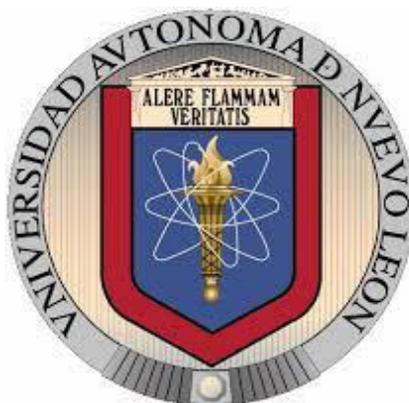


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LOS
TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN CÉLULAS DE
Yarrowia lipolytica CARENTES DE *GPA1* Y *GPA2*.**

Presenta

L. N. MIRANDA CAMPOS GONZÁLEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

Monterrey, N. L.

Diciembre, 2024

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FaSPyN

Facultad de Salud Pública y Nutrición

**EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LOS
TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN CÉLULAS DE
Yarrowia lipolytica CARENTES DE *GPA1* Y *GPA2***

Presenta:

L.N. MIRANDA CAMPOS GONZÁLEZ

Monterrey, N. L.

Diciembre, 2024

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FaSPyN

Facultad de Salud Pública y Nutrición

**EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LOS
TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN CÉLULAS DE
Yarrowia lipolytica CARENTES DE *GPA1* Y *GPA2***

Presenta:

L.N. MIRANDA CAMPOS GONZÁLEZ

Director:

DR. EDUARDO CAMPOS GÓNGORA

Monterrey, N. L.

Diciembre, 2024

APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA

EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LOS
TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN CÉLULAS DE *Yarrowia*
lipolytica CARENTES DE GPA1 Y GPA2



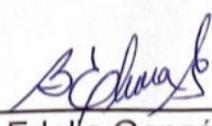
Dr. Eduardo Campos Góngora
Presidente



Dr. Zacarías Jiménez Salas
Secretario



MCN. Joselina Huerta Oros
Vocal



Dra. Blanca Edella González Martínez
Subdirectora de Investigación, Innovación y Posgrado

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El comité de evaluación de tesis **APROBÓ** la tesis titulada "EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN CÉLULAS DE *Yarrowia lipolytica* CARENTES DE *GPA1* Y *GPA2*" presentada por la L.N. Miranda Campos González, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.



Dr. Zacarías Jiménez Salas
Presidente



Dr. Eduardo Campos Góngora
Secretario



MCN. Joselina Huerta Oros
Vocal

DRA. BLANCA EDELIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ
SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO
PRESENTE.

Estimada Dra. González-Martínez, por este conducto le comunico que se han atendido e incorporado las recomendaciones realizadas por los miembros del Comité de Evaluación de la tesis titulada: **“EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN CÉLULAS DE *Yarrowia lipoytica* CARENTES DE GPA1 Y GPA2”**, la cual presenta la L. N. Miranda Campos González, como un requisito para la obtención de su grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro asunto en particular, le enviamos un cordial saludo.

Atentamente

“Alere Flammam Veritatis”

Monterrey, Nuevo León a 15 de Octubre del 2024



DR. EDUARDO CAMPOS GÓNGORA
DIRECTOR DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente **a mi familia, a mis padres** por formar la persona que soy el día de hoy, por su amor y apoyo en todo lo que me proponga.

A mis hermanas **Arantza** y **Sassia**, por su cariño y momentos de diversión que me han brindado en este tiempo.

A mi gran compañera fiel Selina por acompañarme en las noches de desvelo y brindarme tranquilidad en los momentos más difíciles, y a Tines por siempre hacerme reír.

A Luis por escucharme siempre que lo necesité, por su paciencia, cariño, sentido del humor y apoyo incondicional.

A la UANL, a la FaSPyN, al comité de la MCN y al CONAHCYT por permitirme realizar un posgrado de calidad.

A mis compañeras de generación y amigas que hice en la maestría, **Paulette, Karlita, Damaris, Ángel, Naish**. Gracias por su sabiduría, solidaridad, apoyo emocional, por los momentos de diversión que pasamos juntas y su apoyo en los obstáculos que se nos presentaban.

Agradezco sobre todo la compañía, la amistad y las risas que pasaba en el laboratorio con mis amigas **Paulette, Dama** y **Karlita**.

A todos los profesores con los que tuve el placer de tomar clases, gracias por compartir su sabiduría y su tiempo, en especial al **Dr. Zacarías**.

A mis compañeros de laboratorio **Ricardo, Saúl, Gerardo, Susana, Delia, Rosario**, por brindarme momentos de risa y sobre todo agradezco a mi gran amiga y hermana de laboratorio Paulette por escucharme y permitir que nos ayudáramos mutuamente cuando éramos nosotras solas contra el mundo, juntas sacamos nuestro trabajo adelante.

A mi director de tesis, el **Dr. Eduardo Campos** por aceptarme en su laboratorio, por su entera disposición de ayudarme y resolver cualquier duda que tuviera, por celebrar pequeñas y grandes victorias, aconsejarme, por formar parte de este logro académico.

Gracias a todas las profesoras, doctoras, maestras, compañeras, amigas que se encuentran en el camino de la investigación por motivarme a seguir estudiando, ayudarme a creer en mí y ser mi fuente de admiración.

Por último, agradezco y dedico especialmente este trabajo **a mi mamá**, tu fuerza, amor y resiliencia me han hecho la mujer que soy, porque es un reflejo de lo que eres.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis **a mi familia**:

A mi madre **Vera** porque es mi gran ejemplo a seguir de amor, de fortaleza e inteligencia.

A mi padre **Eduardo** por sus consejos, por su dedicación, su amor y motivación.

A mis hermanas **Arantza** y **Sassia** por su cariño, preocupación y apoyo.

A Tines, el más pequeño de la casa.

A mi grandiosa Selina.

“A veces tenemos la impresión de que ya no nos queda nada por dar y, sin embargo, en esos momentos oscuros y desesperados descubrimos que si seguimos dando un paso tras otro, hay una forma de conseguir lo que parece imposible”.

Angela Duckworth

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS.....	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1 Definición del problema.....	10
2 Antecedentes	12
2.1 Glucosa como fuente de energía	12
2.2 Dieta occidental: Ingesta excesiva de glucosa	13
2.3 Glucotoxicidad y estrés oxidativo: enfermedades asociadas	13
2.4 Vía de sensado de nutrientes en organismos eucariotas (Vía PKA)	14
2.4.1 Funcionamiento de la vía PKA	16
2.4.2 Patologías asociadas con la vía PKA	18
2.5 Transportadores de glucosa en humanos y levaduras	19
2.6 <i>Yarrowia lipolytica</i> como organismo modelo	21
2.7 Efectos de la inactivación de la vía PKA en hongos.....	22
2.8 Mutante de <i>Yarrowia lipolytica</i>	24
3 Justificación	26
4 Hipótesis	27
5 Objetivos	27
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos específicos.....	27
6 Metodología	28
6.1 Diseño de estudio.....	28

6.2 Estrategia de trabajo	29
6.3 Métodos	30
6.3.1 Búsqueda <i>in silico</i> de secuencias de genes que codifican para transportadores de glucosa en el genoma de <i>Y. lipolytica</i>	30
6.3.2 Diseño de oligonucleótidos específicos	30
6.3.3 Procedimiento experimental.....	30
6.3.3.1 Preparación de medio de cultivo	30
6.3.3.2 Preparación del preinóculo	31
6.3.3.3 Ajuste del preinóculo según la OD.....	31
6.3.3.4 Cultivo de inóculos de las cepas P01a y <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>	31
6.3.3.5 Eliminación de reservas de glucosa intracelular	32
6.3.3.6 Preparación de medio YNB y tratamiento con glucosa.....	32
6.3.3.7 Obtención de paquetes celulares.....	32
6.3.3.8 Procesamiento del material genético	33
6.3.3.8.1 Purificación de ácidos nucleicos	33
6.3.3.8.2 Cuantificación de la concentración de AN	33
6.3.3.8.3 Purificación de ARN.....	34
6.3.3.8.4 Cuantificación y ajuste de la concentración de ARN.....	34
6.3.3.8.5 Síntesis de ADNc por Transcripción Reversa.....	34
6.3.3.8.6 Análisis de la expresión de los genes	35
6.3.3.8.7 Electroforesis	36
6.3.3.8 Densitometría de bandas.....	36
6.3.3.9 Plan de análisis.....	37
7 Resultados	38
7.1 Identificación <i>in silico</i> de secuencias de los genes <i>YHT</i> de <i>Y. lipolytica</i> ; diseño de oligonucleótidos específicos.....	38

7.2	Análisis de expresión de los genes	39
7.2.1	Extracción de los ácidos nucleicos	39
7.2.2	Evaluación del tratamiento con DNasa I	40
7.2.3	Expresión de los genes <i>YHT</i> en las cepas P01a y <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> de <i>Y. lipolytica</i>	41
7.2.3.1	Expresión del gen <i>YHT1</i>	42
7.2.3.2	Expresión del gen <i>YHT2</i>	44
7.2.3.3	Expresión del gen <i>YHT3</i>	44
7.2.3.4	Expresión del gen <i>YHT4</i>	46
7.2.3.5	Expresión del gen <i>YHT5</i>	47
7.2.3.6	Expresión del gen <i>YHT6</i>	48
8	Discusión.....	49
8.1	El sensado de glucosa mediado por la vía PKA.....	49
8.2	Comparación de la expresión de los genes <i>YHT</i>	51
8.3	Análisis de cambios en la expresión de los <i>YHT</i> por inactivación de la vía PKA	53
8.4	Disfunción de la vía PKA y transportadores de glucosa en humanos	56
9	Conclusión	58
10	Referencias.....	59

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
1	Componentes de las reacciones de Transcripción Reversa (RT).	35
2	Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	36
3	Características de los oligonucleótidos usados para el análisis de expresión de los genes que codifican para transportadores de hexosas de <i>Y. lipolytica</i>	39

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Funcionamiento de la vía PKA.	17
2	Estrategia general de trabajo.	29
3	Estandarización de las condiciones experimentales de amplificación de los oligonucleótidos.	38
4	Electroforesis de ácidos nucleicos extraídos de células de las cepas P01a y <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> sometidas a tratamientos con glucosa (2%) y sin glucosa en medio YNB.	40
5	PCR sobre muestras de AN sometidas a tratamiento con la enzima DNasa (marcas Bioline y Promega).	41
6	Expresión del gen <i>YHT1</i> en las cepas parental (P01a) y doble mutante (<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>) de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB con y sin glucosa.	42
7	Análisis de expresión del gen <i>YHT2</i> en productos de PCR con muestras de ADNc obtenidas de las cepas parental (P01a) y doble mutante (<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>) de <i>Y. lipolytica</i> .	44
8	Expresión del gen <i>YHT3</i> en las cepas parental (P01a) y doble mutante (<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>) de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB con y sin glucosa.	45
9	Expresión del gen <i>YHT4</i> en las cepas parental (P01a) y doble mutante (<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>) de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB con y sin glucosa.	46
10	Expresión del gen <i>YHT5</i> en las cepas parental (P01a) y doble mutante (<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>) de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB con y sin glucosa.	47
11	Expresión del gen <i>YHT6</i> en las cepas parental (P01a) y doble mutante (<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>) de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB con y sin glucosa.	48

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C	Grados Celsius
%	Porcentaje
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ALG9	Gen que codifica para la enzima alfa-1,2-manosiltransferasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleótido
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CHO's	Hidratos de carbono
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EO	Estrés oxidativo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (y otros)
g	Gramos
GLUT	Transportadores de glucosa (<i>Glucose Transporters</i>)
GPA1	Subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica, gen 1
GPA2	Subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica, gen 2
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
Kb	Kilobases
M	Concentración Molar
Mb	Megabases
min	Minuto(s)
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mL	Mililitros
mM	Concentración milimolar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
OD ₆₀₀	Densidad Óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros
pb	Pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PKA	Proteínas cinasas A (<i>Protein Kinase A</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa (<i>Reverse Transcription</i>)
SGLT	Proteínas de transporte de glucosa-dependientes de sodio (<i>Sodium Glucose Transporters</i>)
UV	Luz Ultravioleta
U	Unidades
<i>YHT</i>	Genes que codifican para las proteínas Yht (responsables del transporte de hexosa)
YNB	Medio de cultivo de base nitrogenada de levadura (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)
YPD	Medio de cultivo con levadura, peptona y dextrosa (<i>Yeast Extract Peptone, Dextrose</i>)
μL	Microlitros
μg	Microgramos

RESUMEN

En organismos eucariotas superiores e inferiores, la vía PKA tiene especial relevancia en el sensado de glucosa; esta vía juega un papel central en el metabolismo y la homeostasis celular, ya que permite que distintos procesos biológicos puedan ser llevados a cabo. Al ser esta una vía de señalización conservada en organismos eucariotas, las células de *Yarrowia lipolytica* se han utilizado para el estudio de la vía PKA. En estudios previos en el laboratorio, utilizando *Y. lipolytica* como organismo modelo, se observó que la inactivación de la vía PKA mediante la delección de los genes que codifican para la subunidad α (*GPA1* y *GPA2*), ocasiona una mayor proliferación de las células que utilizan glucosa como fuente de carbono; sin embargo, tales células presentan una senescencia más rápida. En el presente trabajo se utilizaron las células de la cepa doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* realizada por Briones (2021) y células de la cepa parental P01a como control y se analizó el patrón de expresión de los genes *YHT (1 a 6)* que han sido identificados en *Y. lipolytica* como genes que codifican para transportadores de hexosas, con la finalidad de determinar si la alteración del sensado de glucosa por bloqueo de la vía PKA, modifica la expresión de estos genes, lo que pudiera explicar los hallazgos anteriormente reportados.

La expresión de los genes que codifican para los transportadores de hexosas se analizó por RT-PCR y se encontró que cada gen muestra un patrón distinto de expresión tanto en la cepa parental como en la cepa mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*.

Tras exponer a las células control y doble mutante a la presencia de glucosa la expresión de *YHT1*, *YHT4* y *YH5* disminuyó. Sin embargo, en el caso de *YHT3* y *YHT6*, esta disminución solo se observó en las células control, pero no en las células *gpa1-Δ/gpa2-Δ*. Por otro lado, el gen *YHT2* no presentó expresión bajo ningún tratamiento, tanto en la cepa control como en la doble mutante.

ABSTRACT

In higher and lower eukaryotic organisms, the PKA pathway is particularly relevant in glucose sensing; this pathway plays a central role in metabolism and cellular homeostasis, enabling various biological processes to be carried out. As this is a conserved signaling pathway in both higher and lower eukaryotic organisms, *Yarrowia lipolytica* cells have been used to study the PKA pathway. In previous laboratory studies using *Y. lipolytica* as a model organism, it was observed that inactivating the PKA pathway by deleting the genes encoding the α subunit (*GPA1* and *GPA2*) results in greater proliferation of cells using glucose as a carbon source; however, such cells exhibit faster senescence.

In the present work, cells from the double mutant strain *gpa1- Δ /gpa2- Δ* created by Briones (2021) and cells from the parental strain P01a as a control were used, and the expression pattern of the *YHT* (1 to 6) genes identified in *Y. lipolytica*, which encode hexose transporters, was analyzed to determine whether the alteration of glucose sensing by blocking the PKA pathway modifies the expression of these genes, which could explain the previously reported findings.

The expression of the genes encoding hexose transporters was analyzed by RT-PCR, and it was found that each gene shows a distinct expression pattern in both the parental strain and the double mutant strain *gpa1- Δ /gpa2- Δ* .

Upon exposing the control and double mutant cells to glucose, the expression of *YHT1*, *YHT4*, and *YHT5* decreased, while for *YHT3* and *YHT6*, this phenomenon was only observed in the control cells apart from the *gpa1- Δ /gpa2- Δ* cells. In contrast, the *YHT2* gene did not show expression under any treatment in either the control strain or the double mutant strain.

1. Definición del problema

La principal fuente de energía de muchos organismos eucariotas es la glucosa (Lazar *et al.*, 2017). En humanos, se obtiene mediante la ingestión de hidratos de carbono en forma de polisacáridos y disacáridos (Grooper *et al.*, 2020). Se ha descrito que un sello distintivo de la cultura occidental es una dieta excedente en energía debido principalmente al consumo de alimentos procesados los cuales se caracterizan por un contenido alto de hidratos de carbono (Cui *et al.*, 2023; Ma *et al.*, 2022). La ingesta calórica elevada se ha asociado con la generación de procesos inflamatorios causados por niveles elevados de glucosa en sangre, que de manera prolongada producen un fenómeno denominado glucotoxicidad, lo que conlleva la generación de procesos inflamatorios (Oliveira-Volpe *et al.*, 2018; Scheen *et al.*, 2020). La presencia de niveles elevados de glucosa induce un incremento del metabolismo de hidratos de carbono generando cantidades aumentadas de especies reactivas de oxígeno (ERO), que tienen la capacidad de ocasionar daño a diferentes biomoléculas como proteínas, lípidos y ADN, generando la condición conocida como estrés oxidativo (EO). El EO se ha asociado al desarrollo de distintas enfermedades crónico-degenerativas, autoinmunes, neurológicas, etcétera. Uno de los puntos de control que permiten regular la ingesta adecuada de glucosa en las células, son los mecanismos de sensado de nutrientes (Zuo *et al.*, 2019). El sensado de glucosa juega un papel central en el metabolismo y la homeostasis celular, pues esto permite que distintos procesos biológicos puedan ser llevados a cabo (Rolland *et al.*, 2002; Zhang, 2022).

Una de las rutas implicadas en este mecanismo de detección de la glucosa, es la vía de las proteínas cinasas (o quinasas) dependientes de AMPc (vía PKA), la cual se encuentra conservada tanto en organismos eucariotas superiores (en la escala evolutiva como los seres humanos y otros mamíferos), como en eucariotas inferiores (como las levaduras) (Chadha *et al.*, 2024; Zhu *et al.*, 2022). En este proceso, la participación de la subunidad α (componente de la proteína G heterotrimérica) es esencial para la activación de esta vía, pues permite la activación de procesos metabólicos como la glucólisis, la adaptación al estrés, el crecimiento y desarrollo celular y el transporte de elementos esenciales para la supervivencia

celular (London & Stratakis, 2022). Este último proceso, ocurre en la membrana plasmática de todas las células eucariotas y es facilitado por proteínas conocidas como transportadores, específicamente, los transportadores de glucosa (Sandoval-Muñiz *et al.*, 2016). En distintos estudios llevados a cabo en hongos, se reporta que la inactivación de la vía PKA se ve reflejado en el cambio de fenotipo de las células, así como en su capacidad de reproducción (García-Rico *et al.*, 2017; Maslanka y Zadrag-Tecza, 2019).

En *Y. lipolytica*, la disponibilidad de glucosa como recurso nutricional condiciona la morfología de las células. En el Laboratorio de Proteómica del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública, UANL, se han realizado estudios utilizando este organismo modelo (Huerta, 2014 y Briones, 2021), donde se reporta que la inactivación de la vía PKA mediante la delección de los genes que codifican para la subunidad α (*GPA1* y *GPA2*), ocasiona una mayor proliferación de las células que utilizan glucosa como fuente de carbono; sin embargo, tales células presentan una senescencia más rápida; se desconoce si en estas células mutadas, la mayor incorporación de glucosa intracelular esté mediada por la sobreexpresión de los transportadores de glucosa, como mecanismo compensatorio ante la carencia del proceso de sensado de nutrientes.

2. Antecedentes

2.1 Glucosa como fuente de energía.

En la naturaleza, las moléculas orgánicas más abundantes son los hidratos de carbono o carbohidratos (CHO's), por ende, constituyen uno de los nutrientes dietéticos más estudiados que tienen influencia en la fisiología y la vida de muchos organismos. Los CHO's están presentes de manera natural en vegetales, frutas y leche; y se almacenan abundantemente en forma de polisacáridos, que sirven como almacenamiento de carbono, por ejemplo, el almidón, la inulina, la sacarosa, las gomas, la celulosa y los fructanos (Lazar *et al.*, 2017). Además de representar una fracción considerable de las calorías de la dieta de mamíferos, los CHO's también actúan como elementos de la membrana celular que regulan algunas formas de comunicación intercelular y son precursores de la producción de otras biomoléculas (lípidos, aminoácidos, bases nitrogenadas: pirimidinas y purinas). La mayoría de los hidratos de carbono contienen átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno en proporción $(\text{CH}_2\text{O})_n$ (Mckee & Mckee, 2014). También se les denomina glúcidos, sacáridos y coloquialmente como azúcares (Ferrier, 2014). Usualmente, los CHO's se categorizan como hidratos de carbono simples (monosacáridos y disacáridos, constituidos por uno y dos unidades de carbono, respectivamente) e hidratos de carbono complejos: oligosacáridos y polisacáridos, formados por más de 3 y más de 10 unidades de carbono, respectivamente (Grooper *et al.*, 2020). La forma en la que los hidratos de carbono se utilizan para distintos procesos celulares es mediante su conversión a glucosa, la cual se considera el monosacárido más importante por ser una fuente de energía significativa para los procesos biosintéticos en los seres vivos (Maslanka & Zdrag-Tecza, 2019; Zhang *et al.*, 2022). La glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), es una aldohexosa ya que tiene una estructura conformada por seis carbonos y un grupo aldehído (Mckee & Mckee, 2014). Debido a su papel central en el metabolismo, se ha descrito que la glucosa funciona tanto como ligando para los receptores como sustrato para los transportadores. Por sus características, la glucosa sirve como sustrato para la biosíntesis de otras biomoléculas, así como para la generación de energía mediante la fermentación o la respiración (Van Ende *et al.*, 2019).

2.2 Dieta occidental: Ingesta excesiva de glucosa.

En la alimentación humana, los hidratos de carbono representan más del 50% de la ingesta diaria de energía, por lo que la calidad y la fuente de estos hidratos de carbono son importantes para la prevención de enfermedades metabólicas (Clemente-Suárez *et al.*, 2022). Por lo anterior, se recomienda elegir fuentes alimentarias de hidratos de carbono de alta calidad, es decir aquellos que sean altos en fibra dietética (cereales integrales, legumbres, frutas y granos enteros) y que tengan un índice y carga glucémico bajo, además de que la cantidad de hidratos de carbono a consumir debe ser acorde a los requerimientos individuales (Cui *et al.*, 2023; Sievenpiper, 2020). A pesar de la ubicuidad de las recomendaciones dietéticas, desde mediados de la década de los 2000, la diversidad de fuentes alimentarias de CHO's ha aumentado, generándose un exceso en el consumo de energía; lo que se ha convertido en un sello distintivo de la dieta occidental (Cui *et al.*, 2023; Ma *et al.*, 2022), que tiene como principal característica estar constituida por grandes porciones de alimentos industrializados ricos en grasas, sodio y sobre todo azúcares simples (Rakhra *et al.*, 2020).

En años recientes se ha estudiado la asociación del consumo excesivo de alimentos procesados que contienen azúcares dietéticos o jarabe de alta fructosa con un impacto negativo a la salud, ya que puede condicionar el desarrollo de inflamación crónica de bajo grado (obesidad), síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades autoinmunes e incluso neuroinflamación, entre otras (Clemente-Suárez *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2022). El proceso inflamatorio observado conlleva a un aumento de los niveles de ERO que pueden inducir a estrés oxidativo, generando daño a biomoléculas lo cual permite la progresión de las enfermedades anteriormente mencionadas (Tan & Norhaizan, 2019; Zuo *et al.*, 2019).

2.3 Glucotoxicidad y estrés oxidativo: enfermedades asociadas.

La homeostasis de la glucosa en organismos eucariotas es el resultado de un sistema regulador complejo. Por ejemplo, en los humanos involucra la participación de distintos órganos y diversos factores circundantes como hormonas y neuropéptidos, además de mecanismos de captación de glucosa (Chadt & Al-

Hasani, 2020). Como productos del metabolismo celular normal se generan moléculas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO), los cuales pueden ejercer efectos beneficiosos frente a agentes infecciosos, la inducción de una respuesta mitogénica y el proceso de maduración de las estructuras celulares, cuando se encuentran en concentraciones bajas o moderadas (Kopp, 2019; Oguntibeju, 2019). Las ERO son rápidamente eliminadas por el sistema de defensa antioxidante (SDA) presente en las células. El SDA consta de varias moléculas antioxidantes que neutralizan o eliminan las moléculas oxidantes manteniendo un equilibrio redox (Albert-Garay *et al.*, 2022). Sin embargo, cuando esta homeostasis redox es alterada por la generación de una cantidad excesiva de ERO de manera prolongada que supera los SDA, se presenta la condición conocida como estrés oxidativo (EO), el cual es un componente clave en la patogenia de la inflamación crónica (Hernández-García *et al.*, 2017; Zuo *et al.*, 2019).

En los humanos, se ha descrito que el EO está directamente influenciado tanto por las fluctuaciones de glucosa sérica como por la hiperglucemia crónica; creando un ambiente de glucotoxicidad para las células, lo que conlleva al desarrollo de distintas enfermedades (Oliveira-Volpe *et al.*, 2018). Las condiciones de hiperglucemia desencadenan la activación de varias vías de señalización metabólica a través de proteínas cinasas, factores de transcripción, expresión génica de factores proinflamatorios y a la secreción de citocinas, causando un estado de inflamación, lo que condiciona que las células se vuelvan susceptibles a la apoptosis y la necrosis (Darenskaya *et al.*, 2021; Scheen *et al.*, 2020).

En patologías de características metabólicas, como la diabetes tipo 1 y 2, el aumento de glucosa intracelular puede conducir a estados oxidantes que afectan la generación de los mecanismos antioxidantes o la eficiencia de recuperación de éstos (Masenga *et al.*, 2023; González *et al.*, 2023). El aumento de ERO induce daño a las células al interactuar con (modificando así) la estructura de las macromoléculas (lípidos, proteínas y ADN); lo que se traduce en disfunciones tisulares (Hernández-García *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2016). En la diabetes tipo 2, el EO causado por la hiperglucemia interfiere con la señalización de la insulina al provocar una menor síntesis de esta hormona en las células beta del páncreas

(Takahara *et al.*, 2017; Zuo *et al.*, 2019). La glucotoxicidad en la diabetes también está asociada con el desarrollo de neuropatías como la enfermedad de Parkinson al favorecer la muerte temprana de las neuronas dopaminérgicas (Sergi *et al.*, 2019).

2.4 Vía de sensado de nutrientes en organismos eucariotas (Vía PKA).

Las enzimas proteínas cinasas o fosforilasas (PK) regulan una amplia gama de procesos biológicos y fisiológicos mediante la activación o inhibición de reacciones enzimáticas involucradas en la proliferación, crecimiento, diferenciación celular, progresión del ciclo celular, migración, metabolismo de hidratos de carbono, transporte de iones, entre otros (Liu *et al.*, 2016; Silnitsky *et al.*, 2023).

La manera en la que las PK participan en estos procesos es mediante su acoplamiento con un nucleótido que funciona como segundo mensajero, denominado monofosfato de adenosina cíclico o AMP cíclico (AMPc). El sistema de proteína cinasa dependiente de AMPc (Vía PKA) representa una vía primaria de señalización celular que está presente en todos los sistemas biológicos (Pérez-Landero & Nieto-Sotelo, 2013). Los componentes moleculares de esta ruta de señalización están conservados en los diferentes tipos de células eucariotas (desde organismos unicelulares como las levaduras, hasta células humanas) y juegan un importante papel para el sensado de glucosa (Chadha *et al.*, 2024). En levaduras, la activación de la vía PKA estimula el flujo glucolítico, reprime la expresión de los genes del metabolismo respiratorio, induce la biogénesis de los ribosomas y suprime la respuesta al estrés (Botman *et al.*, 2021). Se ha descrito que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la vía PKA representa una ruta principal de señalización que regula el crecimiento en respuesta a la presencia de nutrientes, el metabolismo y a las condiciones de estrés, estimulando a las enzimas que participan en la glucólisis y la fermentación, así como a aquellas implicadas en el desarrollo y en la proliferación celular, al mismo tiempo que inhibe a las proteínas involucradas en la gluconeogénesis, en la resistencia al estrés y en la síntesis del glucógeno y la trealosa (Rolland *et al.*, 2002). En eucariotas superiores (humanos), la vía PKA contribuye a la glucorregulación, facilitando las acciones de los

neurotransmisores, las hormonas y otras moléculas de señalización que se unen a los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) para modular los niveles de AMPc (London & Stratakis, 2022).

2.4.1 Funcionamiento de la vía PKA.

En todos los seres vivos, la participación de la vía PKA es esencial en la transducción de señales intracelulares y en el mantenimiento de los procesos homeostáticos celulares. Esta vía les permite a las células percibir estímulos extracelulares a través de la potenciación de señales de ligandos que se unen a receptores acoplados a proteína G (GPCR), de los cuales existen dos clases: monoméricos, que se asemejan a Ras, y heterotriméricos. Las proteínas G pequeñas, similares a Ras, se dividen en cinco subfamilias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran. Las proteínas de las familias Ras y Rho desempeñan un papel en la regulación del crecimiento celular y la participación de la actina en el citoesqueleto (Cui *et al.*, 2020; Hamm, 1998). Una vez ocupado por su ligando, los GPCR activan el heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ (conocido generalmente como proteína G heterotrimérica, ya que está compuesto por las subunidades $G\alpha$ y el heterodímero compuesto por $G\beta$ y $G\gamma$), y ello conduce a la liberación de $G\alpha$, lo cual es mediado por la unión de esta subunidad a guanosín trifosfato (GTP). De esta manera $G\alpha$ (ya libre de $G\beta\gamma$), es responsable de la activación de la enzima adenilato ciclasa, la cual sintetiza el segundo mensajero denominado adenosín monofosfato cíclico AMPc. El desenlace de este proceso es la activación de vía PKA (ver figura 1). Una vez concluida su función en la transmisión de señales y activación de procesos determinados, la subunidad $G\alpha$ se libera del GTP y se asocia nuevamente con el dímero $G\beta\gamma$ (London & Stratakis, 2022; Valdespino-Gómez *et al.*, 2009).

Los GPCR se ubican en la membrana celular plasmática y se caracterizan por un dominio extracelular con un fragmento N-terminal, siete hélices transmembranales que forma parte del sitio de unión a ligandos y un fragmento terminal C intracelular que interactúa con las proteínas G heterotriméricas (Ferrier, 2014; Mckee & Mckee, 2014). En los humanos, estos receptores responden a una amplia gama de ligandos endógenos extracelulares, incluidos hormonas como la insulina, la TSH, el glucagón, las catecolaminas y los endocannabinoides; y a neurotransmisores como

el glutamato, la dopamina, el ácido γ -aminobutírico, entre otros (González-Gil, 2012; Wang *et al.*, 2020). Por otra parte, en eucariotas inferiores (hongos y levaduras), los GPCR reaccionan a la presencia de nutrientes como la glucosa (Rolland *et al.*, 2002). En humanos, la vía de señalización PKA regula la homeostasis de la glucosa en múltiples niveles, incluida la secreción de insulina y glucagón, la captación de glucosa, la síntesis y descomposición del glucógeno, la gluconeogénesis, entre otros, por lo que se ha descrito que una falla en esta vía (PKA) puede alterar los niveles de glucosa hasta su progresión a la condición de prediabetes o incluso a diabetes Mellitus tipo 2 (London & Stratakis, 2022; Yang & Yang, 2016).

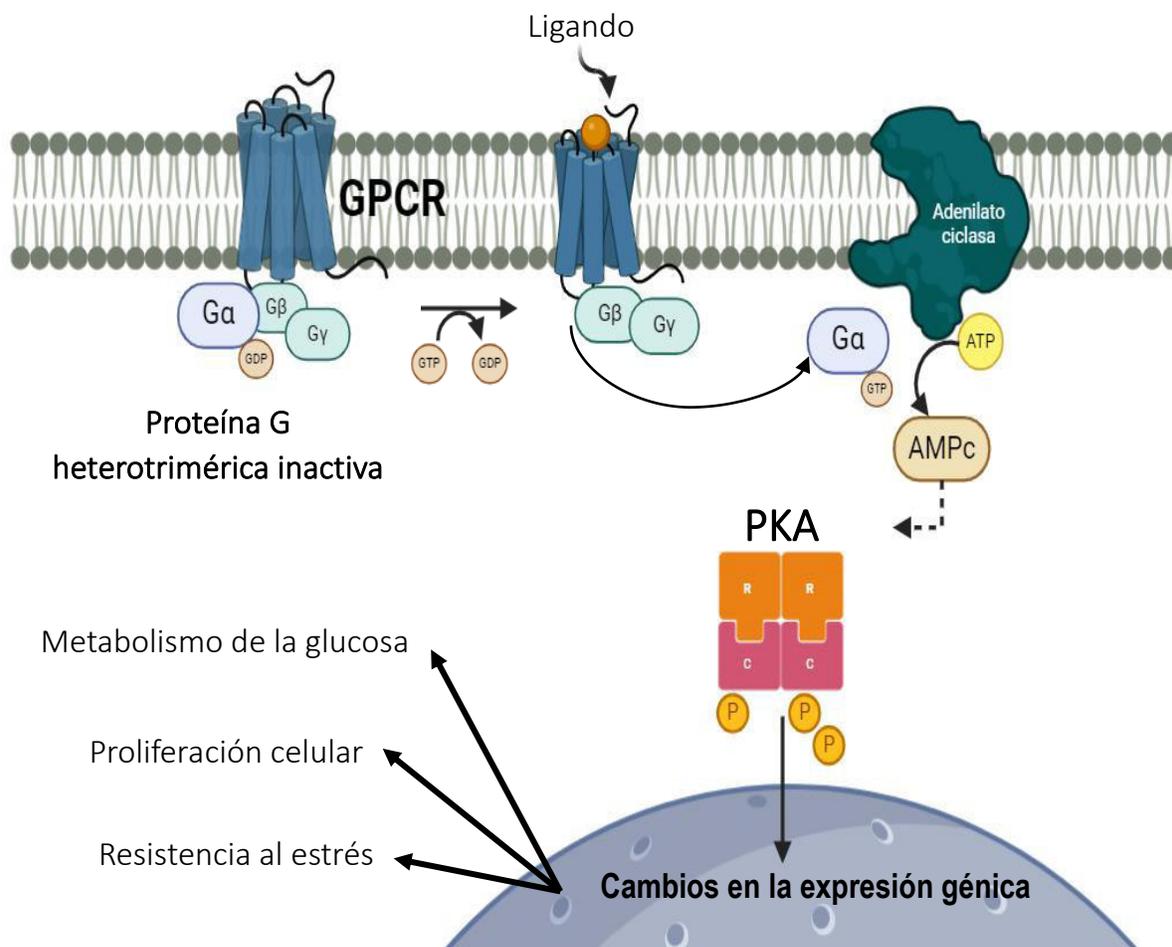


Figura1. Funcionamiento de la vía PKA dependiente de AMPc. GPCR: receptores acoplados a proteína G; GTP: guanósín trifosfato; GDP: guanósín difosfato; ATP: adenosín trifosfato; P: fosfato; G α : subunidad alfa de la proteína G; G β : subunidad beta de la proteína G; G γ : subunidad gamma de la proteína G. AMPc: adenosín monofosfato cíclico; PKA: proteína cinasa A dependiente de AMPc; R: Subunidad reguladora de la PKA; c: Subunidad catalítica de la PKA. Adaptado de García-Rico & Fierro, 2017.

2.4.2 Patologías asociadas con la vía PKA.

En seres humanos, las anomalías en la transducción y transmisión de las señales a nivel intracelular están asociadas a alteraciones en diferentes procesos tales como: proliferación, diferenciación, supervivencia, etc., dando lugar a un grupo diverso de enfermedades (Schöneberg & Liebscher, 2020; Valdespino-Gómez *et al.*, 2009).

Se ha descrito que alteraciones en la secuencia de eventos de la vía de señalización PKA puede ocasionar desequilibrios en los mecanismos hormonales como, por ejemplo, la producción excesiva de cortisol causando alteraciones en la proliferación de células adrenocorticales que más tarde se traduce en la aparición del Síndrome de Cushing. Esta afección, representa la enfermedad más comúnmente causada por mutaciones en las subunidades catalíticas de la vía PKA (Ronchi, 2019; Ramms *et al.*, 2021).

Adicionalmente, también se ha mencionado que mutaciones inactivadoras (ya sea mutaciones de un solo nucleótido, inserciones/delecciones, mutaciones de cambio de marco de lectura y/o delección parcial o completa del gen) en los genes que codifican para los GPCR conducen a defectos en el plegamiento del receptor e interfieren con la unión de su acoplamiento a la proteína G heterotrimérica. Tal situación es responsable de la aparición de una serie de patologías que incluyen defectos visuales como la retinitis pigmentaria y el daltonismo, la hipercalcemia hipocalciúrica familiar, disfunciones de señalización hormonal (hipertiroidismo o hipotiroidismo), hipogonadismo hipogonadotrópico y diabetes (Schöneberg & Liebscher, 2020; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2022; Valdespino-Gómez *et al.*, 2009).

De manera similar, se ha mencionado que mutaciones en el GPCR conocido como MCR4 (que codifica para el receptor de melanocortina 4) están asociadas con la presencia de obesidad al alterar el equilibrio de las señales orexigénicas y anorexigénicas a nivel hipotalámico; y por lo tanto, causar irregularidades en la ingesta de alimentos, la homeostasis energética y el peso corporal (Fatima *et al.*, 2022; Paisdzior *et al.*, 2020).

En el cuerpo humano órganos clave como cerebro, hígado, músculo y páncreas están asociados con la regulación de la glucosa mediante la expresión de diversos

GPCR y variantes de la subunidad $G\alpha$, por lo que, variaciones genéticas como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en $G\alpha$, están asociados a un mayor riesgo de padecer diabetes tipo 2 (Layden *et al.*, 2010; Tao & Liang, 2014) y algunos tipos de cáncer. Como un ejemplo de lo anterior, se ha descrito que el SNP T393C en el gen *GNAS1* (que codifica para la subunidad α de la proteína G que se une al nucleótido de guanina), está asociado con la progresión de carcinoma urotelial (Frey *et al.*, 2005).

Con respecto al sistema nervioso, alteraciones en la vía PKA se han relacionado con la afectación de la agudeza conductual y mental ocasionando la aparición de enfermedades mentales, incluido el trastorno depresivo mayor (Thomas *et al.*, 2022).

2.5 Transportadores de glucosa en humanos y levaduras.

La glucosa es el principal sustrato energético que controla la homeostasis celular (Chiarello *et al.*, 2022). En la mayoría de los organismos, las células requieren de un suministro continuo de glucosa para sintetizar energía en forma de ATP. Debido a que la membrana celular no es permeable a moléculas polares y de gran tamaño como la glucosa, se requiere de un sistema de transporte que depende, de manera general, de proteínas transmembranales que facilitan su entrada a la célula (Grooper *et al.*, 2020; Sandoval-Muñiz *et al.*, 2016). Los transportadores de hexosas se han identificado en una amplia variedad de organismos (Saitoh *et al.*, 2015; Gluchowska *et al.*, 2021) y pertenecen principalmente a la superfamilia de facilitadores principales (MFS). La mayoría de ellos son de tipo uniporter, lo que significa que solo mueven un sustrato a la vez, ya sea a favor o en contra del gradiente de concentración de dicho sustrato, generalmente mediante difusión facilitada. Sin embargo, algunos tienen la capacidad de transportar glucosa y otros azúcares contra el gradiente de concentración al acoplar el transporte con el movimiento simultáneo de protones en la misma dirección. Éstos se conocen como transportadores symporter y son sistemas que requieren energía (Donzella *et al.*, 2023; Sauve *et al.*, 2023).

En los seres humanos, hasta el momento se han identificado dos tipos de transportadores de glucosa: los ligados a sodio-glucosa (SGLT: Sodium Glucose Transporter) y una familia de proteínas denominadas transportadores de glucosa (GLUT: Glucose Transporter). Ambos tipos de transportadores difieren en cuanto a su especificidad de sustrato, distribución y mecanismos reguladores (Navale & Paranjape, 2016; Carbó & Rodríguez, 2023). Una de las características diferenciales más notables entre estos dos transportadores es que los SGLT utilizan un transporte activo en el cual interviene la bomba sodio-potasio, mientras que los GLUT transportan glucosa mediante el mecanismo de difusión facilitada (Koepsell, 2020). En humanos se conocen al menos 7 SGLT, de los cuales, las isoformas SGLT1 y SGLT2 destacan por distribuir glucosa a órganos importantes del cuerpo: cerebro y riñones (Wright, 2021). Asimismo, se han identificado 13 miembros o isoformas de la familia de los GLUT, divididas en distintas clases (I, II, III) de acuerdo con las similitudes encontradas en su estructura. Estas proteínas se expresan en diferentes tejidos. Por ejemplo, GLUT1 y GLUT3 se encuentran en casi todos los tejidos, GLUT2 en el hígado, riñones y páncreas, mientras que GLUT4 se expresa principalmente en el músculo y el tejido adiposo, entre otros (Chadt & Al-Hasani, 2020). A pesar de tener una alta afinidad por la glucosa, se ha descrito que los GLUT también pueden transportar otros monosacáridos como galactosa, fructosa y manosa, e incluso pueden participar en la distribución de sustratos como ácido dehidroascórbico, ácido úrico y mioinositol a diferentes tejidos u órganos (Chen, 2022; Grooper *et al.*, 2020; Holman; 2020).

Muchas especies de levaduras utilizan una variedad de azúcares como sustrato para la generación de biomasa celular y energía metabólica, mostrando una captación preferencial de glucosa sobre otros monosacáridos como fructosa (Horák, 2013). Para que estas moléculas puedan metabolizarse, deben ser captadas por las células, lo que requiere de transportadores que son activados mediante fosforilación por enzimas hexocinasas (Van Ende *et al.*, 2019). En *Candida albicans* y *Candida glabrata* se han identificado 20 y 11 transportadores de hexosas (HXT: hexose transporters), respectivamente (Van Ende *et al.*, 2019). *S. cerevisiae* presenta al menos 20 transportadores de hexosa, todos con una estructura común de 12

regiones transmembranales y que han sido caracterizados por diferentes parámetros de afinidad y propiedades cinéticas en respuesta a la glucosa (Milanesi *et al.*, 2021; Van Ende *et al.*, 2019). Adicionalmente, se ha descrito que algunos de estos HXT no son capaces de transportar glucosa, sino que actúan como sensores señalando la presencia de ésta (Donzella *et al.*, 2023). De acuerdo con Hapeta y cols. (2021), *Y. lipolytica* posee seis transportadores de hexosa codificados por los genes *YHT1* a *YHT6*. Los autores reportan que, en células normales y bajo condiciones óptimas de crecimiento, Yht1, Yht3 e Yht4 son transportadores de amplio espectro que permiten la captación eficiente de varias hexosas, incluyendo glucosa, fructosa, manosa y galactosa (Hapeta *et al.*, 2021).

2.6 *Yarrowia lipolytica* como organismo modelo.

Y. lipolytica es considerada como una levadura no convencional que principalmente ha sido utilizada en el ámbito industrial y como organismo modelo en el área de la investigación debido a la gran variedad de propiedades que posee además de compartir algunas características con eucariotas superiores (Park & Ledesma-Amaro, 2022). Originalmente fue denominada un tipo de hongo *Candida*, luego como *Saccharomyces* y finalmente obtiene el nombre genérico de *Yarrowia* en honor al investigador holandés David Yarrow quien la descubrió, y el nombre específico *lipolytica* debido su preferencia por los lípidos como fuente de alimentación (Cabralés, 2012; Madzak, 2018). La FDA (*Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés) la ha clasificado como GRAS (Generalmente Reconocida como Segura) al no ser un organismo patógeno. *Y. lipolytica* ha sido utilizada para estudiar varios mecanismos biológicos, como: dimorfismo, secreción y expresión de proteínas, manipulación de genes, biogénesis de peroxisomas, fisiología, genética, degradación de sustratos hidrofóbicos y acumulación de lípidos (Ruiz-Herrera, 2012), ya que posee un perfil versátil de utilización de sustratos, diversidad metabólica, adaptabilidad a diversas condiciones químicas y físicas así como presentar alta tolerancia a ambientes extremos, entre otras características (Mamaev & Zvyagilskaya, 2021). Se ha descrito, que *Y. lipolytica* es capaz de metabolizar hidrocarburos y lípidos, acumular grandes cantidades de ácidos orgánicos y secretar proteínas heterólogas. Dentro del área

medio ambiental, *Y. lipolytica* es considerada como un organismo biorremediador ya que tiene la capacidad de degradar aceites contaminantes de ambientes marinos y terrestres, además, funciona como un sistema efectivo para la absorción de metales pesados ya que presenta una alta tolerancia a éstos (Cabralés, 2012; Ruiz-Herrera, 2012; Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002).

Se ha determinado que el genoma de esta levadura tiene un tamaño de 20.5 Mb, el cual se encuentra dividido en 6 cromosomas mostrando 6073 secuencias codificantes, con un promedio de un gen aproximadamente cada 3 Kb y presenta un contenido de GC cuyos valores oscilan entre 49.6 y 51.7% (Cabralés, 2012; Liu *et al.*, 2015). En respuesta a las condiciones ambientales y a los mecanismos de regulación genética, *Y. lipolytica* posee la capacidad de crecer en forma de levadura o de micelio al ser un hongo dimórfico. Algunos factores importantes para su crecimiento y metabolismo son el pH, las fuentes de carbono y nitrógeno, la concentración de oxígeno y la temperatura (óptima a los 28°C y no debe de exceder los 32-34°C) (Fickers *et al.*, 2011). Otra característica importante de este organismo dimórfico es que puede asimilar y fermentar diferentes fuentes de carbono, como materiales hidrofílicos (glucosa, glicerol, alcoholes y acetato) y sustratos hidrofóbicos (ácidos grasos, triacilgliceroles y alcanos). La morfología de *Y. lipolytica* puede ser inducida por un simple cambio en la fuente de carbono; así, cuando este organismo se cultiva en un medio con glucosa como fuente de carbono, su crecimiento es en forma de levadura, mientras que cuando la fuente de carbono es N-acetilglucosamina, crece en forma de micelio (Rodríguez & Domínguez, 1984; Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002). La transición de la forma de levadura a micelio está relacionada con dos mecanismos de señalización incluida la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y la vía de la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) (Liu *et al.*, 2015).

2.7 Efectos de la inactivación de la vía PKA en hongos.

Lengeler y cols. (2000), destacan que en levaduras como *S. cerevisiae*, la generación de AMPc a través de la vía PKA activa el crecimiento en forma de filamentos; mientras que en el hongo *Ustilago maydis*, el AMPc desempeña una

función opuesta al inhibir el crecimiento celular en forma de hifas o micelio. Por otra parte, se ha establecido una relación de las proteínas G en la regulación de diversos procesos biológicos, como el crecimiento, la producción de enzimas y la respuesta al estrés, entre otros. En el año 2017, García-Rico y cols., utilizando cepas transformantes de *Penicillium camemberti*, que contenían el alelo dominante *pga1G42R* (que codifica una proteína Gai) de *Penicillium chrysogenum*, reportaron que la sobreexpresión de la subunidad Gai resulta en la alteración del fenotipo normal de *P. camemberti* al afectar el crecimiento y la esporulación del hongo. Los autores observaron hifas de menor extensión que en la cepa control, así como una reducción de la producción de conidias, sugiriendo que Gai está implicada en la expresión de los genes de la vía central de conidiación a través de la modulación de los niveles de AMPc, como ocurre en otros hongos. Adicionalmente, también mencionan que, la sobreexpresión de Gai al expresar *pga1G42R* reduce la resistencia al estrés térmico y osmótico.

En distintos modelos celulares se ha reportado que diferentes concentraciones de glucosa influyen en la fisiología y la vida útil de la célula, afectando su capacidad reproductiva. Para profundizar en este conocimiento Maslanka y Zadrag-Tecza (2019), utilizaron cepas mutantes *gpr1-Δ* y *gpa2-Δ* de *S. cerevisiae* (las cuales tienen reducida la actividad de la vía PKA). Dentro de los resultados recabados en este estudio, se describe que la tasa de captación de glucosa de las cepas *gpr1-Δ* y *gpa2-Δ* fue menor que la determinada en la cepa parental. En condiciones de glucosa extracelular alta, se observó una reducción del potencial reproductivo en la cepa parental, indicando que una mayor concentración de glucosa conduce a una reducción de la capacidad de reproducción de la célula. De la misma forma, se relaciona con una disminución en la vida reproductiva de la cepa control. Por otra parte, se ha descrito que la presencia de hidratos de carbono fermentables en el medio extracelular tiene grandes efectos en el crecimiento celular de ciertos hongos, incluido *S. cerevisiae*. En el año 2021, Van Zeebroeck y cols., monitorearon los niveles de AMPc *in vivo* utilizando un sensor de proteína de intercambio activada por AMPc en cepas de *S. cerevisiae* cultivadas en medios con distintos nutrientes. Cuando la fuente de carbono era glucosa, se mostró un rápido aumento de la

trealosa (disacárido considerado como indicador de la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae*). Este incremento dependía directamente de la actividad del GPCR, *gpr1*, ya que al deletar el gen *GPR1* en una cepa de la levadura ya no se observó aumento en los niveles de AMPc. Por otra parte, la adición de nitrógeno, fosfato y sulfato no mostraron aumento de los niveles de AMPc. Con estos resultados, los autores concluyen que, a pesar de que estos nutrientes también activan la vía PKA, sólo la glucosa lo hace por medio de los GPCR, mientras que el nitrógeno, sulfato y fosfato la activan de una forma independiente de AMPc.

2.8 Mutante de *Yarrowia lipolytica gpa1-Δ/gpa2-Δ*.

En 2014 en el laboratorio de Proteómica del CINSP, UANL, con el objetivo de conocer la función de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica en el sensado de nutrientes, se generó una cepa mutante en células de *Y. lipolytica* mediante la eliminación del gen que codifica para la subunidad α (gen *GPA1*); sin embargo, en el análisis fenotípico se observó que la delección del gen *GPA1* no tuvo efectos en el crecimiento en las células cuando estas fueron cultivadas en un medio adicionado con diferentes concentraciones de glucosa. La explicación posible detrás de estas observaciones radica en la identificación de dos secuencias en el genoma de esta levadura que cumplen con las características necesarias para ser consideradas como genes *GPA*: *YIGPA1* y *YIGPA2* (que presuntamente codifican para proteínas con un tamaño de 410 y 442 aminoácidos, respectivamente) y es posible que al deletar solo uno de estos genes, el restante tenga una función compensatoria (Huerta, 2014). Con base en esta información, Briones (2021) generó, mediante la delección de ambos genes, la doble mutante de *Y. lipolytica gpa1-Δ/gpa2-Δ*, asegurando con ello el total bloqueo de la vía PKA, por inactivación de la subunidad α ($G\alpha$). En el análisis fenotípico de la mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* se observó que el crecimiento es predominantemente en forma de células filamentosas (micelio), mientras que el crecimiento de la cepa parental (control) es tanto en forma de levadura como de micelio, cuando ambas cepas se cultivaron en presencia de glucosa como fuente de carbono. También se observó que en comparación con la cepa control, la cepa doble mutante tiene un mayor crecimiento bajo la misma

condición nutricional. Sin embargo, se describe que a diferencia de la cepa control, en la cepa doble mutante se presenta una disminución rápida en el crecimiento celular. Tales resultados se discuten en el contexto de que la interrupción de la vía PKA (por delección de los genes *GPA*) repercute en la detección de la presencia de glucosa provocando una alteración de la modulación de la entrada de glucosa a célula. Así, el ingreso de una cantidad no controlada de glucosa a la célula explicaría tanto el mayor crecimiento en las células que tienen la vía PKA inactiva, como la muerte prematura de las células, posiblemente debido a la glucotoxicidad ocasionada por las altas concentraciones de glucosa intracelular. Es posible que el ingreso de altas concentraciones de glucosa a la célula sea mediado por los transportadores de glucosa (Yht), lo que implicaría una mayor expresión de los genes que codifican para estas proteínas.

3. Justificación

La homeostasis de la glucosa es necesaria en los organismos eucariotas para llevar a cabo importantes procesos biológicos, por lo que un mecanismo eficaz en la detección de esta molécula es imprescindible. La manera en la que las células logran este proceso es por la activación de la vía PKA como respuesta a un estímulo externo detectado por receptores transmembranales (GPCR) asociados a la proteína G heterotrimérica (conformada por 3 subunidades: $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$). Al detectar el estímulo se provoca una separación de la subunidad $G\alpha$ la que unida a GTP lleva a cabo la activación de la enzima adenilato ciclasa la cual es responsable de la síntesis de AMPc (segundo mensajero) el cual media la activación de las proteínas cinasas (PKA). En humanos, este estímulo corresponde a diferentes tipos de moléculas como hormonas, endocannabinoides y neurotransmisores por lo que disfunciones en cualquier nivel de la vía PKA se asocian con distintas patologías como diabetes, obesidad, desequilibrios hormonales, entre otras. En organismos inferiores (en la escala evolutiva) como las levaduras, la activación de la vía PKA comienza con la detección de los nutrientes presentes en el medio.

En *Y. lipolytica*, la presencia de glucosa como fuente de carbono condiciona su morfología y se ha descrito en trabajos previos del laboratorio de Proteómica-CINSP, que la delección de los genes *GPA* (*GPA1* y *GPA2*) en este organismo, están implicados en la interrupción de la vía de señalización PKA ocasionando un inadecuado sensado de nutrientes. Es por esto, que en este estudio la doble mutante generada en el trabajo de Briones (2021), cuyo análisis fenotípico indica que; a) en presencia de glucosa esta mutante tiene una tasa de crecimiento mayor que en la cepa parental; b) se observa que el crecimiento no se mantiene (no se observa fase estacionaria) sino que hay una disminución abrupta en el crecimiento celular. Tales observaciones sugieren que en respuesta a la interrupción de la vía PKA (por delección de los genes *GPA1* y *GPA2*), en las células de este organismo eucariota hay una mayor incorporación de glucosa, lo que implicaría una mayor actividad de transporte de este nutriente.

Debido a la dificultad de generar este tipo de modelos mutantes en humanos, la cepa doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*, generada por Briones (2021),

constituye un excelente modelo celular para profundizar en el conocimiento de los mecanismos que regulan la incorporación de glucosa en células que carecen de un adecuado sensado de nutrientes en un contexto experimental controlado. Los resultados que se obtengan en este estudio ayudarán a comprender cómo las células eucariotas utilizan otros mecanismos compensatorios a la falta de sensado de nutrientes, así como las implicaciones que a nivel fisiológico tendría una ingesta excesiva de glucosa.

La eliminación de los genes *GPA* en las células de *Y. lipolytica* tiene como resultado la inactivación de la vía PKA, la cual está involucrada en la detección de glucosa. Esto provoca cambios en la forma de las células, un mayor crecimiento y muerte celular prematura en comparación con las células de la cepa control, posiblemente debido a la entrada descontrolada de glucosa. Los cambios observados en la expresión de los genes que codifican para los transportadores de glucosa (genes *YHT*), tanto en la cepa parental como en la cepa doble mutante, permitirá entender el papel que tiene la vía PKA en el transporte de glucosa.

4. Hipótesis

La hipótesis del presente trabajo es: en las células dobles mutantes (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) de *Y. lipolytica* hay sobreexpresión de los genes que codifican para transportadores de glucosa.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

- 1) Analizar y comparar la expresión de los genes que codifican para transportadores de glucosa en la cepa doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* y en la cepa parental de *Y. lipolytica* cultivadas en presencia o en ausencia de glucosa.

5.2. Objetivos específicos.

- 1) Identificar las secuencias correspondientes a los genes que codifican para los transportadores de glucosa (*YHT*) en *Y. lipolytica*, diseñar oligonucleótidos específicos y estandarizar las condiciones experimentales para su uso.
- 2) Examinar el patrón de expresión de los genes *YHT* en células de *Y. lipolytica* (cepas parental y doble mutante: *gpa1-Δ/gpa2-Δ*), cultivadas en presencia o en ausencia de glucosa.

6. Metodología

6.1 Diseño de estudio

Estudio de tipo experimental y analítico. El proceso experimental se realizó en el Laboratorio de Proteómica del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP) de la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

6.2 Estrategia general de trabajo

En la figura 2 se presenta la estrategia de trabajo, considerando los objetivos planteados y las etapas para su ejecución.

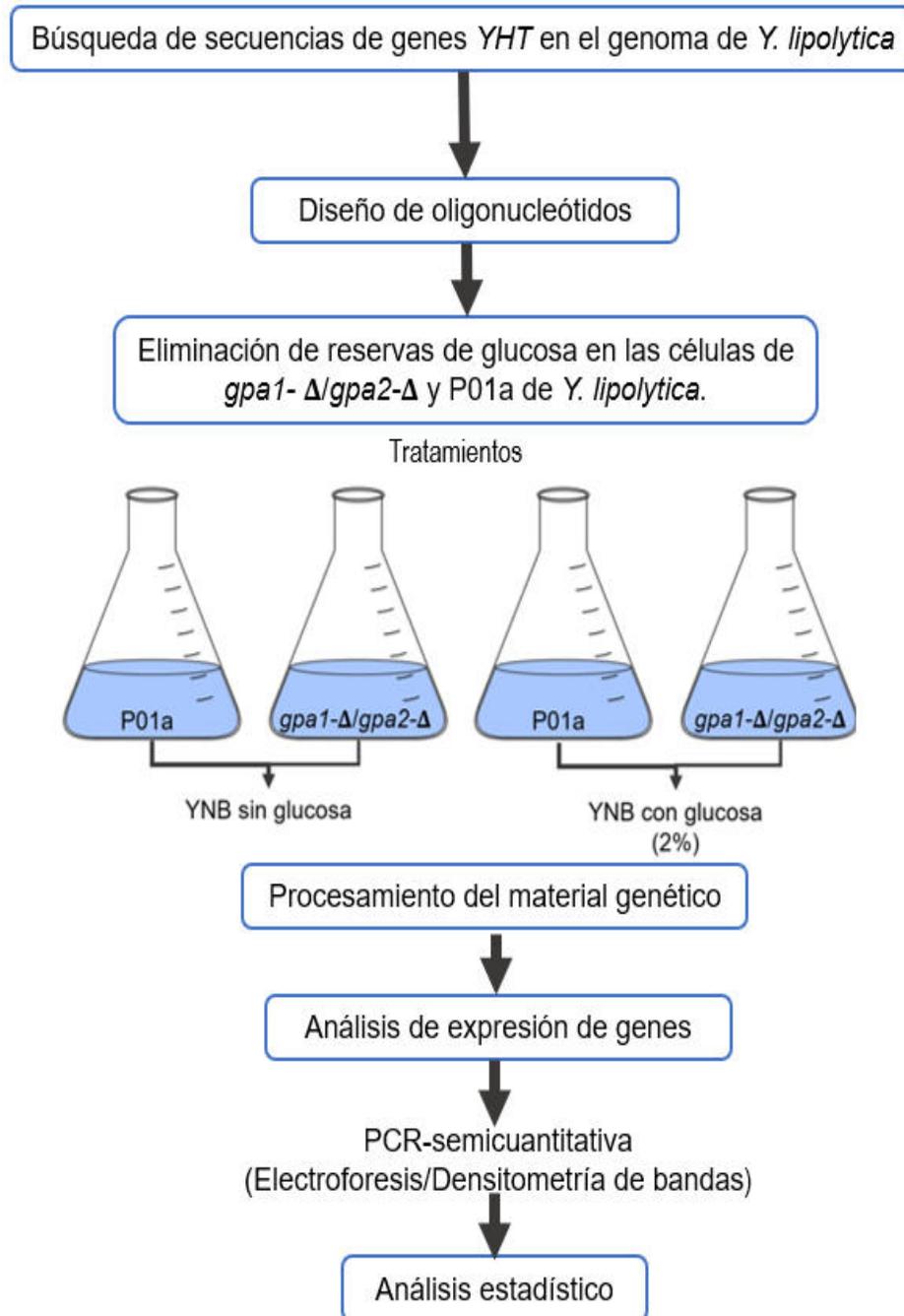


Figura 2. Estrategia general de trabajo. YNB: medio mínimo en nutrientes; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; P01a: células control de *Y. lipolytica*; *gpa1-Δ/gpa2-Δ*: células mutantes de *Y. lipolytica*.

6.3 Métodos

6.3.1 Búsqueda *in silico* de las secuencias de los genes que codifican para transportadores de glucosa, en el genoma de *Y. lipolytica*.

Se identificaron las secuencias correspondientes de los genes *YHT1* a *YHT6* presentes en el genoma de *Y. lipolytica* descritos por Lazar y cols. (2017) utilizando la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

6.3.2 Diseño de oligonucleótidos específicos.

Sobre las secuencias nucleotídicas identificadas, correspondientes a los genes *YHT1* a *YHT6* de *Y. lipolytica*, se diseñaron oligonucleótidos específicos que permiten la amplificación de los genes codificantes de los transportadores de glucosa de *Y. lipolytica*, y el posterior análisis de expresión de estos genes por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). Para el proceso de diseño de oligonucleótidos se consideraron características tales como: el número de nucleótidos (nt) que se quiera amplificar (> 400 pb), el tamaño de cada oligonucleótido (18 a 26 nt), el contenido de guanina y citosina (45-65%), la temperatura de alineamiento de cada oligonucleótido (50-65°C); y que no hubiese más de 3°C de diferencia entre los oligonucleótidos de cada par. Tales características se verificaron por análisis *in silico*, utilizando los softwares *Oligo Analyzer Tool* (idt.com), *Oligo Calc* (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) y *Primer Blast* (ncbi.gov); este último software se utilizó para corroborar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados, mediante PCR virtual.

6.3.3 Procedimiento experimental

6.3.3.1 Preparación de medio de cultivo.

Se prepararon 250 mL de medio de cultivo YPD líquido compuesto por extracto de levadura (1%), peptona de caseína (2%) y glucosa anhidra (2%) disueltos en agua

desionizada estéril (ultrapura Milli-Q). Posterior a la preparación, el medio se esterilizó en autoclave (Yamato Sterilizer SE-300) a condiciones de 121°C y 15 lb/pulg² de presión durante 15 min (Trecó & Lundblad, 1993).

6.3.3.2 Preparación del preinóculo.

En una campana de flujo laminar (SG 403G, SterilGARD III Advance), a partir de cultivos en placa de las células de *Y. lipolytica* cepas P01a y *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, se seleccionó una colonia aislada de cada cepa y se depositó en un tubo cónico de polipropileno que contenía 30 mL de medio YPD líquido. Las muestras se colocaron en una incubadora con sistema de agitación (Modelo 1575, SL Shel Lab) bajo las siguientes condiciones: 28°C a 200 rpm durante 24 h.

6.3.3.3 Ajuste del preinóculo según la OD.

Posteriormente, se realizaron diluciones (1:10, 1:20, 1:50 y 1:100) de los cultivos (preinóculo) de ambas cepas y se determinó la densidad óptica de éstas utilizando un espectrofotómetro (Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer; Thermo Scientific) con el objetivo de obtener un número uniforme de células en fase de crecimiento logarítmico, tanto de una como de otra cepa. Para obtener el volumen necesario del preinóculo, que sirviera como inóculo para los cultivos posteriores, se utilizó la siguiente fórmula:

$$(Concentración\ inicial) (Volumen\ inicial) = (Concentración\ final) (Volumen\ final)$$

- Concentración inicial: densidad óptica obtenida del pre-cultivo.
- Concentración final: densidad óptica deseada.
- Volumen inicial: cantidad de pre-cultivo que se utilizó a partir del preinóculo.
- Volumen final: volumen final deseado.

6.3.3.4 Cultivo de inóculos de las cepas P01a y *gpa1-Δ/gpa2-Δ*.

Los inóculos correspondientes a cada cepa (necesarios para tener una OD inicial = 0.2), se dispusieron en dos matraces Erlenmeyer (de 250 mL de capacidad) que contenían 50 mL de YPD cada uno y se incubaron a 28°C con agitación (200 rpm) durante 18-20 h; permitiendo obtener células en fase de crecimiento logarítmico, en cada uno de los tratamientos a probar.

6.3.3.5 Eliminación de las reservas de glucosa intracelular.

Posterior al tiempo de incubación en medio YPD, las células se sometieron a 2 lavados con agua estéril. El volumen de los cultivos (cepas P01a y *gpa1-Δ/gpa2-Δ*) se dividió en tubos Falcon de 50 mL (25 mL de cultivo en cada uno) y se centrifugaron a 5,000 rpm durante 10 min (Z 326 K, HERMLE), el sobrenadante se decantó y se agregaron 5 mL de agua Milli-Q estéril para la resuspensión de las células (el proceso de lavado de las células se repitió 2 veces). Después de cada centrifugación, el sobrenadante se decantó en un matraz y se eliminó. Posterior al segundo lavado, se agregó agua Milli-Q estéril hasta completar 50 mL. Para remover las reservas intracelulares de glucosa, las células resuspendidas en agua se incubaron en matraces de 250 mL, durante 3 h a 28°C, con agitación (200 rpm).

6.3.3.6 Preparación de medio YNB y tratamiento con glucosa.

Después de la eliminación de las reservas celulares de glucosa, las células se incubaron en medio mínimo en nutrientes (YNB) líquido adicionado con diferentes concentraciones de glucosa (0 y 2%) bajo condiciones de 28°C, a 200 rpm, durante 15 min.

Los matraces se rotularon de la siguiente manera:

- P01a sin glucosa
- *gpa1-Δ/gpa2-Δ* sin glucosa
- P01a con glucosa (2%)
- *gpa1-Δ/gpa2-Δ* con glucosa (2%)

6.3.3.7 Obtención de paquetes celulares.

Pasados los 15 min de incubación, se recuperaron 1.5 mL de cada muestra a un tubo Eppendorf (1.5 mL de capacidad) y se centrifugaron por 2 min en una microcentrífuga (5415D, Eppendorf) a 12,000 rpm; posteriormente, se decantó el sobrenadante y se repitieron estos pasos 2 veces más para obtener un paquete celular de un total de 4.5 mL de cultivo. Por último, las células cosechadas se

colocaron en una cama de hielo (a una temperatura aproximada de 4°C) para el proceso siguiente.

6.3.3.8 Procesamiento del material genético.

6.3.3.8.1 Purificación de ácidos nucleicos (AN).

Para la obtención de los AN de las células sometidas a los diferentes tratamientos, se siguió el método de lisis celular utilizando perlas de vidrio (Hoffman y Winston, 1987), el cual consiste en agregar aproximadamente 200 µL de perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro), 400 µL de buffer TSNT (1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM TRIS HCl (pH 8) y 2% Tritón X-100) y 400 µL de una mezcla de fenol-cloroformo (v/v). Las muestras se sometieron a 3 ciclos de 1 min de agitación con vórtex y 1 min en hielo. Enseguida, se centrifugaron por 10 min a 12,000 rpm para aislar la fase acuosa de la cual se transfirieron aprox. 300 µL a un nuevo tubo de polipropileno por cada muestra. Los tubos se rotularon y se mantuvieron en una cama de hielo. Posteriormente, se les añadieron 0.1 volúmenes (30 µL) de acetato de sodio (3 M, pH 5.4) y 2 volúmenes (600 µL) de etanol absoluto frío para precipitar los AN; las soluciones contenidas en los tubos se mezclaron por inversión y las muestras se incubaron a -20°C durante aproximadamente 20 min. Pasado este tiempo, se sometieron a centrifugación por 10 min a 12,000 rpm decantando el sobrenadante al término. Posteriormente, se continuó con 2 lavados de las muestras con etanol al 70%, para lo cual se agregaron 500 µL de etanol al 70%, se mezcló por inversión, se centrifugó (5 min a 12,000 rpm) y se eliminó el sobrenadante por decantación. El exceso de etanol se retiró con una micropipeta y las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente (TA) por 5-10 min. Por último, el material obtenido (AN) se resuspendió con 50 µL de agua bidestilada estéril.

6.3.3.8.2 Cuantificación de la concentración de los ácidos nucleicos

Para la cuantificación de los AN se utilizó el espectrofotómetro (Nanodrop 2000 UV-Visible; Thermo Scientific) leyendo a una OD de 260 nm (Desjardins & Conklin, 2010). Para evaluar la pureza de los AN, se consideraron las relaciones 260/280 y 260/230, considerando como valores óptimos aquellos que se encuentran entre 1.8

y 2.0, lo que asegura una muestra de calidad, libre de compuestos aromáticos, fenoles, proteínas e hidratos de carbono (Thermo Fisher Scientific, 2015).

6.3.3.8.3 Purificación de ARN

Para el aislamiento del ARN se utilizó el tratamiento con enzima DNasa (Bioline). Para ello, se colocó lo correspondiente a 500 ng/ μ L de ácidos nucleicos en un tubo nuevo de polipropileno de 1.7 mL añadiendo 2 μ L de la enzima DNasa (2 U) y 1 μ L del buffer de reacción correspondiente a la DNasa. Se aforó con agua bidestilada estéril para obtener un volumen final de 10 μ L.

La reacción se incubó por 2 h a 37°C en un termociclador (PCR Sprint Thermal Cycler®; Thermo Electron Corporation). Una vez terminado este periodo se realizó la inactivación química y térmica de la enzima añadiendo 1 μ L de EDTA (25 mM) e incubando durante 15 min a 65°C.

6.3.3.8.4 Determinación de la concentración de ARN.

La concentración final de las muestras de ARN se comprobó con el equipo Nanodrop 2000 a una longitud de onda de 260 nm.

6.3.3.8.5 Síntesis de ADNc por Transcripción Reversa

Para las reacciones de síntesis del ADNc, se utilizó el sistema de transcripción reversa (Kit GoScript; Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este proceso consta de dos reacciones (ver tabla 1) las cuales tienen distintos tiempos de incubación y se realizó a una temperatura de 4°C utilizando una cama de hielo. Previamente a la elaboración del protocolo se mezclaron los reactivos necesarios en un tubo de polipropileno de 1.5 mL de capacidad utilizando una pipeta. El volumen final que se obtuvo de ambas reacciones fueron 20 μ L.

Tabla 1. Componentes de las reacciones de Transcripción Reversa (RT).

Reactivo	Volumen (μL)	Periodo de incubación
Reacción 1		
ARN	Correspondiente a 500 ng	Incubación a 70°C por 5 min en el termociclador (Thermo Scientific Fisher). Reposo en hielo durante 5 min.
Oligo (dT) (0.5 μg)	1	
Reacción 2		
Buffer de reacción 5x	4	Incubación 1. A 25°C por 5 min. 2. A 42°C por 1 h. 3. A 70°C por 15 min.
MgCl ₂ (25 mM)	2	
Enzima transcriptasa reversa (Promega)	1	
dNTP's (0.5 mM)	1	

Las distintas condiciones de incubación tienen el objetivo de favorecer el alineamiento (hibridación) de la cola poli-A del ARNm, con la secuencia poli-T del Oligo (dT), la síntesis del ADNc y la desnaturalización de la enzima RT.

6.4.3.8.6 Análisis de la expresión de los genes.

Este procedimiento se llevó a cabo utilizando la técnica de PCR-RT (*Reverse Transcription-PCR*, por sus siglas en inglés) con la finalidad de amplificar los fragmentos de interés correspondientes al ADNc obtenido en el punto anterior (Mullis, 1990). El protocolo de las reacciones de PCR consistió en 3 etapas llamadas: 1) desnaturalización (que consiste en la separación, por calentamiento, de las 2 cadenas de nucleótidos que conforman el ADN por calentamiento), 2) alineamiento e hibridación (unión de los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar), y 3) extensión (en donde la enzima ADN polimerasa sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3').

Los componentes de 1 reacción de PCR incluyen: la enzima Taq polimerasa Boline (0.1 μL , 5 U/ μL), el ADNc (1 μL), agua bidestilada estéril (6.9 μL), buffer de la reacción (2.5 μL , 5X) y los oligonucleótidos diseñados en el punto 6.4.2 (forward (1 μL) y reverso (1 μL) para los genes *YHT* y para el gen constitutivo *ALG9* (Teste et

al., 2009). Todos los reactivos mencionados, se mezclaron en un tubo de polipropileno de 200 μ L de capacidad, en condiciones de baja temperatura (4°C). Para las reacciones de PCR, se utilizó el Termociclador (Sprint Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation) en las condiciones que se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Etapas	Fases	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de ciclos
1	Desnaturalización	95	5	1
2	Desnaturalización		72	1
	Alineamiento			
	Extensión			
3	Extensión final	4	10	1
4	Conservación	4	∞	N/A

6.4.3.8.7 Electroforesis.

Los fragmentos amplificados de interés se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Para la preparación de los geles, se mezclaron 2 g de agarosa en 100 mL de buffer TAE 1X en un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad. Esta mezcla se disolvió mediante calor utilizando una placa de calentamiento (PC 420D, Corning Stirrer) hasta que tomó una apariencia homogénea. De dicha mezcla, se vaciaron 25 mL en un tubo Falcon de 50 mL de capacidad y se agregó 1 μ L del marcador fluorescente GelRed utilizando una micropipeta. La mezcla se homogeneizó mediante inversión y se vertió en un molde con peine de plástico para la formación de pocillos en los cuales se cargaron las muestras y se dejó gelificar de 15 a 30 min, a TA. Pasado ese lapso, el gel se colocó en una cámara de electroforesis (C.B. S. Scientific Co, Bio-Rad) y se cubrió con buffer TAE 1X.

En el primer carril (pocillo) del gel, se cargaron 2 μ L de marcador de talla molecular (Hyperladder IV, Bioline); el uso de este marcador permitió verificar que los productos amplificados correspondan al tamaño del fragmento deseado. Los productos obtenidos de las diferentes reacciones de PCR se mezclaron con 2 μ L de buffer de carga (0.25% de azul de bromofenol y 40% de sacarosa) utilizando una micropipeta y se depositaron en los pocillos del gel de agarosa. Después, para la separación de las bandas, las muestras se sometieron a electroforesis aplicando un voltaje inicial de 20 Volts por 5 min, seguido de un voltaje de 120 Volts durante 25 min con una fuente de poder (Power pack 300; Bio-Rad).

6.4.3.8.8 Densitometría de bandas.

Al concluir el tiempo de electroforesis, el gel se visualizó con luz UV en un fotodocumentador (Gel Doc-It Imaging System) y se obtuvo el valor de expresión correspondiente a cada gen con el software Vision Works (UV-Visible Evolution 300, Thermo Scientific). Este software cuenta con un algoritmo que permite la conversión de la intensidad observada en cada banda (producto amplificado) a valores numéricos. Para normalizar los valores obtenidos en los diferentes experimentos, se consideraron los valores de expresión del gen constitutivo *ALG9*.

6.3.3.8.9. Plan de análisis

Para el análisis de los resultados, se utilizó el software estadístico SPSS IBM Statistics® versión 25.0. Se analizó la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk y debido a que se obtuvo un valor de p mayor a 0.05, se utilizó la prueba paramétrica *t* de Student para muestras independientes. Los valores de p menores de 0.05 ($p < 0.05$) se consideraron como significativos.

7. Resultados

7.1 Identificación *in silico* de secuencias de los genes *YHT* de *Y. lipolytica* y diseño de oligonucleótidos específicos.

La identificación de las secuencias de los genes *YHT* (1-6) permitió el diseño de los oligonucleótidos considerando las características descritas en la sección 6.3.2.

Para la estandarización de las condiciones óptimas de amplificación de los oligonucleótidos, se realizaron reacciones de PCR con ADN genómico (ADNg) de *Y. lipolytica* utilizando distintos ciclos de PCR, temperaturas de alineamiento diferentes (58-64°C) y cantidades distintas de ADNg para corroborar el límite de detección de los primers. En la figura 3 se presentan ejemplos de las reacciones de PCR realizadas para la estandarización.

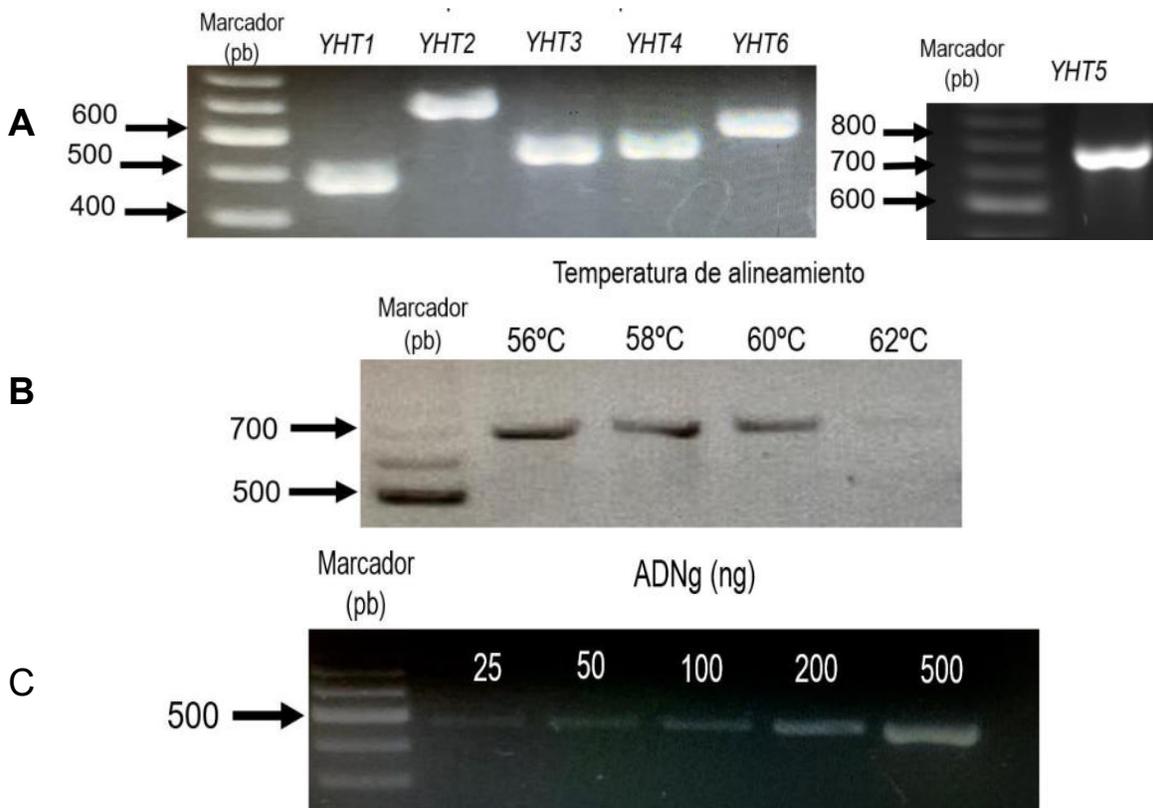


Figura 3. Estandarización de las condiciones experimentales de amplificación de los oligonucleótidos diseñados. A: Amplificación por PCR de los genes *YHT* utilizando ADNg de *Y. lipolytica*, los primers específicos para cada gen y 30 ciclos de PCR. B: Análisis de los fragmentos de PCR del gen *YHT2* considerando diferentes temperaturas de alineamiento de los primers. C: Análisis de los productos de PCR del gen *YHT1* utilizando distintas cantidades de ADNg de *Y. lipolytica*. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Marcador: HyperLadder IV. Pb = pares de bases.

El proceso experimental correspondiente a la estandarización permitió obtener oligonucleótidos específicos para la amplificación con los 6 juegos de primers diseñados sobre la secuencia de los genes *YHT*. La temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos utilizados para el análisis fue de 60°C para la mayoría de los genes a excepción del gen *YHT5* cuya temperatura óptima es de 64°C. En la tabla 3 se presenta las características finales de los oligonucleótidos diseñados y probados para el análisis de expresión génica.

Tabla 3. Características de los oligonucleótidos usados para el análisis de expresión de los genes que codifican para transportadores de hexosas de *Y. lipolytica*.

Gen	Identificación del gen	Secuencia de los primers (5→3)	Amplicón (pb)	Temp (°C)
<i>YHT1</i>	YALI0C06424	Fw: GGACTCGCTAACATCATCAACCGTGG Rv: GCAAACCTGGTAGATGGAGACAACG	479	60
<i>YHT2</i>	YALI0C08943	Fw: CTCTCTATCAGTCAGAAGTGTCTCC Rv: CCTTGGAAGACACCTGGCTATCC	690	60
<i>YHT3</i>	YALI0F19184	Fw: CCAGATCACAGCCTTCACAGCC Rv: CCACAGAGCTGCTGGAGAACC	540	60
<i>YHT4</i>	YALI0E23287	Fw: CGACTTTCACACTCCAGATCCGC Rv: CTGTCAAGAGCCCATCGACTCC	547	60
<i>YHT5</i>	YALI0B01342	Fw: CGGCTGCTCATAATCAAGGGCC Rv: CGGAGCAGTAGAGCCAGATGCC	749	64
<i>YHT6</i>	YALI0B06391	Fw: GGCCTTGGTATCGGTCTGGG Rv: GGTCAATGAACAGAAGAGCGGGG	619	60

7.2 Análisis de la expresión de los genes

7.2.1 Extracción de los ácidos nucleicos

Se obtuvieron 4 lotes de 4 experimentos independientes de células de *Y. lipolytica* de las cepas P01a y *gpa1-Δ/gpa2-Δ*. La extracción del ADN y ARN se realizó a partir de 1 lote de células y para comprobar la calidad de los ácidos nucleicos se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (ver figura 4); mediante espectrofotometría se cuantificó la concentración y pureza de los ácidos nucleicos

midiendo la absorbancia a una longitud de onda a 260 nm. La integridad de las bandas correspondientes al ADN y al ARN indicó que los ácidos nucleicos obtenidos tuvieron una calidad adecuada para utilizarse en los procesos subsecuentes de eliminación de ADN, síntesis de ADNc y PCR.

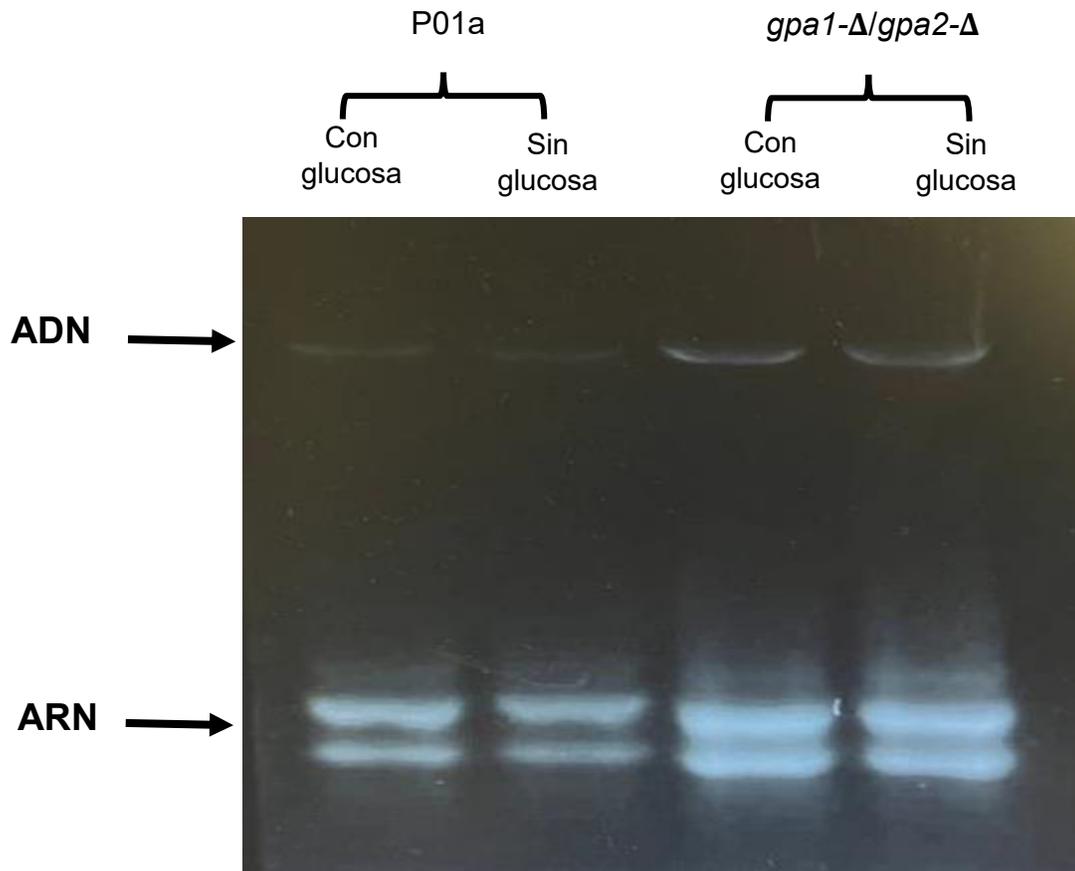


Figura 4. Electroforesis de ácidos nucleicos extraídos de células de las cepas P01a y *gpa1-Δ/gpa2-Δ* sometidas a tratamientos con glucosa (2%) y sin glucosa, en medio YNB. En la parte superior se observa la banda correspondiente a ADN y en la parte inferior, las bandas correspondientes a ARN.

7.2.2 Evaluación del tratamiento con DNasa I

Con el objetivo de verificar que el ADNg se eliminó completamente después del tratamiento con la DNasa, se realizó una PCR con 1 muestra de ácidos nucleicos tratada con la enzima. Se probaron diferentes condiciones experimentales: con DNasas de diferente marca (Bioline y Promega), distintas concentraciones de

enzima y diferentes tiempos de incubación. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed.

En la figura 5, se muestran los productos de las reacciones de PCR de dichas muestras. En los carriles 3 al 8 se colocaron productos de PCR con muestras de AN tratadas con DNasa, en las diferentes condiciones descritas.

Los resultados que se muestran en la figura 5 indican que bajo los tratamientos, tanto con la enzima DNasa de la marca Bioline como con DNasa de la marca Promega, en las distintas condiciones experimentales utilizadas, el ADN_g, se eliminó de manera eficiente. Se decidió por conveniencia utilizar la condición 1 (2 U de enzima, incubación 2h, 37°C) con la enzima DNasa 1 Bioline con el resto de las muestras de ácidos nucleicos de ambas cepas P01a y *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, como paso previo a la síntesis de ADN_c, a partir del ARNm de las células de *Y. lipolytica*.

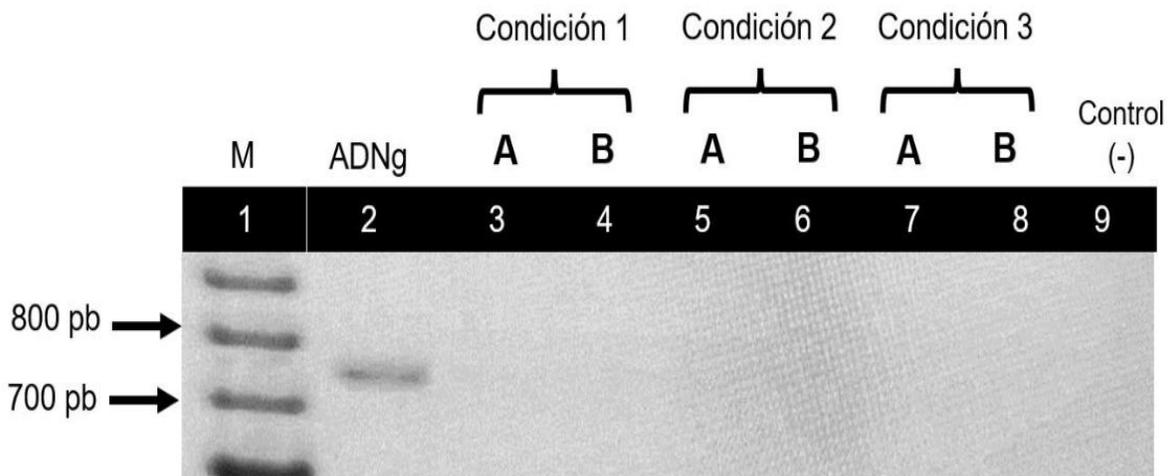


Figura 5. PCR sobre muestras de AN sometidas a tratamiento con la enzima DNasa (marcas Bioline y Promega). Condición 1: 2 U enzima, 2 h incubación a 37°C; Condición 2: 2 U enzima, 1h incubación a 37°C + 2 U enzima, 1 h incubación a 37°C; Condición 3: 1 U enzima, 1 h incubación a 37°C + 1 U enzima, 1 h incubación a 37°C + 1 U enzima, 1 h incubación a 37°C. Para las reacciones de PCR se utilizó como templado 1 uL de muestra y los primers correspondientes al gen *ALG9*. A: Enzima DNasa Bioline; B: Enzima DNasa Promega; M: marcador de pares de bases (Hyperladder IV, Bioline); pb: pares de bases. ADN_g: obtenido de células de P01a; Control (-): H₂O bidestilada (en lugar de ADN_g).

7.2.3 Expresión de los genes *YHT* en las cepas P01a y *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*.

7.2.3.1 Expresión del gen *YHT1*

Para analizar los cambios de la expresión de los genes *YHT* en las cepas parental P01a y doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*, se partió de muestras de ADNc obtenidas mediante retrotranscripción a partir de ARNm de cada cepa, obtenido de las células sometidas a las diferentes condiciones experimentales (Ver materiales y métodos). Con esas muestras se realizaron reacciones de PCR (27 ciclos) con temperaturas de alineamiento correspondientes a cada par de primers de los genes *YHT* (ver tabla 3) y los datos obtenidos correspondientes a la expresión de cada gen se analizaron estadísticamente y se graficaron.

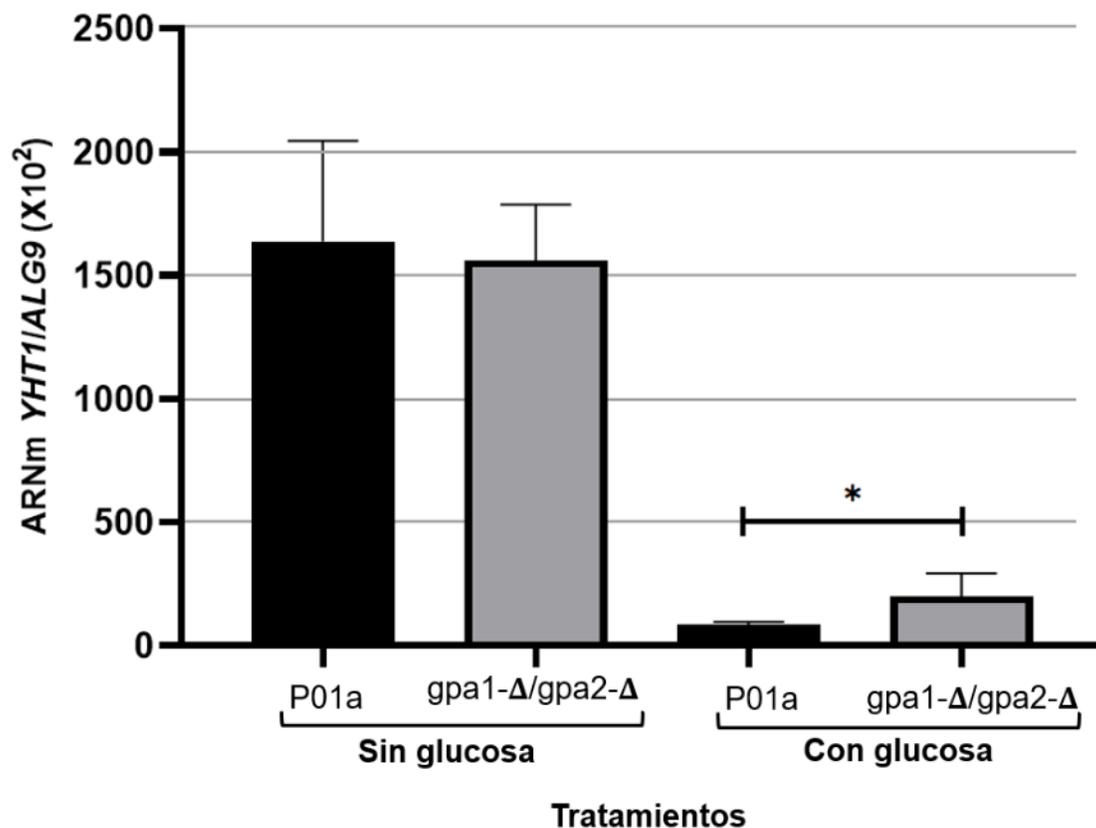


Figura 6. Expresión del gen *YHT1* en las cepas parental (P01a) y doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB con y sin glucosa. Los valores graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes; la línea en la parte superior de las barras representa el valor de la desviación estándar. Asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos comparados con la prueba *t* de Student para muestras independientes.

Los valores correspondientes al análisis de expresión del gen *YHT1* obtenidos por densitometría de los productos amplificados, en las células de la cepa parental y doble mutante se muestran en la figura 6.

La expresión del gen *YHT1* tanto en la cepa parental como en la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*, fue mayor en las células cultivadas en ausencia de glucosa (en medio YNB).

El análisis estadístico muestra diferencia ($p=0.037$) entre los niveles de expresión del gen *YHT1* de las células mutantes de *Y. lipolytica*, con respecto al grupo control (células de la cepa parental P01a).

7.2.3.2 Expresión del gen *YHT2*

En el análisis de expresión del gen *YHT2*, los productos de RT-PCR obtenidos fueron indetectables en las condiciones experimentales utilizadas, por lo que la densitometría de bandas y el análisis estadístico no se pudo realizar. La figura 6 corresponde a un gel de agarosa al 2% donde se muestran los productos obtenidos de las reacciones de PCR. En el análisis por RT-PCR se incluyó, como control positivo (carril 2) una muestra de ADNc con los primers correspondientes al gen constitutivo *ALG9*, para demostrar que los resultados de PCR, en las condiciones usadas, son correctos; los resultados se muestran en la figura 7.

En los carriles 3 al 6, correspondientes a las muestras con tratamiento -con y sin glucosa- de las cepas parental y doble mutante, sometidas a PCR con los primers del gen *YHT2*, no se observan bandas que indiquen producto amplificado.

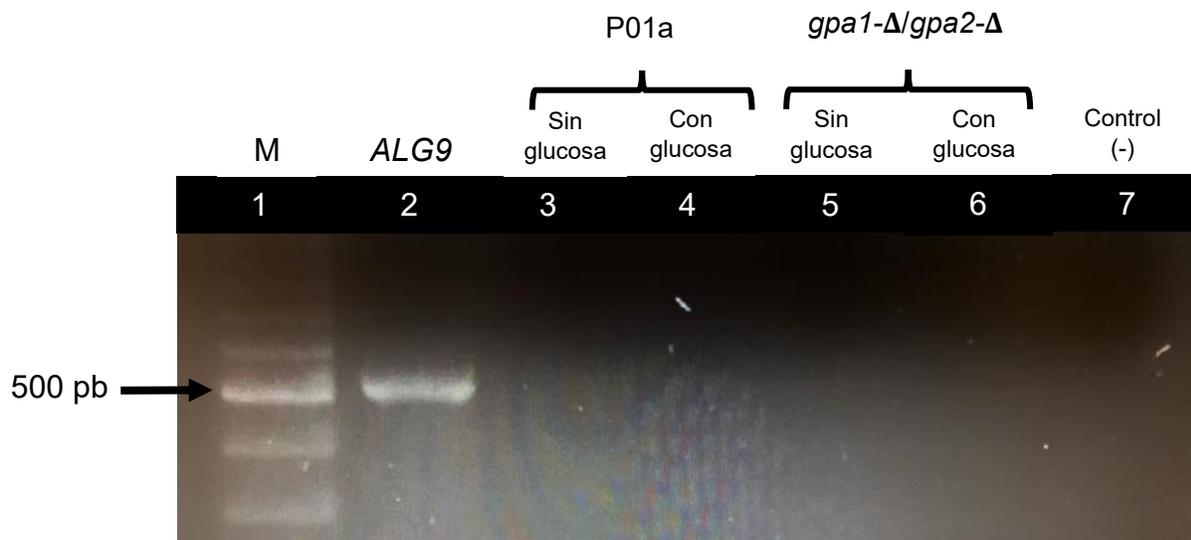


Figura 7. Análisis de expresión del gen *YHT2*. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de productos de PCR con muestras de ADNc obtenidas de las cepas parental (P01a) y doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) de *Y. lipolytica*. Tratadas con glucosa y sin glucosa (carriles 3 al 6); Carril 1, (M): marcador de pares de bases (Hyperladder IV, Bioline); carriles 2-6: productos de PCR sobre ADNc con los primers correspondientes al gen constitutivo *ALG9*. Carril 7: control negativo (reacción de PCR sin ADN); pb: pares de bases.

7.2.3.3 Expresión del gen *YHT3*

Se observan diferencias en la expresión del gen *YHT3*, entre las células parental (P01a) y doble mutante cultivadas en ausencia de glucosa ($p=0.014$).

Adicionalmente se observa que cuando las células de la cepa *gpa1-Δ/gpa2-Δ* son cultivadas en medio con glucosa hay un ligero incremento en la expresión del gen con respecto a las células de la cepa P01a en medio con glucosa, aunque este incremento no es estadísticamente significativo ($p= 0.126$) (ver figura 8).

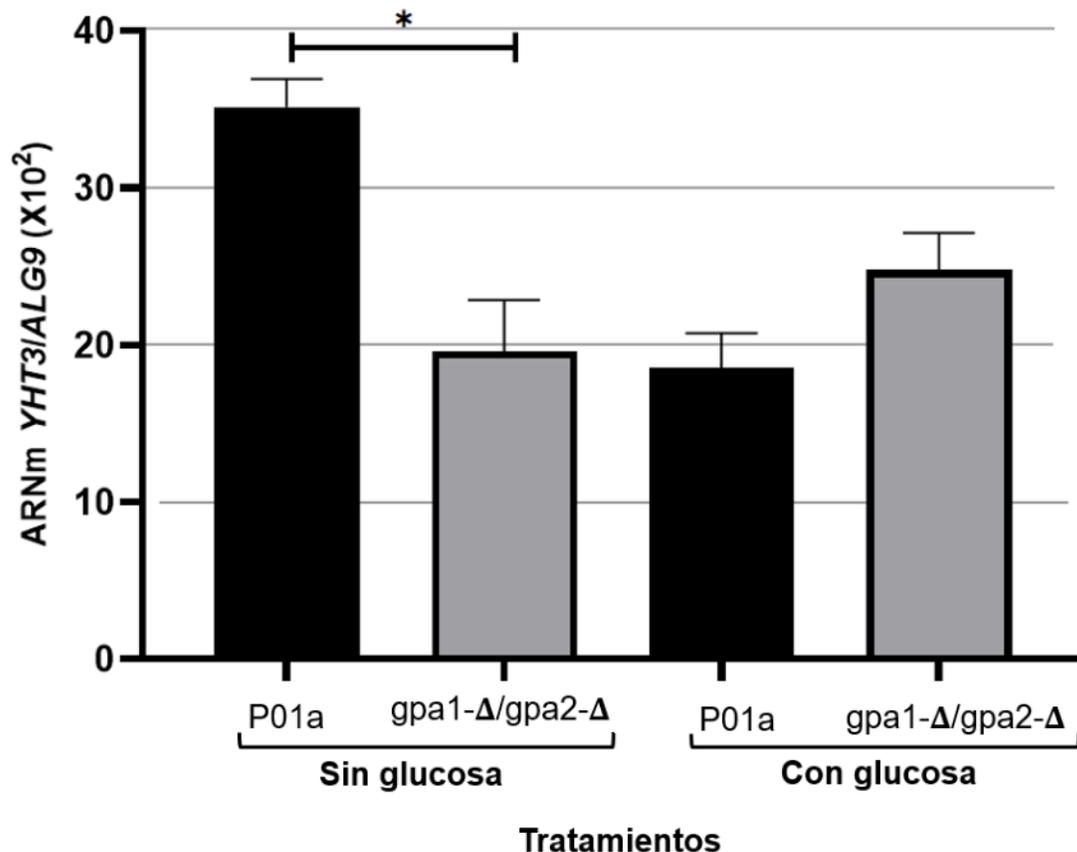


Figura 8. Expresión del gen *YHT3* en las cepas parental (P01a) y doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB con y sin glucosa. Los valores graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes; la línea en la parte superior de las barras representa el valor de la desviación estándar. Asterisco (*) indica diferencias significativas ($p<0.05$) entre los grupos comparados con la prueba *t* de Student para muestras independientes.

En las células de la cepa P01a se observa que la expresión del gen *YHT3* disminuye cuando las células son sometidas al tratamiento con glucosa; sin embargo, en el caso de las células de la doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) cultivadas con glucosa, la expresión del gen aumenta aproximadamente 26% con respecto a la expresión obtenida en el tratamiento sin glucosa.

7.2.3.4 Expresión del gen *YHT4*

La expresión del gen *YHT4* fue similar entre los grupos. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) de la expresión de *YHT4* en las células de ambas cepas en ambas condiciones de tratamiento (ver figura 9). Sin embargo, se observa que la expresión disminuye aproximadamente 10-15% en las células de ambas cepas, tratadas con glucosa.

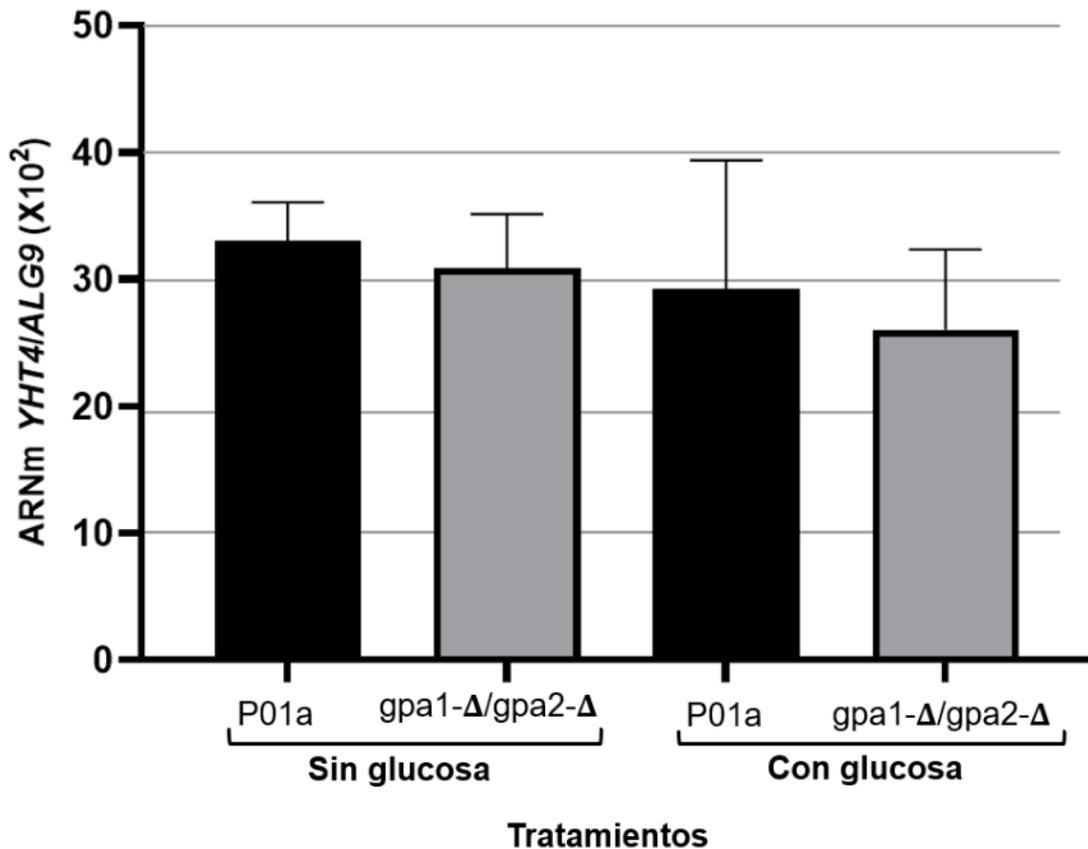


Figura 9. Expresión del gen *YHT4* en las cepas parental (P01a) y doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB con y sin glucosa. Los valores graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes; la línea en la parte superior de las barras representa el valor de la desviación estándar. Los grupos se compararon con la prueba *t* de Student para muestras independientes con un intervalo de confianza del 95%.

7.2.3.5 Expresión del gen *YHT5*

Los valores de expresión del gen *YHT5* no presentaron diferencias significativas entre las células, tanto en la cepa P01a como de la cepa doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, expuestas a glucosa ($p=0.161$). Este fenómeno también se observa en las células de ambas cepas cultivadas en ausencia de glucosa ($p=0.135$).

En comparación con el patrón de expresión de los genes anteriores, la actividad transcripcional de *YHT5* es similar a la encontrada en *YHT1*, en el que la disminución de la expresión del gen es más marcada en las células cultivadas con glucosa en ambas cepas.

Los valores obtenidos del análisis de densitometría de los productos amplificados del gen *YHT5*, en los diferentes grupos se observan en la figura 10.

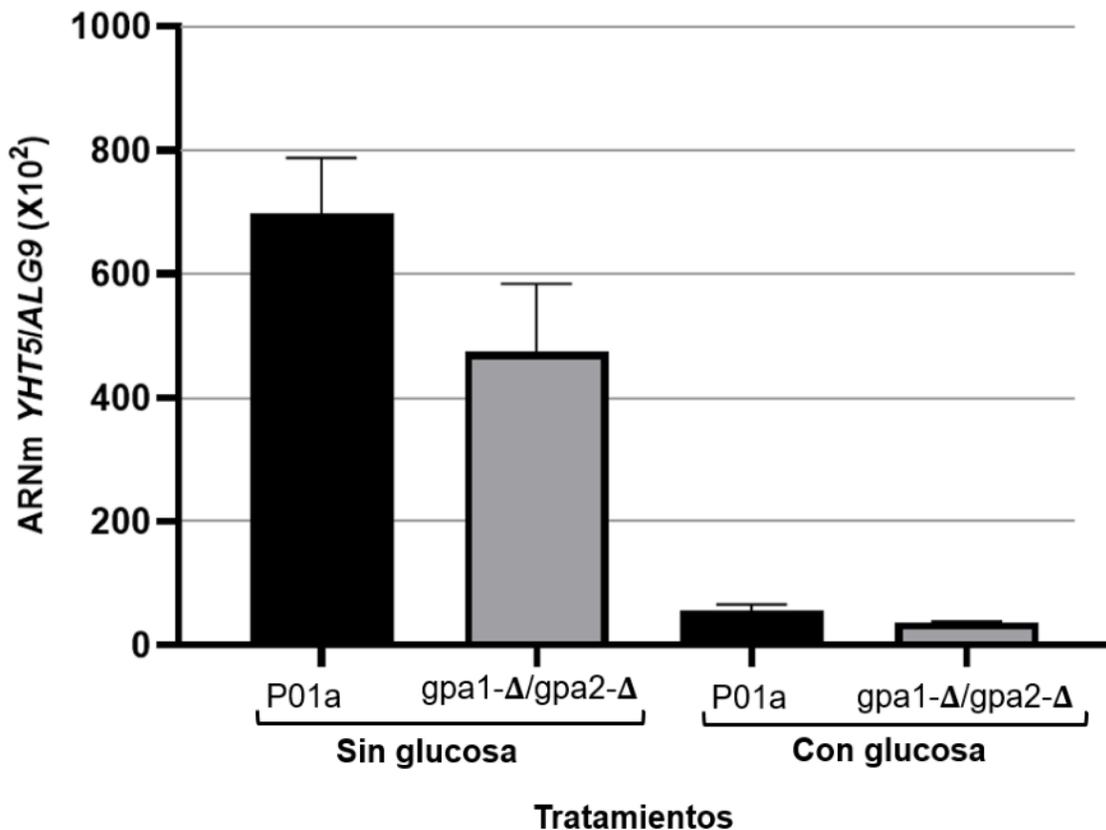


Figura 10. Expresión del gen *YHT5* en las cepas parental (P01a) y doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB con y sin glucosa. Los valores graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes; la línea en la parte superior de las barras representa el valor de la desviación estándar. Los grupos se compararon con la prueba *t* de Student para muestras independientes con un intervalo de confianza del 95%; no se observaron diferencias significativas en la expresión del gen *YHT5*, en ambos tipos de células, en ninguna de las condiciones probadas.

7.2.3.6 Expresión del gen *YHT6*

El patrón de expresión del gen *YHT6* es similar al encontrado en el análisis del gen *YHT3* en las células de la doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*). La expresión del gen aumenta ligeramente (aproximadamente 18%) en el tratamiento con glucosa con respecto a la expresión del gen en las células tratadas sin glucosa.

Se encontraron diferencias significativas entre ambas cepas cuando las células se expusieron a glucosa ($p=0.011$) Este fenómeno también se observa cuando las células de ambas cepas fueron cultivadas sin glucosa ($p=0.017$). En ambas condiciones, la expresión del gen fue mayor en la cepa parental (P01a). (ver figura 11).

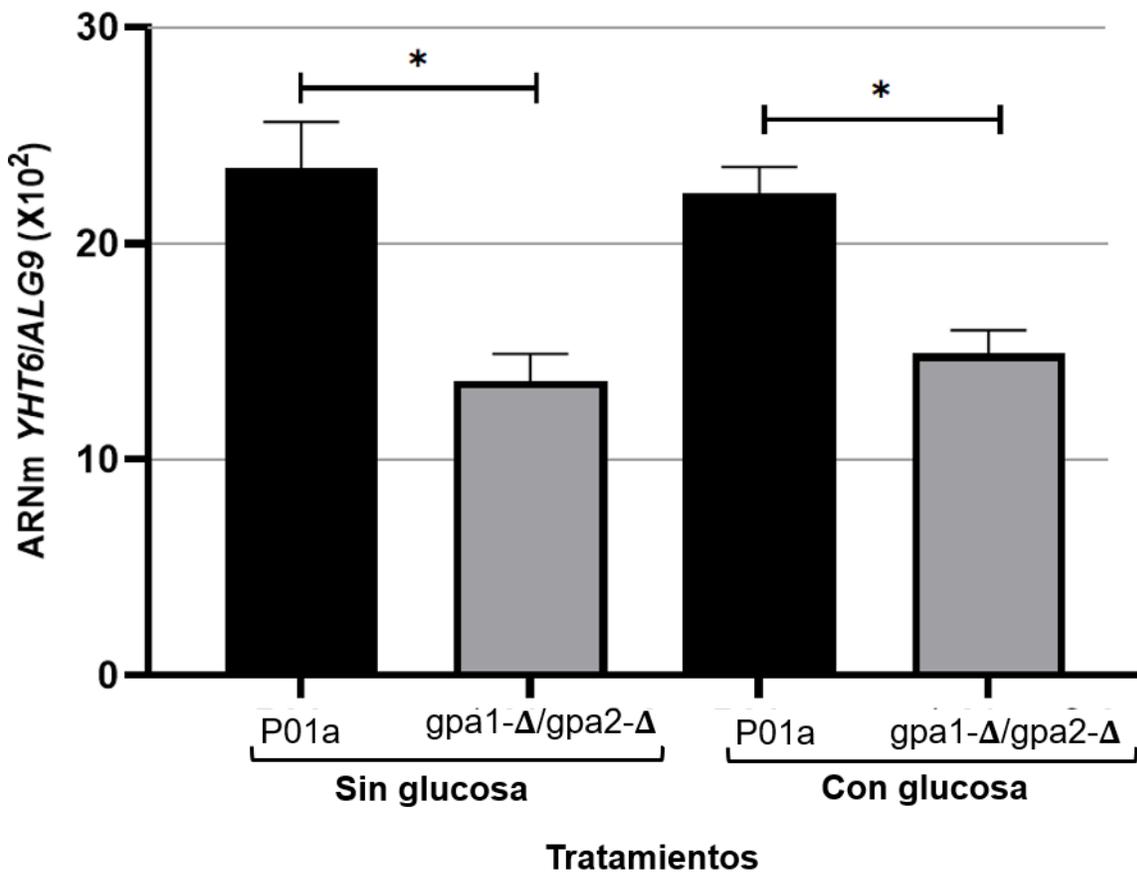


Figura 11. Expresión del gen *YHT6* en las cepas parental (P01a) y doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB con y sin glucosa. Los valores graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes; la línea en la parte superior de las barras representa el valor de la desviación estándar. Asterisco (*) indica diferencias significativas ($p<0.05$) entre los grupos comparados con la prueba *t* de Student para muestras independientes.

8. Discusión

8.1 El sensado de glucosa mediado por la vía PKA.

Las células de todos los organismos eucariotas responden a nutrientes, estrés y estímulos de hormonas al activar circuitos complejos de señalización. En organismos tanto complejos como sencillos, los sistemas de señalización intracelular vía GPCR y la cascada de PKA-AMPC funcionan en la detección de glucosa (Maruyama *et al.*, 2023). La glucosa, no solo es crucial para la obtención de energía, sino que dentro de las células puede influir directamente en el transporte de glucosa o desencadenar de manera indirecta una respuesta transcripcional que afecta el metabolismo de esta molécula (Xi & Heinemann, 2023).

En humanos, la activación de la vía PKA por aumento de AMPC intracelular, da como resultado la inhibición de la enzima glucógeno sintasa, la activación de la enzima glucógeno fosforilasa, el aumento de la gluconeogénesis y la elevación de los niveles de glucosa en sangre (Wang *et al.*, 2021; Vaerney & Benovic, 2024). La proteína PKA (proteína cinasa dependiente de AMPC) es un heterotetrámero de dos subunidades reguladoras y dos catalíticas que se activa mediante la unión del AMPC a las subunidades reguladoras, lo que desencadena su disociación de las subunidades catalíticas (Plank, 2022). En esta vía participan los GPCR (receptores transmembranales) que se acoplan a las proteínas G heterotriméricas, las cuales son importantes interruptores moleculares que facilitan la transmisión de una variedad de señales desde el exterior hacia el interior de las células y desencadenan una serie de diferentes funciones biológicas tales como el control de la proliferación, el comportamiento y el desarrollo celular en organismos superiores (Tong *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2019). Al ser una vía altamente conservada y considerando que los mecanismos implicados son difíciles y complejos de estudiar, se han utilizado organismos unicelulares que permitan el análisis de cada uno de los componentes que participan en la vía PKA y otras vías de señalización (Thevelein *et al.*, 2008).

La posibilidad de deducir el funcionamiento de las células humanas a partir de estudios con células de levadura ha llevado a la idea de que algunas enfermedades

humanas podrían estudiarse a nivel celular en levaduras para analizar sus bases moleculares (Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2010).

En las levaduras, ajustarse a la disponibilidad y calidad de los nutrientes es esencial para asegurar la resiliencia y la supervivencia celular en un entorno variable. En estos organismos, se ha descrito que azúcares fermentables como la glucosa o la sucralosa (edulcorante artificial) activan la vía PKA (Pérez-Díaz *et al.*, 2023).

La vía PKA controla una gran variedad de procesos biológicos en levaduras, como almacenar azúcares como reserva, la resistencia al estrés, la composición de la pared celular, la capacidad de fermentación, el crecimiento, la esporulación y el crecimiento en forma de hifas (Thevelein *et al.*, 2008). Algunos experimentos en organismos modelo como *S. cerevisiae* han llevado a la identificación de un circuito de señalización como el complejo I de la cinasa diana de rapamicina (TORC1) y sobre todo la vía altamente conservada de la proteína cinasa dependiente de AMPc. En este circuito, las vías TORC1 y PKA trabajan juntas para regular la expresión de los genes ribosomales y la síntesis de proteínas y, como consecuencia, la determinación de la tasa de crecimiento de la célula (Kunkel *et al.*, 2019).

Por otra parte, en estudios realizados con *Y. lipolytica*, se ha reportado que la vía PKA participa en el dimorfismo de las células y que opera sinérgicamente con otras vías como la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) en otros procesos biológicos de las células (Cervantes-Chávez *et al.*, 2009).

En el estudio realizado por Briones (2021), se reporta que en células de *Y. lipolytica*, la eliminación de los genes *GPA1* y *GPA2* que codifican para la subunidad G α de la proteína G heterotrimérica bloquea el funcionamiento de la vía PKA y como resultado se altera el dimorfismo de las células, al crecer únicamente en forma de micelio en un medio rico en nutrientes, además, se determinó que en un medio mínimo (YNB) con adición de glucosa: a) el crecimiento de las células de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* es mayor en comparación con la cepa P01a; b) la tasa de crecimiento de las células de la doble mutante tiene menor duración que la de la cepa parental; es posible que en la cepa doble mutante haya una mayor

incorporación de glucosa por carecer de un mecanismo adecuado de sensado de glucosa. La glucotoxicidad generada por este hecho es lo que detiene el crecimiento de la cepa doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*.

8.2 Comparación de la expresión de los genes *YHT*.

En este trabajo se utilizaron células de la cepa carente de los genes GPA y de la cepa parental P01a de *Y. lipolytica* cultivadas en ausencia y presencia de 2% de glucosa en medio mínimo en nutrientes. En el trabajo de Briones (2021) se reporta que estas condiciones corresponden a estrés nutricional para las células (causado por el exceso de glucosa), como ha sido reportado por diferentes autores (Abelovska *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha descrito que en ausencia de glucosa se activa la utilización de fuentes alternativas de carbono, la respiración, la esporulación y la respuesta al estrés; mientras que, en presencia de glucosa, son otros los mecanismos que se activan: la glucólisis, la fermentación y la síntesis de transportadores de hexosas (Maruyama *et al.*, 2023). En el genoma de *Y. lipolytica* se han descrito 6 transportadores específicos para hexosas (*YHT* 1 a 6) los cuales muestran distintas afinidades por el sustrato. De acuerdo con Lazar y cols. (2017), los genes *YHT1* y *YHT4* probablemente tienen un rol similar en la absorción de glucosa, fructosa y manosa en varias concentraciones mientras que los otros cuatro transportadores, aparentemente constituyen un conjunto de transportadores de hexosas de reserva en el clado (mismo grupo filogenético) de *Yarrowia*.

En levaduras, los transportadores de hexosas suelen ser no selectivos: generalmente un transportador es capaz de transportar múltiples tipos de azúcares, regularmente con preferencia por uno (Spagnuolo *et al.*, 2018).

Se ha reportado que la regulación del patrón de expresión de los genes involucrados en el transporte de hexosas es compleja y requiere el involucramiento de varios factores de transcripción. En estudios filogenéticos con *S. cerevisiae*, se ha revelado que los genes *YHT1*, *YHT2* y *YHT3* tienen una gran homología con los genes que codifican para el transportador de alta afinidad *HXT7* y con *SNF1*; este último es un sensor que se activa en concentraciones bajas de glucosa (Spagnuolo *et al.*, 2018, Donzella *et al.*, 2023).

En este estudio, se muestra que, tanto en la cepa parental P01a como doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, los genes *YHT1*, *YHT4* y *YHT5* tienen un patrón similar de expresión, el cual disminuye cuando las células son cultivadas con glucosa. En el caso del gen *YHT4*, el patrón de expresión no mostró diferencias entre ningún tratamiento tanto en las cepas control como mutante. En la literatura, la proteína codificada por este gen corresponde a un transportador de alta afinidad por la glucosa (Lazar *et al.*, 2017).

Por otro lado, los transcritos de *YHT2* no fueron detectados bajo las condiciones experimentales utilizadas. Lazar y cols. (2017), reportan que este transportador muestra una especificidad de sustrato menos amplia en comparación con los demás transportadores y que probablemente éste no esté relacionado con el transporte *per se* de azúcares sino que, juegue un papel similar a un sensor de glucosa como los reportados en *S. cerevisiae*, *Snf1* y *Rgt2* o que este gen *YHT2* sea en realidad un pseudogén (que no se transcribe) y que por ello no se hayan detectado los productos de PCR sobre el ADNc de las células analizadas.

Desde el punto de vista experimental, una posible explicación del por qué no se detectaron productos de este gen, es por el número de ciclos utilizados en la PCR semicuantitativa. Andoofar y cols. (2019), reportan que entre las técnicas de PCR, la PCR en tiempo real (qPCR) o cuantitativa tiene ventajas sobre la semicuantitativa, debido a que la qPCR se considera como un estándar de oro para la detección de transcritos (ARNm) ya que la PCR semicuantitativa es menos sensible en comparación con el método de tiempo real, especialmente cuando las variaciones de la cantidad de ARNm son muy pequeñas ya que se dificulta la visualización de las bandas en el gel de agarosa y por lo tanto la cuantificación de la expresión del producto(s) de interés (Andoofar *et al.*, 2019). Otra posibilidad, es que los productos de PCR de *YHT2* puedan ser visualizados con más ciclos de PCR, sin embargo, el aumento de ciclos podría suponer una sobreestimación de la expresión del gen bajo las condiciones en las que fueron diseñados y probados los primers y en la estandarización de la técnica en el laboratorio y con respecto a la cuantificación del resto de transportadores.

La expresión de numerosos genes transportadores de hexosas en levaduras se adapta meticulosamente a las cantidades de glucosa accesibles para las células, garantizando que los transportadores de glucosa sintetizados posibiliten la importación más eficiente de glucosa disponible, abarcando un amplio espectro de concentraciones externas de glucosa. En distintos tipos de levaduras, se ha reportado que esta sincronización se logra mediante la expresión de proteínas sensoras de glucosa y éstas en conjunto con la actividad de la vía PKA (Broach, 2012), por lo que se podría pensar que conforme a lo descrito por Lazar y cols. *YHT1* y/o *YHT2* (con alta homología con proteínas sensoras de *S. cerevisiae*) regulen la actividad de los transportadores *YHT3*, *YHT4*, *YHT5* y *YHT6*, y que, exceptuando a *YHT3* y *YHT6*, el bloqueo de la vía PKA no sea suficiente para alterar la actividad de estos transportadores. Otra posible explicación de por qué la expresión de los genes disminuya en ausencia de glucosa, es debido a que la presencia de esta fuente de carbono condiciona la transcripción de distintos genes involucrados en el metabolismo de la glucosa. En cepas mutantes de *S. cerevisiae* con bloqueo de la vía PKA cultivadas en ausencia de glucosa, se ha reportado que se reprime en distintos grados, la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de carbono, entre los cuales se reportan los genes que codifican para transportadores de glucosa *HXT1*, *HXT3*, *HXT6* Y *HXT7*; además, se ha reportado que la ausencia de PKA también altera genes involucrados en el metabolismo de los lípidos y del nitrógeno (Livas *et al.*, 2011).

En el organismo modelo *Schizosaccharomyces pombe*, se ha descrito que además de la vía PKA-AMPc, otras vías como la TORC2 y la vía de calcio/calmodulina dependiente de proteína cinasa (CaMK) e incluso el contenido de hierro, están involucrados en la regulación de los transportadores de hexosas en respuesta a cambios en la concentración extracelular de glucosa (Maruyama *et al.*, 2023; Özkan *et al.*, 2019), esto aún no se ha comprobado en *Y. lipolytica*.

8.3 Análisis de cambios en la expresión de los *YHT* por inactivación de la vía PKA.

Cuando se comparó la expresión de los genes *YHT3* y *YHT6* en células de la cepa de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, no se encontraron diferencias en la expresión

entre los tratamientos con y sin glucosa; sin embargo, comparado con el patrón de expresión de las células control P01a se observó que este no era similar, pues la expresión tanto de *YHT3* como de *YHT6* en la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* no disminuía, al contrario, la tendencia era aumentar la expresión en el tratamiento sin glucosa. El transportador *YHT3*, está reportado como un transportador de amplio espectro de hexosas además de tener un 47% de homología con el transportador *GAL2* de *S.cerevisiae* el cual está involucrado en el transporte transmembranal de galactosa y glucosa (Lazar *et al.*, 2017, Spagnuolo *et al.*, 2018). Por otra parte, *YHT6* es un transportador más específico ya que aparentemente su espectro se limita a la captación de sólo dos hexosas (galactosa y manosa), por lo que no es considerado un transportador específico para glucosa (Lazar *et al.*, 2017).

En otras especies de levaduras, como *S. pombe*, existen proteínas transportadoras de hexosas que no se ven involucradas en la captación y transporte de glucosa; mientras que en *C. albicans*, transportadores de hexosa con capacidad sensora de azúcares juegan un papel importante en los cambios morfológicos de las células, al generar una señal intracelular para inducir la expresión de ciertos genes que codifican transportadores de hexosas (Maruyama *et al.*, 2023; Brown *et al.*, 2006).

Se sabe comparativamente poco sobre los cambios en la transducción de señales y el metabolismo celular en respuesta a la disponibilidad de glucosa (Li *et al.*, 2022), en diferentes estudios se reporta que disfunciones en cualquier nivel de los participantes de la vía PKA-AMPC tiene un impacto en el crecimiento de las células y esto debido a alteraciones en el metabolismo de la glucosa. La adaptación de las células de levadura al entorno depende las variaciones de las concentraciones de glucosa, y con ello la activación transcripcional de los transportadores de glucosa.

En células humanas con alguna disfunción en las vías de transducción de señales (como las células tumorales) se han reportado alteraciones a nivel transcripcional de la proteína GLUT1 (codificado por el gen *SLC2A1*), traducándose en una sobreexpresión de este transportador, y por ende un aumento de la incorporación de glucosa a las células (O'Donnell *et al.*, 2019). En este estudio, si bien este aumento de expresión no fue significativo en las cepas carentes de genes *GPA* en

condiciones de glucosa, por lo que podría suponer que una disfunción en la cascada de señalización de PKA podría tener impacto en el comportamiento del gen *YHT3*, ocasionando que la incorporación de glucosa no sea regulada adecuadamente.

Tanto en organismos unicelulares, como pluricelulares, las variaciones en la disponibilidad de nutrientes, en particular de glucosa, son uno de los principales desafíos y las células han desarrollado una serie de estrategias para contrarrestar el agotamiento de las reservas de glucosa (Milanes *et al.*, 2024). En eucariotas, distintas señales de nutrientes son transmitidas por receptores específicos de la membrana plasmática para activar vías de transducción que están interconectadas en redes complejas de procesamiento de información. Estas señales ambientales, pueden ser tanto sinérgicas como antagonistas y se procesan dentro de la célula mediante interferencias entre las vías de transducción de señales para producir una respuesta adaptativa y robusta al entorno nutricional de la célula (Jalihal *et al.*, 2021). Debido a la complejidad de diseccionar estas vías en organismos eucariotas superiores, las levaduras han servido como sistema modelo para el análisis de la respuesta de los nutrientes, sobre todo de la glucosa. Se ha descrito que las vías Snf1-Mig1 (o vía de represión de la glucosa al prevenir la expresión de los genes necesarios para el metabolismo de fuentes alternativas de carbono), la Rgt2/Snf3 (consiste en las proteínas transmembranales similares a Hxt sensoras de glucosa conocidas como Rgt2 y Snf3, que reaccionan a la glucosa extracelular mediante un cambio conformacional que activa la proteína caseína cinasa) y la vía PKA-AMPc trabajan juntas a través de reguladores centrales (generalmente cinasas como Mth1 y Std1) para controlar la expresión de genes necesarios para el metabolismo de la glucosa o bien aquellos que participan en el metabolismo de fuentes alternativas de carbono (Stahl *et al.*, 2019; Milanes *et al.*, 2024). Por lo tanto, la alteración en alguna de estas vías podría afectar la actividad de las otras vías. Diferentes genes pueden ser inducidos o reprimidos mediante la inactivación de la vía PKA. En un estudio realizado por Livas y cols. (2011) se describe que, aunque la inducción de la expresión del transportador *HXT3* de *S. cerevisiae* es independiente de la activación de la vía PKA, la expresión de *HXT3* disminuye en ausencia de PKA.

8.4 Disfunción de la vía PKA y de los transportadores de glucosa en humanos.

Las rutas de transducción de señales son altamente específicas y, hasta donde sabemos, no se han identificado rutas similares en otras clases de organismos eucariotas. La activación de la vía PKA activada por nutrientes puede representar un antepasado evolutivo de la regulación del receptor PKA-AMPC.

En eucariotas superiores la regulación de la señalización mediada por hormonas y otros receptores agonistas podría estar mediada también por la disponibilidad de nutrientes (Steyfkens *et al.*, 2018; Milanés *et al.*, 2024). En todos los tipos de células eucariotas, los transportadores y receptores se encuentran en la membrana plasmática y se ha propuesto que las proteínas transportadoras de nutrientes, incluyendo a los transportadores de hexosas surgieron primero en la evolución debido a que la importación de nutrientes al interior de las células era crucial para la supervivencia y proliferación de cualquier organismo unicelular. En cambio, la detección y señalización mediante proteínas receptoras parece ser una característica más avanzada que se desarrolló posteriormente en la evolución (Steyfkens *et al.*, 2018).

En humanos, las desregulaciones en cualquier nivel de la vía de las proteínas cinasas pueden resultar en el desarrollo de diversas enfermedades como diabetes, obesidad, cáncer y enfermedades concomitantes, así como en alteraciones del metabolismo de la glucosa (London & Stratakis, 2022; London *et al.*, 2020).

Como ejemplo de lo anterior, se ha descrito que, en ambientes hiperglucémicos, la actividad de algunas proteínas GLUT se puede suprimir o aumentar. En la diabetes, GLUT4 (transportador sensible a insulina) puede ser suprimido mientras que GLUT1 (transportador insensible) puede ser inducido en células mesenquimales de riñón (Deb *et al.*, 2017)

Por otra parte, en distintos tipos de cáncer, GLUT1 y GLUT3 se sobreexpresan y sus niveles de expresión se han propuesto como marcadores pronósticos y predictivos de la enfermedad (Stahl, 2019).

En humanos, las proteínas cinasas C y A regulan la actividad de transporte de los SGLT y en la fosforilación de transportadores de glucosa, como GLUT1 en distintos tejidos (Sharari, 2020; Lee *et al.*, 2015)

Además, se ha sugerido que GLUT1 y GLUT2 desempeñan funciones duales como receptores y transportadores. GLUT1 podría estar involucrado en la activación de las vías de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas), mientras que GLUT2 podría participar en las vías de señalización de la insulina en las células pancreáticas (Steyfkens *et al.*, 2018).

Sumado a esto, en el estudio realizado por Zhang y cols. se describe que GLUT1 podría tener papel fundamental en la fisiopatología de la calcificación vascular diabética, y se ha reportado que la anticalcificación se puede lograr al inhibir GLUT1 mediante medicamentos que actúen sobre la activación de la vía de señalización PKA-AMPc (Zhang *et al.*, 2023).

Con lo mencionado anteriormente, se puede concluir que en las células de *Y. lipolytica*, la inactivación de la vía PKA (por la delección de los genes *GPA1* y *GPA2*) modifica la expresión de los genes *YHT* en células de *Y. lipolytica*. Contrariamente a lo planteado en la hipótesis de esta investigación, el cambio de la expresión no corresponde a una sobreexpresión de los transportadores con respecto a la expresión de las células control; sino a una disminución de la expresión en presencia de glucosa. Específicamente en el caso del gen *YHT3*, se observa una tendencia a mantener los niveles de expresión similares, sin una respuesta celular diferenciada en presencia o ausencia de glucosa, tanto en la cepa control P01a como en la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*. Lo cual sugiere que este transportador no es específico para glucosa.

Para determinar la especificidad de los diferentes transportadores analizados será necesario analizar el patrón de expresión de los genes que codifican para estos transportadores en células cultivadas a) con diferentes concentraciones de glucosa, b) con diferentes hexosas, incluso con diferentes hidratos de carbono.

9. Conclusiones

- Cada uno de los genes *YHT* de *Y. lipolytica* presenta un patrón de expresión específico, tanto en presencia como en ausencia de glucosa.
- En células de la cepa P01a, la expresión de los genes *YHT* (excepto *YHT2*) se muestra un patrón similar de expresión (disminución de la expresión) cuando las células son tratadas con glucosa, contrario a lo observado en las células de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*.
- Cuando las células de ambas cepas (parental y doble mutante) son tratadas con glucosa, la expresión de *YHT1*, *YHT4* y *YHT5* disminuye.
- La expresión de *YHT3* en la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica* no disminuye cuando hay glucosa en el medio de cultivo.
- En este estudio, la expresión del gen *YHT2* no pudo ser detectada bajo las condiciones experimentales utilizadas.
- La expresión del gen *YHT6* no disminuyó, tanto en las células de la cepa doble mutante como en las células de la cepa parental tratadas con glucosa, lo que sugiere que *Yht6* no es un transportador específico de glucosa.

Los resultados obtenidos en este estudio no permiten aceptar o rechazar la hipótesis planteada. Esto debido a que el patrón de expresión es específico para cada uno de los genes analizados. Aunque la delección de los genes *GPA* en células de *Y. lipolytica* (cepa doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*) no indujo cambios en los niveles de expresión de los genes de *YHT1*, *YHT4*, *YHT5*, Se observaron modificaciones en los genes *YHT3* y *YHT6*, con una disminución en su expresión en las células mutantes sin glucosa, en comparación con la célula parental, y un aumento en su expresión en las células mutantes en presencia de glucosa, en comparación con las células mutantes sin glucosa.

10. Referencias

- Abelovska, L., Bujdos, M., Kubova J., Petrezselyova S., Nosek, J. y Tomaska, L. (2007). Comparison of element levels in minimal and complex yeast media. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(4), 533-535. <https://doi.org/10.1139/W07-012>.
- Albert-Garay, J. S., Riesgo-Escovar, J. R. & Salceda, R. (2022). High glucose concentrations induce oxidative stress by inhibiting Nrf2 expression in rat Müller retinal cells in vitro. *Scientific Reports*, 12 (1261). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05284-x>
- Andoorfar, S., Hosseini Tafreshi, S, A. & Rezvani, Z. (2019). Assessment of the expresión leve lof miRNA molecules using a semi-quantitative RT-PCR approach. *Molecular Biology Reports*, 46, 5057–5062. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04959-5>
- Bolotin-Fukuhara, M., Dumas, B. & Gaillardin, C. (2010). Yeasts as a model for human diseases. *FEMS Yeast Research*, 10(8), 959-60. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00693.x>
- Broach, J. R. (2012). Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*, 192 (1), 73-105. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731>
- Botman, D., O' Toole, T. G., Goedhart, J., Bruggeman, F. J., van Heerden, J. H. & Teusink, B. (2021). A yeast FRET biosensor enlightens cAMP signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 32(13), 1229-1240. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-05-0319>.
- Briones, A. (2021). *Efecto del estrés nutricional en células de Y. lipolytica en ausencia de los genes GPA*. (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León.
- Brown, V., Sexton, J. A. & Johnston, M. (2006). A glucose sensor in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 5(10),1726-37. <https://doi.org/10.1128/ec.00186-06>

- Cabralles, C. (2012). *Expresión de una proteína CRY1 de Bacillus thuringiensis en la levadura Yarrowia lipolytica*. (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional de Reynosa. Reynosa, Tamaulipas.
- Carbó, R. & Rodríguez, E. (2023). relevance of sugar transport across the cell membrane. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6085. <https://doi.org/10.3390/ijms24076085>
- Cervantes-Chávez, J. A., Kronberg, F., Passeron, S. & Ruiz-Herrera, J. (2009). Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 390-399
- Chadha, Y., Khurana, A. & Schmoller, K. M. (2024). Eukaryotic cell size regulation and its implications for cellular function and dysfunction. *Physiological Reviews*, 104(4), 1679-1717. <https://doi.org/10.1152/physrev.00046.2023>.
- Chadt, A. & Al-Hasani, H. (2020). Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflügers Archiv*, 472(9), 1273-1298. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02417-x>.
- Chen, L. Y. (2022). Quantitative characterization of the path of glucose diffusion facilitated by human glucose transporter 1. *BBA Biomembranes*, 1864(9). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.183975>
- Chiarello, E., Di Nunzio, M., Picone, G., Antonelli, G., Capozzi, F. & Bordoni, A. (2022). Insight on glucose and fructose absorption and relevance in the enterocyte milieu. *Nutrients*, 14(3), 517. <https://doi.org/10.3390/nu14030517>
- Clemente-Suárez, V. J., Mielgo-Ayuso, J., Martín-Rodríguez, A., Ramos-Campo, D. J., Redondo-Flórez, L. & Tornero-Aguilera, J. F. (2022). The burden of carbohydrates in health and disease. *Nutrients*, 14(18), 3809. <https://doi.org/10.3390/nu14183809>
- Cui, Y., Jiang, N., Xu, Z. & Xu, Q. (2020). Heterotrimeric G protein are involved in the regulation of multiple agronomic traits and stress tolerance in rice. *BMC Plant Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2289-6>

- Cui, Z., Wu, M., Liu, K., Wang, Y., Kang, T., Meng, S. & Meng, H. (2023). Associations between conventional and emerging indicators of dietary carbohydrate quality and new-onset type 2 diabetes mellitus in chinese adults. *Nutrients*, 15(3), 647. <https://doi.org/10.3390/nu15030647>
- Darenskaya, M. A., Kolesnikova, L. I. & Kolesnikov, S. I. (2021). Oxidative stress: pathogenetic role in diabetes mellitus and its complications and therapeutic approaches to correction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 171(2), 179-189. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05191-7>
- Deb, D. K., Bao, R. & Li, Y. C. (2017). Critical role of the cAMP-PKA pathway in hyperglycemia-induced epigenetic activation of fibrogenic program in the kidney. *FASEB Journal*, 31(5), 2065-2075. <https://doi.org/10.1096/fj.201601116R>
- Desjardins, P. & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, 45, 2565. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Donzella, L., Sousa, M. J. & Morrissey, J. P. (2023). Evolution and functional diversification of yeast sugar transporters. *Essays in Biochemistry*, EBC20220233. <https://doi.org/10.1042/EBC20220233>
- Fatima, M. T., Ahmed, I., Fakhro, K. A. & Akil, A. S. A. (2022). Melanocortin-4 receptor complexity in energy homeostasis, obesity and drug development strategies. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 24(4), 583-598. <https://doi.org/10.1111/dom.14618>
- Ferrier, D. R. (2014). *Bioquímica*. (6.^a ed.) Lippincott Williams and Wilkins. Wolters Kluwer Health.
- Fickers, P., Marty, A. & Nicaud, J. M. (2011). The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 29(6), 632-44. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv>

- Frey, U. H. (2005). *GNAS1* T393C polymorphism and survival in patients with sporadic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(14), 5071-5077. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-05-0472>
- García- Rico, R.O. & Fierro, F. (2017). Papel de las subunidades alfa de proteínas G en los procesos morfogénicos de hongos filamentosos de la división Ascomycota. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(1). <http://doi:10.1016/j.riam.2016.06.005>.
- García-Rico, R. O., Gil-Durán, C., Rojas-Aedo, J. F., Vaca, I., Figueroa, L., Levicán, G. & Chávez, R. (2017). Heterotrimeric G protein alpha subunit controls growth, stress response, extracellular protease activity, and cyclopiazonic acid production in *Penicillium camemberti*. *Fungal Biology*, 121(9), 754-762. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.05.007>
- Głuchowska, K., Pliszka, M. & Szablewski, L. (2021). Expression of glucose transporters in human neurodegenerative diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 540, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.12.067>
- González-Gil, P. (2012). Receptores acoplados a proteínas G: Entendiendo cómo responde nuestro organismo a señales diversas. *Revista de Química*, 26(1-2), 16-19.
- González, P., Lozano, P., Ros, G. & Solano, F. (2023). Hyperglycemia and oxidative stress: an integral, updated and critical overview of their metabolic interconnections. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9352. <https://doi.org/10.3390/ijms24119352>.
- Grooper, S. S., Smith, J. L. & Carr, T. P. (2020). *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. (8.a ed.). Cengage Learning.
- Hamm, H. (1998). The many faces of G protein signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2), 669-672. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.2.669>

- Hapeta, P., Szczepanska, P., Witkowski, T., Nicaud, J. M., Crutz-Le Coq, A. M. & Lazar, Z. (2021). The role of hexokinase and hexose transporters in preferential use of glucose over fructose and downstream metabolic pathways in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9282. <https://doi.org/10.3390/ijms22179282>
- Hernández-García, F., Robaina-Castillo, J. I. & Vázquez-Almoguera, E. (2017). Estrés oxidativo y diabetes mellitus, un acercamiento al tema. *Universidad Médica Pinareña*, 13(2), 169-185.
- Hoffman, C. S. & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57 (2-3), 267-272. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)901314](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)901314)
- Holman, G. D. (2020). Structure, function and regulation of mammalian glucose transporters of the SLC2 family. *Pflügers Archiv*, 472(9), 1155-1175. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02411-3>
- Horák, J. (2013). Regulations of sugar transporters: insights from yeast. *Current Genetics*, 59(1-2), 1-31. doi: 10.1007/s00294-013-0388-8
- Huang, S., Benben, A., Green, R., Cheranda, N., Lee, G., Joseph, B., Keaveney, S. & Wang, Y. (2019). Phosphorylation of the G α protein Gpa2 promotes protein kinase A signaling in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 6-294(49), 18836-18845. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009609>.
- Huerta, J. (2014). Papel de la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica en el sensado de glucosa y en la diferenciación celular del hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica*. (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León.
- Jalihal, A. P., Kraikivski, P., Murali, T. M. & Tyson, J. J. (2021). Modeling and analysis of the macronutrient signaling network in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 32, 1-14. <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E20-02-0117>

- Koepsell, H. (2020). Glucose transporters in the small intestine in health and disease. *Pflügers Archiv*, 472(9), 1207-1248. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02439-5>.
- Kopp, W. (2019). How western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 12, 2221-2236. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S216791>.
- Kunkel, J., Luo, X. & Capaldi, A.P. (2019). Integrated TORC1 and PKA signaling control the temporal activation of glucose-induced gene expression in yeast. *Nature Communication*, 10, 3558. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11540-y>
- Layden, B. T., Durai, V. & Lowe, W. L. (2010). G-protein-coupled receptors, pancreatic islets, and diabetes. *Nature Education*, 3(9), 13. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/g-protein-coupled-receptors-pancreatic-islets-and-14257267/>
- Lazar, Z., Neuvéglise, C., Rossignol, T., Devillers, H., Morin, N., Robak, M. & Crutz-Le Coq, A. -M. (2017). Characterization of hexose transporters in *Yarrowia lipolytica* reveals new groups of sugar porters involved in yeast growth. *Fungal Genetics and Biology*, 100, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.01.001>
- Lee, E. E., Ma, J., Sacharidou, A., Mi, W., Salato, V. K., Nguyen, N., Jiang, Y., Pascual, J. M., North, P.E, Shaul, P. W, Mettlen, M. & Wang, R. C. (2015). A protein kinase C phosphorylation motif in GLUT1 affects glucose transport and is mutated in GLUT1 deficiency syndrome. *Molecular Cell*. 58(5), 845-53. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.015>.
- Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.-C., Wang, P. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 746-785.
- Li, S., Li, Y., Rushing, B. R., Harris, S. E., McRitchie, S. L., Dominguez, D., Sumner, S. J. & Dohlman, H. G. (2022). Multi-omics analysis of multiple glucose-sensing

- receptor systems in yeast. *Biomolecules*, 12(2), 175. <https://doi.org/10.3390/biom12020175>.
- Li, X., Heinemann, M. (2023). Quantifying intracellular glucose levels when yeast is grown in glucose media. *Science Report*, 13, 17066. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43602-z>
- Livas, D., Almering, MJ, Daran, J. M, Pronk, J. T. & Gancedo, J. M. (2011). Transcriptional responses to glucose in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking a functional protein kinase A. *BMC Genomics*, 12, 405. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-405>
- Liu, H. -H., Ji, -X. J. & Huang, H. (2015). Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: past, present and future. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1522-1546. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.010>
- Liu, R., Wong, W. & IJzerman, A. P. (2016). Human G protein-coupled receptor studies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Pharmacology*, 15(114), 103-115. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.02.010>.
- London, E., Bloyd, M. & Stratakis, C. A. (2020). PKA functions in metabolism and resistance to obesity: lessons from mouse and human studies. *Journal of Endocrinology*, 246(3), 51-64. <https://doi.org/10.1530/JOE-20-0035>.
- London, E. & Stratakis, C. A. (2022). The regulation of PKA signaling in obesity and in the maintenance of metabolic health. *Pharmacology and Therapeutics*, 237, 108113. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108113>.
- Ma, X., Nan, F., Liang, H., Shu, P., Fan, X., Song, X., Hou, Y. & Zhang, D. (2022). Excessive intake of sugar: an accomplice of inflammation. *Frontiers in Immunology*. 13, 988481. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.988481>
- Madzak, C. (2018). Engineering *Yarrowia lipolytica* for use in biotechnological applications: a review of major achievements and recent innovations. *Molecular Biotechnology*, 60(8), 621-635. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0093-4>

- Mamaev, D. & Zvyagilskaya, R. (2021). *Yarrowia lipolytica*: a multitalented yeast species of ecological significance. *FEMS Yeast Research*, 21(2). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab008>
- Maruyama, T., Hayashi, K., Matsui, K., Maekawa, Y., Shimasaki, T., Ohtsuka, H., Shigeaki, S. & Aiba, H. (2023). Characterization of hexose transporter genes in the views of the chronological life span and glucose uptake in fission yeast. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 68(6), 270-277. <https://doi.org/10.2323/jgam.2022.05.006>.
- Masenga, S. K., Kabwe, L. S., Chakulya, M. & Kirabo, A. (2023). Mechanisms of oxidative stress in metabolic syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 7898. <https://doi.org/10.3390/ijms24097898>.
- Maslanka, R., & Zdrag-Tecza, R. (2019). Less is more or more is less: Implications of glucose metabolism in the regulation of the reproductive potential and total lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), 17622-17638. <https://doi.org/10.1002/jcp.28386>.
- Mckee, T. & Mckee, J. (2014). *Bioquímica las bases moleculares de la vida*. (5.^a ed.). McGraw-Hill.
- Milanes, J. E., Kwain, S., Drawdy, A., Dodson, L., Monaghan, M. T., Rice, C. A., Dominy, B. N., Whitehead, D. C. & Morris, J. C. (2024). Glucose metabolism in the pathogenic free-living amoebae: Tempting targets for treatment development. *Chemical Biology & Drug Design*, 103(1), 14377. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14377>
- Milanesi, R., Tripodi, F., Vertemara, J., Tisi, R. & Coccetti, P. (2021). AMPK phosphorylation is controlled by glucose transport rate in a PKA-independent manner. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9483. <https://doi.org/10.3390/ijms22179483>
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-65. https://sileks.com/assets/files/review/unusual-origin-of-the-polymerase-chain-reaction_by-kary-b-mullis.pdf

- Navale, A. M. & Paranjape, A. N. (2016). Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophysical Reviews*, 8(1), 5-9. <https://doi.org/10.1007/s12551-015-01862>
- O'Donnell, A. F. & Schmidt, M. C. (2019). Helping daughters succeed: asymmetric distribution of glucose transporter mRNA. *EMBO Journal*. 38(10), 102063. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102063>
- Oguntibeju, O. O. (2019). Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 11(3), 45-63. www.ijppp.org /ISSN:1944-8171/IJPPP0091641
- Oliveira-Volpe, C. M., Villar-Delfino, P. H., Ferreira- dos Anjos, P. M. & Nogueira-Machado, J. A. (2018). Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death and Disease*, 9(2), 119. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>
- Özkan, E., Kartal, B., Yilmazer, M. & Palabıyık, B. (2019). Iron regulates hexose transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Basic Microbiology*, 59(5), 458-464. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800618>
- Paisdzior, S., Dimitriou, I. M., Schöpe, P. C., Annibale, P., Scheerer, P., Krude, H., Lohse, M. J., Biebermann, H. & Kühnen, P. (2020). Differential signaling profiles of *MC4R* mutations with three different ligands. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1224. <https://doi.org/10.3390/ijms21041224>
- Park, Y. K. & Ledesma-Amaro, R. (2022). What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry?. *Trends in Biotechnology*, 42(2). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.07.00>
- Pérez-Díaz, A. J., Vázquez-Marín, B., Vicente-Soler, J., Prieto-Ruiz, F., Soto, T., Franco, A., Cansado, J. & Madrid, M. (2023). cAMP-Protein kinase A and stress-activated MAP kinase signaling mediate transcriptional control of autophagy in fission yeast during glucose limitation or starvation. *Autophagy*, 19(4), 1311-1331. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2125204>

- Pérez-Landero, S. & Nieto-Sotelo, J. (2013). La ruta de señalización de la cinasa de proteínas tipo a dependiente del AMPc en *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista de Educación Bioquímica*, 32(3), 97-105.
- Plank, M. (2022). Interaction of TOR and PKA signaling in *S. cerevisiae*. *Biomolecules*. 26(2), 210. <https://doi.org/10.3390/biom12020210>
- Rakhra, V., Galappaththy, S. L., Bulchandani, S. & Cabandugama, P. K. (2020). Obesity and the western diet: how we got here. *Missouri Medicine*, 117(6), 536-538.
- Ramms, D. J., Raimondi, F., Arang, N., Herberg, F., Taylor, S. & Gutkind, S. (2021). Gas-protein kinase A (PKA) pathway signalopathies: the emerging genetic landscape and therapeutic potential of human diseases driven by aberrant gas-pka signaling. *Pharmacological Reviews*, 73 (4), 1326-1368. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000269>
- Rodríguez, C. & Domínguez., A. (1984). The growth and characteristics of *Saccharomycopsis lipolytica*: morphology and induction of mycelium formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(5). <https://doi.org/10.1139/m84-090>
- Rolland, F., Winderickx, J. & Thevelein, J. (2002). Glucose-sensing and signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2(2), 183-201. [https://doi.org/10.1016/s1567-1356\(02\)00046-6](https://doi.org/10.1016/s1567-1356(02)00046-6)
- Ronchi, C. L. (2019). cAMP/protein kinase A signalling pathway and adrenocortical adenomas. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 8, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.06.003>
- Ruiz-Herrera, J. (2012). *Dimorphic fungi: their importance as models for differentiation and fungal pathogenesis*. Bentham Science Publishers.
- Ruiz-Herrera, J. & Sentandreu, R. (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology*, 178, 477-483.
- Saitoh, S., Mori, A., Uehara, L., Masuda, F., Soejima, S. & Yanagida, M. (2015). Mechanisms of expression and translocation of major fission yeast glucose

- transporters regulated by CaMKK/phosphatases, nuclear shuttling, and TOR. *Molecular Biology of the Cell*, 26(2), 373–386. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-11-1503>
- Sandoval-Muñiz, R. J., Vargas-Guerrero, B., Flores-Alvarado, L. J. & Gurrola-Díaz, C. M. (2016). Glucotransportadores (GLUT): aspectos clínicos, moleculares y genéticos. *Gaceta Médica de México*, 152, 547-57.
- Sauve, S., Williamson, J., Polasa, A. & Moradi, M. (2023). Ins and outs of rocker switch mechanism in major facilitator superfamily of transporters. *Membranes*, 13(5), 462. <https://doi.org/10.3390/membranes13050462>
- Scheen, M., Giraud, R. & Bendjelid, K. (2020). Stress hyperglycemia, cardiac glucotoxicity, and critically ill patient outcomes current clinical and pathophysiological evidence. *Physiological Reports*, 9(2), 14713. <https://doi.org/10.14814/phy2.14713>
- Schöneberg, T. & Liebscher, I. (2020). Mutations in G Protein–coupled receptors: mechanisms, pathophysiology, and potential therapeutic approaches. *Pharmacological Reviews*, 73(1), 89-119. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000011>
- Sergi, D., Renaud, J., Simola, N. & Martinoli, M.G. (2019). Diabetes, a contemporary risk for Parkinson’s disease: epidemiological and cellular evidences. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 302. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00302>
- Sharari, S., Abou-Alloul, M., Hussain, K. & Ahmad Khan, F. (2020). Fanconi-Bickel syndrome: a review of the mechanisms that lead to dysglycaemia. *International Journal of Molecular Science*, 21(17), 6286. <https://doi.org/10.3390/ijms21176286>
- Sievenpiper, J. L. (2020). Low-carbohydrate diets and cardiometabolic health: the importance of carbohydrate quality over quantity. *Nutrition Reviews*, 78(1), 69-77. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz082>

- Silnitsky, S., Rubin, S. J. S., Zerihun, M. & Qvit, N. (2023). An update on protein kinases as therapeutic targets-part i: protein kinase C activation and its role in cancer and cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17600. <https://doi.org/10.3390/ijms242417600>.
- Spagnuolo, M., Shabbir- Hussain, M., Gambill, L. & Blenner, M. (2018). Alternative substrate metabolism in *Yarrowia lipolytica*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1077. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01077>
- Stahl, T., Hümmer, S., Ehrenfeuchter, N., Mittal, N., Fucile, G. & Spang, A. (2019). Asymmetric distribution of glucose transporter mRNA provides a growth advantage in yeast. *EMBO Journal*, 38(10), e100373. <https://doi.org/10.15252/emj.2018100373>
- Steyfkens, F., Zhang, Z., Van Zeebroeck, G. & Thevelein, J. M. (2018). Multiple transceptors for macro- and micro-nutrients control diverse cellular properties through the PKA pathway in yeast: a paradigm for the rapidly expanding world of eukaryotic nutrient transceptors up to those in human cells. *Frontiers of Pharmacology*, 13, 9-191. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00191>
- Tan, B. L. & Norhaizan, M. E. (2019). Effect of high-fat diets on oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function. *Nutrients*, 11(11), 2579. <https://doi.org/10.3390/nu11112579>
- Tao, Y. -X. & Liang, X. -F. (2014). G Protein-coupled receptors as regulators of glucose homeostasis and therapeutic targets for diabetes mellitus. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 121, 1-21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800101-1.00001-6>
- Teste, M., Duquenne, M., François, J. & Parrou, J. (2009). Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Molecular Biology*, 10(1), 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-99>
- Thermo Fisher Scientific. (2015). Nucleic acid quantification using NanoDrop 2000/2000c spectrophotometers. Thermo Fisher Scientific.

<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>

- Thevelein, J. M., Bonini, B. M., Castermans, D., Haesendonckx, S., Kriel, J., Louwet, W., Thayumanavan, P., Popova, Y., Rubio-Teixeira, M., Schepers, W., Vandormael, P., Van Zeebroeck, G., Verhaert, P., Versele, M. & Voordeckers, K. (2008). Novel mechanisms in nutrient activation of the yeast protein kinase A pathway. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 55(2), 75-89. <https://doi.org/10.1556/AMicr.55.2008.2.1>
- Thomas, R., Hernández, A., Benavides, D. R., Li, W., Chunfenf, T., Umfress, A., Plattner, F., Chakraborti, A., Pozzo-Miller, L., Taylor, S.S. & Bibb., J. A. (2022). Integrated regulation of PKA by fast and slow neurotransmission in the nucleus accumbens controls plasticity and stress responses. *Journal of Biological Chemistry*, 298(8). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102245>
- Tong, Y., Wu H, Liu, Z., Wang, Z. & Huang, B. (2020) G-Protein subunit Gai in mitochondria, MrGPA1, affects conidiation, stress resistance, and virulence of entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Frontiers of Microbiology*, 11, 1251. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01251>
- Treco, D. A. & Lundblad, V. (1993). Preparation of Yeast Media. *Current Protocols of Molecular Biology*, 23(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1301s23>
- Ulloa-Aguirre, A., Zariñan, T., Gutierrez-Sagal, R. & Tao, Y. X. (2022). Targeting trafficking as a therapeutic avenue for misfolded GPCRs leading to endocrine diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 934685. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.934685>
- Vaerney, M. J., & Benovic, J. L. (2024). The role of G Protein–Coupled receptors and receptor kinases in pancreatic β -cell function and diabetes. *Pharmacological Reviews*. 76(2) 267-299. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.123.001015>

- Valdespino-Gómez, V. M., Valdespino-Castillo, V, E. & Márquez-Holmberg, M. (2009). Alteraciones en los señalamientos intracelulares en el cáncer. *Cirugía y Cirujanos*. 77(4), 329-339.
- Van Ende, M., Wijnants, S. & Van Dijck, P. (2019). Sugar sensing and signaling in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Frontiers in Microbiology*, 10(99). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00099>
- Van Zeebroeck, G., Demuyser, L., Zhang, Z., Cottignie, I. & Thevelein, J. M. (2021). Nutrient sensing and cAMP signaling in yeast: G-protein coupled receptor versus transceptor activation of PKA. *Microbial Cell*, 8(1), 17-27. <https://doi.org/10.15698/mic2021.01.740>
- Wang, X., van Westen, G. J. P., Heitman, L. H. & IJzerman, A. P. (2020). G protein-coupled receptors expressed and studied in yeast. The adenosine receptor as a prime example. *Biochemical Pharmacology*, 187, (114370). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114370>
- Wang, Y., Liu, Q., Kang, S. G., Huang, K. & Tong, T. (2021). Dietary Bioactive Ingredients Modulating the cAMP Signaling in Diabetes Treatment. *Nutrients*, 13(9), 3038. <https://doi.org/10.3390/nu13093038>
- Wright, E. M. (2021). SGLT2 Inhibitors: physiology and pharmacology. *Kidney* 260, 2(12), 2027-2037. <https://doi.org/10.34067/KID.0002772021>
- Yang, H. & Yang, L. (2016). Targeting cAMP/PKA pathway for glycemic control and type 2 diabetes therapy. *Journal of Molecular Endocrinology*, 57(2), 99-108. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0316>
- Zhang, D., Liu, C., Nakatsukasa, H. & Chen, W. (2022). Hexose uptake and metabolism in immune homeostasis and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 12(832293). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.832293>.
- Zhang, Y. R., Liu, S. M., Chen, Y., Zhang, L. S, Ji, D. R., Zhao, J., Yu, Y. R., Jia, M. Z., Tang, C. S., Huang, W., Zhou, Y. B., Chai, S. B. & Qi, Y. F. (2023). Intermedin alleviates diabetic vascular calcification by inhibiting GLUT1

through activation of the cAMP/PKA signaling pathway. *Atherosclerosis*, 385, 117342. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2023.117342>

Zheng, H., Wu, J., Zhen, J. & Yan, L. (2016). Protein modifications as manifestations of hyperglycemic glucotoxicity in diabetes and its complications. *Biochemistry Insights*, 9, 1-9. <https://doi.org/10.4137/BCI.S36141>

Zhu, M. C., Zhao, N., Liu, Y. K., Li, X. M., Zhen, Z. Y., Zheng, Y. Q., Zhang, Q. & Yang, J. K. (2022). The cAMP-PKA signalling pathway regulates hyphal growth, conidiation, trap morphogenesis, stress tolerance, and autophagy in *Arthrobotrys oligospora*. *Environmental Microbiology*, 24(12), 6524-6538. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16253>.

Zuo, L., Prather E. R., Stetskiv, M., Garrison, D. E., Meade, J. R., Peace, T. I. & Zhou, T. (2019). Inflammaging and oxidative stress in human diseases: from molecular mechanisms to novel treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4472. <https://doi.org/10.3390/ijms20184472>