos grasos.....36

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia general de trabajo.....	24
Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa P01A de <i>Y. lipolytica</i> cultivada con diferentes fuentes de carbono en medio YP.....	32
Figura 3. Comparación del crecimiento de la cepa P01A de <i>Y. lipolytica</i> cultivada en medio YP adicionada con diferentes fuentes de carbono.....	32
Figura 4. Curva de crecimiento de la cepa P01A de <i>Y. lipolytica</i> cultivada con diferentes fuentes de carbono en medio YNB.....	35
Figura 5. Comparación de la generación de ERO en medios de cultivo YNB de <i>Y. lipolytica</i> adicionados con diferentes fuentes de carbono.....	38
Figura 6. Células de <i>Y. lipolytica</i> en fase exponencial cultivadas en medio YNB adicionado con diferentes fuentes de carbono.....	40
Figura 7. Células de <i>Y. lipolytica</i> en fase estacionaria cultivadas en medio YNB adicionado con diferentes fuentes de carbono.....	41
Figura 8. Células de <i>Y. lipolytica</i> en fase estacionaria tardía cultivadas en medio YNB adicionado con diferentes fuentes de carbono.....	42

## NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGMI	Ácido graso monoinsaturado
AMPI	Ácido graso poliinsaturado
AGS	Ácido graso saturado
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CAT	Catalasa
DCF-DA	Diacetato de diclorofluoreseína
DMSO	Dimetilsulfóxido
EO	Estrés oxidativo
EPA	Ácido eicosanopentanoico
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ETC	Cadena de transporte de electrones
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
g	Gramos
GPX	Glutación peroxidasa
h	Horas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HNE	4-hidroxinonenal
HO <sub>2</sub>	Radical hidroperoxilo
IMC	Índice de masa corporal
lb/pulg <sup>2</sup>	Libras por pulgada al cuadrado
MDA	Malondialdehido
ml	Mililitros
μM	Micromolar
μl	Microlitro

nm	nanómetros
O <sub>2</sub>	Oxígeno
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno singlete
OD	Densidad óptica
OD <sub>600</sub>	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros
OH	Radical hidroxilo
PBS	Buffer de fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
ROO	Radical peroxilo
rpm	Revoluciones por minuto
SOD	Superóxido dismutasa
SPSS	Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales
T80	Tween 80 (Polisorbato 80)
URF	Unidades relativas de fluorescencia
UV	ultravioleta
YPD	Extracto de levadura, peptona, dextrosa
YNB	Base nitrogenada de levadura
YP	Extracto de levadura y peptona
PO1a	Cepa parental de <i>Y. lipolytica</i>

## 1. RESUMEN

El estrés oxidativo (EO) es causado por un desequilibrio entre la cantidad de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la capacidad del organismo de contrarrestar su acción, por medio de sistemas de protección antioxidante. La excesiva generación de EROs puede provocar daño celular, al atacar a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, contribuyendo al desarrollo de patologías como hipertensión, diabetes mellitus, cáncer, entre otras. Existe una relación entre la dieta y el desarrollo de EO, influyendo la cantidad y calidad de los micro y macronutrientes que la componen. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de aceites con alto contenido de ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) sobre el desarrollo de estrés oxidativo en células de *Yarrowia lipolytica*. En la primera fase de este estudio se realizaron inóculos de *Y. lipolytica* (cepa P01A) en diferentes medios (YP y medio mínimo YNB) adicionados con 2% de: AGS (aceite de coco), AGMI (aceite de canola), AGPI (aceite de semilla de chía) y glucosa (control). Se monitoreó el crecimiento celular ( $OD_{600}$ ) en los diferentes medios de cultivo durante diferentes tiempos. En la segunda fase se cuantificó la cantidad de EROs por fluorescencia utilizando un fluorímetro (Fluoroskan Ascent). Los resultados se compararon mediante T de Student y ANOVA de un factor. En ambos medios (YP y YNB) se observó un aumento en el crecimiento de células cultivadas con AGMI, mientras que con AGS se observó un menor crecimiento. Se encontraron diferencias en la generación de EROs en los diferentes medios de cultivo, observando la mayor cantidad en los medios adicionados con AGPI, y la menor en los medios con AGMI. Además se observaron diferencias en la morfología celular de *Y. lipolytica*, presentando forma predominante de micelio cuando fue cultivada con medios adicionados con glucosa y forma mixta (levadura/micelio) en medios adicionados con ácidos grasos. Por lo tanto, existe diferencia en el crecimiento, la morfología y la generación de EROs en células de *Y. lipolytica* cuando es cultivada con diferentes fuentes de carbono.

## 1.1. Abstract

Oxidative stress (OS) is caused by an imbalance between the amount of reactive oxygen species (ROS) and the body's ability to counteract its action, through antioxidant protection systems. The excessive generation of ROS can cause cellular damage, by attacking proteins, lipids and nucleic acids, contributing to the development of pathologies such as hypertension, diabetes mellitus, cancer, among others. There is a relationship between the diet and the development of OS, influencing the quantity and quality of the micro and macronutrients that compose it. The objective of this work was to analyze the effect of oils with high content of saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) on the development of OS in *Yarrowia lipolytica* cells. In the first phase of this study, inocula of *Y. lipolytica* (strain P01A) were made in different media (YP and minimum medium YNB) added with 2% of: SFA (coconut oil), MUFA (canola oil), PUFA (chia seed oil) and glucose (control). Cell growth (OD<sub>600</sub>) was monitored in the different culture media during different times. In the second phase, the amount of ROS was quantified by fluorescence using a fluorimeter (Fluoroskan Ascent). The results were compared by Student's t-test and one-way ANOVA. In both media (YP and YNB) an increase in the growth of cells cultured with MUFA was observed, whereas with SFA a lower growth was observed. Differences were found in the generation of ROS in the different culture media, observing the greatest amount in the media added with PUFA, and the lowest in the media with MUFA. In addition, differences were observed in the cellular morphology of *Y. lipolytica*, presenting a predominant form of mycelium when it was cultivated with media added with glucose, and mixed form (yeast / mycelium) in media added with fatty acids. Therefore, there is a difference in the growth, morphology and generation of ROS in *Y. lipolytica* cells when it is cultivated with different carbon sources.

## 2. INTRODUCCIÓN

El EO está asociado a una alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante, en favor del prooxidante (Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Este desbalance puede surgir por un aumento en la producción de EROs o por la pérdida de la habilidad protectora antioxidante, estando caracterizada por la reducción de la capacidad de los sistemas endógenos de defenderse del ataque dirigido hacia biomoléculas (Pisoschi & Pop, 2015).

Las EROs pueden provocar daño celular mediante el ataque a diferentes biomoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos). Esto genera disfunción celular, pérdida de energía, alteraciones en la señalización, pérdida de control del ciclo celular, mutaciones genéticas, alteraciones en los mecanismos de transporte, disminución de la actividad biológica e inflamación celular (Rani, Deep, Singh, Palle & Yadav, 2016).

El estrés oxidativo tiene un papel significativo en el desarrollo de múltiples patologías, incluyendo obesidad, diabetes, aterosclerosis, cáncer y alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina e hiperlipidemias (Le Lay, Simard, Martínez & Andriantsitohaina, 2014).

Existen factores endógenos y exógenos que generan EROs. La respiración mitocondrial, las acciones enzimáticas de óxido reducción son algunos de los factores endógenos más importantes, mientras que en los factores exógenos encontramos la contaminación ambiental, radiación ultravioleta, exposición al humo de tabaco, sustancias tóxicas como pesticidas, consumo excesivo de alcohol y estupefacientes, elevado estrés físico y una incorrecta alimentación (Núñez-Sellés, 2011).

La composición de la dieta influye sobre el daño oxidativo y los mecanismos antioxidantes, es por eso que la alimentación está fuertemente relacionada con el desarrollo de enfermedades crónicas (Pérez, Strobel, Foncea, Díez, Martín & Leighton, 2002).

Existe una relación entre la ingesta de ácidos grasos y el desarrollo de estrés oxidativo (Vetrani, Costabile, Marino & Rivellese, 2012). Tipos específicos de ácidos grasos tienen efectos diferentes sobre la inflamación, la actividad endotelial y la producción de EROs, sin embargo se necesitan más estudios que lo sustenten (Peairs, Rankin, & Lee, 2011).

## 2.1. Justificación

El perfil epidemiológico en México ha cambiado en las últimas décadas, el escenario actual se encuentra dominado por enfermedades crónicas no transmisibles. De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) la alta prevalencia de dislipidemias en la población mexicana se debe a la interacción de diferentes factores, en los cuales la dieta tiene un papel principal. Evidencia reciente postula que la calidad, más que la cantidad, en la ingesta total de lípidos es lo que predispone al desarrollo de un gran número de patologías (Ramírez-Silva, Villalpando, Moreno-Sarancho & Bernal-Medina, 2011).

Un excesivo consumo de lípidos, acompañado con un estilo de vida sedentario tiene repercusiones sobre el peso corporal y el estado de salud. La obesidad, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer son patologías estrechamente relacionadas con el alto consumo de este macronutriente (Cabezas, Hern, Vargas & Bogot, 2016).

Se ha descrito en numerosos estudios que hay diferentes efectos postprandiales cuando se ingieren alimentos con alto contenido de diferentes ácidos grasos, teniendo un rol potencial en el desarrollo de estrés oxidativo (Harika, Eilander, Alssema, Osendarp & Zock, 2013). Se cree que los efectos que tienen los diferentes ácidos grasos pueden estar relacionados con su estructura y sus propiedades químicas, en particular con el grado de saturación en sus cadenas (Vetrani *et al.*, 2012).

No existe información suficiente sobre el efecto del consumo de lípidos con alto contenido de diferentes tipos de ácidos grasos sobre la producción de EROs y el desarrollo de estrés oxidativo. Esta información es de gran importancia para el correcto tratamiento nutricional de enfermedades crónico degenerativas. Por esta razón se propone determinar el efecto que tienen los ácidos grasos saturados, insaturados y poliinsaturados en el desarrollo de EO en células de *Y. lipolytica*.

### **3. HIPÓTESIS**

Existe diferencia en la respuesta de las células de *Y. lipolytica* al daño oxidativo cuando son cultivadas con diferentes fuentes de carbono (ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados)

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Analizar el efecto de aceites con alto contenido de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, utilizados como fuente de carbono, sobre la generación de estrés oxidativo en *Y. lipolytica*.

#### **4.2. Objetivos específicos**

1) Evaluar el efecto de aceites con alto contenido de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados sobre el crecimiento de *Y. lipolytica*.

2) Determinar el efecto que tienen los aceites con alto contenido de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados sobre la producción de especies reactivas de oxígeno, en células de *Y. lipolytica*.

3) Identificar las diferencias en la morfología de las células de *Y. lipolytica* cuando son cultivadas con diferentes fuentes de carbono.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1. Estrés oxidativo

La existencia de EROs, conocidas como prooxidantes, es una característica normal de la vida aeróbica (Sies, 1991), su producción en cantidades normales es esencial para la regulación del metabolismo, participando en reacciones de óxido reducción, en la generación de ATP, la transducción de señales y la activación o inactivación de biomoléculas (Núñez-Sellés, 2011). Sin embargo, una producción excesiva de EROs puede provocar daño a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos provocando un desbalance que se conoce como estrés oxidativo (EO) (Sies, 1991). Este desbalance, aunado a una condición de inflamación crónica, traza el camino para el desarrollo de enfermedades crónicas (Rani *et al.*, 2016).

### 5.2. Daño a macromoléculas

El aumento excesivo en la cantidad de EROs conlleva a un daño celular, siendo los principales objetivos: los lípidos membranales, los ácidos nucleicos, las proteínas e hidratos de carbono (Sies, 2015).

#### Lípidos de membrana

Los ácidos grasos poliinsaturados que se ubican principalmente en las membranas celulares, son los primeros afectados por el ataque de las EROs. En este proceso, los fosfolípidos son desprovistos de los átomos de hidrógeno que los forman por causa del radical hidroxilo, que se inactiva formando un radical lipídico muy reactivo que, al unirse al oxígeno forma el radical superóxido. Esta peroxidación se expande cuando este radical comienza a interactuar con otros lípidos de membrana, formando hidroperóxido y radical hidroxilo. Este fenómeno de lipoperoxidación de las membranas celulares es el responsable de la pérdida

de integridad de la misma, del daño causado en los organelos y las alteraciones en la permeabilidad. Además se producen otro tipo de compuestos denominados alquenos, altamente tóxicos, estos compuestos reaccionan con el ADN, inhibiendo la síntesis de ARN y de proteínas, e incluso afectando la reparación del material genético. Este proceso de oxidación no solo daña a la membrana celular también afecta a lipoproteínas plasmáticas, incluso se ha asociado el incremento de la lipoperoxidación con el envejecimiento celular (González-Torres, Betancourt-Rule, & Ortiz-Muñiz, 2000).

### Ácidos nucleicos (ADN y ARN)

El EO puede provocar diferentes tipos de lesiones en el ADN, incluyendo modificaciones directas de nucleótidos, formación de sitios purínicos o pirimidínicos y, con menor frecuencia, daños a la doble cadena de ADN. Las modificaciones directas de nucleótidos han sido ampliamente reportadas como consecuencia de daño oxidativo en la célula. De las bases nitrogenadas, la guanina es la más susceptible a modificaciones oxidativas, estas modificaciones representan una posible lesión mutagénica del ADN, ya que provocan un cambio conformacional, intercambiando guanina con timina. Modificaciones oxidativas similares han sido reportadas en menor cantidad para adenina, timina y citosina (Badalà, Nouri-mahdavi, & Raouf, 2008).

### Proteínas

Las EROs pueden inducir a la fragmentación y a la pérdida de la función de las proteínas. Esta fragmentación ocurre principalmente en aminoácidos aromáticos, enlaces disulfuro y enlaces peptídicos. Uno de los principales radicales que pueden causar modificaciones en residuos de aminoácidos es el radical hidroxilo, que formando entrecruzamientos covalentes fragmenta cadenas polipeptídicas. Otro radical importante es el radical peroxinitrito que

afecta principalmente a las proteínas que se encuentran en las membranas celulares y en el citoplasma. Las reacciones de oxidación que afectan a las proteínas pueden convertir a algunos aminoácidos, como la arginina y lisina, en derivados de tipo carbonilo, este grupo químico se utiliza para medir el daño oxidativo. Las EROs pueden causar alteraciones en la estructura de los aminoácidos, un ejemplo es la actividad del óxido nítrico sobre la tirosina, que la transforma en nitrotirosina. Este tipo de alteraciones están relacionadas con la pérdida de la acción catalítica en enzimas como la ribonucleasa, esta inactivación enzimática tiene un rol importante en la alteración de las funciones de la célula y por consiguiente de la muerte celular (González-Torres *et al.*, 2000).

#### Hidratos de carbono

Los efectos de las EROs sobre los hidratos de carbono han sido muy poco descritos, pero se sabe que los polisacáridos del grupo glucosaminoglucanos presentan susceptibilidad a especies reactivas, especialmente a los radicales superóxido e hidroxilo. Esta alteración en la función de los polisacáridos está relacionada con patologías de tipo inflamatorias (González-Torres *et al.*, 2000). También se ha descrito el daño de las especies radicales sobre la desoxirribosa y ribosa de los ácidos nucleicos, provocando rompimiento de las cadenas (Sies, Berndt & Jones, 2017).

### **5.3. Patologías relacionadas a estrés oxidativo**

El EO tiene un impacto negativo en una amplia variedad de funciones fisiológicas y participa en el desarrollo de diferentes patologías (Sánchez & Méndez, 2013). A continuación se describe la relación entre el desbalance del estado redox y enfermedades de impacto epidemiológico:

## **Enfermedades metabólicas**

El exceso de peso corporal, las dislipidemias, la resistencia a la insulina y la presión arterial elevada constituyen al síndrome metabólico (Soto, García, Arias, Leirós, Del Álamo & Pérez, 2017). La fisiopatología de este síndrome incluye diversos factores, entre ellos la inflamación crónica y el estrés oxidativo, involucrados en el desarrollo de enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2, la obesidad y algunas complicaciones cardiovasculares como la hipertensión arterial y la aterosclerosis (Aouacheri, Saka, Krim, Messaadia & Maidi, 2015).

Existe una relación inversa entre el porcentaje de grasa corporal, la obesidad visceral y los marcadores de defensa antioxidante en individuos con obesidad, y se ha reportado que la presencia de células hipertrofiadas del tejido adiposo producen altas cantidad de EROs, alterando la función de numerosos tipos de células y tejidos (Le Lay *et al.*, 2014). Las células secretoras de insulina, células sensibles periféricas a la insulina y células endoteliales también se ven afectadas por el aumento de EROs, provocando un deterioro en la función de las células beta del páncreas, involucradas en la patogénesis y en el desarrollo de complicaciones en ambos tipos de diabetes mellitus (I y II) (Aouacheri, Saka, Krim, Messaadia & Maidi, 2015).

El EO está implicado en la patogénesis de diversas enfermedades cardiovasculares, incluyendo la aterosclerosis. Los factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus tipo II y el consumo de tabaco, están asociadas con la producción excesiva de EROs en la pared vascular (Sánchez & Méndez, 2013), esto provoca la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), fragmentándolas y alterando algunos de sus residuos de aminoácidos, proporcionándoles un poder aterogénico mayor. Estas LDL oxidadas son

captadas con mayor facilidad por los macrófagos provocando una lesión aterosclerótica. (Li, Horke, & Förstermann, 2014).

## **Enfermedades neurodegenerativas**

En la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas existe un daño en la conexión formada entre dos neuronas que permite el intercambio de señales (sinapsis). La implicación del EO en la disfunción sináptica es poco entendida, sin embargo, se ha observado que una excesiva generación de EROs en el cerebro puede inducir daño e incluso apoptosis de células neuronales (Kamat *et al.*, 2016).

La enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson son las dos enfermedades neurodegenerativas más comunes, caracterizadas por una neurodegeneración prominente en los sistemas neurales selectivos. Aunque una pequeña fracción de los casos de estas dos enfermedades muestra evidencia de heredabilidad, entre los cuales se han identificado muchos genes, la mayoría son esporádicos sin causas conocidas. Los mecanismos moleculares subyacentes a la neurodegeneración y la patogénesis de estas enfermedades siguen siendo una interrogante, sin embargo, existe evidencia convincente que demuestra que el EO tiene un rol importante y lo vincula con el desarrollo de disfunción y muerte neural. Otra característica prominente en estas enfermedades es la disfunción mitocondrial, que probablemente sea de importancia crítica en la formación de EROs y la fisiopatología de estas enfermedades (Yana, Wanga & Zhu, 2013). Se necesita mayor comprensión de estos mecanismos para el desarrollo de estrategias terapéuticas de prevención y tratamiento de patologías neurodegenerativas (Kamat *et al.*, 2016).

## Otras patologías

### Cáncer

Las EROs ha sido relacionadas con el desarrollo tumoral en diversos procesos cancerígenos como la neovascularización tumoral (angiogénesis), ya que se ha documentado que estimulan el crecimiento de células musculares lisas; la presencia de oncogenes, que en parte son influenciados por el estado de oxidación de la célula; la presencia de algunas especies reactivas en sustancias tóxicas como la nicotina y el alquitrán, involucradas en el desarrollo del cáncer de pulmón y la disminución de enzimas antioxidantes que caracterizan a diversos tipos de células tumorales (Filaire *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha descrito que el cáncer genera por sí mismo EO. Se ha observado que pacientes con cáncer tienen concentraciones de EROs muy elevadas; además, en estos individuos la actividad de enzimas de la defensa antioxidante se encuentra disminuida. Esto se debe, en parte, al incremento del requerimiento de energía por medio de las células neoplásicas, que, al estar en continuo y descontrolado crecimiento y proliferación, aumenta la síntesis de energía en la mitocondria, favoreciendo la producción excesiva de EROs, y por consiguiente a la formación de EO (Viñas, Puig, & Porta, 2012).

### Envejecimiento

La teoría del EO como causa del envejecimiento se basa en la acumulación de lesiones orgánicas a biomoléculas, ocasionada por cantidades elevadas de EROs. Algunas moléculas resultantes de la oxidación, como los aldehídos, generan una pérdida en la flexibilidad de los tejidos, al afectar a proteínas como el colágeno, deteriorando las funciones fisiológicas del organismo. Además se ha observado en células envejecidas una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes y acumulación excesiva de proteínas oxidadas (Guerra, 2001).

#### 5.4. EROs

Una de las principales características de la evolución de la célula eucariota fue la capacidad de utilizar la energía en forma de ATP a través de vías metabólicas que conducen a la reducción final del oxígeno molecular ( $O_2$ ) (Sies, Berndt & Jones, 2017). La utilización de vías metabólicas como el ciclo del ácido cítrico y la cadena de transporte de electrones en la membrana interna de la mitocondria genera EROs y conduce a la síntesis de radicales libres. La síntesis de estas moléculas es un fenómeno natural e importante para la defensa, supervivencia y correcta función de la célula. La mayoría de los organismos vivos no podrían sobrevivir sin la producción de EROs, o con una producción por debajo del punto homeostático, ya que tienen un rol fisiológico en la defensa y proliferación celular. De esta manera los organismos vivos no solo han logrado adaptarse a coexistir con las EROs, sino que han desarrollado mecanismos que les permiten beneficiarse de estas moléculas (Newsholme, Cruzat, Keane, Carlessi & Bittencourt, 2016).

Las EROs son especies químicas que tienen uno o más electrones impares en su orbital externo haciéndolas extremadamente inestables; esta inestabilidad es inversamente proporcional a su vida media y su difusión en el medio celular (Chihuailaf, Contreras, & Wittwer, 2002). Las EROs involucradas con el daño oxidativo son el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo (OH), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el radical peroxilo (ROO), el radical alcoxilo (RO) y el radical hidroperoxilo ( $HO_2$ ) (Newsholme *et al.*, 2016). Algunas de ellas intervienen en reacciones de óxido reducción, necesarias para el metabolismo aeróbico realizado por células eucariotas y algunas procariotas, que, mediante la oxidación de los hidratos de carbono y otros compuestos orgánicos, se produce y almacena energía en forma de ATP (Sies, 1991).

### **5.4.1. Formación de ERO**

Existen factores endógenos y exógenos que inducen la generación de EROs. Entre los factores endógenos se encuentra la respiración mitocondrial, el metabolismo del ácido araquidónico, acciones enzimáticas y catálisis por liberación de cobre y hierro. Otras especies reactivas se forman por factores externos como la contaminación ambiental, las radiaciones UV, la exposición a humo de tabaco, pesticidas, fertilizantes, el consumo excesivo de alcohol y/o estupefacientes, el elevado estrés físico o psicológico y una mala alimentación (Núñez-Sellés, 2011).

Las EROs se generan a nivel intra y extracelular, las células que están involucradas en la producción a nivel intracelular son los macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos y células endoteliales. A nivel extracelular pueden generarse por la administración de fármacos como el paracetamol, tetracloruro de carbono, agentes oxidantes como el humo del cigarro, radiaciones ionizantes, luz solar y shock térmico (Venereo, 2002).

Los mayores sitios de generación de especies reactivas, incluyendo EROs y especies reactivas de nitrógeno (ERN), son la cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTE), el retículo endoplásmico, peroxisomas y sintasas de óxido nítrico. La mitocondria produce el anión superóxido por transferencia de electrones en los complejos I y III de la CTE. Los microsomas y peroxisomas también son fuentes de EROs, principalmente de peróxido de hidrógeno (Newsholme *et al.*, 2016).

## **5.5. Antioxidantes**

Los antioxidantes son cualquier componente que, a concentraciones menores a un sustrato oxidable, tiene la capacidad de retrasar o prevenir la oxidación del mismo (Pisoschi & Pop, 2015). Existen dos grupos principales de antioxidantes, los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Ndhlala, Moyo, &

Van Staden, 2010). Los antioxidantes enzimáticos pueden ser primarios o secundarios, los más eficaces son las enzimas antioxidantes primarias como glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), que neutralizan o previenen la formación de radicales libres. Las enzimas secundarias como glutatión reductasa (GR) no neutralizan directamente a los radicales libres pero juegan un papel de soporte a otros antioxidantes endógenos. Los antioxidantes no enzimáticos pueden ser metabólicos o en forma de nutriente. Los antioxidantes metabólicos son generados de manera endógena por el organismo mediante vías metabólicas. Los antioxidantes también se pueden obtener de manera exógena en la dieta o en suplementos alimenticios, algunos de ellos son la vitamina C, vitamina E, carotenoides, selenio, zinc, compuestos fenólicos, etc. (Aslani & Ghobadi, 2016).

## **5.6. Estrés oxidativo y alimentación**

Los elementos de la dieta tienen un papel crítico en la respuesta al estrés oxidativo. La deficiencia o exceso de nutrientes específicos de la dieta pueden desequilibrar el balance entre los agentes anti y pro oxidantes, además una nutrición hipo o hipercalórica se ha asociado a una mayor probabilidad de oxidación celular, mediada por vías metabólicas específicas (Arrigo *et al.*, 2015).

Las EROs se producen en las rutas del metabolismo aeróbico, pero es en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTEm) donde se genera la mayor cantidad (Arrigo *et al.*, 2015). En los organismos aeróbicos, la CTEm se encarga de la producción de energía mediante la oxidación de los nutrientes, en este proceso, los nutrientes pierden electrones que son captados por los transportadores NAD<sup>+</sup> (nicotidamida adenina dinucleótido) y FAD (flavín adenina dinucleótido) que al ser oxidados generan ATP. Durante el paso de electrones en los complejos de la CTEm, algunos de ellos pueden cambiar de dirección y unirse a moléculas de oxígeno produciendo O<sub>2</sub><sup>-</sup>. De un 1 a 5% del oxígeno total que

debe ser utilizado por la mitocondria no es reducido en agua y se transforma en especie reactiva (Quiles, Ochoa, Huertas & Mataix, 2004).

Debido a la estrecha relación entre el EO y el desarrollo de patologías, se han realizado numerosas investigaciones sobre terapias antioxidantes y dietas especializadas para prevenir y/o disminuir el daño provocado por un exceso de EROs (Guerra, 2011). El consumo de micro y macronutrientes en la dieta contribuye al desarrollo de un entorno con menor o mayor susceptibilidad a la generación y propagación de EROs (Quiles *et al.*, 2004). Además se ha estudiado el efecto que tienen diferentes tipos de lípidos sobre el daño oxidativo (Couillard *et al.*, 2006).

### **5.6.1. Ácidos grasos**

La asociación entre la ingesta de ácidos grasos y la generación de estrés oxidativo ha sido estudiada, sin embargo aún existe controversia en si hay una relación significativa entre ambos, esto se puede deber a las diferencias en el tipo de intervención, diseño de protocolo y duración de los diversos estudios (Vetrani *et al.*, 2012).

Existe evidencia acerca del efecto positivo que tienen los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) sobre la funcionalidad y estructura de las membranas biológicas, disminuyendo su susceptibilidad al ataque oxidativo, mientras que los ácidos grasos saturados (AGS) y ácidos grasos trans (AGT) tienen un efecto negativo en el estado oxidativo. Estos efectos pueden estar relacionados con las propiedades químicas de los ácidos grasos, en especial su grado de insaturación. El alto contenido de dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) los convierte en un objetivo fácil del daño oxidativo, además al ser precursores de ácido araquidónico, están involucrados en procesos de inflamación (Vetrani *et al.*, 2012).

En general los ácidos grasos son consumidos por la población como una mezcla de estos, formando parte de los diferentes aceites comestibles.

#### **5.6.1.1. Ácidos grasos monoinsaturados**

Los ácidos grasos monoinsaturados se clasifican químicamente como ácidos grasos que contienen un solo doble enlace, a diferencia de los ácidos grasos poliinsaturados que contienen dos o más enlaces dobles y ácidos grasos saturados que carecen de dobles enlaces (Schwingshackl & Hoffmann, 2012).

Aunque no existen recomendaciones dietéticas para el consumo de ácidos grasos monoinsaturados dadas por el Instituto Nacional de Medicina, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ni la Asociación Americana de Diabetes, la Academia de Nutrición y Dietética y la Asociación Canadiense de Dietética promueven un consumo menor al 25% AGMI del total diario de energía (Schwingshackl & Hoffmann, 2012).

#### **5.6.1.2. Ácidos grasos poliinsaturados**

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son un factor importante en la salud y enfermedad de los seres humanos, su complejo rol se encuentra aún en debate. Estos ácidos grasos son esenciales, dependen de una ingesta de alimentos ricos en ellos, su principal función es la de mantenimiento de la funcionalidad de las membranas biológicas. Cuando se encuentran incorporados en la membrana lipídica funcionan como sustratos para enzimas oxidantes, generando una serie de moléculas involucradas en procesos de inflamación, respuesta inmunológica, regulación hormonal y proliferación celular (Andrisic, Collinson, Tehlivets, Perak, Zarkovic, Dawes & Gasparovic, 2015)

La influencia de los AGPI en la salud humana puede evaluarse por un desequilibrio en la ingesta de omega 3 y 6. Existe una proporción de 30 a 1, en favor del omega 6, por la alta ingesta de aceites vegetales que caracteriza a la dieta occidental. Esta inclinación puede ser la base del desarrollo de un gran número de patologías. Los metabolitos producidos por la oxidación enzimática de los AGPI omega 6 son considerados pro inflamatorios, promoviendo condiciones patológicas como el cáncer. Por otra parte los metabolitos de AGPI omega 3 son mayormente anti inflamatorios y con propiedades de protección. La oxidación de los múltiples dobles enlaces de los AGPI por acción de EROs da inicio a un proceso de peroxidación lipídica (Andrisic *et al.*, 2015).

### **5.6.1.3. Ácidos grasos saturados**

La obesidad y la resistencia a la insulina se asocian con niveles elevados en plasma de ácidos grasos libres y triglicéridos. Experimentos *in vitro* en una amplia gama de tipos de células han demostrado que la sobreexposición de ácidos grasos saturados promueve la expresión de citoquinas proinflamatorias, altera la señalización de la insulina y estimula la apoptosis caracterizada por el estrés oxidativo (Leamy, Egnatchik, & Young, 2013).

El reemplazo de AGS por AGPI, especialmente ácido graso omega 3, va a repercutir de manera positiva en la salud, particularmente en la mejora de funciones cognitivas y del aparato cardiovascular. Sin embargo los AGPI, omega 6 principalmente, presentan un índice alto de dobles enlaces, que los hace más propensos a la oxidación mediada por oxidantes de la dieta como el hierro hemínico, dando lugar a componentes secundarios de la peroxidación (Guéraud *et al.*, 2015).

## 5.7. Levaduras como modelo de estudio

Las levaduras han sido un instrumento para poder entender mecanismos como la división celular, la replicación del ADN, el doblamiento de proteínas, el transporte intracelular y el metabolismo. Eliminar, insertar o mutar secuencias genómicas se convierte en una tarea relativamente sencilla gracias a la eficiencia de transformación de estas células y por la presencia de una ruta eficiente de recombinación homóloga (Tenreiro & Outeiro, 2010). El genoma de muchas levaduras tiene un alto grado de homología con el genoma humano, incluso muchas proteínas muestran una homología funcional elevada con proteínas humanas específicas, por lo cual es un modelo de estudio óptimo para entender procesos celulares complejos (Torre-Ruiz, Pujol, & Sundaran, 2015).

### 5.7.1. Características generales de *Y. lipolytica*

En los últimos años ha aumentado el interés en las levaduras no convencionales por sus características bioquímicas y aplicaciones potenciales. *Y. lipolytica* es una levadura no convencional con una fisiología y características específicas. Sus capacidades metabólicas le permiten asimilar diferentes fuentes de carbono, incluyendo materiales hidrofóbicos e hidrofílicos (Coelho, Amaral, & Belo, 2010).

*Y. lipolytica* es una levadura aeróbica muy sensible a las concentraciones de oxígeno que afecta su ciclo de crecimiento y metabolismo, puede asimilar y utilizar diferentes fuentes de carbono, ya sean solubles o no en agua. No es patogénica y es considerada por la FDA como segura (Liu, Ji, & Huang, 2015). Originalmente fue aislada de material rico en lípidos como mantequilla rancia, es por esta razón por la que se le llamo *lipolytica* (Coelho *et al.*, 2010).

### **5.7.2. Respuesta de las levaduras a diferentes fuentes de carbono**

Como se mencionó anteriormente, las levaduras pueden utilizar diferentes fuentes de carbono para su crecimiento; sin embargo, se han descrito diferencias en procesos biológicos. En un estudio realizado en *S. cerevisiae* se comparó el crecimiento en medios de cultivo con glucosa, glicerol y una mezcla de ambos, encontrando diferencias en la tasa de crecimiento, el tiempo de duplicación y el tiempo en que las células sufrieron apoptosis; además, se determinó que el contenido intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue mayor en las células que crecieron en el medio adicionado con la mezcla de glucosa y glicerol (Zeng, Chen, Gao, Ren, Wang & Mao, 2015).

En *Y. lipolytica* se ha comparado el crecimiento y la síntesis de lípidos en medios de cultivo con glicerol, dextrosa y aceite de canola como fuente de carbono, encontrando que los medios con aceite de canola presentaron un crecimiento mayor a los medios adicionados con glicerol o dextrosa, además la formación de triglicéridos se ve afectada dependiendo de la cantidad de nitrógeno que contenían los medios de cultivo (Sestric, Munch, Cicek, Sparling & Levin, 2014).

### **5.7.3. Levaduras y EO**

Las células de levaduras se han utilizado como modelos de experimentación para el estudio del EO y sus efectos, debido a que son fácil y eficientemente manipulables por técnicas de genética clásica y molecular, y por otra parte, a que conservan procesos celulares básicos característicos de células eucariotas. Cuando las levaduras se encuentran en condiciones de EO se induce la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes incluyendo eliminadores de EROs (glutatión peroxidasas, catalasas, tiorredoxinas, superóxido dismutasas) y de proteínas que contrarrestan los daños ocasionados por el estrés oxidativo (Farrugia & Balzan, 2012).

En 2013, Lopes y colaboradores, realizaron un estudio en el que se determinó la actividad de enzimas antioxidantes en células de levaduras sometidas a diferentes condiciones de estrés oxidativo; los autores describen una respuesta antioxidante más potente *en Y. lipolytica* que en otras especies, observando un incremento en la actividad de las enzimas SOD y CAT.

Los datos anteriores sugieren que la generación intracelular de EROs se ve condicionada por el metabolismo y utilización de las diferentes fuentes de carbono, además de la respuesta antioxidante específica de cada especie.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Material químico

Los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron: extracto de levadura (USBiological), peptona (Difco), glucosa (Sigma), YNB (Difco), buffer de fosfatos (PBS), leucina, uracilo, sulfato de amonio, tween 80, diacetato de diclorofluoresceína (Sigma), dimetil sulfóxido (Sigma), peróxido de hidrógeno (Jalmek), aceite comestible puro de canola (Canoil), aceite de semilla de chía (Solanum Pharma) y aceite virgen de coco (Central Market Organics).

### 6.2. Material biológico

La cepa de *Yarrowia lipolytica* que se utilizó en este estudio es P01A.

### 6.3. Métodos

#### 6.3.1. Diseño del estudio

Este es un estudio de tipo experimental que se realizó de julio de 2017 a julio de 2018 utilizando como modelo de estudio al hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica*. Para cada experimento se realizaron precultivos de la cepa P01A de *Y. lipolytica* para lograr una OD de 0.2. Para la determinación del posible efecto de diferentes ácidos grasos sobre el metabolismo y desarrollo de estrés oxidativo se analizó el crecimiento celular por medio de espectrofotometría y la cantidad de especies reactivas de oxígeno por medio de espectrometría de fluorescencia. Los experimentos se realizaron por triplicado y se compararon mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA) utilizando el software SPSS (SPSS, Inc. Chicago Illinois, EE. UU.).

La parte experimental se realizó en los laboratorios de Proteómica, Genética y Biología Molecular en el 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).

### **6.3.2. Estrategia general**

El desarrollo del presente trabajo se basó en la evaluación del efecto de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados sobre la generación de estrés oxidativo en la cepa P01A de *Y. lipolytica* en tres etapas principales (figura 1):

1. Búsqueda de fuentes comestibles (aceites) con alto contenido de ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados).
2. Análisis del efecto de la adición de los aceites en el crecimiento celular de *Y. lipolytica*.
3. Cuantificación de la generación de EROs en los medios de cultivo adicionados con los aceites altos en ácidos grasos.
4. Análisis de la morfología celular en los diferentes medios de cultivo,

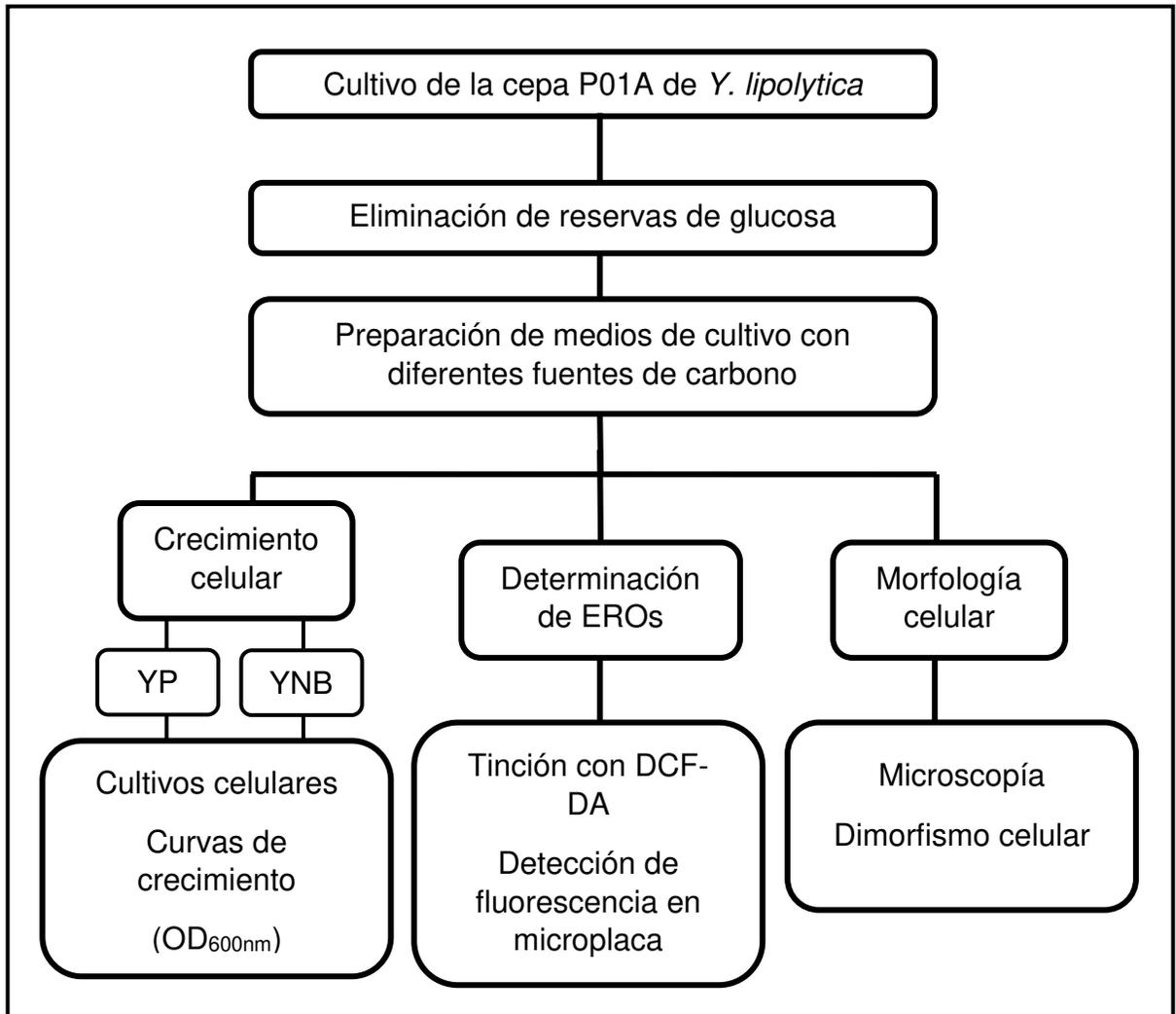


Figura 1. Estrategia general de trabajo.

### 6.3.3. Preparación del preinóculo

Para la reactivación de la cepa P01A de *Y. lipolytica* se utilizó el medio de cultivo YPD, el cual se preparó mezclando los siguientes reactivos: 2 g de glucosa (2%), 2 g de peptona (2%) y 1 g de extracto de levadura (1%). Posteriormente se disolvieron con agua ultra pura estéril aforando a un volumen final de 100 ml y se esterilizó por autoclave (121 °C, 15 lb/pulg<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos).

#### **6.3.4. Eliminación de reservas de glucosa y preparación de inóculos**

Para la eliminación de las reservas de glucosa en las células de *Y. lipolytica* se utilizó como preinóculo el cultivo de células en medio YPD (12-16 h de incubación a 28°C y 200 rpm), el cual se centrifugó a 2500 rpm por 5 min (centrifuga 5804 R, Eppendorf), se eliminó el sobrenadante por decantación y se sustituyó por 100 ml de agua ultra pura estéril (este proceso de lavado se realizó dos veces en condiciones de esterilidad). Las células resuspendidas en agua estéril se incubaron durante 2h a 28°C con agitación (200 rpm). Después se determinó la densidad óptica (OD<sub>600nm</sub>) utilizando un espectrofotómetro Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific). Para determinar el volumen necesario del preinóculo que permitiera tener una OD inicial de 0.2 en los diferentes cultivos, se utilizó la siguiente fórmula:

$$V_i = (C_f) (V_f) / (C_i)$$

**V<sub>i</sub>**= Volumen inicial de inóculo

**C<sub>f</sub>**= Concentración final

**V<sub>f</sub>**= Volumen final

**C<sub>i</sub>**= Concentración de precultivo

#### **6.3.5. Preparación de medio YP adicionado con diferentes fuentes de carbono**

Para preparar la solución YP (extracto de levadura y peptona) se disolvieron 1.2 g de extracto de levadura y 2.4 g de peptona aforando a un volumen final de 120 ml con agua pura estéril y se esterilizó por autoclave. El medio se repartió en 4 matraces estériles de 250 ml (30 ml en cada uno) y se les adicionaron los siguientes componentes: a) 2% de glucosa, b) 2% de aceite de coco (AGS), c) 2% de aceite de semilla de chía (AGPI) y d) 2% de aceite de canola (AGMI). Posteriormente se agregó la cantidad calculada de inóculo de células de *Y. lipolytica* con reservas de glucosa agotadas. La inoculación de los medios se

realizó en condiciones de esterilidad utilizando la campana de flujo laminar (SterilGARD®III Advance).

#### **6.3.6. Preparación de medio YNB adicionado con diferentes fuentes de carbono**

Para preparar la solución YNB se disolvieron 0.85 g de base nitrogenada de levadura (YNB), 0.112 g de uracilo, 0.130 g de leucina y 2.5 g de sulfato de amonio aforando a un volumen final de 200 ml con agua pura estéril. El medio se repartió en 6 matraces estériles de 250 ml (30 ml cada uno) a los cuales se les adicionó los siguientes componentes: a) 2% de glucosa, b) 2% de aceite de coco (AGS)/Tween 80, c) 2% de aceite de semilla de chía (AGPI)/Tween 80, d) 2% de aceite de canola (AGMI)/Tween 80, e) 2% de glucosa/Tween 80 y f) 2% de Tween 80. Posteriormente se agregó la cantidad calculada de inóculo de células de *Y. lipolytica* con reservas de glucosa agotadas. La adición del emulsificante Tween 80 se realizó para facilitar la solubilidad de los aceites adicionados al medio mínimo YNB.

La inoculación de los medios se realizó en condiciones de esterilidad utilizando la campana de flujo laminar (SterilGARD®III Advance).

#### **6.3.7. Curvas de crecimiento en medios YP**

La velocidad de crecimiento de la cepa P01A de *Y. lipolytica* se observó realizando curvas de crecimiento mediante la determinación de OD<sub>600nm</sub>, en medio de cultivo YP adicionado con diferentes fuentes de carbono. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 28°C con agitación a 200 rpm. La OD<sub>600nm</sub> se determinó cada 12 horas durante 7 días de cultivo, los valores obtenidos se graficaron y se comparó el crecimiento celular en cada uno de los medios adicionados con ácidos grasos, con respecto al medio adicionado con glucosa (cultivo control).

### **6.3.8. Curvas de crecimiento en medios YNB**

La velocidad de crecimiento de la cepa P01A de *Y. lipolytica* se analizó realizando curvas de crecimiento mediante la determinación de OD<sub>600nm</sub>, en medios de cultivo YNB adicionados con diferentes fuentes de carbono (aceite de coco, aceite de canola, aceite de semilla de chía), utilizando 3 controles (YPD, YPD/Tween 80, y 1% de Tween 80). Los cultivos se incubaron a una temperatura de 28°C con agitación a 200 rpm. La OD<sub>600nm</sub> se determinó cada 24 horas durante 144 h, los valores obtenidos se graficaron y se comparó el crecimiento celular en cada uno de los medios adicionados con ácidos grasos con respecto a los medios control.

### **6.3.9. Detección de Especies Reactivas de Oxígeno**

Para evaluar el efecto de las diferentes fuentes de carbono sobre la producción de EROs en las células de *Y. lipolytica* se dispusieron 7 matraces estériles de 250 ml de capacidad con 40 ml de medio YNB a los cuales se les adicionó los siguientes componentes: a) 2% de glucosa, b) 2% de aceite de coco (AGS)/Tween 80, c) 2% de aceite de semilla de chía (AGPI)/Tween 80, d) 2% de aceite de canola (AGMI)/Tween 80, e) 2% de glucosa/Tween 80, f) 2% de Tween 80 y g) glucosa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Después se agregó la cantidad calculada de inóculo de células de *Y. lipolytica* con reservas de glucosa agotadas.

Los medios se inocularon con la cantidad de células necesarias para obtener una OD inicial de 0.2 y se incubaron a 28°C con agitación orbital (200 rpm). La inoculación de los medios se realizó en condiciones de esterilidad utilizando la campana de flujo laminar (SterilGARD®III Advance). A diferentes tiempos de incubación se tomó una alícuota de cada medio, la cual se ajustó a una OD de 1.0. Posteriormente se le agregó el fluoróforo Diacetato de diclorofluoresceína y se incubó a 30°C por 1 hora en la oscuridad, se recuperó el paquete celular y las células se lavaron 3 veces con PBS 1X. Las muestras se transfirieron a

microplacas de 96 pocillos, donde se realizó la lectura de la fluorescencia en un fluorímetro (Fluoroskan Ascent FL) a una longitud de onda de 465-538 nm.

#### **6.3.10. Morfología celular**

La capacidad de dimorfismo de la cepa P01A de *Y. lipolytica* se evaluó al ser cultivada en medio mínimo YNB adicionado con diferentes fuentes de carbono (ácidos grasos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados y glucosa, adicionados con T80; glucosa sin T80 y glucosa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), durante determinadas fases del crecimiento celular. La diferenciación celular se observó después de 24, 48, 72, 96 y 144 h de incubación (siguiendo la metodología descrita en el inciso 6.3.8), utilizando la técnica de microscopía en contraste de fase en un microscopio trinocular invertido (AE21, Motic), utilizando un objetivo 20X. Los resultados se documentaron a través de fotografías empleando el programa Motic Images Plus 2.0.

#### **6.4. Análisis estadísticos**

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS versión 23 (SPSS, Inc. Chicago Illinois, EE. UU.). Para comparar las diferencias en el crecimiento celular de la cepa P01A de *Y. lipolytica* en los medios de cultivo YP y YNB adicionados con ácidos grasos contra el control (glucosa) se utilizó la prueba T de Student para muestras independientes. Posteriormente se analizaron las diferencias en el crecimiento celular en los medios de cultivo adicionados con los diferentes tratamientos y la producción de EROs, utilizando el análisis de varianza de un factor (ANOVA) con la prueba Post Hoc de Tukey. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Selección de aceites vegetales

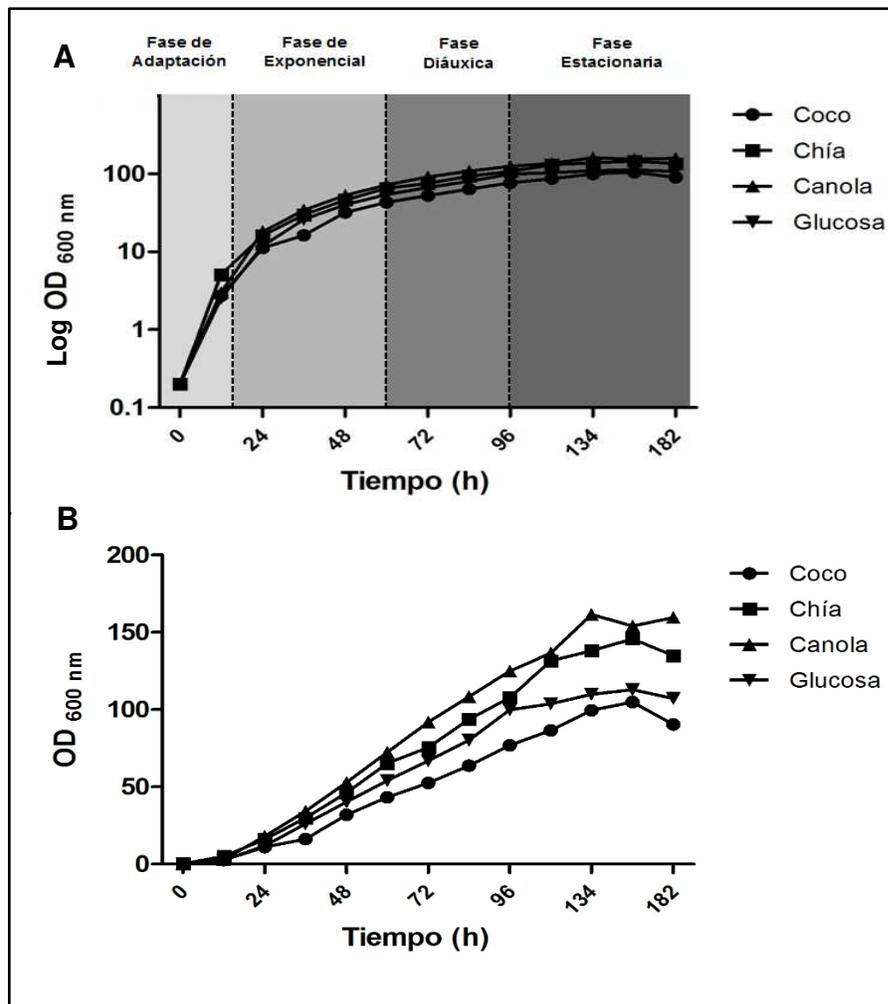
En la primera parte de la investigación se realizó la selección de los aceites que se utilizaron como fuente de ácidos grasos. Se utilizó la base de datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para identificar los aceites vegetales que presentaran una composición de ácidos grasos con elevada uniformidad, seleccionando los siguientes: aceite de coco con 82.47% de ácidos grasos saturados (ácido láurico, mirístico, palmítico, cáprico y esteárico); aceite de semilla de chía con 83% de ácidos grasos poliinsaturados (ácido alfa linolénico y linoleico) y aceite de canola con 63.27% de ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico). Se decidió utilizar aceites con contenidos alto de ácidos grasos en lugar de ácidos grasos libres con la intención de recrear una condición similar a la que ocurre en un organismo al ingerir nutrientes, en este caso aceites comestibles.

### 7.1. Crecimiento de *Y. lipolytica* cultivada con diferentes fuentes de carbono

Para determinar el crecimiento de la cepa P01A de *Y. lipolytica* con diferentes fuentes de carbono se realizaron medios de cultivo YP adicionados con: aceite de coco, semilla de chía, canola y glucosa (control). Se observó que esta levadura tiene la capacidad de crecer utilizando otras fuentes de carbono, además de la glucosa, observando un patrón de crecimiento similar en todos los medios de cultivo (figura 2).

En los patrones de crecimiento de los diferentes cultivos se identificaron las fases de crecimiento celular. En la figura 2A se observan las fases de crecimiento celular: fase de adaptación, la cual comprende desde la inoculación (hora cero) hasta aproximadamente 15 horas de incubación, a partir de este momento el número de células llega a  $10^7$  cel/ml ( $OD_{600}$  nm de 0.5); la fase exponencial o logarítmica, caracterizada por una tasa de duplicación acelerada que se extiende

desde las 15 h hasta las 60 h; la fase de crecimiento diaúxico, de 60 h a las 96 h, en el cual la célula utiliza otra fuente de carbono para continuar con un crecimiento desacelerado y la fase estacionaria (a partir de las 96 h), la cual se caracteriza por no haber cambios en la cantidad de células o la densidad óptica en los cultivos.

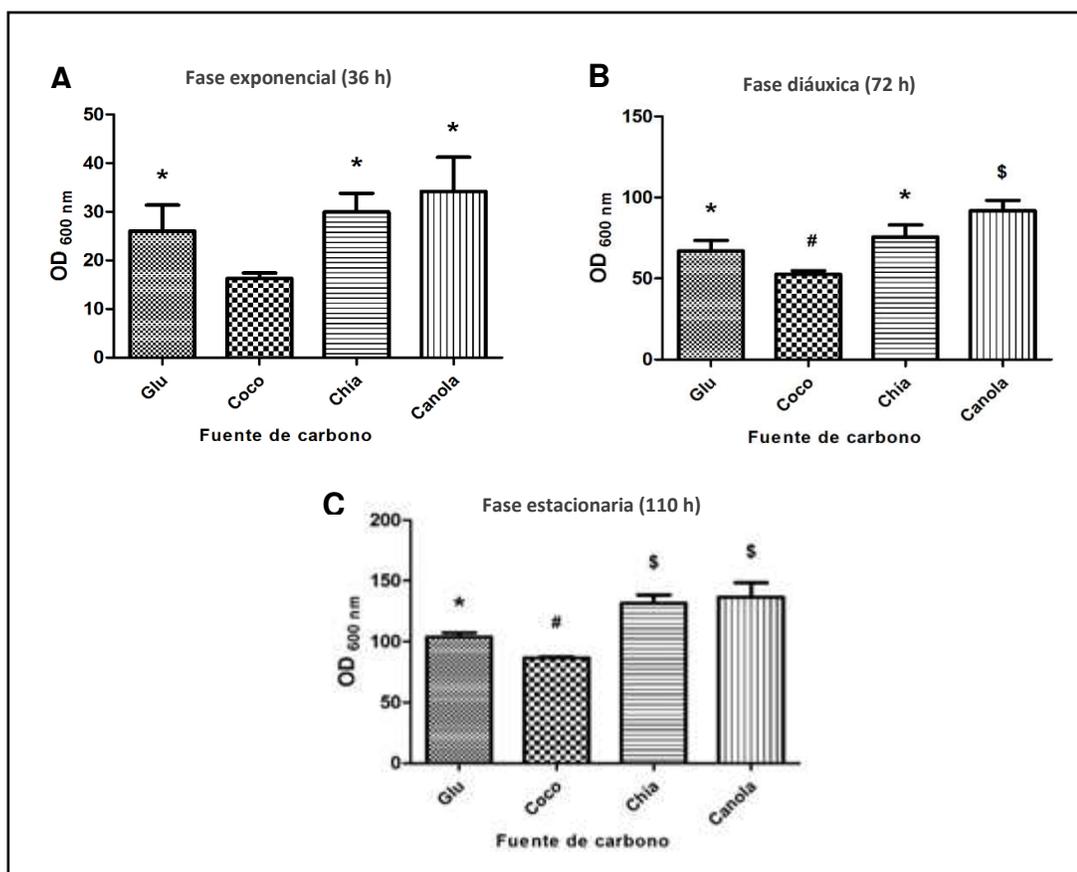


**Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa P01A de *Y. lipolytica* cultivada con diferentes fuentes de carbono.** Se realizaron inóculos con OD inicial de 0.2 en medio YP adicionados con aceite de coco, semilla de chía, canola y glucosa (control), realizando mediciones cada 12 h durante 182 h. En la figura A se observan las fases de crecimiento: fase de adaptación (de 0 a 15 h), exponencial (de 15 a 60 h), diáuxica (de 60 a 96 h) y estacionaria (a partir de 96 h), los valores están expresados de manera logarítmica. En la figura B se observan las diferencias en el crecimiento celular de *Y. lipolytica* cuando utiliza diferentes fuentes de carbono a determinado tiempo de incubación. Se indica el valor promedio de tres experimentos independientes.

Para determinar el crecimiento de la cepa P01A en el medio YP adicionado con ácidos grasos saturados (aceite de coco), ácidos grasos poliinsaturados (aceite de semilla de chía), ácidos grasos monoinsaturados (aceite de canola y el control (glucosa), se realizaron mediciones en intervalos de 12 h durante 182 h. En la figura 2B se observa el patrón de crecimiento celular en los medios de

cultivo con las distintas fuentes de carbono, encontrando diferencias significativas en todos los tiempos de incubación excepto a las 60 y 96 h.

Utilizando la prueba estadística análisis de varianza de un factor (ANOVA) y post hoc de Tukey, se comparó el crecimiento celular de *Y. lipolytica* entre los diferentes medios de cultivo, encontrando diferencias en la fase de crecimiento exponencial (figura 3A), en la fase diáuxica (figura 3B), y en la fase estacionaria (figura 3C).



**Figura 3. Comparación del crecimiento de la cepa P01A de *Y. lipolytica* cultivada en medio YP adicionado con ácidos grasos saturados (aceite de coco), ácidos grasos poliinsaturados (aceite de semilla de chíá), ácidos grasos monoinsaturados (aceite de canola) y el control (glucosa). A las 36 h de incubación (A) se observa un menor crecimiento en el medio con AGS en comparación con los demás medios; a las 72 h (B) el medio con AGMI presenta un crecimiento mayor y el medio con AGS un crecimiento menor a los demás medios y a las 110 h (C) los medios de cultivo con AGMI y AGPI presentaron un crecimiento similar entre ellos y mayor al control (glucosa) y el medio con AGS presentó un crecimiento menor al de los anteriores. Se indica el valor promedio de tres experimentos independientes; la barra en la parte superior de cada columna indica la desviación estándar. Superíndices (\*, #, \$) indican diferencias entre grupos, con base en el análisis de varianza y post-hoc de Tukey.**

Para la determinación del efecto de cada uno de los aceites con alto contenido de ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) en el crecimiento de *Y. lipolytica* se comparó la OD de los cultivos adicionados con ácidos grasos contra el medio control (glucosa), encontrando diferencias a determinados tiempos de incubación (tabla 1).

**Tabla 1. Comparación del crecimiento de *Y. lipolytica* cultivada en medio YP adicionado con glucosa contra los medios adicionados con ácidos grasos.**

	<b>Glucosa</b>	<b>Coco</b>	<b>P</b>	<b>Chía</b>	<b>P</b>	<b>Canola</b>	<b>P</b>
<b>12 h</b>	<b>2.54 ± 0.43</b>	2.72 ± 0.43	0.828	5.20 ± 1.32	0.033*	3.01 ± 1.36	0.491
<b>24 h</b>	<b>11.91 ± 2.54</b>	11.14 ± 0.43	0.631	16.10 ± 0.63	0.096	18.08 ± 4.62	0.066
<b>36 h</b>	<b>26.02 ± 5.35</b>	16.28 ± 1.10	0.036*	29.95 ± 3.83	0.359	34.18 ± 9.66	0.184
<b>48 h</b>	<b>40.21 ± 5.50</b>	31.95 ± 3.90	0.101	46.25 ± 3.87	0.195	52.90 ± 7.64	0.046*
<b>60 h</b>	<b>54.15 ± 8.50</b>	43.22 ± 7.59	0.172	65.24 ± 9.70	0.211	72.44 ± 6.39	0.057
<b>72 h</b>	<b>66.91 ± 6.64</b>	52.61 ± 2.21	0.024*	75.53 ± 7.53	0.211	91.85 ± 8.85	0.009*
<b>84 h</b>	<b>80.30 ± 12.8</b>	63.80 ± 5.20	0.107	93.8 ± 13.63	0.279	108.4 ± 4.56	0.021*
<b>96 h</b>	<b>99.90 ± 6.51</b>	76.9 ± 9.55	0.026*	107.7 ± 20.2	0.559	124.96 ± 3.7	0.015*
<b>110 h</b>	<b>103.8 ± 3.71</b>	86.54 ± 0.96	0.001*	131.6 ± 6.85	0.003*	136.6 ± 13.8	0.010*
<b>134 h</b>	<b>109.9 ± 5.17</b>	99.63 ± 1.55	0.029*	138.1 ± 6.97	0.005*	161.6 ± 8.03	0.000*
<b>158 h</b>	<b>112.93 ± 5</b>	104.9 ± 4.83	0.118	145.7 ± 11.2	0.010*	154.1 ± 16.1	0.013*
<b>182 h</b>	<b>107.3 ± 16.2</b>	90.48 ± 12	0.223	134.9 ± 25.3	0.187	159.52 ± 33	0.034*

Se compararon los valores de OD tomadas cada 12 h durante 182 h. Los datos se expresan como media ± desviación estándar de los valores obtenidos de tres experimentos independientes. Prueba t de Student para muestras independientes: \* indica diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los medios de cultivo.

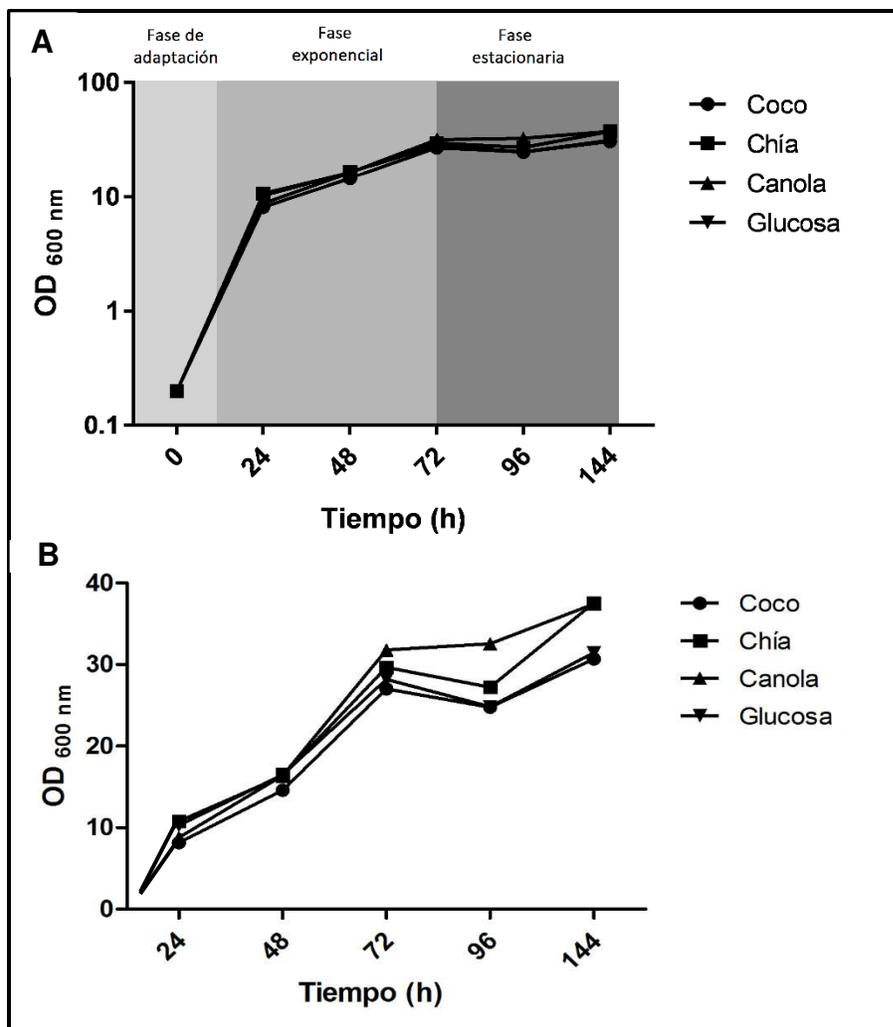
## 7.2. Crecimiento de *Y. lipolytica* en medio de cultivo YNB con diferentes fuentes de carbono

Para determinar si el crecimiento de la cepa P01A de *Y. lipolytica* era atribuido únicamente a la fuente de carbono administrada en cada medio de cultivo, y no a los elementos traza (hidratos de carbono, aminoácidos, etc.) se decidió realizar una segunda serie de experimentos, utilizando el medio mínimo YNB en lugar del medio YP, ya que éste contiene extracto de levadura y peptona). Al utilizar el medio YNB fue necesario agregar el emulsificante Tween 80, para evitar la formación de micelas en los medios adicionados con ácidos grasos.

De manera similar a lo efectuado en el medio YP, se realizaron inóculos de la cepa P01A (OD inicial= 0.2) en medio de cultivo YNB adicionado con aceite de coco (AGS), aceite de semilla de chía (AGPI), aceite de canola (AGMI) y glucosa (control), en las condiciones descritas en materiales y métodos. Además se agregaron 2 medios control: YNB + Tween 80 y YNB + glucosa (sin Tween 80).

En la figura 4A se observan las fases de crecimiento: fase de adaptación (0 a 12 h), la fase exponencial (12 a 72 h) y la fase estacionaria, de las 72 h en adelante, en la cual no se observan cambios en la densidad óptica de los cultivos.

Se determinó el crecimiento de *Y. lipolytica* en los diferentes medios de cultivo, comparando las OD de los cultivos a intervalos de 24 h durante 144 h. En la figura 4B se observa el patrón de crecimiento de los medios de cultivo con ácidos grasos (saturados, poliinsaturados y monoinsaturados) y el medio control (glucosa), encontrando diferencias a las 24, 72 y 96 h de incubación.



**Figura 4. Curva de crecimiento de la cepa P01A de *Yarrowia lipolytica* cultivada con diferentes fuentes de carbono en medio YNB.** Se realizaron inóculos con OD inicial de 0.2 en medio YNB adicionados el emulsificante Tween 80 y aceite de coco, semilla de chía, canola y glucosa (control), realizando mediciones cada 24 h durante 144 h. En la figura A se observan las diferentes fases de crecimiento: fase de adaptación (de 0 a 12 h), exponencial (de 12 a 72 h) y estacionaria (a partir de 72 h), los valores están expresados de manera logarítmica. En la figura B se observan el crecimiento con diferentes fuentes de carbono a determinado tiempo de incubación. Se indica el valor promedio de tres experimentos independientes.

En la tabla 2 se observan los resultados de la comparación del crecimiento de las células de *Y. lipolytica* en medio YNB adicionado con los diferentes ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados). Se observan un crecimiento mayor en los medios de cultivo adicionados con AGMI (aceite de canola) a las 96 y 144 h de incubación, en comparación con el medio control (glucosa).

**Tabla 2. Comparación en el crecimiento de *Y. lipolytica* cultivada en medio YNB con glucosa contra los medios adicionados con ácidos grasos.**

<b>h</b>	<b>Glucosa/T80</b>	Coco/T80	P	Chía/T80	P	Canola/T80	P
<b>24</b>	<b>10.28 ± 0.35</b>	8.14 ± 0.39	0.002*	10.77 ± 0.9	0.463	8.79 ± 1.55	0.234
<b>48</b>	<b>16.49 ± 1.14</b>	14.57 ± 1.6	0.170	16.35 ± 0.3	0.850	16.40 ± 0.68	0.906
<b>60</b>	<b>28.19 ± 0.99</b>	27.01 ± 1.7	0.358	29.65 ± 0.9	0.143	31.77 ± 2.25	0.065
<b>96</b>	<b>24.81 ± 0.76</b>	24.76 ± 1.4	0.962	27.2 ± 1.66	0.084	32.55 ± 2.14	0.004*
<b>144</b>	<b>31.46 ± 0.36</b>	30.69 ± 0.6	0.321	37.4 ± 0.78	0.000*	38.2 ± 3.72	0.035*

Se compararon las mediciones de OD tomadas cada 24 h durante 144 h. Los datos se expresan como media ± desviación estándar de los datos obtenidos de tres experimentos independientes. Prueba t de Student para variables independientes: \* indica diferencia significativa entre los medios de cultivo.

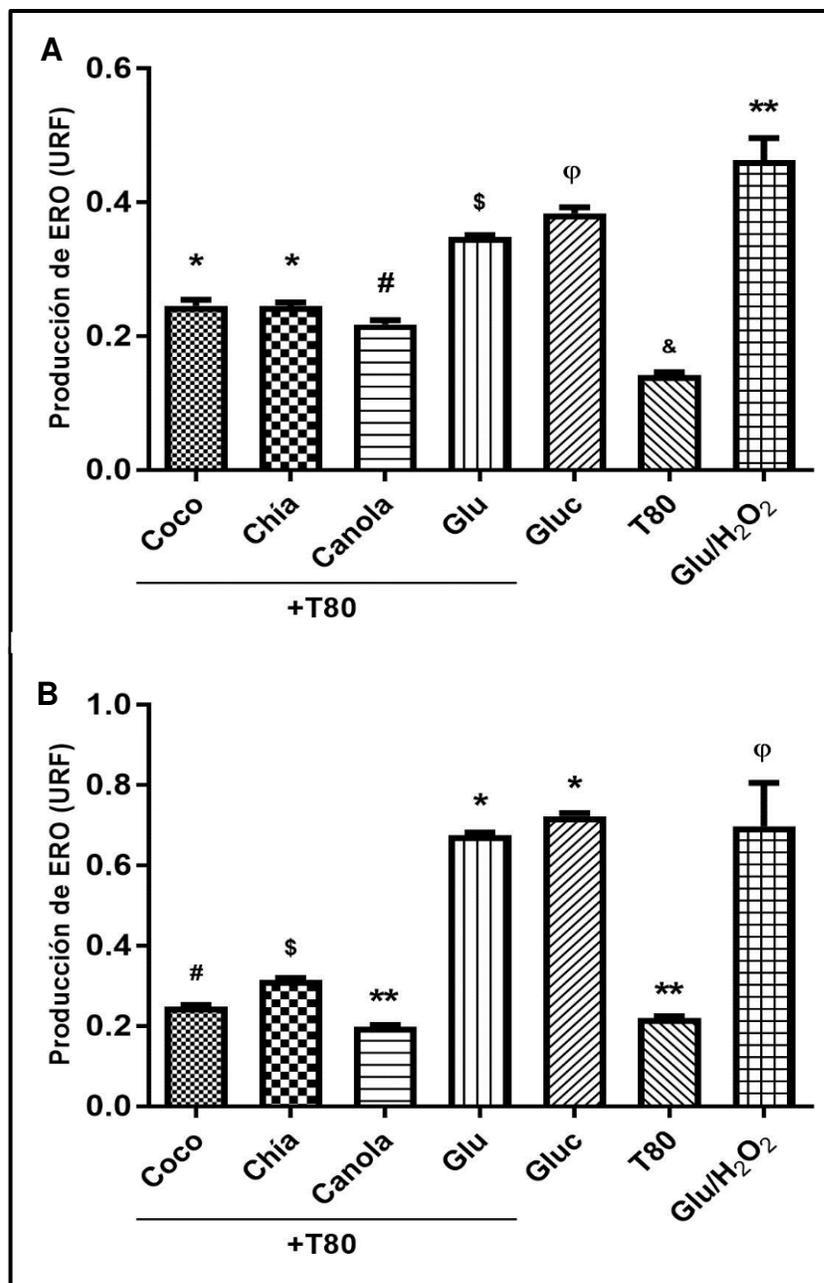
### **7.3. Cuantificación de la generación de EROs en medios de cultivo YNB**

Para la cuantificación de las EROs intracelulares se utilizó la sonda de fluorescencia diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA). Este reactivo entra en la célula y reacciona con las EROs produciendo el fluoróforo diclorofluoresceína. Las células fueron incubadas a 28°C por una hora en la oscuridad con una solución de PBS/DMSO/DCF-DA permitiendo que se incorpore al interior de la célula. El paquete celular fue centrifugado y resuspendido en buffer de fosfatos. La fluorescencia de las células cultivadas en los diferentes medios se midió a una longitud de onda de 485-538 nm (ex., em. respectivamente).

En las células cultivadas en los medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono se encontró diferencias en la cantidad de fluorescencia emitida a las 24, 48, 72, 96 y 144 h de incubación. A las 24 h de incubación el medio de cultivo con aceite de canola (AGMI) fue el que menor cantidad de EROs generó, seguido del aceite de semilla de chía (AGPI), el medio con aceite de coco (AGS) y el emulsificante Tween 80 presentan cantidades similares, los medios de cultivo adicionados con glucosa y glucosa con Tween 80 generaron altas cantidades de

EROs, siendo el medio de glucosa adicionado con  $H_2O_2$  el que más generó. A las 48 h de incubación el medio con Tween 80 generó la menor cantidad de EROs, seguido del aceite de canola, los medios con aceite de semilla de chía y coco presentaron cantidades similares, después el medio con glucosa, glucosa con Tween 80 y por último el medio de glucosa con  $H_2O_2$  generando la mayor cantidad. A las 72 horas de incubación el medio de cultivo adicionado con Tween 80 generó la menor cantidad de EROs, seguido del medio con canola, aceite de coco, aceite de semilla de chía, glucosa y glucosa con Tween 80 generaron cantidades similares, y por último el medio de glucosa con  $H_2O_2$ . A las 96 h de incubación el medio de cultivo con Tween 80 generó la menor cantidad de EROs, seguido del medio con aceite de canola, los medios con aceite de coco y semilla de chía generaron cantidades similares, seguidos del medio con glucosa, glucosa con Tween 80 y por último el medio de glucosa con  $H_2O_2$ . A las 144 h de incubación los medios adicionados con aceite de canola y Tween 80 fueron los que menor cantidad de EROs generaron, seguidos del medio con aceite de coco, aceite de semilla de chía, los medios con glucosa y glucosa con Tween 80 generaron cantidades similares y el medio de glucosa con  $H_2O_2$  fue el que mayor cantidad de EROs generó.

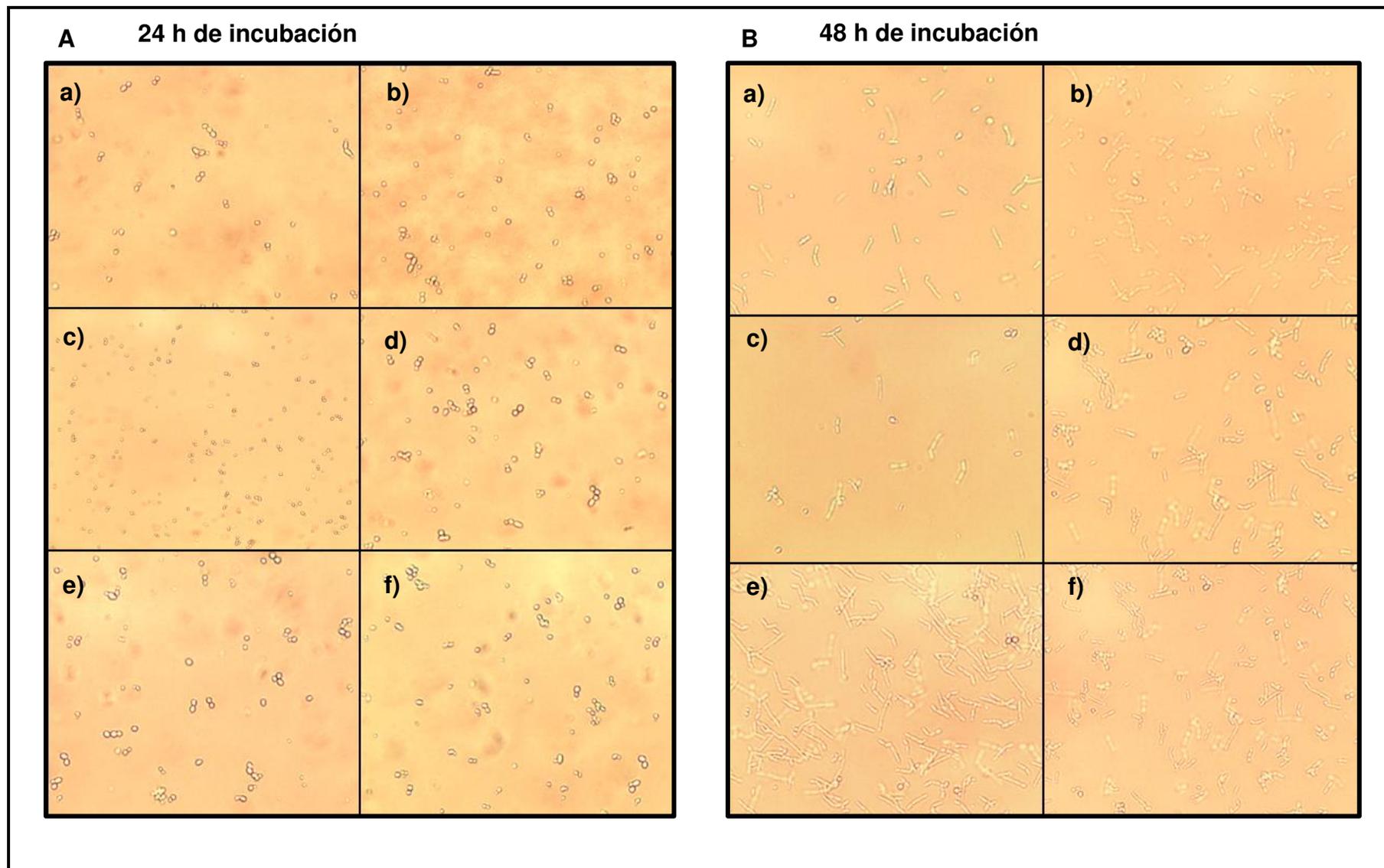
En la figura 5 se observan las diferencias en la cantidad de EROs generadas en los diferentes medios de cultivo a las 48 h, fase exponencial (fig. 5A), y a las 144 h, fase estacionaria (figura 5B). Se observó que las células cultivadas en los medios de cultivo adicionados con ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) generaron una cantidad de EROs menor en comparación con los medios de cultivo adicionados con glucosa.



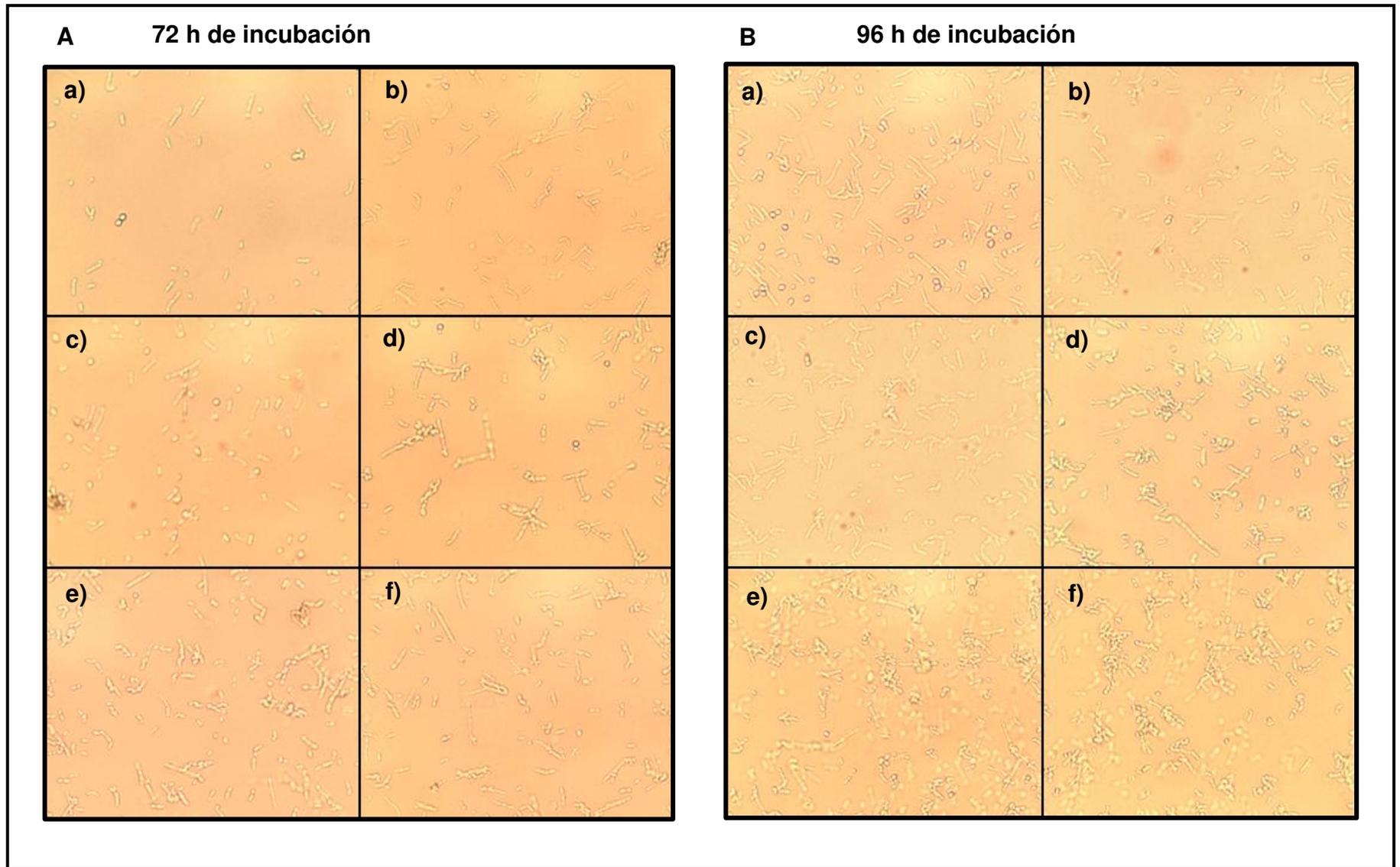
**Figura 5. Comparación de la generación de EROs en medios de cultivo de la cepa P01A de *Y. lipolytica* en medio YNB adicionado con aceite de coco, aceite de semilla de chía, aceite de canola y el control (glucosa), adicionados con T80, y 3 controles (glucosa sin T80, T80 y glucosa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).** En A se observa la cantidad de EROs generadas a las 48 h de incubación (fase exponencial) y en B la cantidad de EROs generada a las 144 h de incubación (fase estacionaria). Se indica el valor promedio de tres experimentos independientes; la barra en la parte superior de cada columna indica la desviación estándar. Superíndices (\*, #, \$, \*\*, φ) indican diferencias significativas (p ≤ a 0.05) con base en el análisis de varianza y post-hoc de Tukey. URF: Unidades relativas de fluorescencia.

#### **7.4. Morfología de *Y. lipolytica* cultivada con diferentes fuentes de carbono**

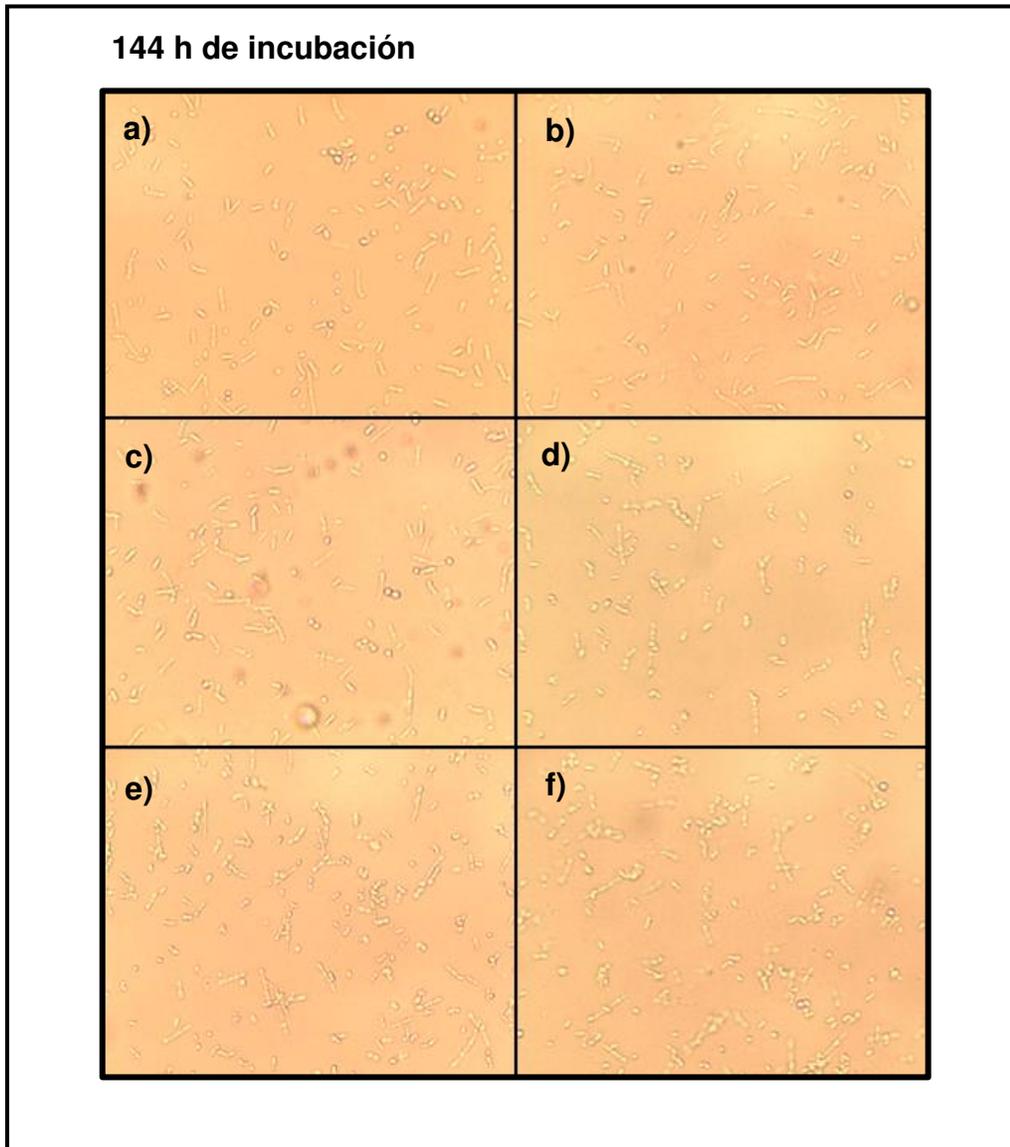
Los cambios en la morfología de las células de la cepa P01A de *Y. lipolytica* cuando fue cultivada en diferentes fuentes de carbono se analizaron utilizando un microscopio invertido Motic AE21. En la figura 6A se observan la morfología de las células después de 24 horas de incubación, presentando forma de levadura en todos los medios de cultivo. A las 48 h (fig. 6B) se observan cambios en la morfología celular al presentar forma tanto de micelio como de levadura en todos los medios de cultivo, además se observa diferencia en la cantidad de células, siendo los medios de cultivo con glucosa los que mayor número de células presentaron. A las 72 h (fig. 7A) se observa que en el medio con aceite de coco (ácidos grasos saturados) la cantidad de células en forma de micelio es similar a las que presentan forma de levadura, mientras que en los medios con aceite de semilla de chía (ácidos grasos poliinsaturados) y aceite de canola (ácidos grasos monoinsaturados) predomina la forma de micelio, en los medios de cultivo con glucosa, glucosa/T80 y glucosa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observa un crecimiento predominantemente de micelio. A las 96 h de incubación, inicio de la fase estacionaria (fig. 7B), no se observan cambios en la morfología celular con respecto a lo descrito a las 72 h de incubación. Sin embargo, a las 144 h de incubación ocurre una disminución en la cantidad de células de todos los medio de cultivo (fig. 8A), esto puede deberse a la muerte celular que ocurre progresivamente en la fase estacionaria tardía.



**Figura 6. Células de *Y. lipolytica* en fase de crecimiento exponencial, cultivadas en medio YNB adicionado con diferentes fuentes de carbono.** En A se muestra la morfología celular en los diferentes medios a las 24 h y en B, a las 48 h de incubación. En ambas figuras las letras corresponden a: a) aceite de coco (ácidos grasos saturados), b) aceite de semilla de chía (ácidos grasos poliinsaturados), c) aceite de canola (ácidos grasos monoinsaturados), d) glucosa, e) glucosa/tween80 y f) glucosa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 7. Células de *Y. lipolytica* en fase de crecimiento estacionaria, cultivadas en medio YNB adicionado con diferentes fuentes de carbono.**  
 En A se muestra la morfología celular en los diferentes medios a las 72 h y en B, a las 96 h de incubación. En ambas figuras las letras corresponden a: a) aceite de coco (ácidos grasos saturados), b) aceite de semilla de chía (ácidos grasos poliinsaturados), c) aceite de canola (ácidos grasos monoinsaturados), d) glucosa, e) glucosa/tween80 y f) glucosa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 8. Células de *Y. lipolytica* en fase de crecimiento estacionaria tardía cultivadas en medio YNB adicionado con diferentes fuentes de carbono.** Se muestra la morfología celular en los diferentes medios a las 144 h de incubación. Las letras corresponden a: a) aceite de coco (ácidos grasos saturados), b) aceite de semilla de chía (ácidos grasos poliinsaturados), c) aceite de canola (ácidos grasos monoinsaturados), d) glucosa, e) glucosa/tween80 y f) glucosa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 8. DISCUSIÓN

El estrés oxidativo representa una alteración en el equilibrio entre las reacciones antioxidantes y prooxidantes en organismos vivos. La sobreproducción de EROs puede conducir a un daño oxidativo de las moléculas biológicas (ADN, proteínas y lípidos), que se ha asociado con trastornos crónico-degenerativos, especialmente cáncer, enfermedades metabólicas y enfermedades cardiovasculares. El daño oxidativo puede ocurrir si existen dos condiciones: primero, una mayor producción de especies reactivas como consecuencia de enfermedades crónicas o fuentes exógenas y, en segundo lugar, por la presencia de niveles disminuidos de antioxidantes dietéticos y/o cofactores enzimáticos. La composición de la dieta puede influir tanto en la intensidad del daño oxidativo como en los mecanismos antioxidantes, es por esta razón que existe una relación entre la alimentación y un gran número de enfermedades crónicas (Vetrani *et al.*, 2012).

El tipo de lípidos que se ingieren en la dieta tiene un impacto en las membranas biológicas, determinando su funcionalidad, estructura y susceptibilidad al daño oxidativo (Quiles *et al.*, 2004). La asociación entre el consumo de lípidos y el desarrollo de estrés oxidativo ha sido ampliamente investigada, se ha encontrado que el grado de saturación de las cadenas de carbono puede influir en la fluidez de las membranas y en el grado de sensibilidad a la oxidación. Sin embargo, existen algunos resultados contradictorios ya que no se encuentra una asociación significativa en algunas investigaciones, esto puede deberse al diseño de los protocolos, la duración y el tipo de intervención (Vetrani *et al.*, 2012).

Este trabajo se realizó para evaluar el efecto de aceites con diferencias en su perfil de ácidos grasos, sobre el crecimiento y la producción de especies reactivas de oxígeno en células eucariotas, utilizando células del hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica*.

Los modelos de levadura han sido fundamentales para la comprensión actual de los mecanismos celulares conservados, como la división celular, la replicación del ADN, el metabolismo, el plegamiento de proteínas y el transporte intracelular (Tenreiro & Fleming, 2010). *Yarrowia lipolytica* es una de las levaduras no convencionales más estudiadas, ampliamente utilizada en la industria, en biología molecular y estudios de genética. Se eligió a *Y. lipolytica* como modelo experimental debido a la seguridad en su manipulación, ya que no es patogénica, es clasificada por la FDA como segura, y es capaz de metabolizar diferentes fuentes de carbono incluyendo azúcares, alcanos, aceites vegetales, glicerol entre otros (Coelho, Amaral & Belo, 2010).

El primer objetivo de este proyecto fue analizar y comparar el crecimiento de *Y. lipolytica* en medio YP adicionado con aceites vegetales con alto contenido de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados contra el medio YP adicionado con glucosa, que se utilizó como control del crecimiento por ser una fuente de carbono “tradicional”. Se encontró que en las diferentes fases de crecimiento los medios de cultivo adicionados con aceite de canola (AGMI) y aceite de semilla chía (AGPI) presentaron un crecimiento celular mayor en comparación con el medio adicionado con glucosa. Estos resultados son similares a los reportados por Sestric y colaboradores en 2014, quienes compararon el crecimiento y la síntesis de lípidos de *Y. lipolytica* al ser cultivada con glicerol, glucosa y aceite de canola durante 120 h. Los autores reportaron que el crecimiento fue mayor en el medio de cultivo adicionado con aceite de canola, seguido por el medio adicionado con glucosa, y por último, el medio con glicerol, que presentó un crecimiento mucho menor al de los dos medios anteriores; además, se encontraron diferencias en la síntesis de lípidos y en los niveles de pH. Estos resultados pueden explicarse, en parte, por la naturaleza del modelo de estudio, ya que *Y. lipolytica* tiene el potencial de producir lipasas y proteasas, por lo cual puede ser aislada de materiales ricos en lípidos como productos lácteos, queso, yogur, carne, aves y aceites. Por su capacidad de

metabolizar materiales hidrofóbicos y ser aislada originalmente de mantequilla rancia, se le otorgó el nombre de *lipolytica* (Liu et al., 2015).

Debido a que los componentes del medio de cultivo YP (extracto de levadura y peptona), contienen cantidades traza de otros componentes (carbohidratos y aminoácidos), podrían ser utilizado por las células de levadura como fuente de carbono, se decidió utilizar el medio mínimo YNB, el cual está compuesto por sulfato de amonio, vitaminas, y algunas sales. Para evitar la formación de micelas que se presentaban en los medios al adicionar los diferentes aceites, se utilizó Tween 80 como emulsificante. Tomando en cuenta que el Tween 80 está compuesto por ésteres parciales de ácidos grasos y sorbitol, se decidió agregar a la serie de experimentos de medio YNB, cantidades equivalentes de este emulsificante, para determinar si tiene un efecto en el crecimiento celular.

Se comparó el crecimiento de *Y. lipolytica* en medio mínimo YNB adicionado con el emulsificante Tween 80 y diferentes fuentes de carbono: aceite de coco (AGS), aceite de semilla de chía (AGPI), aceite de canola (AGMI) y glucosa, encontrando diferencias en las fases exponencial, diáuxica y estacionaria (24, 72 y 144 h, respectivamente). A las 24 h el medio de cultivo adicionado con aceite de semilla de chía tuvo un mayor crecimiento que el medio de cultivo adicionado con aceite de coco; a las 72 h el medio de cultivo adicionado con aceite de canola presentó un mayor crecimiento que el medio adicionado con aceite de coco y a las 144 h el medio con aceite de canola presentó un crecimiento superior al de los demás medios de cultivo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Zhao y colaboradores en 2015, en cuyo trabajo se determinó el crecimiento y la acumulación de lípidos en células de *Y. lipolytica* (cepa DSMZ No. 3286) cultivadas con monosacáridos, disacáridos, glicerol y ácido oleico. En este estudio se encontró que el medio de cultivo adicionado con ácido oleico presentó un crecimiento mayor a los medios adicionados con galactosa, lactosa, sacarosa y maltosa, además de presentar un contenido de lípidos mayor (50%) a los medios adicionados con glucosa. Se ha reportado que algunos sustratos hidrófobos (ácidos grasos libres) son suficientes para el crecimiento y

acumulación de lípidos en células de *Y. lipolytica* sin requerimientos nutricionales adicionales (Papanikolaou, Muniglia, Chevalot, Aggelies & Marc, 2002).

Para determinar la cantidad de EROs, producto del metabolismo de las diferentes fuentes de carbono en las células de *Y. lipolytica*, se cuantificó mediante la utilización de la sonda fluorescente DCF-DA, que al introducirse en las células se une a las especies reactivas intracelulares produciendo el fluoróforo diclorofluoresceína. Esta sonda fluorescente es susceptible a diferentes radicales de oxígeno como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), superóxido, óxido nítrico, peroxinitrito, entre otros. Los resultados mostraron diferencias en la generación de EROs en las células de los diferentes medios, y se observó que en los medios de cultivo adicionados con glucosa se presentaron las cantidades más altas de EROs en comparación con los medios de cultivo adicionados con ácidos grasos. Estos resultados corroboran la hipótesis de que un medio de cultivo con 2% de glucosa es un exceso de energía para la célula, como lo sugieren Lin y colaboradores en su estudio realizado en 2002, en el cual se aplicó una restricción calórica a medios de cultivo de levadura disminuyendo la cantidad de glucosa de 2% a 0.5%, encontrando que hubo un aumento en la prolongación de la vida media de las levaduras en un 25%. Este resultado es consistente con nuestros hallazgos encontrados en ambas curvas de crecimiento (medio YP y YNB), donde los medios de cultivo con glucosa tuvieron un crecimiento celular menor y una producción de EROs superior a los medios de cultivo adicionados con ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados. Se ha sugerido que la restricción calórica disminuye el daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos en múltiples modelos de estudio, incluyendo mamíferos (Ungvary, Parrado-Fernández, Csiszar & Cabo, 2008). Para futuros proyectos sería interesante comparar el crecimiento y la generación de EROs en los medios de cultivo con las diferentes fuentes de carbono, utilizando porcentajes de glucosa menores al estándar (2%).

Los resultados encontrados al comparar los medios de cultivo adicionados con ácidos grasos mostraron que el medio que contenía aceite de semilla de chía

como fuente de carbono generó una mayor cantidad EROs en comparación a los medios adicionados con aceites ricos en AGMI y AGS. Se observó, que la cantidad de EROs aumentaba conforme se incrementaba el tiempo de incubación, siendo más acentuado en la fase estacionaria (144 h). Estos resultados son similares a los encontrados en un estudio realizado por Ruenwai y colaboradores en 2011, en el cual se analizó una mutante de *S. cerevisiae* que producía ácidos grasos poliinsaturados omega 6. En dicho estudio se encontró que la cantidad de EROs aumentaba conforme el paso del tiempo tanto en la cepa mutante como en la cepa control, sin embargo la presencia de AGPI aceleraba la acumulación de EROs cuando las células entraban a fase estacionaria. Se ha demostrado anteriormente en *S. cerevisiae*, que la composición lipídica de las membranas es de gran importancia para dar resistencia al daño oxidativo, las células que tienen ácidos grasos con pocas saturaciones en sus membranas tienen mayor resistencia a las que tienen AGPI, esto se debe, probablemente a la peroxidación de AGPI esterificados en membranas, lo que resulta en la producción de radicales lipídicos (Ruenwai *et al.*, 2011). Es importante tomar en cuenta que en organismos más complejos, como los mamíferos, el consumo de AGPI tiene numerosos beneficios en la salud, en la prevención de enfermedades cardiovasculares, disminuyendo la resistencia a la insulina, y controlando complicaciones de la diabetes mellitus tipo II y la obesidad (Rodríguez-Cruz, Tovar, Del Prado & Torres, 2005); sin embargo la ingesta diaria recomendada de lípidos, según la Organización Mundial de la salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) es de 30% de las calorías diarias totales, de este porcentaje se recomienda que del 6 al 11% sean AGPI y que estos tengan una proporción 1:5, ácidos grasos omega 3 y omega 6, respectivamente. El consumo en AGPI, fuera de los rangos recomendados, y con una proporción inadecuada, puede contribuir al desarrollo de patologías (Szostak-Wegierek , Kłosiewicz-Latoszek, Szostak & Cybulska, 2013).

Es interesante observar que en todos los experimentos de este estudio las células de *Y. lipolytica* cultivadas en el medio de cultivo adicionado con aceite de

canola (AGMI) presentaron la menor cantidad de EROs a las 24, 48 y 96 h de incubación (fase exponencial y estacionaria) en comparación con los demás medios de cultivo. Estos resultados coinciden con los hallazgos del estudio realizado por Haeiwa y colaboradores (2014), donde se indujo EO a líneas celulares de fibroblastos de ratones, que habían sido tratados con diferentes ácidos grasos (saturados e insaturados) encontrando que los ácidos grasos insaturados, especialmente el ácido oleico, promueven una respuesta adaptativa al daño oxidativo al aumentar la capacidad antioxidante de las células. Una posible explicación de que los medios de cultivo adicionados con aceite de canola (AGMI) presentaron un mayor crecimiento celular y una generación de EROs menor, en comparación con los demás medios de cultivo, sugiere que los ácidos grasos monoinsaturados tienen un efecto inhibitorio en el desarrollo de EO, en este modelo de estudio.

*Y. lipolítica* tiene la capacidad de crecer en medios simples y complejos, como un conjunto de células en forma de levadura o micelio. Se han analizado las condiciones ambientales que favorecen el crecimiento de cualquiera de las dos formas, sin embargo se necesita más investigación para una comprensión completa de los mecanismos que regulan el dimorfismo en este modelo (Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002). Los resultados de nuestro estudio muestran diferencias en la morfología de las células de *Y. lipolytica* en los diferentes medios de cultivo y en determinadas fases de crecimiento. A las 24 h de incubación, se observó en las células de *Y. lipolytica* forma de levadura en todos los medios de cultivo; a las 48 h, los medios adicionados con aceite de coco (AGS) mostraron una proporción 50/50 entre la forma de levadura y micelio, en los medios adicionados con aceite de canola y semilla de chía 40/60 (levadura y micelio, respectivamente) y en los medios adicionados con glucosa se observó una proporción 20/80 predominando la forma de micelio; a las 72 y 96 h (fase estacionaria) se observa un patrón similar de diferenciación celular y solamente en los medios de cultivo adicionados con glucosa se observan células en forma de micelio en su totalidad. Por otra parte, durante la fase estacionaria tardía (144

h), las células de los medios adicionados con aceite de coco presentaron una proporción 50/50, en los medios adicionados con aceite de semilla de chía y canola una proporción 40/60 (levadura y micelio, respectivamente) y en los medios adicionados con glucosa se observa una reversión de forma de micelio a levadura, presentado una proporción 30/70, predominando la forma de micelio. Las células de *Y. lipolytica*, gracias a su capacidad de dimorfismo, se adaptan a su entorno, respondiendo a estímulos como la fuente de carbono, cantidad de nutrientes, temperatura y pH, esto se observa en el estudio realizado por Timoumi y colaboradores (2016) donde se analizó la morfología de la cepa W29 de *Y. lipolytica* en medios de cultivo de glucosa y glicerol con pH de 4.5, 5.6 (condición óptima) y 7, encontrando diferencias en su morfología. También se observó un aumento en el número de células en forma de hifa cuando las células presentaban una tasa de crecimiento máxima relacionada con una alta cantidad de nutrientes, además se encontró una inclinación de las células en medios adicionados con glucosa, de tomar una forma predominantemente de micelio. Actualmente no existen estudios que relacionen al dimorfismo de *Y. lipolytica* con la generación de EO, sin embargo, está ampliamente documentado que el provocar otros tipos de estrés, como el estrés térmico, estrés osmótico, de nutrientes (fuentes de carbono, nitrógeno, medios pobres en minerales, etc.), puede inducir al cambio morfológico en levaduras dimórficas (Rosales-López, Valerín-Berrocal & Jiménez-Bonilla, 2017). Se sugiere, para futuras proyectos, investigar el efecto que tiene el EO sobre el dimorfismo de *Y. lipolytica*.

Desde el punto de vista nutricional podemos concluir que el consumo en exceso de carbohidratos (glucosa), no solo induce al sobrepeso y obesidad, sino que favorece la generación de EROs, lo que podría tener como consecuencia el desarrollo de EO y provocar un deterioro celular. Además una proporción inadecuada en el consumo de ácidos grasos poliinsaturados puede contrarrestar sus propiedades beneficiosas y contribuir al desarrollo de patologías relacionadas con la pérdida del balance oxidativo. Estos resultados proporcionan

mayor información sobre el efecto del consumo de aceites vegetales con diferente composición de ácidos grasos, sirviendo como base para la correcta selección y consumo de grasas en nuestra dieta.

## 9. CONCLUSIONES

En este trabajo, para analizar el efecto de ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) sobre el crecimiento, diferenciación celular y generación de EROs, se utilizó como modelo de célula eucariota a *Y. lipolytica* y se encontró que:

- Existe diferencias en el crecimiento de *Y. lipolytica* cuando se cultiva en medio YP y YNB adicionado con diferentes fuentes de carbono (ácidos grasos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados y glucosa)
- El aceite de canola (AGMI) estimula un mayor crecimiento de *Y. lipolytica* en comparación con los medios adicionados con ácidos grasos saturados, poliinsaturados y el estándar (glucosa), tanto en YP como en YNB.
- La presencia de ácidos grasos saturados en los cultivos celulares inducen una disminución del crecimiento de *Y. lipolytica* en comparación a los medios adicionados con otras fuentes de carbono.
- ❖ Existen diferencias en la generación de EROs en los medios de cultivo de *Y. lipolytica* cuando son adicionados con diferentes fuentes de carbono.
- La glucosa utilizada como fuente de carbono genera una mayor cantidad de EROs en células de *Y. lipolytica*, contribuyendo al desarrollo de estrés oxidativo en estas células.
- Los ácidos grasos monoinsaturados presentes en el aceite de canola, genera una menor cantidad de EROs en comparación con los demás medios utilizados.
- Existe un cambio en la morfología de las células de *Y. lipolytica* cuando existen diferentes estímulos: tiempo de incubación, fuente de carbono y posiblemente cambios en el pH.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

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.

Andrisic, L., Collinson, E. J., Tehlivets, O., Perak, E., Zarkovic, T., Dawes, I. W. & Cipak Gasparovic, A. (2015). Transcriptional and antioxidative responses to endogenous polyunsaturated fatty acid accumulation in yeast. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 399(1– 2), 27–37.

Aouacheri, O., Saka, S., Krim, M., Messaadia, A., & Maida, I. (2015). The investigation of the oxidative stress-related parameters in type 2 diabetes mellitus. *Canadian Journal of Diabetes*, 39(1), 44–49.

Arrigo, T., Leonardi, S., Cuppari, C., Manti, S., Lanzafame, A., D'Angelo & Salpietro, C. (2015). Role of the diet as a link between oxidative stress and liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 21(2), 384–395.

Badalà, F., Nouri-mahdavi, K., & Raoof, D. A. (2008). Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. *Computer*, 144(5), 724–732.

Cabezas, C. C., Hern, B. C., Vargas, M. & Bogot, S. (2016). Aceites y grasas : efectos en la salud y regulación mundial. *Revista de la Facultad de Medicina*, 64(4), 761–768.

Chihuailaf, R. H., Contreras, P.A. & Wittwer, F. G. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México*, 33: 265-283.

Coelho, M. A. Z., Amaral, P. F. F., & Belo, I. (2010). *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 35 (5), 930– 944.

Couillard, C., Pomerleau, S., Ruela, G., Archer, W., Bergeron, J., Couture, P., Lamarche, B. & Bergeron, N. (2006). Associations between hypertriglyceridemia, dietary fat intake, oxidative stress, and endothelial activation in men. *Applied nutritional investigation*, 22: 600-608.

Farrugia G & Balzan R. (2012). Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontiers in Oncology*. 2, 64.

Filaire, E., Dupuis, C., Galvaing, G., Aubreton, S., Laurent, H., Richard, R., & Filaire, M. (2013). Lung cancer: What are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition. *Lung Cancer*, 82(3), 383–389.

González-Torres, M. C., Betancourt-Rule, M., & Ortiz-Muñiz, R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1), 3–9.

Guéraud, F., Taché, S., Steghens, J., Milkovic, L., Borovic-Sunjic, S., Zarkovic, N., Gaultier, E., Naud, N., Héliès-Toussaint, C. & Pierre, F. (2015). Dietary polyunsaturated fatty acids and heme iron induce oxidative stress biomarkers and a cancer promoting environment in the colon of rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 83, 192–200.

Guerra, J. I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 326–335.

Haeiwa, H., Fujita, T., Saitoh, Y. & Miwa N. (2014). Oleic acid promotes adaptability against oxidative stress in 3T3-L1 cells through lipohormesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 386(1-2):73-83.

Harika, R. K., Eilander, A., Alssema, M., Osendarp, S. J. M., & Zock, P. L. (2013). Intake of fatty acids in general populations worldwide does not meet dietary recommendations to prevent coronary heart disease: A systematic review of data from 40 countries. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 63(3), 229–238.

Kamat, P.K., Kalani, A., Rai, S., Swarnkar, S., Tota, S., Nath, C. & Tyagi, N. (2016). Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the

pathogenesis of alzheimer's disease: Understanding the therapeutics strategies. *Molecular Neurobiology*, 53(1):648-661.

Le Lay, S., Simard, G., Martínez, M. C., & Andriantsitohaina, R. (2014). Oxidative stress and metabolic pathologies: From an adipocentric point of view. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 908539, 18.

Leamy, A. K., Egnatchik, R. A., & Young, J. D. (2013). Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 165–174.

Li, H., Horke, S., & Förstermann, U. (2014). Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 237(1), 208–219.

Lin, S.J., Kaeberlein, M., Andalis, A.A., Sturtz, L.A., Defossez, P.A., Culotta, V.C., Fink, G.R. & Guarente, L. (2002). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*, 418(6895):344-8.

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*, 448–458.

Liu, H.H., Ji, X.J. & Huang, H. (2015). Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnology advances*, 33(8):1522-46.

Ndhlala, A. R., Moyo, M & Van Staden, J. (2001). Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules?. *Molecules*, 15(10):6905-30.

Newsholme, P., Cruzat, V. F., Keane, K. N., Carlessi, R., & Bittencourt, P. I. H. (2016). Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochemical Journal*, 473(24), 4527–4550.

Núñez-Sellés, A. J. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes : retos y oportunidades. *Revista Cubana de Salud Pública*, 37, 644–660.

Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G. & Marc, I. (2002). *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4):737-44.

Peairs, A. D., Rankin, J. W., & Lee, Y. W. (2011). Effects of acute ingestion of different fats on oxidative stress and inflammation in overweight and obese adults. *Nutrition Journal*, 10(1), 122.

Pérez, D. D., Strobel, P., Foncea, R., Díez, M. S., Martín, A. S. A. N., & Leighton, F. (2002). Wine, diet, antioxidant defenses, and oxidative damage. *Annals of the New York Academic of Science*, 145, 136– 145.

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.

Quiles, J., Ochoa, J., Huertas, J. & Mataix, J. (2004). Mitochondrial aspects of aging. role of dietary fat type and oxidative stress. *Endocrinología y Nutrición*. 51. 107-120.

Ramírez-Silva, I., Villalpando, S., Moreno-Saracho, J. E., & Bernal- Medina, D. (2011). Fatty acids intake in the Mexican population. Results of the National Nutrition Survey 2006. *Nutrition & Metabolism*, 8(1), 33-39.

Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K., & Yadav, U. C. S. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*, 148, 183–193.

Ruenwai, R., Neiss, A., Laoteng, K., Vongsangnak, W., Cheevadhanarak, S., Petranovic, D. & Nielsen, J. (2011). Heterologous production of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae* causes a global

transcriptional response resulting in reduced proteasomal activity and increased oxidative stress. *Biotechnology Journal*, 6(3):343-56.

Ruiz-Herrera J, González-Prieto, JM & Ruiz-Medrano, R. (2002). Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Research* 1(4):247-56.

Ruiz, D., Fernández-Caraballo, D., Rodríguez, J., Ballesteros, M. (2012). El estrés oxidativo en la insuficiencia renal asociada con hipertensión. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 31(1):16-25.

Sánchez-Valle, V., Méndez-Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Revista de Investigación Médica Sur*, 20 (3): 161-168.

Schwingshackl, L., & Hoffmann, G. (2012). Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta-analyses. *Nutrients*, 4(12), 1989–2007.

Sestric, R., Munch, G., Cicek, N., Sparling, R., & Levin, D. B. (2014). Growth and neutral lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* on various carbon substrates under nutrient-sufficient and nutrient-limited conditions. *Bioresource Technology*, 164, 41–46.

Sies, H. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91, 31– 38.

Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4: 180–183

Sies, H., Berndt, C , Jones. D.P. (2017).Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 20; 86:715-748

Sies, H., Stahl, W. & Sevanian, A. (2005). Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *The Journal of Nutrición*, 135(5):969-72.

Soto-Rodríguez, A., García-Soidán, J.L., Arias-Gómez, M.J., Leirós-Rodríguez, R., Del Álamo-Alonso, A. & Pérez-Fernández, M.R. (2017). Metabolic syndrome and visceral fat in women with cardiovascular risk factor. *Nutrición Hospitalaria*, 28;34 (4):863-868.

Tenreiro, S., & Outeiro, T. F. (2010). Simple is good: Yeast models of neurodegeneration. *FEMS Yeast Research*, 10(8), 970–979.

Timoumi, A., Cléret, M., Bideaux, C., Guillouet, S.E., Allouche, Y., Molina-Jouve, C., Fillaudeau, L. & Gorret N. (2016). Dynamic behavior of *Yarrowia lipolytica* in response to pH perturbations: dependence of the stress response on the culture mode. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1):351-366.

Torre-Ruiz, M.A., Pujol, N. & Sundaran, V. (2012). Coping with oxidative stress. The yeast model. *Current drug targets*, 16(1):2-12.

Ungvari, Z., Parrado-Fernandez, C., Csiszar, A. & Cabo, R. (2008). Mechanisms underlying caloric restriction and lifespan regulation: implications for vascular aging. *Circulation Research*, 14; 102(5):519-28.

United States Department of Agriculture. (2018). USDA Food Composition Databases. Recuperado de: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>

Vetrani, C., Costabile, G., Di Marino, L., & Rivellese, A. (2012). Nutrition and oxidative stress: a systematic review of human studies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64, 121102054314003.

Venereo, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina*, 31(2), 126–133.

Viñas, G., Puig, T., & Porta, R. (2012). Estrés oxidativo en pacientes con cáncer: dos caras de una misma moneda. *Medicina Clinica*, 139(4), 171–175.

Yana, M., Wang, X. & Zhu, X. (2013). Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology Medicine*, 62: 90–101.

Zhao, X., Tang, J., Wang, X., Yang, R., Zhang, X., Gu, Y., Li, X. & Ma, M. (2015) YNL134C from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a novel protein with aldehyde reductase activity for detoxification of furfural derived from lignocellulosic biomass. *Yeast*, 32(5):409-22.

Zeng, X., Chen, X. S., Gao, Y., Ren, X. D., Wang, L., & Mao, Z. G. (2015). Continuously high reactive oxygen species generation decreased the specific poly-l-lysine formation rate in fed-batch fermentation using glucose and glycerol as a mixed carbon source. *Process Biochemistry*, 50(12), 1993–2003.