



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

**“EFECTO DE ESTÍMULOS OXIDATIVOS Y METALES
EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CU, ZN SOD
DE LA LEVADURA MARINA *Debaryomyces hansenii*”.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

**Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)**

Presenta

Rogelio Ramírez Serrano

La Paz, Baja California Sur, febrero del 2003.

RESUMEN.

El presente trabajo de tesis comprendió el estudio del efecto de sustancias pro-oxidantes y metales sobre las cinéticas de crecimiento de la cepa C11 *Debaryomyces hansenii*, así como el estudio de los niveles de expresión de la enzima superóxido dismutasa, la biomasa se produjo en un fermentador con volumen de 2 L. Los metales se adicionaron por pulsos en la fase exponencial media (7hr), a una concentración final de: 80 μ M (CuSO₄) y 50 μ M (AgNO₃, Pb(NO₃)₂, Co(NO₃)₂) monitoreando su efecto en el crecimiento cada hora antes del pulso y cada 30 minutos en las siguientes 3 horas hasta completar 10 hr. de cultivo. El tratamiento de *D. hansenii* con Pb(NO₃)₂ y Co(NO₃)₂, no produjo un cambio significativo en la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}), el efecto tóxico tuvo una duración menor a 30 minutos, CuSO₄ presento un efecto ligeramente mayor en un tiempo cercano a los 30 minutos, modificándose su patrón electroforético de actividad SOD. La adición de AgNO₃ produjo un efecto tóxico con una tendencia letal, afectando el patrón de actividad. El efecto en el crecimiento producido por ditranol fue tóxico, modificándose también el patrón electroforetico, particularmente de la SODC y SODM, afectando su expresión o actividad. La adición de hipoclorito de sodio (NaOCl) tuvo un efecto ligero en el crecimiento sin embargo el patrón y la actividad de la SODC se modifica y la forma 2 se ve disminuida. De acuerdo a los resultados podemos concluir que el periodo corto de efecto tóxico durante el crecimiento celular, se debió a la rápida activación del factor de transcripción Acep1 que enciende el sistema de los genes CUP1 y SOD1 que codifican para las metalotioneínas y Cu,Zn SOD respectivamente, obteniendo así una sobreexpresión de estas proteínas capaces de detoxificar la célula y poder mantener la homeostasis celular, por lo anterior podríamos considerar a *D. hansenii* como una posible herramienta en biorremediación.

Palabras Claves: Regulación, SOD, Metales.

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

ABSTRACT.

The present work of thesis there understood the study of the effect of substances pro-oxidizers and metals on the kinetic ones of growth of the yeast C11 *Debaryomyces hansenii*, as well as the study of the levels of expression of enzyme superoxide dismutase, the biomass was produced in a fermentator with volume of 2 L. The metals were added by pulses in the exponential average phase (7hr), to a final concentration of: 80mM (CuSO₄) and 50mM [AgNO₃, Pb (NO₃)₂, Co(NO₃)₂] monitoring its effect in the growth every hour before the pulse and every 30 minutes in the following 3 hours up to completing 10 hr. of culture(culturing). The treatment of *D. hansenii* with Pb(NO₃)₂ and Co(NO₃)₂, did not produce a significant change in the specific maximum speed of growth (μ_{max}), the toxic effect had a minor duration to 30 minutes, CuSO₄ present an effect lightly major in a time near to the 30 minutes, being modified its boss electroforetic of activity SOD. The addition of AgNO₃ produced a toxic effect with a lethal trend, affecting the boss of activity. The effect in the growth produced for ditranol was toxic, being modified also the boss electroforetico, particularly of the SODC and SODM, affecting its expression or activity. The addition of sodium hypochlorite (NaOCl) had a light effect in the growth nevertheless the boss and the activity of the SODC is modified and the form 2 is seen diminished. In agreement to the results we prune to conclude that the short period of toxic effect during the cellular growth, owed to the rapid activation of the factor of transcription Acep1 that ignites the system of the genes CUP1 and SOD1 that they codify for the metallothioneins and Cu, Zn SOD respectively, obtaining this way a overexpresion of these capable proteins of detoxify the cell and to be able to support the cellular homeostasis, for the previous thing we might consider to *D. Hansenii* as a possible tool in bioremediation.

Key Words: Regulation, SOD, Metals

DEDICATORIA.

Quiero dedicar esta Tesis:

A mi Madre, por su fortaleza y su gran ejemplo.

A mi padre, por su dedicación y esfuerzo.

A mi novia, Yaksha .

A Norma.

AGRADECIMIENTOS.

A **Dios**, por permitirme estar aquí, viviendo estos momentos.

Al verdadero espíritu del **CIBNOR** que hace tiempo sentí, y me motivo a superarme.

A la **Dra. Norma** por permitirme ser parte de este fascinante tema de investigación por su apoyo, motivación, crítica y sobre todo su confianza en los momentos difíciles.

A los **Drs. Ricardo Vázquez y Felipe Ascencio**, por su ayuda y comprensión ante todo.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética Molecular muy en especial a **Delia**, por su amistad y su invaluable ayuda en cuestiones experimentales, **Jesús, Nacho, Dr. Murugan**, por su amistad, **Arturo Sierra**, por ser el ejemplo del investigador nato.

A todos los miembros de la Real Unidad de Patología Marina. A **Martín Ramírez** por su valioso apoyo técnico con el BIOFLO III, solamente tú conoces el esfuerzo de las cinéticas.

A Reyna Romero por ser el enlace de superación, Iván Sánchez y Manuel Melero, por su financiamiento, en las n veces que me quede sin gasolina en la carretera, no importando el horario y a todos mis amigos del **CIBNOR y compañeros de generación de la Maestría.**

Al grupo de Posgrado, Dra. Thelma, Osvelia, Lety, Bety y Horacio, por las facilidades otorgadas, al final del camino.

Al **CONACyT** por su apoyo económico a través de la beca-crédito No. 144425.

Al **PES** (Patronato del Estudiante Sudcaliforniano), en especial al Profr. Alejandro Merino Orea, por su apoyo a los estudiantes de Baja California Sur.

A mi Abuelo **Salvador Serrano** por la confianza y ayuda económica.

| CONTENIDO | Página |
|---|---------------|
| INDICE GENERAL | i |
| INDICE DE FIGURAS | v |
| INDICE DE TABLAS | vii |
| INDICE DE GRAFICAS | viii |
| | |
| 1. INTRODUCCION. | 1 |
| 1.1. Levaduras | 1 |
| 1.2 Importancia de metales divalentes y sus rutas metabólicas en seres vivos. | 3 |
| 1.2.1 Cobre (Cu^{+2}) | 6 |
| 1.2.2 Plata (Ag^{+1}) | 6 |
| 1.2.3 Plomo (Pb^{+2}) | 6 |
| 1.2.4 Cobalto (Co^{+2}) | 7 |
| 1.3 Mecanismos de respuesta a estrés en levaduras. | 7 |
| 1.3.1 Adaptación a condiciones de ayuno. | 9 |
| 1.3.2 Adaptación a condiciones de choque térmico. | 10 |
| 1.3.3 Respuesta a choque osmótico. | 11 |
| 1.4 Defensa de las levaduras contra el estrés oxidativo. | 14 |
| 1.5 Superóxido dismutasas. | 14 |
| 1.6 Regulación Genética. | 15 |
| 1.6.1 Gen constitutivo. | 16 |
| 1.6.2 Gen inducible. | 16 |
| | |
| 2. ANTECEDENTES. | 17 |
| 2.1 SOD en Levaduras. | 17 |
| 2.2 Cu,Zn SOD en <i>D. hansenii</i> . | 18 |
| 2.3 Regulación de la Cu,Zn SOD en eucariotas. | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.1 Mecanismos de regulación de la expresión. de la Cu,Zn SOD. | 19 |
| 2.4 Expresión de la Cu,Zn SOD en levaduras. | 21 |
| 3. HIPÓTESIS. | 25 |
| 4. OBJETIVOS. | 25 |
| 4.1 Objetivo General. | 25 |
| 4.1.1 Objetivos Particulares. | 25 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS. | 26 |
| 5.1 Organismo de estudio. | 26 |
| 5.2 Determinación de las condiciones de crecimiento basal. | 26 |
| 5.2.1 Preparación del inóculo. | 26 |
| 5.2.2 Estudios de crecimiento en fermentador de 2 litros. | 27 |
| 5.2.3 Método de evaluación y análisis del efecto. de inductores en el crecimiento de <i>D. hansenii</i> . | 27 |
| 5.2.3.1 Análisis estadístico. | 29 |
| 5.3 Experimentos de inducción. | 29 |
| 5.3.1 Metales bivalentes. | 29 |
| 5.3.2 Sustancias pro-oxidantes. | 30 |
| 5.3.2.1 Determinación cualitativa de la concentración. de NaOCl a usar en los experimentos de inducción. | 30 |
| 5.3.2.2 Determinación cuantitativa de la concentración. de NaOCl a usar en los experimentos de inducción. | 33 |
| 5.4 Procesamiento de muestras. | 34 |
| 5.4.1 Análisis proteicos. | 34 |
| 5.4.1.1 Perfil electroforetico de actividad SOD. | 34 |

| | |
|---|----|
| 6. RESULTADOS. | 36 |
| 6.1 Condiciones de crecimiento basal. | 36 |
| 6.1.1 Crecimiento. | 36 |
| 6.1.2 Actividad superóxido dismutasa. | 39 |
| 6.2 Experimentos de inducción mediante sales metálicas. | 41 |
| 6.2.1. Cobre. | 41 |
| 6.2.1.1 Crecimiento . | 41 |
| 6.2.1.2 Actividad superóxido dismutasa. | 42 |
| 6.2.2. Plata. | 44 |
| 6.2.2.1 Crecimiento celular. | 44 |
| 6.2.2.2 Actividad Superóxido Dismutasa. | 45 |
| 6.2.3. Plomo. | 46 |
| 6.2.3.1 Crecimiento celular. | 46 |
| 6.2.3.2 Actividad superóxido. | 47 |
| 6.2.4. Cobalto. | 48 |
| 6.2.4.1 Crecimiento celular. | 48 |
| 6.2.4.2 Actividad superóxido. | 49 |
| 6.3 Análisis estadístico. | 50 |
| 6.4 Experimentos de inducción con sustancias pro-oxidantes. | 53 |
| 6.3.1 Ditranol. | 53 |
| 6.3.1.1 Crecimiento celular. | 53 |
| 6.3.1.2 Actividad superóxido. | 54 |
| 6.3.2 Hipoclorito de sodio. | 55 |
| 6.3.2.1 Determinación cualitativa de la concentración. de NaOCl a usar en los experimentos de inducción. | 55 |
| 6.3.2.2 Determinación cuantitativa de la concentración de NaOCl a usar en los experimentos de inducción | 58 |
| 6.3.2.3 Crecimiento celular. | 60 |
| 6.3.2.4 Actividad Superóxido. | 61 |
| 6.5 Análisis estadístico. | 65 |

| | |
|--|----|
| 7. DISCUSIÓN. | 63 |
| 7.1 Condiciones de crecimiento basal. | 63 |
| 7.2 Experimentos de inducción mediante sales metálicas. | 64 |
| 7.3 Experimentos de inducción mediante. sustancias pro-oxidantes. | 68 |
| | |
| CONCLUSIONES. | 69 |
| BIBLIOGRAFÍA. | 71 |
| APÉNDICE I. | 78 |

| INDICE DE FIGURAS. | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Diferentes tipos de estrés detectados por la célula. | 8 |
| Figura 2. Esquema simplificado que muestra los primeros daños macromoleculares que son causados en las células por las especies reactivas de oxígeno. | 13 |
| Figura 3. Modelo hipotético de la conformación del sitio activo en una subunidad de la enzima Cu,Zn SOD en <i>S. cerevisiae</i> . | 23 |
| Figura 4. Actividad Superóxido dismutasa de los homogenizados celulares de <i>D. hansenii</i> en condiciones basales sobre PAGE nativa 7.5 %. | 40 |
| Figura 5. Actividad Superóxido dismutasa de los homogenizados celulares de <i>D. hansenii</i> inducidos con CuSO_4 sobre PAGE nativa 7.5 %. | 42 |
| Figura 6. Actividad Superóxido dismutasa de los homogenizados celulares de <i>D. hansenii</i> inducidos con AgNO_3 sobre PAGE nativa 7.5 %. | 45 |
| Figura 7A. Actividad Superóxido dismutasa de los homogenizados celulares de <i>D. hansenii</i> inducidos con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sobre PAGE nativa 7.5 %. | 47 |
| Figura 8A. Actividad Superóxido dismutasa de los homogenizados celulares de <i>D. hansenii</i> inducidos con $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ sobre PAGE nativa 7.5 %. | 49 |
| Figura 9. Actividad Superóxido dismutasa de los homogenizados celulares de <i>D. hansenii</i> inducidos con ditranol sobre PAGE nativa 7.5 %. | 54 |

| | |
|---|----|
| Figura 10. Prueba de sensibilidad a diferentes concentraciones de NaOCl mediante la técnica de difusión en disco. | 56 |
| Figura 11. Actividad Superóxido dismutasa de los homogenizados celulares de <i>D. hansenii</i> inducidos con NaOCl sobre PAGE nativa 7.5 %. | 61 |

| INDICE DE TABLAS. | Página |
|---|---------------|
| Tabla I. Características de las sales metálicas usadas como inductores en los experimentos de determinación del efecto de la adición de metales en la expresión de la SOD en <i>D. hansenii</i> . | 30 |
| Tabla II. Concentraciones de NaOCl usadas para determinar la concentración óptima a usar en los experimentos de inducción. | 32 |
| Tabla III. Velocidades específicas de crecimiento y tiempo de duplicación de <i>D. hansenii</i> en los diferentes tratamientos con metales y su control. | 38 |
| Tabla IV. Análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía de las pendientes (m1, m2 y m3) con metales. | 50 |
| Tabla V. Prueba de Tukey en el análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía de las pendientes (m1, m2 y m3) con metales. | 51 |
| Tabla VI. Análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía de tratamiento metales vs. valor de la pendiente m3 . | 51 |
| Tabla VII. Prueba de Tukey en el análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía de tratamiento metales vs. valor de la pendiente m3 . | 51 |
| Tabla VIII. Sensibilidad de levaduras a diferentes concentraciones de NaOCl mediante la técnica de difusión en disco. | 57 |
| Tabla IX. Numero de colonias formadas en la placa. | 59 |

| INDICE DE GRAFICAS | Página |
|--|---------------|
| Grafica 1. Representación de una Curva de crecimiento en la cual se muestra las secciones m1 y m2 que comprenden la fase exponencial m3. | 28 |
| Grafica 2. Curva de crecimiento de <i>D. hansenii</i> en condiciones basales. | 37 |
| Grafica 3. Representación gráfica de los valores obtenidos de las fases de crecimiento exponencial, m1, m2 y m3, en el crecimiento basal de <i>D. hansenii</i> . | 38 |
| Grafica 4. Curva de crecimiento de <i>D. hansenii</i> inducido con CuSO_4 | 41 |
| Grafica 5. Curva de crecimiento de <i>D. hansenii</i> inducido con AgNO_3 | 44 |
| Grafica 6. Curva de crecimiento de <i>D. hansenii</i> inducido con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ | 46 |
| Grafica 7. Curva de crecimiento de <i>D. hansenii</i> inducido con $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ | 48 |
| Grafica 8. Representación gráfica de los valores obtenidos de las fases de crecimiento exponencial, m1, m2 y m3, en el crecimiento de <i>D. hansenii</i> inducida con metales. | 50 |
| Grafica 9. Curva de crecimiento de <i>D. hansenii</i> inducido con Ditranol | 53 |
| Grafica 10. Curva de crecimiento de <i>D. hansenii</i> inducido con NaOCl | 60 |

Grafica 11. Representación grafica de los valores obtenidos de las fases de crecimiento exponencial, m_1 , m_2 y m_3 , en el tratamiento con sustancias pro-oxidantes.

62

1. INTRODUCCION.

1.1. Levaduras

Las levaduras son organismos microscópicos que en un estadio de su ciclo vital aparecen como células simples, reproduciéndose por gemación, fisión o una combinación de ambas. Esta definición incluye un gran número de organismos que no constituyen un grupo taxonómico natural. Se incluyen en el Súper-reino Eucariota, Reino Fungi, según la clasificación de Federen et al. (2002), y dadas sus características en dos Phylums: Ascomycota y Basidiomycota (Kurtzman and Fell, 1999).

El concepto de "*levadura*" fue dado en 1680 por Antonio Van Leewenhoek cuando observó al microscopio una gota de cerveza y distinguió pequeños cuerpos globulares (Phaff et al, 1978). No obstante, el uso y la importancia de las levaduras se remonta a la época en la que el hombre aún vivía de la recolección, pues existen evidencias de que estos microorganismos ya tenían efecto sobre sus alimentos. Fueron utilizadas por primera vez cuando se estableció la práctica de la agricultura, para la elaboración de pan y bebidas alcohólicas (Davenport, 1980). Actualmente las levaduras se usan además, para la producción de biomasa y productos metabólicos tales como enzimas, vitaminas, polisacáridos, carotenoides, lípidos, glicolípidos, alcoholes; y otros componentes sintetizados por la introducción de ADN recombinante en ellas. Algunos géneros se usan como indicadores de contaminación en aguas someras y como degradadoras de hidrocarburos, lo que las hace muy

importantes desde el punto de vista económico, sanitario y biotecnológico (Hernández-Saavedra, 1990).

Las levaduras tienen una amplia distribución, ya que han sido aisladas de diversos tipos de sustratos correspondientes a un variado tipo de habitats, dentro de los que se incluyen los ambientes marinos (Uden y Fell, 1968; Davenport, 1980). A las levaduras aisladas de este tipo de ambientes se les ha denominado "*levaduras marinas*". Dentro de este término se incluyen todas las levaduras que son capaces de construir y perpetuar poblaciones en el medio marino, o aquellas en las que su reproducción y crecimiento ocurren preferentemente en el mar u óptimamente a la concentración normal de sales en el mar (Kholmeyer y Kholmeyer, 1979).

Se ha encontrado que algunas especies de levaduras están mejor equipadas que otras para vivir en ambientes marinos. Se ha demostrado que la versatilidad asimilativa de las levaduras marinas es significativamente mayor que la de levaduras de origen terrestre (Ahearn et al, 1962); mientras que en levaduras terrestres se ha encontrado un promedio de asimilación de 12.8 fuentes de carbono, en las levaduras marinas este promedio es de 19.2. (Uden y Fell, 1968). Así como la disponibilidad de fuentes de carbono es un parámetro variable en el medio, el ambiente es un sistema dinámico, en el que las condiciones pueden cambiar súbitamente. Para ello las células están evolutivamente equipadas con una serie de mecanismos de protección y /o reparación, que les permiten sobrevivir bajo las nuevas condiciones ambientales.

1.2 Importancia de metales divalentes y sus rutas metabólicas en seres vivos.

Los seres vivos están formados fundamentalmente por muy pocos elementos, básicamente carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno (C, H, O, N). Pero, esto no quiere decir que la vida este formada solamente por estos cuatro elementos, un segundo nivel de elementos esenciales es necesario en los organismos terrestres, formado por azufre (S), fósforo (P) e iones sodio (Na^+), Potasio (K^+), Magnesio (Mg^{2+}), Calcio (Ca^{2+}), y Cloro (Cl^-). Después de los dos primeros niveles de elementos, que corresponden a la mayoría de los elementos de las tres primeras filas de la tabla periódica, llegamos a los que desempeñan papeles cuantitativamente menores, aunque a menudo indispensables. La mayor parte de estos elementos de tercer y cuarto nivel son metales. (Mathews, 1998)

Las levaduras adquieren los elementos esenciales de su medio a partir de sencillas fuentes de alimento, los cuales necesitan estar disponibles a nivel macronutriente (aprox. 10^{-3} M) en el caso de C, H, O, N, P, K, Mg y S o a nivel micronutriente (aprox. 10^{-6} M) en el caso de los elementos traza, para el crecimiento celular.

El K y el Mg son considerados como macronutrientes los cuales son requeridos a una concentración milimolar (mM) para establecer el principal ambiente cationico metálico en las células de levaduras.

Los minerales que son requeridos en el rango micromolar (μM) o nanomolar (nM), son referidos como micronutrientes o elementos traza. Los micronutrientes y elementos traza son metales, estos incluyen: Mn, Ca, Fe, Zn, Cu, Ni, Co, y Mo. Un grupo de otros metales (Ag, As, Ba, Cs, Cd, Hg, Li, y Pb) representan minerales tóxicos por que ellos afectan el crecimiento de la levadura a una concentración mayor que $100 \mu\text{M}$. (Rose, 1976)

Las células de levaduras incorporan cationes inorgánicos del exterior por varias razones. Estas pueden involucrar la regulación de pH intracelular, homeostasis celular y generación de una fuerza móvil de protones (en el caso de transporte de H^+); osmoregulación y balance de carga (en el caso de K^+); funciones de cofactor de enzimas (en el caso de Cu^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}); funciones estructurales de metaloenzimas (en el caso de cationes divalentes como Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+}) y funciones de señales de transducción de segundo mensajero (en el caso de Ca^{2+}) (Walker, 1998).

Existen aproximadamente 30 elementos que son prácticamente tóxicos . Algunos son biológicamente nutrientes esenciales. Otros pueden no tener efectos benéficos o funciones. Ningún metal puede ser creado o destruido biológicamente, ellos pueden ser significativamente alterados químicamente a través del metabolismo y otras reacciones químicas. El termino metal se refiere a los elementos que tienen una significancia toxicologica en cualquier forma química.

Transporte de metales divalentes.

Si bien todavía hay mucho que aprender acerca de la incorporación de metales divalentes en las levaduras, se pueden hacer varias declaraciones generales concernientes a los mecanismos de transporte. La incorporación es bifásica, involucrando primeramente un enlace no específico de cationes a la superficie celular, seguido por una más regulada translocación mediada por transportadores a través de la membrana plasmática. Esta fase secundaria involucra un transporte dependiente de energía manejado por gradientes de membrana electroquímicos generados por bombas de protones e iones potasio. No obstante, este es el potencial de transmembrana el cual es la primera fuerza conductora para la incorporación de metales divalentes (Jones y Gadd, 1990). Las concentraciones extracelulares de glucosa, fosfato y potasio, influyen grandemente la incorporación de metales divalentes. Una vez transportados, ciertos metales divalentes son materia de compartimentalización intracelular, más notablemente, en la vacuola de células de levadura. Algunos transportadores de cationes pueden tener una alta afinidad y ser singularmente específicos por ciertos iones, mientras que otros pueden poseer especificidades más amplias y ser capaces de transportar una multitud de cationes divalentes. Un eflujo controlado de ciertos cationes (Ca^{+2} , Cu^{+2}) también existe y esto es importante para mantener los niveles intracelulares a muy bajos niveles subtóxicos.

1.2.1 Cobre (Cu^{+2}).

El cobre es un micronutriente esencial a bajas concentraciones para las levaduras, pero es tóxico a altas concentraciones. La toxicidad del cobre hacia las células de levadura involucra una interacción intracelular entre el cobre, ácidos nucleicos y enzimas. Sin embargo, el principal modo de acción es la disrupción de la integridad de la membrana plasmática (Avery et. al., 1996). La homeostasis del ion cobre en levaduras es controlada por varias estrategias de incorporación, eflujo y quelación dependiendo de la biodisponibilidad externa del cobre. La asimilación de este metal y su subsiguiente metabolismo está estrechamente interconectado tanto en levaduras, como en otros organismos.

1. 2. 2 Plata (Ag^{+1}).2

La plata tiene propiedades fisicoquímicas y electrónicas similares al cobre, pero esta no es capaz de generar especies reactivas de oxígeno por el ciclo redox. Además, la plata ha mostrado ser capaz de inducir una metalotioneína vía el factor ACE1 a un grado comparable como el cobre (Carri et al, 1991).

1. 2. 3 Plomo (Pb^{+2})

Los humanos están expuestos al plomo inorgánico, compuestos de plomo y compuestos de plomo orgánico, esto ocurre por inhalación y a través de alimentos y tabaco. Una fuerte exposición puede ocurrir en trabajos de contacto directo con el plomo como fundidoras, fabricas de pinturas y baterías.

Un modelo metabólico para el plomo inorgánico en el humano debe al menos comprender plasma, células de sangre, tejido blando, y hueso trabecular (skerfving et al., 1985, 1987; Christofferson et al. 1987 Bert et al. 1989).

Poco es conocido acerca del mecanismo básico detrás de la toxicidad del plomo (saturismo). Sin embargo es bien establecido que el plomo se une a grupos sulfhídrico de proteínas. Si esto ocurre sobre una enzima, su función puede ser inhibida, lo cual puede resultar en efectos tóxicos. También el plomo altera los procesos celulares mediados por el calcio.

1. 2. 4 Cobalto (Co^{+2}).

El cobalto es un metal esencial para humanos y es parte de la enzima cianocobalamina (vitamina b12). Este es un metal relativamente raro utilizado en la producción de metales duros. La ingesta diaria a partir de los alimentos es alrededor de 5 a 45 μg /día.

1.3 Mecanismos de respuesta a estrés en levaduras.

La sobrevivencia de las células vivas, depende de su habilidad de detección de alteraciones ambientales, y de su adaptación o respuesta apropiada a las nuevas situaciones. Los eucariotas unicelulares (levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*) tienen que adaptarse a cambios ambientales constantes para mantener una alta tasa de proliferación, ya que alteraciones en las condiciones químicas o físicas de las células, que promueven efectos negativos en el crecimiento y demandan respuestas celulares rápidas que son esenciales para su sobrevivencia. Los mecanismos moleculares inducidos por

la exposición de las células a tales condiciones adversas son comúnmente conocidas como respuestas de estrés. Los diferentes tipos de estrés son detectados por la célula, disparando mecanismos de respuesta molecular específicos y generales. Estas respuestas de estrés resultan en cambios a nivel de expresión de genes y actividades enzimáticas, que le permiten a la célula tolerar las nuevas condiciones de estrés. (figura 1).

La función de los mecanismos de respuesta a estrés, es la protección de la integridad celular y la reparación de cualquier daño molecular promovido por efectos adversos de los retos estresantes, por lo tanto, la respuesta al estrés permite el ajuste del metabolismo y otros procesos celulares a las nuevas condiciones.

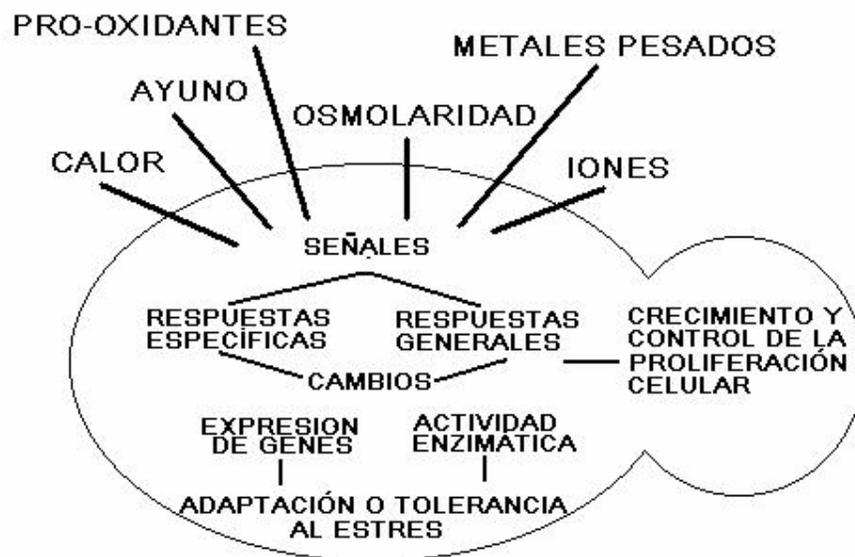


Figura 1. Diferentes tipos de estrés detectados por la célula,

De acuerdo al significado biológico, la respuesta al estrés no solo tiene como consecuencia la reparación de los daños ocurridos, sino que también permite la adaptación o tolerancia al estrés, y por lo tanto el establecimiento de mecanismos que previenen el daño. Desde luego, la exposición a estrés leve evoca un mejoramiento en la resistencia a estrés mucho más severos, por lo tanto, como respuesta a una condición de estrés, la célula produce una serie de proteínas a diferentes niveles o con diferente actividad que aquellas que se sintetizaban antes de la condición de estrés.

1.3.1 Adaptación a condiciones de ayuno.

Los microorganismos comparten la insuperable habilidad de prosperar en ambientes aparentemente improductivos. Dentro de los organismos eucariotas, solo las especies que se encuentran muy abajo en la escalera evolutiva tienen la capacidad de vivir en presencia únicamente de una fuente de carbono simple, algunos compuestos de fósforo, nitrógeno y azufre, y algunos elementos traza. Por lo tanto, los hongos unicelulares o multicelulares simples no sólo son la base de la progenie eucariota, sino que también son el primer eslabón de muchas cadenas alimenticias.

Cuando la disponibilidad de nutrientes en el medio disminuye, la respuesta inmediata de la célula es disminuir su maquinaria proliferativa; las células entran en una fase estacionaria, y entonces se inicia el programa de sobrevivencia que les permite trascender el periodo de ayuno.

Debe de hacerse una clara diferenciación entre limitación y ausencia de nutrientes. Aunque como casi todos los microorganismos las levaduras pueden usar una amplia variedad de sustancias como fuentes nutrientes, la disminución de la disponibilidad de un sustrato puede ser compensado, la mayoría de las veces, por la utilización de otro, por lo que la respuesta a la limitación de nutrientes frecuentemente consiste en un cambio metabólico para la utilización de una fuente nutritiva pobre alternativa. Por ejemplo, en el caso de *S. cerevisiae* creciendo en un medio rico que contiene glucosa, el azúcar fermentable generalmente es el primer nutriente limitante. Posteriormente, la capacidad metabólica y biosintética de las células son re-programadas a lo que se le ha denominado “cambio diauxico” por utilizar acetato y etanol como fuentes de carbono, que se habían acumulado previamente durante el crecimiento fermentativo.

1.3.2 Adaptación a condiciones de choque térmico.

Una de las respuestas a estrés mejor caracterizadas es el choque térmico. Un cambio de 26°C a 36°C en las condiciones de crecimiento de una levadura resultan en la inducción de la expresión de un gran número de genes llamados “genes de respuesta a choque térmico”. En *S. cerevisiae*, la mayor parte de la transcripción de los genes de choque térmico ocurren vía la activación del factor de transcripción Hsf1p, que promueve la transcripción a través de los llamados elementos de choque (HSEs) presentes en los promotores de los genes blanco. El aumento de la expresión de los genes de

choque térmico tiene como consecuencia la acumulación de proteínas llamadas de choque térmico (Hsp) que juegan un papel fundamental en la protección de otras proteínas contra la desnaturalización térmica y en el reestablecimiento de su actividad biológica. Se ha observado que estas Hsp exhiben la misma función de protección bajo condiciones normales de temperatura , ya que funcionan como chaperones moleculares en el plegamiento y transporte de proteínas.

1.3.3 Respuesta a choque osmótico.

Otro claro ejemplo de respuesta a estrés es la respuesta de las levaduras incrementos o disminución de la osmolaridad extracelular (respuesta a estrés osmótico). Los eventos más sobresalientes que se disparan cuando sucede un choque hiperosmótico (por cambio a un medio con alta concentración de sales o azúcares) es la reducción del tamaño celular (mediante un proceso activo de eliminación de moléculas de agua; (Hernández, 1992) y la síntesis paulatina de alcoholes polihídricos (Yancey et al, 1982), generalmente glicerol (Adler et al, 1985; Hernández et al, 1994), que funcionan como solutos compatibles. Sin embargo, también se ha reportado para algunas especies no convencionales que la acumulación de algunos aminoácidos puede funcionar como un sistema efectivo de osmorregulación (Hernández, 1992; Hernández et al, 1994).

La exposición de células de levaduras a altas concentraciones de NaCl provoca, además de una respuesta osmorregulatoria, una respuesta de estrés inducida específicamente por iones Na^+ , como lo es la elevación de la expresión

del gen ENA1 que codifica la bomba de sodio y probablemente la estimulación de otros procesos de transporte de iones. Estos mecanismos de transporte están normalmente involucrados en la homeostasis de los iones y/o en la generación de gradientes que resultan en el proceso de transporte activo.

1.4 Defensa de las levaduras contra el estrés oxidativo.

El ión superóxido es esencial para la vida en la tierra. En su estado normal es poco reactivo, sin embargo, a lo largo del metabolismo normal y como consecuencia de perturbaciones ambientales y contaminantes (como radiaciones, sequía, contaminantes del aire, estrés térmico, herbicidas, etc..) el oxígeno da origen a diversos intermediarios letales o altamente tóxicos. Estos intermediarios, que son las especies biológicas de oxígeno más importantes, reciben el nombre genérico de especies reactivas de oxígeno (ROS en sus siglas en inglés) y radicales libres (Strain et al, 1991). El término ROS incluye al radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), al radical hidroxilo (OH^{\cdot}), al óxido nítrico (NO^{\cdot}) y al peroxinitrito (ONOO^-) (Warner, 1995; figura 2). Para prevenir este daño, las células y los organismos utilizan tres estrategias de defensa. La primera consiste en el uso de mecanismos no enzimáticos en los que se utilizan antioxidantes de bajo peso molecular como el β -caroteno, ácido ascórbico, α -tocoferol, glutatión (Meyers, 1995; Warner, 1995; Goodsell, 1996). La segunda estrategia comprende la reparación de daños macromoleculares (figura 2) causados por los ROS en ácidos nucleicos, lípidos y proteínas a

través de enzimas reparadoras de ADN, proteasas, lipasas, etc. (Medina, 1996). Finalmente, el tercer mecanismo es la transformación de los ROS a través de enzimas que son capaces de remover, neutralizar o depurar radicales libres o intermediarios del oxígeno. Como ejemplo de defensas enzimáticas metabolizantes se pueden mencionar la ascorbato peroxidasa y la glutatión reductasa (que eliminan el H_2O_2 en cloroplastos y mitocondrias), la catalasa (CAT) y la peroxidasa (POx) que remueven el H_2O_2 en las células; y la superóxido dismutasa (SOD) que elimina los radicales superóxido.

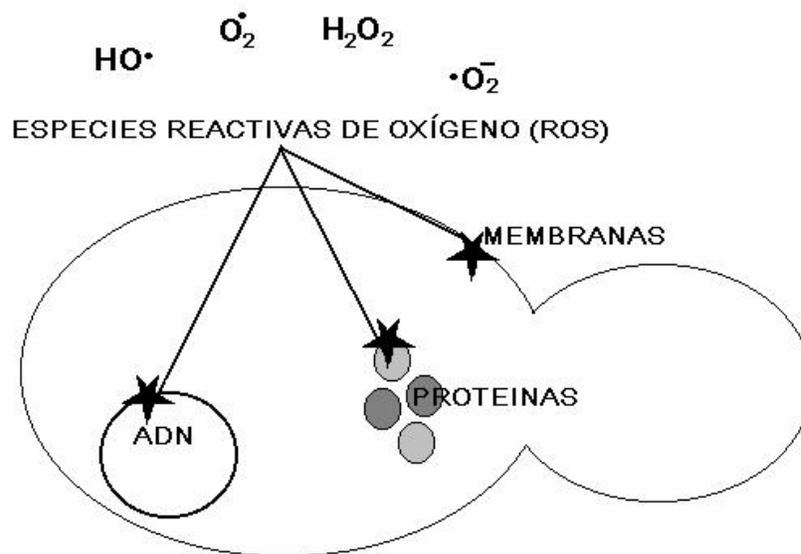


Figura 2. Esquema simplificado que muestra los primeros daños macromoleculares que son causados en las células por las especies reactivas de oxígeno.

1.5 Superóxido dismutasas.

Las células están equipadas con una familia de enzimas que depuran catalíticamente los radicales superóxido a través de la reacción: $2 \cdot O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (McCord y Fridovich, 1969). A la fecha se ha encontrado que existen cuatro tipos de enzimas SOD, dependiendo de su grupo prostético: la Mn SOD (SOD A en procariontas y SOD2 en eucariotas) se encuentra en la matriz mitocondrial y en el citoplasma de bacterias; la Fe SOD (SODB) solo se ha detectado en el espacio periplásmico de procariontas (Hong et al, 1992); la NiSOD (SODN) se ha encontrado únicamente en el género *Streptococcus* (Youn et al, 1996); mientras que la forma citosólica de la Cu,Zn SOD (SOD1) se encuentra en el citoplasma de plantas y otros eucariotas (Amano et al, 1990), aunque recientemente se ha encontrado en mutantes nulos de las formas Fe SOD y Mn SOD en procariontas, (Benov y Fridovich, 1994, 1996). Finalmente la forma extracelular (SODE) se ha aislado de fluidos corporales de mamíferos y algunos parásitos (Marklund, 1980).

La enzima superóxido dismutasa tipo cobre-zinc (Cu,Zn SOD, SOD1 o SODC), es una enzima ubicua que se encuentra en todos los organismos eucariotas (McCord y Fridovich, 1969) y tiene varios efectos importantes en los organismos aerobios. Se considera que la SOD juega un papel central en el metabolismo de los radicales libres y ROS, ya que convierte el radical superóxido (especie de baja actividad que no difunde fácilmente a través de membranas) en peróxido de hidrógeno que difunde libremente a través de

membranas celulares. El ión superóxido, sin embargo, no es en sí mismo inocuo; interactúa con e inactiva a las enzimas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Del mismo modo, actúa recíprocamente con el óxido nítrico para dar lugar al peroxinitrito (ONOO^-), que modifica las cadenas laterales de las cisteínas y tirosinas, y es extremadamente neurotóxico (Warner, 1995). Así pues, la SOD puede proteger a las neuronas limitando la formación no-enzimática de ONOO^- .

1.6 Regulación Genética.

Las células eucarióticas deben reaccionar a los cambios en su medio activando y desactivando conjuntos apropiados de genes.

Los mecanismos de control de un gen requieren información en forma de varias señales (algunas originadas dentro de la célula y otra procedentes del entorno) que interactúan con ADN, ARN o proteína. Algunas de las principales estrategias utilizadas para regular la expresión génica comprenden el control de: 1) la cantidad de ARNm disponible, 2) la rapidez de traducción del ARNm y 3) la actividad de la proteína producida.

En las células eucariotes, tal regulación depende en gran medida del ajuste fino de los sistemas de control, lo cual concuerda con la mayor complejidad de estas células y la necesidad de controlar el desarrollo en los organismos multicelulares. Por ello la regulación de los genes eucarióticos se lleva a cabo a diversos niveles.

1.6.1 Gen constitutivo.

Los genes que se transcriben de manera constante, es decir todo el tiempo, se denominan genes constitutivos. Los genes constitutivos no necesariamente se transcriben (o sus ARNm se traducen) al mismo ritmo. Algunas enzimas funcionan con más eficacia o son más estables que otras, y en consecuencia se requieren en menores cantidades. Muchas de las enzimas "ordinarias" (las necesarias para todas la células) son codificadas por genes constitutivos.

1.6.2 Gen inducible.

Un gen inducible suele ser controlado por un represor que lo mantiene en el estado de "apagado". La presencia de una molécula inductora desactiva al represor, y de este modo el gen se "enciende". Este tipo de sistema regulador permite a la célula ahorrarse los costos energéticos de elaborar enzimas cuando no hay sustratos sobre los cuales actúen. Los genes inducibles, reaccionan a amanezas o estímulos ambientales, como ingestión de metales pesados, infección viral y choque térmico.

2. ANTECEDENTES

2.1 SOD en Levaduras.

El uso de las levaduras como fuente alterna para la obtención de la enzima SOD se apoya en la observación de que esta enzima se presenta en cantidades significativas en este tipo de microorganismos (Ochoa-Ochoa et al, 1995). De acuerdo a trabajos previos, los niveles de SOD obtenidos a partir de levaduras convencionales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida polymorpha* son 16 veces menores que los niveles normales obtenidos de la levadura marina *Debaryomyces hansenii* (cepa C11, Colección de Levaduras Marinas del CIBNOR). *D. hansenii* fué aislada de la Costa Pacífico de Baja California Sur a 50 m de profundidad (Hernández-Saavedra, 1990); esta especie ha sido utilizada como modelo biológico para estudios de halotolerancia (Adler, 1986; Hernández-Saavedra, 1992), y dadas sus cualidades de halotolerancia (18% NaCl), su alta tasa específica de crecimiento, su resistencia a altas concentraciones de dióxido de cloro y sus bajos requerimientos nutricionales, esta especie C11 ha sido ampliamente estudiada para conocer la composición de su pared celular (Hernández Saavedra, 1991), sus mecanismos de halotolerancia (Hernández-Saavedra, 1992, Hernández-Saavedra et al, 1995) y para producir biomasa celular de alta calidad para la obtención de Cu,Zn SOD en un sistema de producción a escala intermedia en un medio que se prepara a base de agua de mar y es esterilizado químicamente (Hernández-Saavedra, 1997; Ramírez-Orozco, 1999; Ramírez-Orozco et al, 2001).

2.2 Cu,Zn SOD en *D. hansenii*.

A la fecha se conoce que en la levadura marina *D. hansenii* existen tres isoformas de la enzima (dos homodímeros y un heterodímero) que han sido caracterizadas fisicoquímica e inmunológicamente (Hernández-Saavedra, 1997; Hernández-Saavedra y Ochoa-Ochoa, 1999). Mediante técnicas de cromatografía líquida se han logrado separar las dos homodímeros de la Cu,Zn SOD en *D. hansenii*, que han mostrado diferencias significativas mediante análisis electroforetico, actividad específica y contenido de aminoácidos (Hernández, 1997; Hernández-Saavedra y Ochoa-Ochoa, 1999; Hernández-Saavedra y Rojas-Posada, 2002). De las dos principales formas de la enzima (homodímeros) se encontró que una de ellas presenta una actividad específica comparable a la de preparaciones comerciales (~5000 - 6000 U/mg de proteína; Hernández-Saavedra y Rojas-Posada, 2002), mientras que la otra es 300% más activa (Hernández-Saavedra, 1997; Hernández-Saavedra y Ochoa-Ochoa, 1999). Adicionalmente a los estudios de caracterización fisicoquímica e inmunológica, se han clonado las secuencias que codifican ambas formas de la Cu,Zn SOD en *D. hansenii*: la secuencia dh *sod1* (Hernández-Saavedra et al, 1998; AFO16383) y la secuencia dh *sod2* (Hernández-Saavedra y Rojas-Posada, 2002, 2002; AY116213). Mediante la traducción de las secuencias de nucleótidos y su análisis, se ha encontrado que estas contienen toda la información necesaria para producir proteínas funcionales. Al correlacionar esta información con la de las proteínas purificadas, se determinó que la secuencia codificante dh *sod1* corresponde a la forma superactiva de la

enzima (Hernández-Saavedra, 1997) mientras que la *dhsod2* corresponde a la forma convencional (Hernández –Saavedra y Rojas-Posada, 2002).

2.3 Regulación de la Cu,Zn SOD en eucariotas.

Aunque se conoce que en ausencia de un "estrés" oxidativo agudo la expresión del gen que codifica para la Cu,Zn SOD es constitutiva (dada su importancia como primer eslabón en el sistema de defensa antioxidante de tipo enzimático) y directamente proporcional al número de copias existentes en un organismo (Medina, 1995), se ha comprobado que la sobre-expresión del gen se puede inducir en presencia de varios estímulos, como el paraquat (Niwa et al, 1990; Warner, 1995), los metales divalentes (Galiazzo et al, 1991; Gralla et al, 1991), el ditranol y el nitrofurantoin (Michels y Remacle, 1988; Michels, et al, 1994), el oxígeno molecular (Greco et al, 1990; Galiazzo, et al, 1988; Ramírez et al, 1998; Michels, 1991), el dióxido de cloro (Hernández, 1997); observando en algunos casos la represión de la expresión del gen que codifica la Mn SOD (Kelner et al, 1990; Warner, 1995).

2.3.1 Mecanismos de regulación de la expresión de la Cu,Zn SOD.

Recientemente se han encontrado evidencias de que en el humano la actividad de la enzima Cu,Zn SOD está regulada por la longitud del ARNm, ya que se ha encontrado un solo gen funcional de la enzima que produce dos tipos de ARNm: uno de tamaño normal (0.7kb) y otro mas grande (0.9 kb). Se sabe que en el mensajero de 0.7kb se usa el primer sitio de poliadenilación, mientras que en el de 0.9 kb se utilizan un segundo y tercero sitios de poliadenilación (Kilk et al,

1995). Analizando las secuencias no traducidas (UTR en sus siglas en inglés) en el extremo 3' de los mensajeros largos (0.9 kb), se encontró que contienen regiones ricas en AUUUA y producen tres veces más enzima que los mensajeros cortos que carecen de sitios adicionales de poliadenilación y de las secuencias repetitivas. Estos hallazgos proponen un modelo de regulación post-transcripcional, que desde el punto de vista de sobrevivencia celular permite una respuesta inmediata a nivel enzimático, bajo una situación de estrés agudo. Sin embargo, el mecanismo de regulación de la Cu,Zn SOD no está bien entendido. Existen además dos modelos de regulación mediante inducción por cobre: 1) modelo de regulación a nivel post-traducciona, en el que la enzima puede estar presente en forma de pro-enzima a bajas concentraciones de Cu^{+2} y activarse cuando la concentración de Cu^{+2} rebasa los niveles normales en la célula (Rossi et al, 1994), y 2) el modelo de regulación transcripcional, en el que la transcripción del mensajero depende de la activación y unión del factor de transcripción al promotor del gen (Galiazzo, et al, 1991, Carri et al, 1991; Gralla et al, 1991).

Rossi et al (1994) encontró que en eucariotas superiores la Cu,Zn SOD se regula diferencialmente en varios órganos, por lo que sugieren que la Cu,Zn SOD participa en la homeostasis del cobre como "proteínas de estrés por metales" además de su papel antioxidante. Una observación interesante, es que en hígado de rata existen dos fracciones de Cu,Zn SOD, una de las cuales funciona como proteína enlazante de Cu^{+2} (sensible a la disponibilidad del metal) y otra de mantenimiento, que es esencial en la defensa antioxidante, como la que está presente en corazón y cerebro de rata (Cirolo et al, 1994).

2.4 Expresión de la Cu,Zn SOD en levaduras

Se ha establecido que la expresión de las enzimas SODs depende de muchos factores. Se ha observado que un incremento en la actividad de la Cu,Zn SOD mejora la resistencia de las células hacia los efectos dañinos del ión superóxido y a las altas concentraciones de metales divalentes tales como el Cu^{+2} y el Zn^{+2} . Se han realizado observaciones similares cuando las células se crecen con N-alcanos como única fuente de carbono, esto debido a que la asimilación del alcano esta sujeta a una oxidación inicial a través de hidroxilación por el citocromo P450 (Kujumdzieva-Savova *et al.*, 1991). Por otra parte, la capacidad de las levaduras de crecer en fuentes de carbono no fermentables (metanol y glicerol), está asociada con la inducción de varias enzimas como la CAT, SOD, AO (Paganelli *et al.*, 1988). En *S. cerevisiae*, las Cu,Zn SOD y Mn SOD tienen un comportamiento diferente en respuesta a la exposición al cobre (Greco *et al.*, 1990). Se ha reportado que la Cu,Zn SOD incrementa su actividad de acuerdo a la concentración de cobre en el medio, sin embargo este efecto no ha sido observado para la Mn SOD; un incremento dependiente de cobre también se ha observado en levaduras bajo condiciones anaeróbicas de crecimiento (Galiazzo *et al.*, 1991). Además, como ya se ha mencionado el Cu^{+2} puede modular la expresión de la proteína a nivel transcripcional vía Ace1p, que es un factor de transcripción que une cobre y activa el promotor CUP1 que codifica para la cobretioneína (sistema de metalotioneínas denominado CUP en levaduras y MT en eucariotas superiores), que es una proteína que quela, secuestra, y por lo tanto, detoxifica a las células de iones cobre. En *S. cerevisiae* se han encontrado

tres genes (CUP1, CRS4 y CRS5 -copper-resistant suppressors-) que participan en la homeostasis del cobre celular. Al caracterizar estos genes, se encontró que el CRS4 corresponde (100% identidad) al gen SOD1. El papel de la SOD1 en la homeostasis de cobre aparentemente no está relacionado con su capacidad para atrapar iones superóxido, ya que la enzima tiene un efecto protector contra el cobre aún en condiciones anaeróbicas, y las diferencias en la eficiencia de activación de la transcripción del gen SOD1 y el sistema CUP radica en que en el primero existe un solo sitio de unión en el promotor para el Ace1p, mientras que en el segundo se han observado dos o más (But et al, 1984; Bermingham-McDonogh, 1988; Carri et al, 1991). Estos datos más la inducción de ARNm de Cu,Zn SOD en presencia de AgNO₃, sugieren un segundo papel para la SODC en levaduras; aparentemente la Cu,Zn SOD of *S. cerevisiae* puede funcionar también como quelador de metales (Ciriolo *et al.*, 1994).

De acuerdo a estudios realizados por Ciriolo et al (1994), la función quelante de la SOD en levaduras, regularmente se asocia a la pérdida de actividad enzimática, dado que el metal que se substituye en el sitio activo es el Cu⁺², que es el responsable de la actividad catalítica del dímero, pues se ha reportado que el Zn⁺² funciona principalmente como estabilizador de la estructura cuaternaria (figura 3). La presencia de cobre en el sitio catalítico de la Cu,Zn SOD (figura 3) sugiere que la disponibilidad del cobre podría limitar la actividad enzimática, por lo que en levaduras existe un mecanismo adicional de regulación: post-traducciona. La Cu,Zn SOD es un dímero con subunidades equivalente unidas por interacciones hidrofóbicas, conteniendo cada una de ellas un átomo de cobre y uno de zinc.

Recientemente, se han propuesto dos modelos de estados de oligomerización durante la transferencia del cobre: a) la formación de un heterodímero compuesto por un monómero de CCS y otro de SOD (Lamb. *et al.*, 2000), y b) un dímero de dímeros que involucra interacciones entre los dos homodímeros (Hall *et al.*, 2000).

Se cree que la incorporación del cobre a la SOD por la CCS involucra la cooperación entre tres regiones diferentes de la misma: un dominio I amino-terminal homólogo al sitio Atx1p de la metalochaperona, una porción central (dominio II) homólogo a la Cu,Zn SOD, y un extremo carboxi-terminal corto (dominio III) que es una secuencia única y particular de las moléculas CCSs. Se supone que el dominio II participa en el reconocimiento de la Cu,Zn SOD (Casareno *et al.*, 1998), mientras que segmentos pequeños de los extremos N- y C-terminal de la CCS facilitan la unión y entrega del cobre a la Cu,Zn SOD (Schmidth *et al.*, 1999a). La homología entre el dominio II de la CCS y la Cu,Zn SOD alcanza valores del 50% en términos de identidad y del 60% en lo que se refiere a similitud (Casareno *et al.*, 1998).

3. HIPÓTESIS.

Si consideramos que la expresión de la Cu,Zn SOD es constitutiva pero bajo condiciones agudas de estrés oxidativo puede comportarse como inducible, entonces al adicionar sustancias reportadas como pro-oxidantes en otros sistemas eucariotas y metales divalentes, a cultivos de la levadura marina *D. hansenii*, observaremos una inducción de la expresión de la enzima (sobre-expresión).

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo General.

Determinar el efecto de sustancias pro-oxidantes y metales divalentes sobre los niveles de expresión de la Cu,Zn SOD en la levadura marina *D. hansenii*.

4.1.1 Objetivos Particulares.

- 1) Evaluar el efecto de la adición de metales divalentes a cultivos de *D. hansenii* en la expresión de Cu,Zn SOD, y
- 2) Evaluar el efecto del ClO₂ y ditranol en los niveles de expresión de la Cu,Zn SOD de *D. hansenii*, monitoreando:
 - a. El crecimiento
 - b. La actividad enzimática

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Organismo de estudio

En este trabajo se utilizó la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa C11 como objeto de estudio. Esta cepa pertenece a la Colección de Levaduras Marinas del CIBNOR, S. C., y se aisló de agua de mar colectada a 50 m de profundidad a 45 brazas de distancia respecto a la línea de costa (estación 127.45 de acuerdo al plan básico de CALCOFI; Hernández-Saavedra, 1990).

5.2 Determinación de las condiciones de crecimiento basal

5.2.1 Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de placas de C11 en medio YPD + tetraciclina (dextrosa 2%, peptona 2%, extracto de levadura 1%, agar 2%, tetraciclina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) incubadas durante 24 horas a temperatura ambiente. De estas placas se tomó una asada con la que se inocularon 200 mL de medio YPD líquido contenidos en un matríz Erlenmeyer de 1000 mL. El cultivo se incubó durante 18 horas a 30°C y en agitación orbital constante a 130 rpm; a partir de la hora 18 se monitoreo la absorbancia a 580 nm (Abs_{580}) del cultivo hasta obtener un valor de 0.33 en una dilución 1:20. La estimación del número de células se realizó de acuerdo a la ecuación: $y = 0.132 x + 0.099$ ($r = 0.98$) que nos relaciona el número de células (10^7) determinado mediante conteo directo al microscopio usando una cámara de Neubauer, con la Abs_{580} (Hernández-Saavedra, 1985).

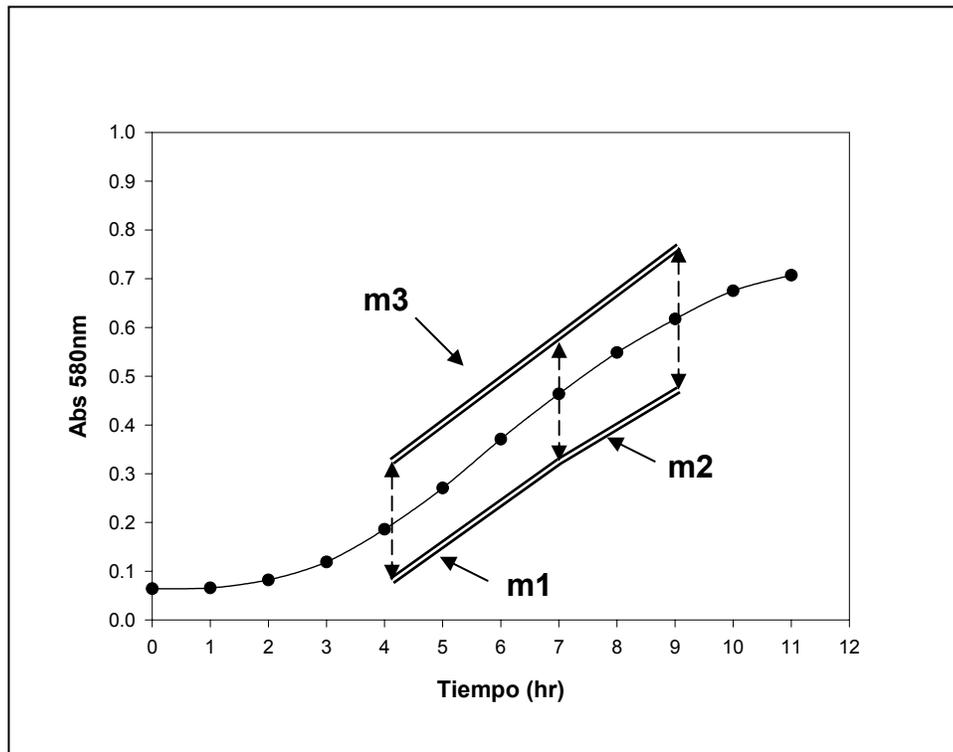
5.2.2 Estudios de crecimiento en fermentador de 2 litros

Una vez alcanzada una absorbancia de 0.33 (dil.1:20) en el inóculo (9×10^{10} cel/mL), este se adicionó (200 mL) a 1800 mL de medio YPD líquido estéril contenidos en un vaso de fermentador de 2 Lt (BioFlo III, New Brunswick) en el que las condiciones de agitación (250 RPM), aireación (434 cc/min) y temperatura (30°C) se mantuvieron controladas, y dejando como única variable no controlada al pH. Se realizó el monitoreo del cultivo cada hora y durante 24 horas, determinándose el crecimiento mediante la medición de la Abs₅₈₀ (por triplicado) en un espectrofotómetro Beckman DU 660 a temperatura ambiente y en cubetas de plástico de 1 cm. La curva de crecimiento se siguió hasta alcanzar la fase estacionaria, realizándose tres experimentos (o curvas) independientes para determinar las condiciones basales de crecimiento de *D. hansenii* cepa C11. Con esta información se determinaron los parámetros de crecimiento “normales” del organismo en estudio, así como el tiempo de inicio, la duración y el tiempo de terminación de la fase exponencial.

5.2.3 Método de evaluación y análisis del efecto de inductores en el crecimiento de *D. hansenii*.

Para facilitar la evaluación y el análisis de los efectos de la adición de inductores en el crecimiento de *D. hansenii*, como se observa en la grafica 1, la fase de crecimiento exponencial (m3) se dividió en dos secciones (m1 y m2) definidas por su pendiente. Así pues, la m1 definirá el crecimiento de las células desde que se inicia la fase exponencial (t = 4) hasta la fase exponencial media (t =

7), antes de aplicar el estímulo inductor; la m_2 define el crecimiento desde la fase exponencial media ($t = 7$), cuando se aplicará el estímulo, hasta la última parte de la fase exponencial ($t = 10$).



Gráfica 1. Representación de una Curva de crecimiento en la cual se muestra las secciones m_1 y m_2 que comprenden la fase exponencial m_3 .

De tal forma que si el estímulo:

- No tiene efecto (inocuo), entonces $m_3 \approx m_1$ y m_2 , $m_1 = m_2$
- Tiene efecto positivo, entonces $m_3 \approx m_1$ y $m_1 < m_2$
- Tiene efecto tóxico, entonces $m_3 \approx m_1$ y $m_1 > m_2$
- Tiene efecto letal, entonces $m_3 \approx m_1$ y $m_1 > m_2$, donde el valor de $m_2 \leq 0$

Se determinó que este tipo de análisis facilitará la evaluación del efecto de los inductores en los parámetros de crecimiento de *D. hansenii*, dada la posibilidad de inflexión de la curva (positiva o negativa) a partir del momento de la adición del inductor, lo cual se vería enmascarado si sólo consideráramos la m_3 .

5.2.3.1 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de la adición de inductores en el crecimiento de *D. hansenii* se aplicarán a los datos de las pendientes (m_1 , m_2 y m_3) análisis ANOVA de 1 vía, considerando como variables dependientes los valores y como variables independientes las pendientes, aplicando la prueba de homogeneidad de Tukey, considerando un intervalo de confianza del 95%.

5.3 Experimentos de inducción

Para los experimentos de inducción por la adición de metales divalentes y sustancias pro-oxidantes se realizaron cultivos “normales”, solo que en este caso se dio un pulso inductivo en la fase exponencial media, de acuerdo a los parámetros establecidos en el punto 5.2.2.

5.3.1 Metales bivalentes

Para evaluar el efecto de la adición de metales divalentes (Cu^{+2} , Ag^{+1} , Pb^{+2} , Cd^{+2} , y Co^{+2}) sobre la expresión de la Cu,Zn SOD en *D. hansenii*, los pulsos inductivos se dieron durante la fase exponencial media, manejando una

concentración final de sales metálicas de 50-80 μM (tabla 1; Fridovich, 1975; Galliazzo et al, 1991).

Se tomó la primera muestra a los 5 minutos del momento de la inducción, la segunda a los 20 minutos y posteriormente cada 30 min. hasta completar 5 horas de evaluación. Se separó una alícuota de 500 μL de cada muestra para determinar la Abs_{580} (por triplicado); el resto de la muestra se centrifugó durante 10 min a 4°C a 12000 X g. El botón celular se lavó dos veces con buffer de fosfatos (50mM, pH 7.8); las células lavadas se dividieron en dos alícuotas (ver punto 5.4) cosechándose posteriormente por centrifugación (30 seg., 4°C, 14000 X g) para congelarse a -80°C hasta su análisis.

Tabla I. Características de las sales metálicas usadas como inductores en los experimentos de determinación del efecto de la adición de metales en la expresión de la SOD en *D. hansenii*.

| Nombre | Fórmula | Metal | Peso molecular (g/mol) | Conc. (μM) |
|--------------------|--|------------------|------------------------|-------------------------|
| Sulfato de cobre | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | Cu^{+2} | 249.68 | 80 |
| Nitrato de plata | AgNO_3 | Ag^{+1} | 169.87 | 50 |
| Nitrato de plomo | $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | Pb^{+2} | 331.21 | 50 |
| Nitrato de cobalto | $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ | Co^{+2} | 291.03 | 50 |

5.3.2 Sustancias pro-oxidantes

Los experimentos se llevaron a cabo de la misma forma que aquellos realizados con los metales divalentes (punto 5.3.1). En estos experimentos la concentración de los pro-oxidantes fué: ditranol 50 μM (disuelto en DMSO

inmediatamente antes de cada vez que se utilizó) e hipoclorito de sodio (NaOCl) 21 μ M. Se tomó la primera muestra a los 5 minutos del momento de la inducción, la segunda a los 20 minutos y posteriormente cada 30 min hasta completar 5 horas de evaluación. Se separó una alícuota de 500 μ L de cada muestra para determinar la Abs₅₈₀ (por triplicado); el resto de la muestra se centrifugó durante 10 min a 4°C a 12000 x g. El botón celular se lavó dos veces con buffer de fosfatos (50mM, pH 7.8); las células lavadas se dividieron en dos alícuotas (ver punto 5.4) cosechándose posteriormente por centrifugación (30 seg., 4°C, 14000xg) para congelarse a -80°C hasta su análisis. En el caso del NaOCl al 5% (Clorox[®]) se realizaron experimentos previos para determinar la concentración de trabajo a usar antes de llevarse a cabo los experimentos de inducción.

5.3.2.1 Determinación cualitativa de la concentración de NaOCl a usar en los experimentos de inducción

De acuerdo a los reportes de Martínez-Orozco (1998 y et al, 2001) la sustancia clorada utilizada para esterilizar químicamente los medios usados para la fermentación de *D. hansenii* es dióxido de cloro (ClO₂: 67.45 g/mol, Halox E-100[®]), a una concentración de 130mg/mL, generando en placas de YPD-agar, halos de inhibición del crecimiento de 10 mm de diámetro con un volumen aplicado de 10 μ L (1300 μ g totales de ClO₂ en 10 μ L; Martínez-Orozco et al, 2001). Debido a que el Halox E-100[®] quedó fuera del mercado, se buscó sustituir la fuente de Cl⁻ por otra sustancia comercial, seleccionándose el hipoclorito de sodio (NaOCl: 74.45 g/mol, Clorox[®]) en su presentación al 5%. Los experimentos

consistieron en determinar la concentración de NaOCl suficiente para generar halos de inhibición del crecimiento de 10 mm de diámetro. Las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio ensayadas en la prueba de difusión en discos (sensidiscos) se muestran en la tabla 2.

Tabla II. Concentraciones de NaOCl usadas para determinar la concentración óptima a usar en los experimentos de inducción (ver punto 5.3.2)

| EXPERIMENTO | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| En placas | En líquido |
| NaOCl (μg) | NaOCl ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) |
| 1500 | 10 |
| 1250 | 6.6 |
| 1000 | 3.3 |
| 750 | 1.6 |
| 500 | 1.6×10^{-1} |
| 250 | 1.6×10^{-2} |
| 200 | 1.6×10^{-3} |
| 150 | 1.6×10^{-4} |
| 100 | 1.6×10^{-5} |
| 50 | 1.6×10^{-6} |
| 0 | 0 |

A partir de la concentración de 250µg de NaOCl se uso como organismo control, y con fines de comparación de sensibilidad, a *Saccharomyces cerevisiae* cepa X2180.

La prueba de sensidiscos se realizó de la siguiente manera: se prepararon placas Petri con medio YPD-agar de 5 mm de grosor, las cuales se mantuvieron a 30°C durante 24 horas para eliminar el exceso de humedad. Posteriormente, las placas se sembraron con 100 µL de un cultivo líquido de *D. hansenii* en fase exponencial (18 horas de crecimiento), diseminándose homogéneamente sobre la superficie del agar mediante una "L" de vidrio estéril (siembra por arrastre). Las placas se dejaron secar al aire dentro de una campana de flujo laminar, para posteriormente colocar, de una forma equidistante, discos estériles de papel 3MM (Millipore) de 8 mm de diámetro. A cada disco se le aplicaron 30 µL de las diluciones a probar (tabla 2), incubándose posteriormente a 30°C durante 48 horas; las placas se realizaron por triplicado. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se midió con una regla el diámetro de inhibición del crecimiento (en milímetros).

5.3.2.2 Determinación cuantitativa de la concentración de NaOCl a usar en los experimentos de inducción

Debido a que la información de la prueba de difusión en disco solo nos proporciona información cualitativa de la actividad antimicrobiana del NaOCl, a partir de la concentración estimada para rendir halos de inhibición de 10 mm de diámetro se estimó cualitativamente la misma mediante el método de diluciones en tubo / número de unidades formadoras de colonia.

A partir de un cultivo de *D. hansenii* en fase exponencial, se determinó el número de células mediante conteo directo al microscopio usando una cámara de Neubauer (Apéndice 1), para ajustar el número de células en 100 mL de una suspensión celular a 3500cel/mL. A parte, se prepararon 9 mL de diferentes concentraciones de NaOCl, de acuerdo a los valores citados en la tabla 2. En tubos de rosca de 10 mL estériles se adicionaron 2 mL de la suspensión celular (10 000 células) y 2 mL de la concentración correspondiente de NaOCl. Las mezclas se incubaron a 30°C durante 1, 12 y 24 en agitación orbital constante a 100 rpm. Posterior al período de incubación, se tomaron 200µL de cada tubo (teóricamente 500 células) para sembrarlos por arrastre en placas Petri con medio YPD-agar. Posteriormente las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas, para finalmente contar el número de colonias por placa. De acuerdo con los resultados obtenidos se calculó el volumen de NaOCl al 5% a adicionar a un volumen de cultivo de 1.86L.

5.4 Procesamiento de muestras

5.4.1 Análisis proteicos

5.4.1.1 Perfil electroforetico de actividad SOD

La segunda alícuota de células lavadas se rompió mediante disrupción mecánica usando un vortex y perlas de vidrio, aplicando 15 pulsos de 30" alternando periodos de reposos en hielo de 30". Los homogenizados celulares se centrifugaron a 17000Xg durante 15 minutos a 4°C, y los sobrenadantes así obtenidos se procesaron de acuerdo a los métodos descritos por Hernández-

Saavedra y Ochoa-Ochoa (1999). La cuantificación de proteínas totales de determino de acuerdo al método por Lowry (1975) y el patrón de bandeo de actividad SOD se determinó mediante electroforesis nativa en geles de poliacrilamida al 7% (Davis, 1964) cargando 50 μg de proteínas totales por pozo, usando como sustrato el sistema metionina-riboflavina-EDTA-NBT de acuerdo al método descrito por Beauchamp y Fridovich (1971). Los geles se realizaron por duplicado, envenenando uno de ellos con 500 μL NaCN 100 mM (inhibición de actividad Cu,Zn SOD) para evidenciar sólo la actividad MnSOD. Los geles se secaron en celofán y se foto documentaron en un escáner HP 2200c.

6. RESULTADOS

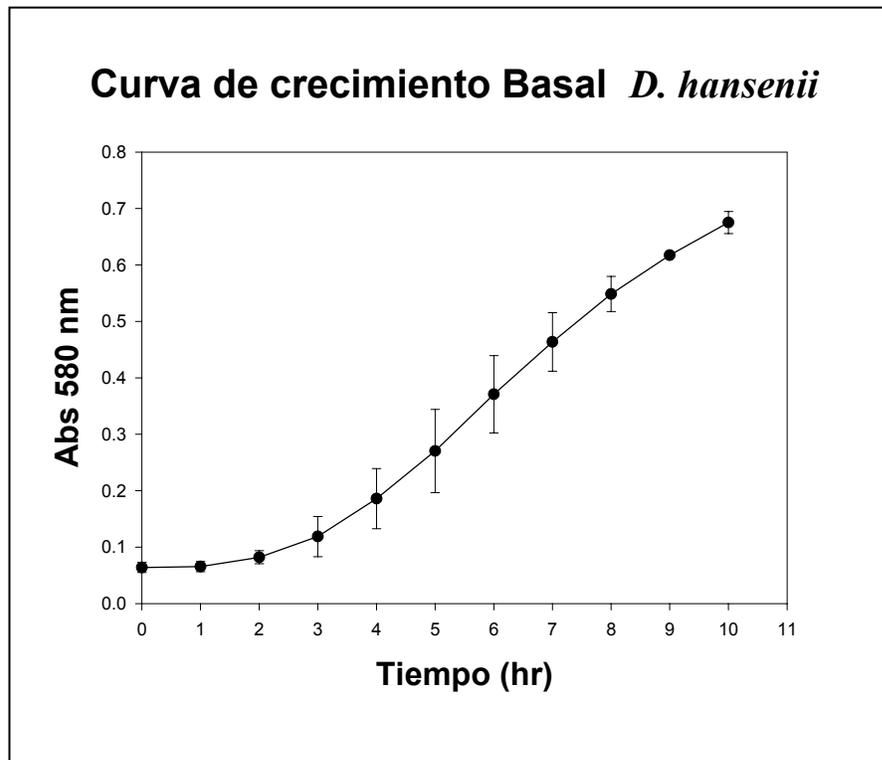
6.1 Condiciones de crecimiento basal

6.1.1 Crecimiento

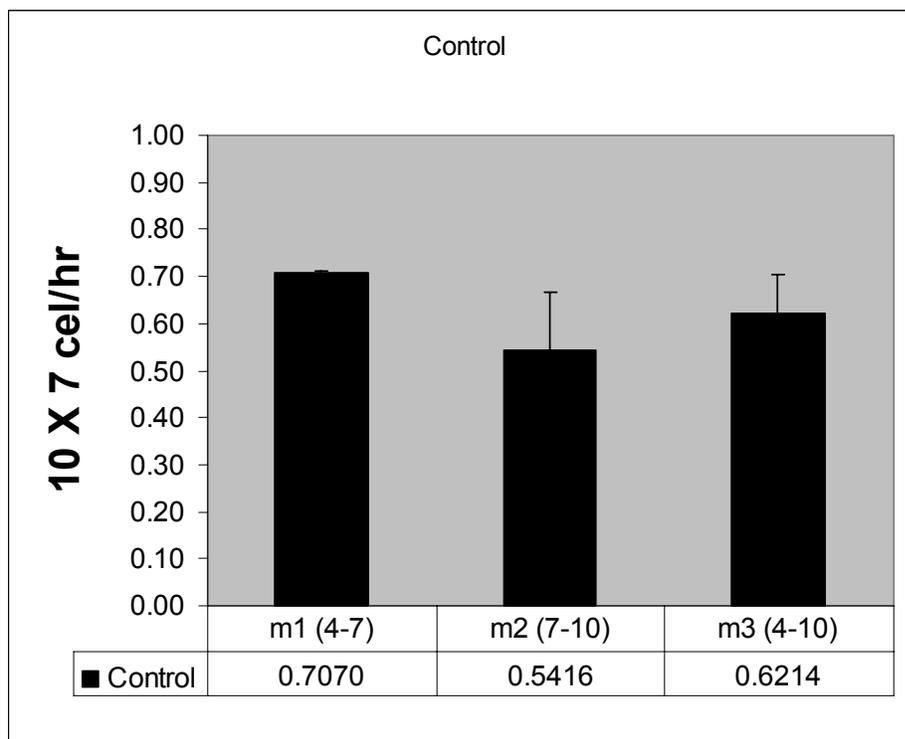
En la Grafica 2 se puede observar que la duración del periodo de adaptación de la cepa al medio usado para la fermentación es de 2 horas, iniciándose el crecimiento acelerado a partir de esta hora y hasta la hora 4, a partir de la cual se entra en una franca etapa de crecimiento exponencial. En la etapa del crecimiento exponencial, las células se encuentran totalmente adaptadas al medio por lo que su metabolismo está operando óptimamente. En esta etapa, que se dispara en la hora 4 y termina hasta la hora 10, no hay restricciones de disponibilidad de nutrientes ni efectos adversos por la acumulación de metabolitos secundarios que afecten el crecimiento. De acuerdo a la duración de la fase exponencial (de la hora 4 a la 10) se determinaron los valores correspondientes a la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) = 0.27, y al tiempo de duplicación (t_d) = 2.56. A partir de la hora 10 y hasta la 11 el cultivo entra en una etapa de desaceleración del crecimiento para entrar finalmente en una fase estacionaria a partir de la hora 11, en la que los nutrientes empiezan a ser un factor limitante del crecimiento así como la acumulación de metabolitos secundarios. En esta fase (no mostrada en la figura), el número de nuevas células iguala al número de células que mueren. Debido a que lo que se buscaba con la estandarización del proceso de fermentación era la reproducibilidad para la aplicación de estímulos inductores a una t dada, y el establecimiento de las

características normales de crecimiento (bajo las condiciones experimentales de cultivo) para poder establecer patrones de comparación, se determinó que el tiempo ideal para dar los pulsos inductivos corresponde a la fase media exponencial ($t = 7$), por ser un periodo en el que las células se encuentran metabólicamente al 100%, y ni la disponibilidad de nutrientes ni la acumulación de metabolitos secundarios son factores limitantes para el crecimiento.

Como se puede observar en la grafica 3, los valores calculados para m_1 , m_2 y m_3 de la curva de crecimiento basal (control) son 0.7070, 0.5416 y 0.6214 respectivamente. Bajo esta perspectiva de análisis, las μ_{\max} y t_d de los segmentos de la fase exponencial se pueden observar en la tabla 3; estos fueron considerados como los parámetros normales de crecimiento para *D. hansenii*.



Gráfica 2. Curva de crecimiento de *D. hansenii* en condiciones basales.



Grafica 3. Representación gráfica de los valores obtenidos de las fases de crecimiento exponencial, m1, m2 y m3, en el crecimiento basal de *D. hansenii*.

Tabla III. Velocidades específicas de crecimiento y tiempo de duplicación de *D. hansenii* en los diferentes tratamientos con metales y su control.

| Metal | Velocidad específica de crecimiento μ_{max} (hr ⁻¹) | | | Tiempo de duplicación (hr) | | |
|---------|---|-----------|-----------|----------------------------|-----------|-----------|
| | m1(4-7) | m2 (7-10) | m3 (4-10) | m1(4-7) | m2 (7-10) | m3 (4-10) |
| Control | 0.47 | 0.17 | 0.32 | 1.47 | 4.07 | 2.16 |

6.1.2 Actividad superóxido dismutasa

Como se observa en la figura 4, a lo largo de la cinética de crecimiento la actividad SOD permanece constante (figura 4A y B), en este caso solo se observan los dos homodímeros (DhSODC1 y DhSODC2; Hernández 1997; Hernández y Ochoa, 1999) siendo la forma más electronegativa aparentemente más activa. Para discriminar entre las actividades Cu,Zn SOD y Mn SOD se envenenó la Cu,Zn SOD mediante la incubación de los geles correspondientes en el sustrato conteniendo NaCN 100 mM. Como se observa en la figura 4C, la actividad de la enzima MnSOD no es constante a lo largo de la cinética de crecimiento (en la figura 4C solo se presenta el perfil electroforético de actividad Mn SOD del tiempo 1 al 7), aparentemente existe un incremento gradual de la actividad, concomitante con el aumento de la densidad celular. Cabe mencionar que este efecto de actividad mínima al inicio de la curva de crecimiento (figura 4C carriles 2 y 3) con un incremento gradual hasta una aparente estabilización, no es el resultado de diferencias en la concentración de proteínas totales aplicadas por línea, pues como se estableció en la sección 5.4.2.1 la cantidad de proteínas fue estandarizada a 50 µg, por lo que las diferencias en los patrones de actividad son resultado de diferencias en la proporción de proteínas con actividad SOD en la muestra.

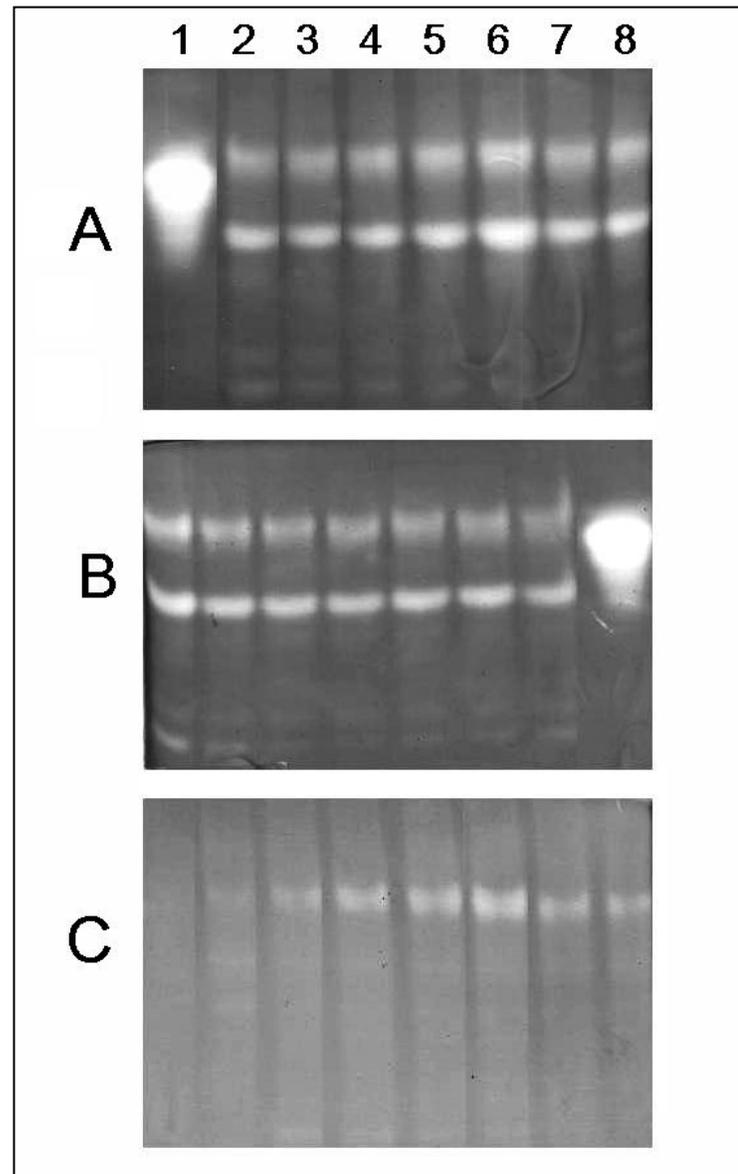
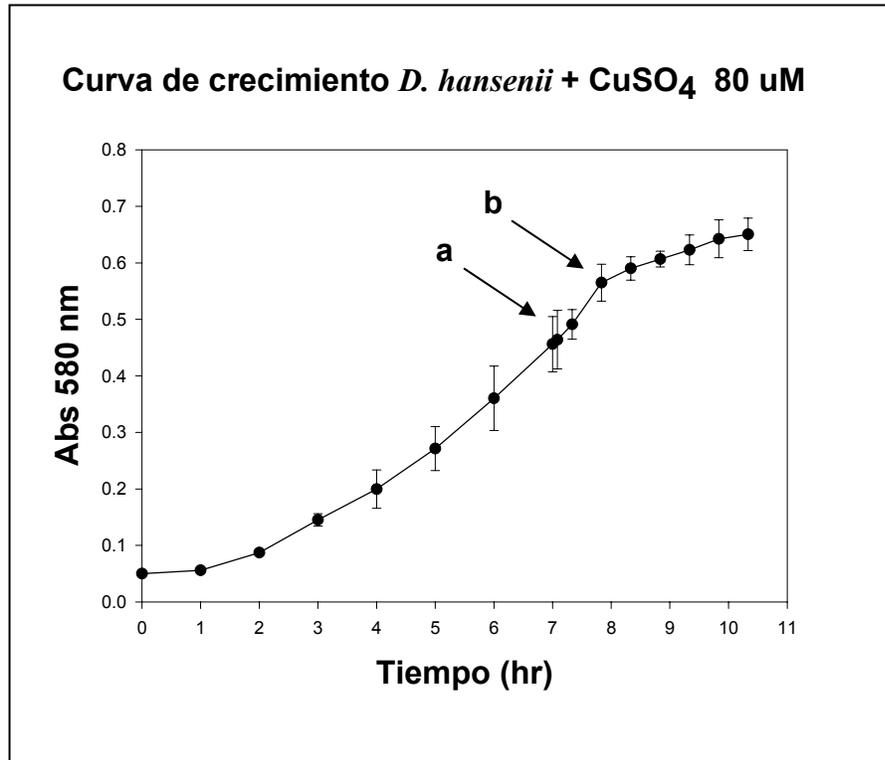


Figura 4. Actividad Superóxido dismutasa de los homogenizados celulares de *D. hansenii* en condiciones basales sobre PAGE nativa 7.5 %. A. Carril 1 estándar de actividad Cu,Zn SOD de *S. cerevisiae*; carriles 2 - 8 homogenizados celulares correspondientes a las horas de cultivo 1- 7. B. Carriles 2 - 8 homogenizados celulares correspondientes a las horas de cultivo 7-13, carril 14 estándar para actividad. C. PAGE nativa 7.5 % con NaCN 100mM Carril 1 estándar para actividad Cu,Zn SOD; carriles 2 - 8 homogenizados celulares correspondientes a los horas de cultivo 1- 7. Método de tinción NBT, (Beauchamp y Fridovich, 1971)

6.2 Experimentos de inducción mediante sales metálicas

6.2.1. Cobre

6.2.1.1 Crecimiento



Grafica 4. Curva de crecimiento de *D. hansenii* inducido con CuSO₄. a, tiempo de inducción 7 hr, b tiempo de recuperación 8 hr.

En la grafica 4 al adicionar CuSO₄ 80 μ M (concentración final) al tiempo 7, hay una disminución inmediata del crecimiento (punto a) con una duración del período crítico menor a 30 min. Posteriormente, se observa una recuperación del crecimiento (punto b) 60 minutos después del pulso inductivo, y a partir de ahí una estabilización del crecimiento. A pesar de la adaptación de las células observada a partir de la hora 8 y hasta el final del periodo de evaluación (t=10), la μ_{max} y el t_d no se recuperan del todo, de acuerdo a los parámetros establecidos en las

condiciones normales de cultivo (tabla 3, grafica 3). De acuerdo a la definición de efectos considerando los parámetros establecidos en el punto 5.2.3, se puede establecer que el efecto final de la adición de CuSO_4 en el crecimiento de *D. hansneii* es inocuo pues aunque en la gráfica se observa un efecto, este no es estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) en términos de m_2 , m_3 (tabla 7).

6.2.1.2 Actividad superóxido dismutasa.

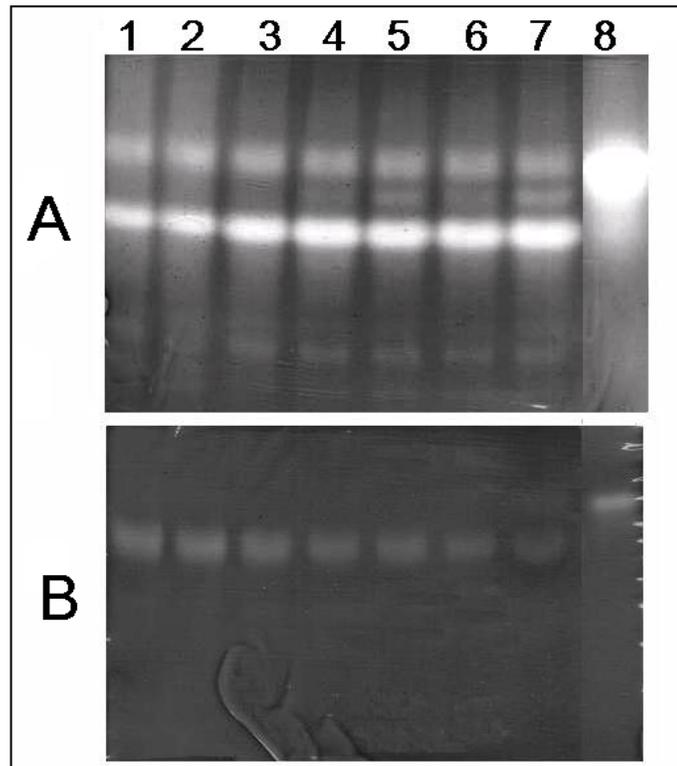
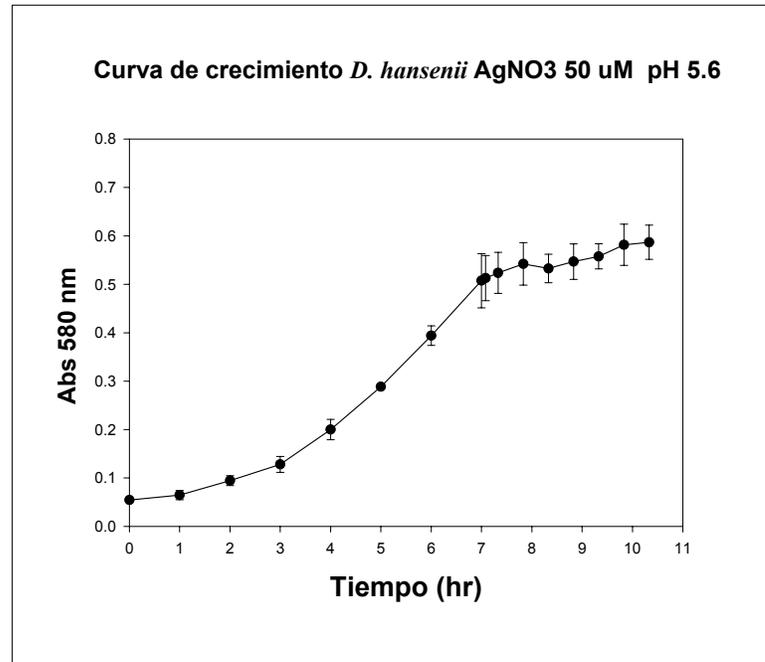


Figura 5. Actividad Superóxido dismutasa de los homogenizados celulares de *D. hansneii* inducidos con CuSO_4 sobre PAGE nativa 7.5 %. A. Carriles 1 – 7 homogenizados celulares correspondientes a los horas de cultivo 7.08 - 9.83. Carril 8 estándar para actividad Cu,Zn SOD de *S. cerevisiae*. B PAGE nativa 7.5 % con NaCN 100mM. Carriles 1 – 7 homogenizados celulares correspondientes a los horas de cultivo 7.08 - 9.83. Carril 8 estándar para actividad Cu,Zn SOD. Método de tinción NBT, (Beauchamp y Fridovich, 1971)

El análisis de la figura 5A nos muestra la actividad SOD a partir del tiempo 7 (carril 1) de la cinética de crecimiento en donde esta permanece constante por un breve periodo de 20 minutos después de la inducción siendo visibles solamente los dos homodímeros (DhSODC1 y DhSODC2; Hernández 1997; Hernández y Ochoa, 1999) de forma similar al perfil de la curva basal, inmediatamente después se aprecia un incremento en la actividad de la forma mas electronegativa, este aumento se intensifica a partir del tiempo 8 y al mismo tiempo se activa una nueva isoforma la cual presenta una electronegatividad intermedia. Para discriminar entre las actividades Cu,Zn SOD y Mn SOD se envenenó la Cu,Zn SOD mediante la incubación de los geles correspondientes en el sustrato conteniendo NaCN 100 mM. La figura 5B muestra que la actividad de la enzima Mn SOD disminuye a lo largo de la cinética de crecimiento (en la figura 5B solo se presenta el perfil electroforetico de actividad Mn SOD del tiempo 7 – 9.8) esta disminución en la actividad se relaciona directamente con el aumento en la actividad de las isoformas Cu,Zn SOD, a partir del tiempo 8.

6.2.2. Plata

6.2.2.1 Crecimiento celular.



Grafica 5. Curva de crecimiento de *D. hansenii* inducido con AgNO₃

La gráfica 5 muestra que al adicionar AgNO₃ 50 µM (concentración final) al tiempo 7, hay una disminución inmediata del crecimiento sin recuperación aparente, hasta las 10 horas de cultivo. De acuerdo a la definición de efectos considerando los parámetros establecidos en el punto 5.2.3, se puede establecer que el efecto final de la adición de AgNO₃ en el crecimiento de *D. hansenii* es tóxico, tendiendo a ser letal pues la pendiente de un valor de $m_1 = 0.7$ cae a un valor de $m_2 = 0.17$, siendo el valor de $m_3 = 0.4$ (Grafica 8). Estos cambios observados en las pendientes son estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) en términos de m_2 y m_3 ANOVA (tabla 7).

6.2.2.2 Actividad Superóxido Dismutasa.

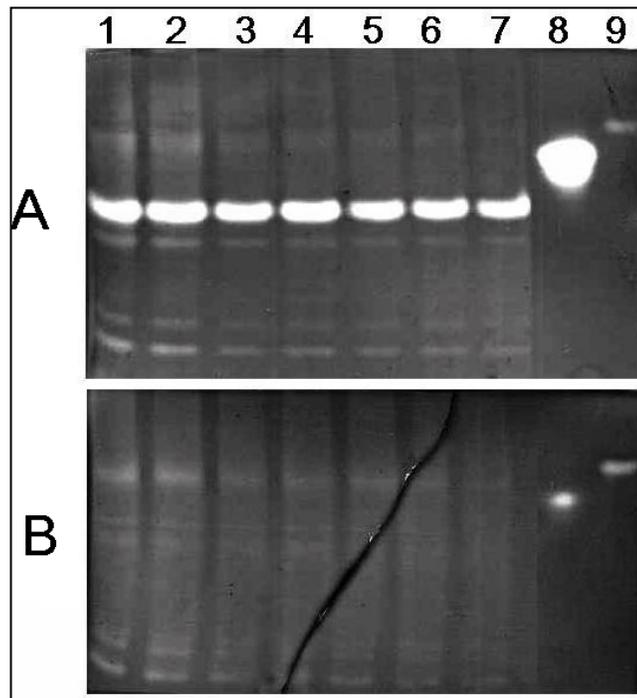
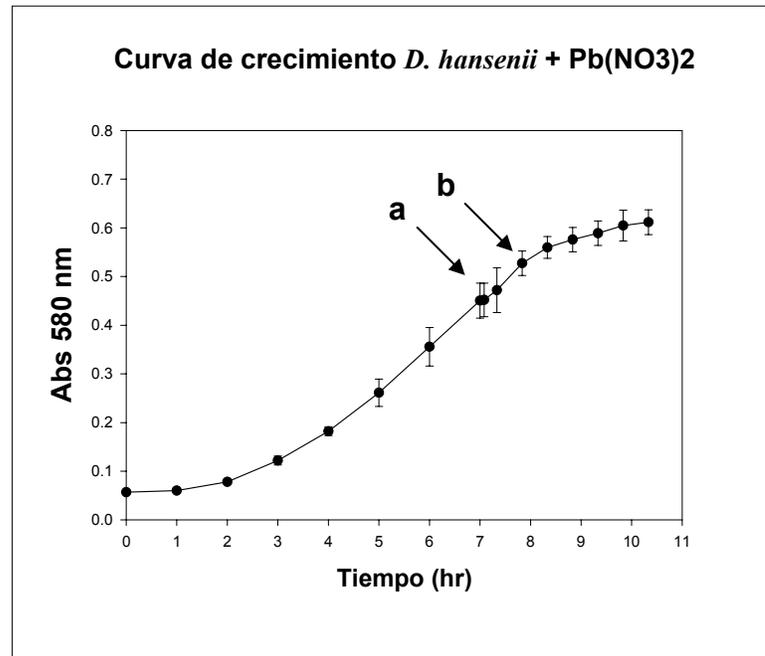


Figura 6. Actividad Superóxido dismutasa de los homogenizados celulares de *D. hansenii* inducidos con AgNO_3 sobre PAGE nativa 7.5 %. A. Carriles 1 – 7 homogenizados celulares correspondientes a los horas de cultivo 7.08 – 9.8. Carril 8 estándar para actividad Mn SOD de *E. coli*; carril 9 estándar para actividad Cu,Zn SOD de *S. cerevisiae*. B. PAGE nativa 7.5 % con NaCN 100mM. Carriles 1 – 7 homogenizados celulares correspondientes a los horas de cultivo 7.08 – 9.8. Carril 8 estándar para actividad Cu,Zn SOD; carril 9 estándar para actividad Mn SOD. Método de tinción NBT, (Beauchamp y Fridovich, 1971).

La figura 6A muestra como la inducción con AgNO_3 afecta el patrón de actividad SOD, el efecto es visible 20 minutos después de la inducción; el efecto principal está dado por una aparente disminución de la DhSODC2 y esto se ve reflejado en también en el patrón de bandeado de la figura 6B correspondiente al gel tratado con NaCN 100mM y en el cual solo se observan enzimas Mn SOD.

6.2.3. Plomo

6.2.3.1 Crecimiento celular.



Grafica 6. Curva de crecimiento de *D. hansenii* inducido con $Pb(NO_3)_2$

La grafica 6 muestra como la cinética de crecimiento es afectada ligeramente después de la inducción con $Pb(NO_3)_2$ al tiempo 7 (punto a) y permaneciendo hasta el tiempo 8 (punto b), logrando recuperarse después de este periodo de tiempo con una tendencia positiva, de acuerdo a la definición de efectos considerando los parámetros establecidos en el punto 5.2.3, se puede establecer que el efecto final de la adición de $Pb(NO_3)_2$ en el crecimiento de *D. hansenii* es tóxico, debido a que la pendiente de un valor de $m_1 = 0.6817$ cae a un valor de $m_2 = 0.3869$, siendo el valor de $m_3 = 0.5393$. Estos cambios observados en las pendientes no son estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) en términos ANOVA (tabla 7).

6.2.3.2 Actividad superoxido.

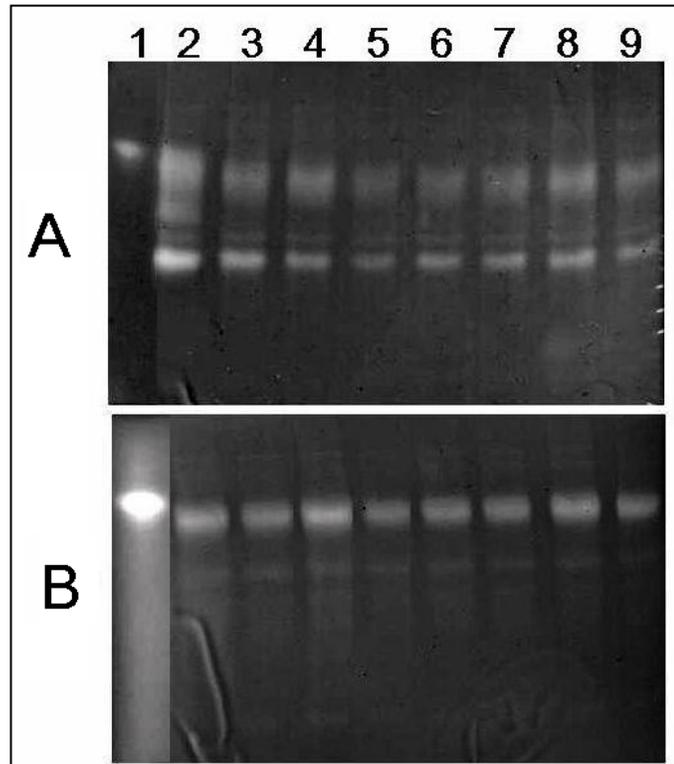


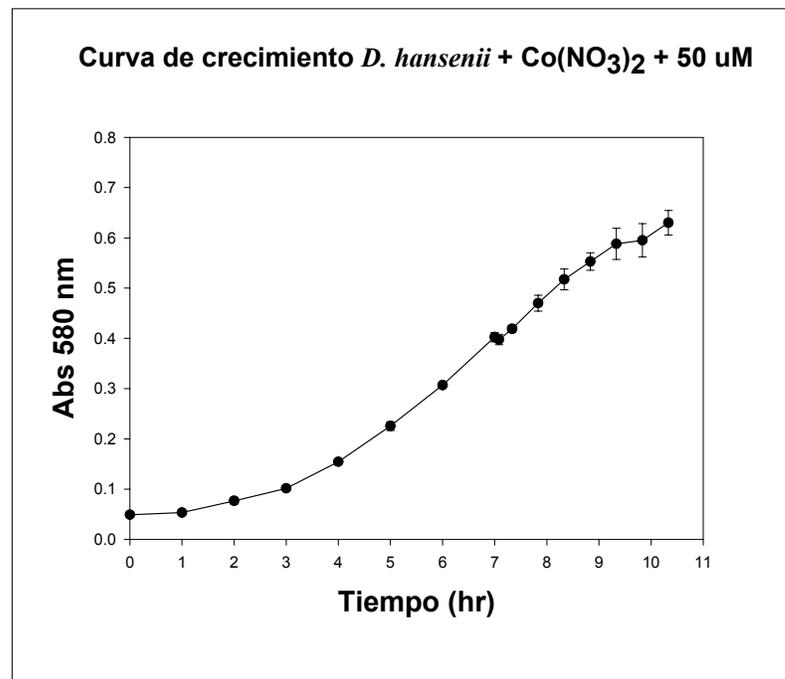
Figura 7A. Actividad Superoxido dismutasa de los homogenizados celulares de *D. hansenii* inducidos con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sobre PAGE nativa 7.5 %. A. Carril 1 estándar para actividad Mn SOD de *E. coli*; carriles 2 – 9 homogenizados celulares correspondientes a los horas de cultivo 7- 9.8. B. PAGE nativa 7.5 % con NaCN 100 mM. Carril 1 estándar para actividad Mn SOD; carriles 2 – 9 homogenizados celulares correspondientes a los horas de cultivo 7- 9.8. Método de tinción NBT, (Beauchamp y Fridovich, 1971).

La actividad SOD en el periodo de tiempo 7.08 –9.8 es presentada en la figura 7A donde inmediatamente después de la inducción con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en el tiempo 7 se ve afectada la actividad de los homodímeros DhSODC1 y DhSODC2 siendo mas evidente en el mas electronegativo (DhSODC1) al tiempo 7.8 (carril 5) y a partir del tiempo 8.3 aparentemente existe una recuperación del nivel de

actividad, Como se observa en la figura 7B, la actividad de la enzima MnSOD es constante a lo largo de la cinética de crecimiento (en la figura B solo se presenta el perfil electroforetico de actividad Mn SOD del tiempo 7.08 al 9.8).

6.2.4. Cobalto

6.2.4.1 Crecimiento celular.



Grafica 7. Curva de crecimiento de *D. hansenii* inducido con $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$

En la Grafica 7 se puede observar que la inducción con $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ no afecto drásticamente la etapa del crecimiento exponencial, si bien se vio un efecto ligero después del tiempo 9 la velocidad específica de crecimiento se recupero en un periodo de 30 minutos con una tendencia positiva en esta fase final (no mostrada en la figura). De acuerdo a la definición de efectos considerando los parámetros

establecidos en el punto 5.2.3, se puede establecer que el efecto final de la adición de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ en el crecimiento de *D. hansenii* es tóxico, tendiendo a ser positiva pues la pendiente de un valor de $m_1 = 0.6185$ cae a un valor de $m_2 = 0.3869$, siendo el valor de $m_3 = 0.5393$ (Grafica 8). Estos cambios observados en las pendientes no son estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) en términos ANOVA (tabla 7).

6.2.4.2 Actividad superoxido.

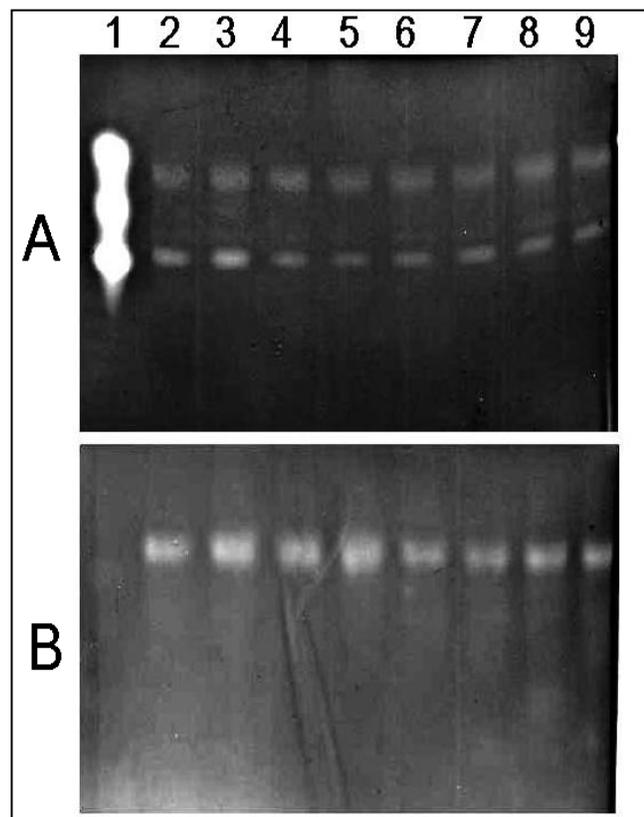
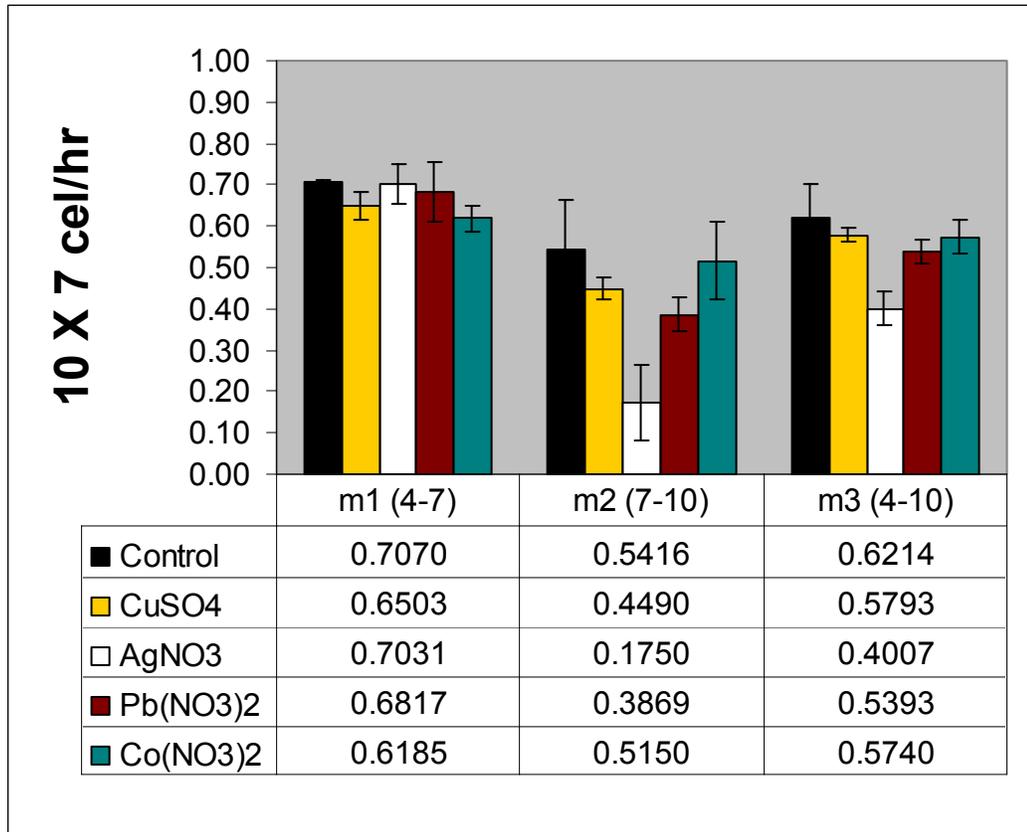


Figura 8A. Actividad Superóxido dismutasa de los homogenizados celulares de *D. hansenii* inducidos con $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ sobre PAGE nativa 7.5 % A. Carril 1 estándar para actividad Cu,Zn SOD de *S. cerevisiae*; carriles 2 – 9 homogenizados celulares correspondientes a los horas de cultivo 7.08-9.08. B. PAGE nativa 7.5 % con NaCN 100mM. Carril 1 estándar para actividad Cu,Zn SOD; carriles 2 – 9 homogenizados celulares correspondientes a los horas de cultivo 7.08- 9.08. Método de tinción NBT, (Beauchamp y Fridovich, 1971).

6.3 Análisis estadístico.



Grafica 8. Representación gráfica de los valores obtenidos de las fases de crecimiento exponencial, m1, m2 y m3, en el crecimiento de *D. hansenii* inducida con metales.

Tabla IV. Análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía de las pendientes (m1, m2 y m3) con metales.

| Analysis of Variance (abril.sta) | | | | | | | | |
|--|-------------|--------|-------------|------------|-------|------------|-------------|-------------|
| Marked effects are significant at p < .05000 | | | | | | | | |
| | SS | df | MS | SS | df | MS | F | p |
| Effect | Effect | Effect | Effect | Error | Error | Error | | |
| ABS | 0.501632452 | 2 | 0.250816226 | 0.47393768 | 42 | 0.01128423 | 22.22714491 | 2.60446E-07 |

Tabla V. Prueba de Tukey en el análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía de las pendientes (m1, m2 y m3) con metales.

| Tukey HSD test; Variable: ABS (abril.sta) | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|
| Marked differences are significant at p < .05000 | | | |
| | {1} | {2} | {3} |
| | M=.67211 | M=.41349 | M=.54293 |
| G_1:1 {1} | | 0.000118586 | 0.005165393 |
| G_2:2 {2} | 0.000118586 | | 0.005066699 |
| G_3:3 {3} | 0.005165393 | 0.005066699 | |

El análisis de varianza de 1 vía (tabla 4) así como la prueba de Tukey (tabla5) del factor Pendiente (m) Vs. Valor (dato) indica que hay una diferencia significativa entre las tres pendientes (p <0.05).

Tabla VI. Análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía de tratamiento metales vs. valor de la pendiente m3 .

| Analysis of Variance (abril.sta) | | | | | | | | |
|--|------------|--------|------------|-----------|-------|------------|------------|------------|
| Marked effects are significant at p < .05000 | | | | | | | | |
| | Effect | SS | df | SS | df | MS | F | p |
| | Effect | Effect | Effect | Error | Error | Error | | |
| ABS | 0.18974553 | 4 | 0.04743638 | 0.7858246 | 40 | 0.01964562 | 2.41460409 | 0.06466156 |

Tabla VII. Prueba de Tukey en el análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía de tratamiento metales vs. valor de la pendiente m3 .

| Tukey HSD test; Variable: ABS (abril.sta) | | | | | |
|--|-------------|------------|-------------|------------|------------|
| Marked differences are significant at p < .05000 | | | | | |
| | {1} | {2} | {3} | {4} | {5} |
| | M=.62331 | M=.55952 | M=.42627* | M=.53598 | M=.56916 |
| G_1:1 {1} | | 0.86898167 | 0.03700687* | 0.67958975 | 0.92308326 |
| G_2:2 {2} | 0.86898167 | | 0.27685437 | 0.99647065 | 0.99990377 |
| G_3:3 {3} | 0.03700687* | 0.27685437 | | 0.4692539 | 0.21491737 |
| G_4:4 {4} | 0.67958975 | 0.99647065 | 0.4692539 | | 0.98674442 |
| G_5:5 {5} | 0.92308326 | 0.99990377 | 0.21491737 | 0.98674442 | |

El análisis de varianza de 1 vía (tabla 6) así como la prueba de Tukey (tabla 7) del factor Tratamiento vs. Valor (dato) indica que:

El tratamiento con AgNO_3 es el único que presenta diferencia significativa $p = 0.0370^*$ ($p < 0.05$) de medias contra los otros tratamientos, la mayor diferencia es contra el control, seguida por los tratamientos con CuSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$.

El tratamiento con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ aparte del tratamiento con AgNO_3 es el único que presenta una significancia (p) importante contra el control, mientras que para los otros tratamientos no hay una diferencia significativa de medias.

El tratamiento de CuSO_4 no presenta diferencias de medias respecto al Control, los tratamientos con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, al grado de presentar con $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ un valor muy cercano a su media, con el tratamiento de AgNO_3 es el único tratamiento que presenta diferencia de medias, pero al menos en este programa no es significativa.

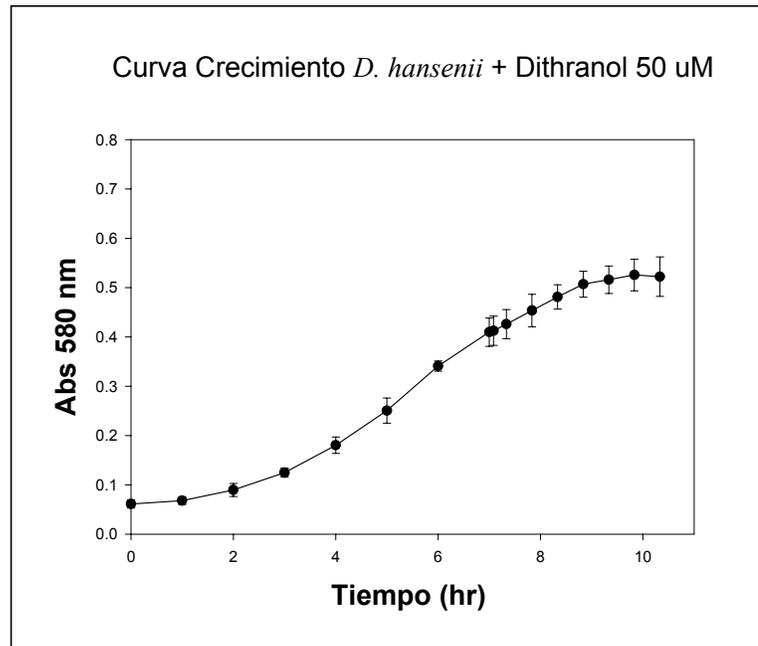
El tratamiento de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ es el que mas se ajusta a la media de CuSO_4 con una significancia de 1.000 y el que menor diferencia presenta contra el control.

El Control solo tuvo una diferencia de medias significativa contra el tratamiento de AgNO_3 en los otros tres tratamientos la diferencia mayor de medias presenta el orden $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CuSO_4 y $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$.

6.3 Experimentos de inducción con sustancias pro-oxidantes

6.3.1 Ditranol

6.3.1.1 Crecimiento celular.



Grafica 9. Curva de crecimiento de *D. hansenii* inducido con Ditranol

En la grafica 9 se observa como la inducción con ditranol al tiempo 7 afecta la velocidad de crecimiento, de acuerdo a la definición de efectos considerando los parámetros establecidos en el punto 5.2.3, se puede establecer que el efecto final de la adición de ditranol en el crecimiento de *D. hansenii* es tóxico, tendiendo a ser positiva pues la pendiente de un valor de $m_1 = 0.5900$ cae a un valor de $m_2 = 0.2867$, siendo el valor de $m_3 = 0.4258$ (Grafica 11).

6.3.1.2 Actividad superoxido.

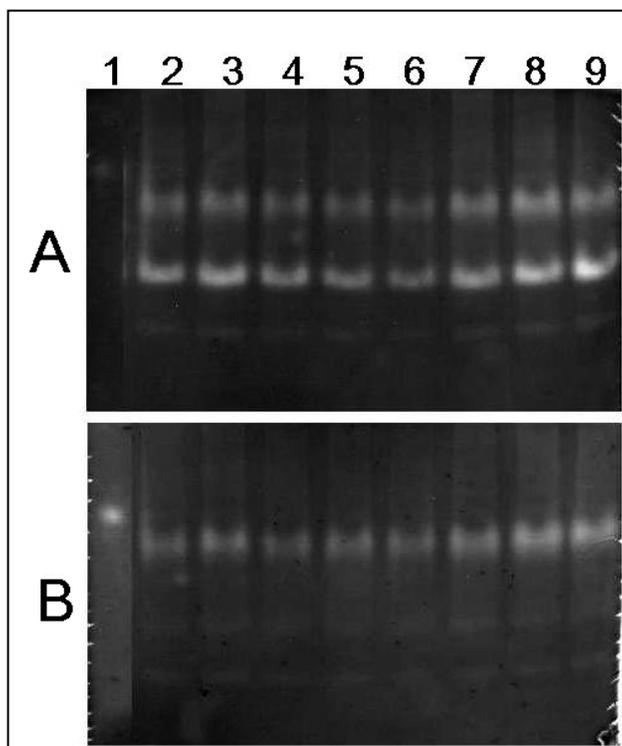


Figura 9. Actividad Superoxido dismutasa de los homogenizados celulares de *D. hansenii* inducidos con ditranol sobre PAGE nativa 7.5 %. A. Carril 1 estándares de actividad Mn SOD de *E. coli*; carriles 2 – 9 y homogenizados celulares correspondientes a los horas de cultivo 7.08- 9.8. B. PAGE nativa 7.5 % con NaCN 100mM. Carril 1 estándares de actividad Mn SOD de *E. coli*; carriles 2 – 9 y homogenizados celulares correspondientes a los horas de cultivo 7.08- 9.8. Método de tinción NBT, (Beauchamp y Fridovich, 1971)

La actividad SOD presentada en la figura 9A correspondiente a la inducción con ditranol nos muestra como es afectado el patrón electroforetico de la DhSODC1 modificando aparentemente su expresión o actividad. En el tiempo 8.8 (carril 7) se puede apreciar una recuperación, en términos de actividad, dada básicamente por el incremento en la actividad de la Mn SOD (figura 9B).

6.3.2 Hipoclorito de sodio

6.3.2.1 Determinación cualitativa de la concentración de NaOCl a usar en los experimentos de inducción

Después de incubar las placas de YPD-agar a 30°C durante 48 horas, se midieron los halos de inhibición en el crecimiento de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* (Figura 10) producidos por las diferentes concentraciones de NaOCl aplicadas en los discos de papel filtro. Los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento producidos se muestran en la tabla 5. Es evidente que la sensibilidad de *S. cerevisiae* al NaOCl es mayor que la de *D. hansenii*. Usando las mismas concentraciones de NaOCl los halos de inhibición del crecimiento de *D. hansenii* son en promedio 50% menores que los producidos en las placas sembradas con *S. cerevisiae*. Por otra parte, se determinó que la concentración de NaOCl que produce un halo de inhibición de 10 mm en *D. hansenii*, bajo las condiciones de prueba, es de 50µg. Sin embargo, estos resultados son cualitativos, por lo que la actividad antimicrobiana del NaOCl se determinó a partir de esta información, en suspensiones celulares cuantificando el número de unidades formadoras de colonia después de cada tratamiento.

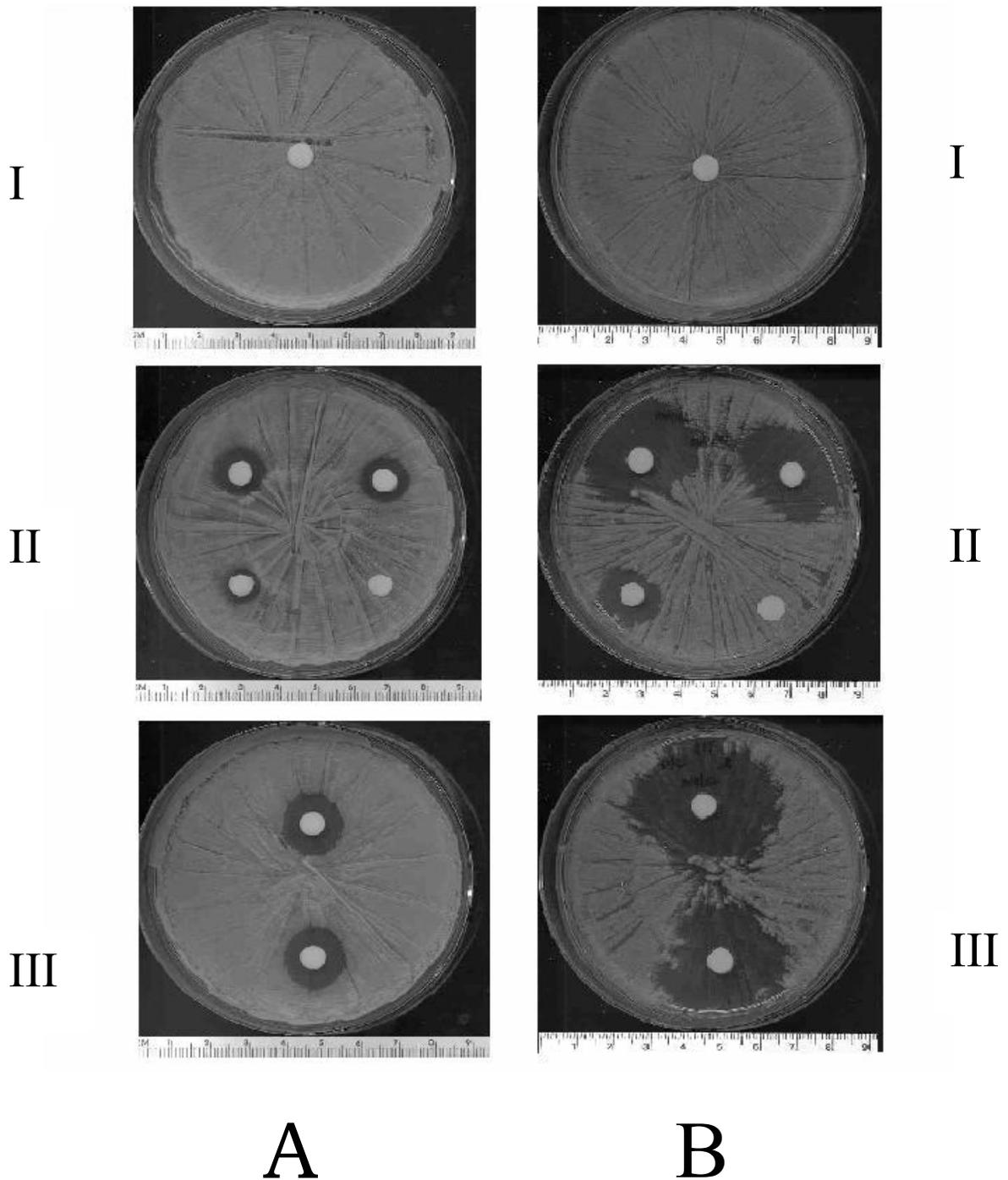


Figura 10. Prueba de sensibilidad a diferentes concentraciones de NaOCl mediante la técnica de difusión en disco. Paneles A, *D. hansenii*; paneles B, *S. cerevisiae*. I: control negativo, II: 0, 1.6, 3.3 y 5 µg de NaOCl en cada disco (de derecha a izquierda y de abajo hacia arriba) y III: 6.6 y 8.3 µg (de abajo hacia arriba).

Tabla VIII. Sensibilidad de levaduras a diferentes concentraciones de NaOCl mediante la técnica de difusión en disco.

| Rotulo | NaOCl _t (µg) | Diámetro (mm) | |
|--------|-------------------------|--------------------|----------------------|
| | | <i>D. hansenii</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 150 | 1500 | 47 | nd |
| 125 | 1250 | 37 | nd |
| 100 | 1000 | 30 | nd |
| 75 | 750 | 28 | nd |
| 50 | 500 | 24 | nd |
| 25 | 250 | 18 | 40 |
| 20 | 200 | 17 | 30 |
| 15 | 150 | 14 | 28 |
| 10 | 100 | 12 | 24 |
| 5 | 50 | 10 | 18 |
| 0 | 0 | 0 | 0 |

6.3.2.2 Determinación cuantitativa de la concentración de NaOCl a usar en los experimentos de inducción

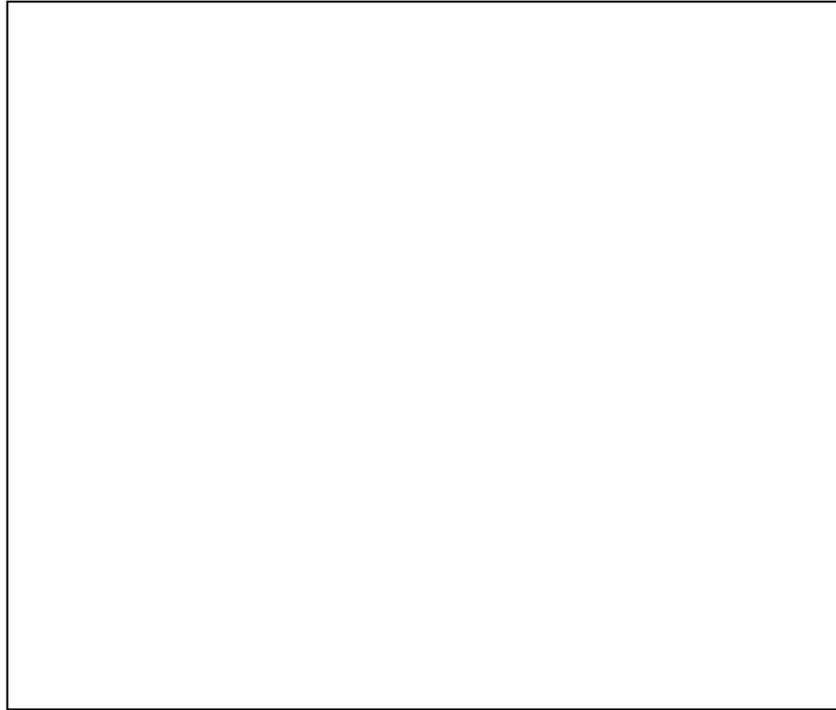
Después de seguir el protocolo establecido para determinar cuantitativamente el efecto de la concentración de NaOCl (tabla 2) en la sobrevivencia de células de *D. hansenii* en solución, se encontró que la concentración de NaOCl determinada mediante el método cualitativo en sensidiscos (50µg totales en 30 µL de una solución de 1.6µg/µL), no dejaba células sobrevivientes (tabla 8), así como ninguna concentración superior a esta. De acuerdo a las diluciones seriadas efectuadas en el experimento cuantitativo, se encontró que a partir de una dilución de 1.6×10^{-2} se obtenían unidades formadoras de colonias. Así mismo, se observó que de acuerdo al conteo directo de células hay una diferencia de alrededor del 88% respecto al número de unidades formadoras de colonias en placa. Así de un conteo teórico de 3500 células /mL el número real de células viables es de ~3080. Como se puede apreciar en la tabla 9 a partir de la concentración de 1.6×10^{-3} se presenta una disminución de la viabilidad de alrededor del 15%, lo que refleja un efecto ligeramente tóxico a nivel celular.

Tabla IX. No. de colonias formadas en la placa.

| Rotulo | Conc. final de NaOCl ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | No. de colonias |
|--------|--|-----------------|
| 1 | 1.6 | 0 |
| 2 | 1.6×10^{-1} | 0 |
| 3 | 1.6×10^{-2} | 1 |
| 4 | 1.6×10^{-3} | 273 |
| 5 | 1.6×10^{-4} | 263 |
| 6 | 1.6×10^{-5} | 283 |
| 7 | 1.6×10^{-6} | 298 |
| 8 | 0 | 308 |

De acuerdo a estos resultados se seleccionó la concentración de 1.6×10^{-3} para realizar los ensayos del efecto de NaOCl en el crecimiento y la actividad SOD en *D. hansenii*, por lo que el volumen de Clorox[®] (NaOCl al 5%) necesario para obtener una concentración final de $1.6 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ es $32 \mu\text{L}$ (por litro de medio), resultando una concentración final de trabajo igual a $21 \times 10^{-6} \text{M} = 21 \mu\text{M}$

6.3.2.3 Crecimiento celular.



Grafica 10. Curva de crecimiento de *D. hansenii* inducido con NaOCl

La adición de NaOCl tuvo en efecto ligero (o inocuo) como se puede apreciar en la grafica x6, a pesar de que en términos de la definición de efectos considerando los parámetros establecidos en el punto 5.2.3, se puede establecer que el efecto final de la adición de NaOCl en el crecimiento de *D. hansenii* es tóxico, tendiendo a ser positiva pues la pendiente de un valor de $m_1 = 0.6427$ cae a un valor de $m_2 = 0.4437$, siendo el valor de $m_3 = 0.5472$ (Grafica 11).

6.3.2.4 Actividad Superoxido.

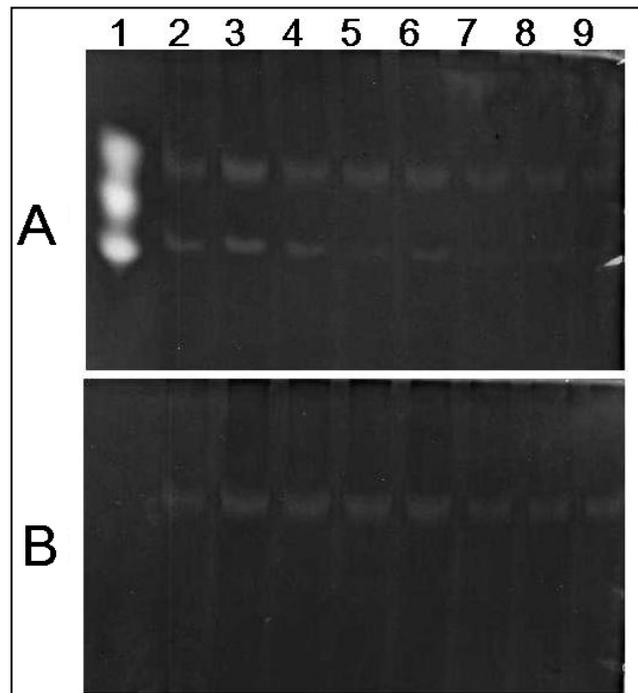
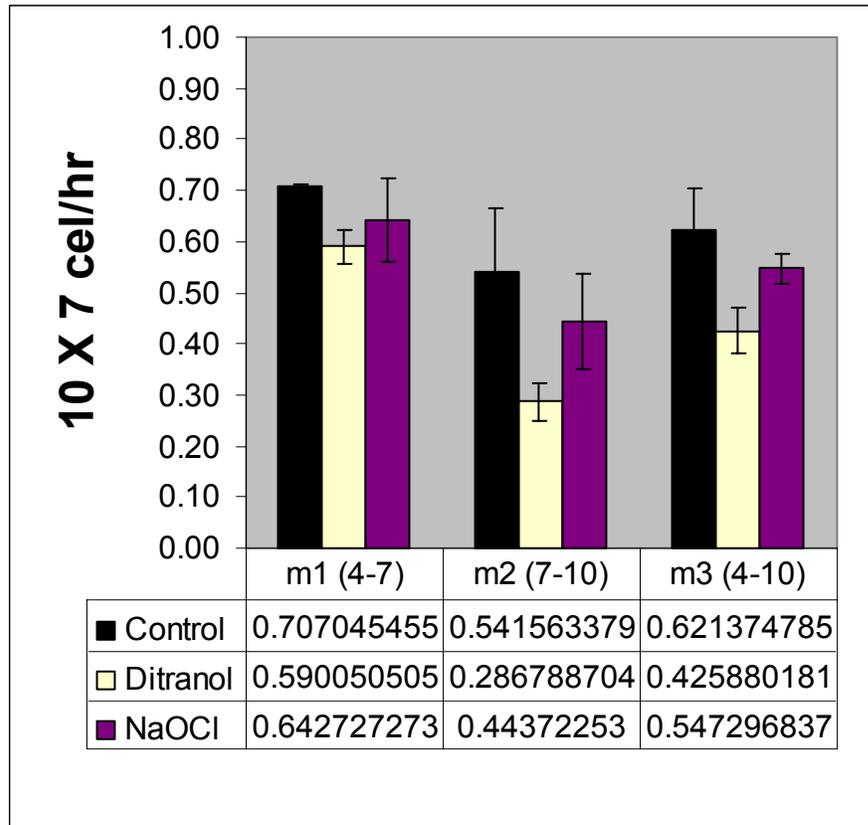


Figura 11. Actividad Superoxido dismutasa de los homogenizados celulares de *D. hansenii* inducidos con NaOCl sobre PAGE nativa 7.5 %. A. Carril 1 estándares de actividad Cu,Zn SOD de *S. cerevisiae*; carriles 2 – 9 homogenizados celulares correspondientes a los horas de cultivo 7.08- 9.8. B. PAGE nativa 7.5 %. Carril 1 estándares de actividad Cu,Zn SOD de *S. cerevisiae*; carriles 2 – 9 homogenizados celulares correspondientes a los horas de cultivo 7.08- 9.8. Método de tinción NBT, (Beauchamp y Fridovich, 1971).

La inducción con el NaOCl modificó el patrón electroforetico de la actividad SOD como se aprecia en la figura 11A en donde en un periodo de 20 minutos (carriles 2-4) la actividad del homodímero DhSODC2 y la Mn SOD se ve disminuida como se aprecia en la figura 11 B.



Grafica 11. Representación grafica de los valores obtenidos de las fases de crecimiento exponencial, m1, m2 y m3, en el tratamiento con sustancias prooxidantes.

El análisis de varianza de 1 vía así como la prueba de Tukey del factor Tratamiento vs. Valor (dato) indica que el tratamiento con ditranol es el único que presenta diferencia significativa $p = 0.00670^*$ ($p < 0.05$) de medias contra los otros tratamientos de sustancias pro-oxidantes.

7. DISCUSION

7.1 Condiciones de crecimiento basal

De acuerdo al planteamiento metodológico descrito en el punto 5.2, se logró estandarizar con un alto grado de reproducibilidad, el método de cultivo en un fermentador de 2 litros, con condiciones de agitación, aireación y temperatura controladas, lo que nos permitió determinar las características de crecimiento normales de *D. hansenii*.

Las diferencias observadas en relación a los patrones electroforéticos de actividad SOD entre los reportes de Hernández (1997) y Hernández y Ochoa (1999) y el presente trabajo, se pueden atribuir a las diferencias en las condiciones de cultivo y el tiempo de cosecha de las células. Por un lado, en los citados trabajos los cultivos se realizaron en recipientes plásticos de 60L, conteniendo 30 L de medio, usando como agente antimicrobiano Halox E-100 a razón de 2mL/L (Ochoa et al, 1995). Las condiciones de cultivo fueron 48 h de incubación a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), con una aereación de 3.3 L/min. De acuerdo a los resultados que presentan (Ochoa et al 1995), bajo aquellas condiciones la fase exponencial tiene una duración de 30 horas (de $t = 12$ a $t = 42$), por lo que la cosecha de las células se lleva a cabo a la hora 48 de cultivo que corresponde el inicio de la fase estacionaria. Es importante mencionar que el sistema de cultivo utilizado en el presente trabajo controla varios parámetros (Ramírez, 1998), optimizando la agitación y aireación para obtener el mayor rendimiento en relación a la fuente de carbono proporcionada y a la duración total del proceso de fermentación.

7.2 Experimentos de inducción mediante sales metálicas

Las concentraciones de inducción con CuSO_4 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ produjeron un ligero efecto tóxico en la levadura, debido a que no se mermó la capacidad de reproducirse y tampoco hubo una tendencia negativa en su μ_{max} (tabla3) que nos indicara muerte celular, esto pudo deberse a la naturaleza de estos inductores que por ser metales divalentes pueden exitosamente substituir al ion cobre en el sitio activo de los homodímeros Cu,Zn SOD de *D. hansenii*, generando nuevas isoformas a un nivel de regulación post-traducciona. Lo cual probablemente indica que tanto el Co^{+2} y el Pb^{+2} , reconozcan el sitio de unión del Cu^{+2} en el factor de transcripción Acep1.

La movilidad e intensidad de las isoformas puede deberse a variaciones en la eficiencia de incorporación de metales exógenos (alta concentración) y la resultante actividad de enzima. Siendo esta enzima regulada a 2 niveles transcripcionalmente mediante el factor de transcripción Acep1 y post – traduccionalmente mediante la incorporación de metales al sitio activo a apoenzimas .

Además el cobre puede modular la CuZnSOD de levaduras a nivel transcripcional vía Ace1p (Carri *et al.*, 1990; Gralla *et al.*, 1991). Un sitio de union al Acep1 se ha identificado en el promotor del gen *sod1* y la habilidad del cobre para unirse a este factor transcripcional se ha demostrado *in vitro* (Carri *et al.*, 1990; Gralla *et al.*, 1991; Culotta *et al.*, 1995). Estos datos, junto a la inducción de ARNm en presencia de AgNO_3 , sugieren un segundo rol para la

SODC en levaduras, aparentemente la Cu,Zn SOD de *S. cerevisiae* puede funcionar también como quelante de metales (Ciriolo *et al.*, 1994); este mismo efecto fue observado en *D. hansenii*.

El factor de transcripción Ace1p es una proteína de 225 aminoácidos con una región altamente básica en el extremo amino terminal (100 aminoácidos) el cual rodea el dominio de unión al ADN y se activa por iones Cu^{+2} o Ag^{+1} (Fürst *et al.*, 1988). El dominio de unión a ADN del Acep1 sufre un cambio conformacional dependiente de cobre, que dirige el plegamiento de este dominio para unirse a la secuencia consenso 5'-TTTTGCTG-3' en el promotor de el gen *sod-1* y *mtt*. El factor de transcripción Acep1 contiene en su extremo amino terminal una serie de 12 residuos de cisteína, 11 de los cuales son esenciales para la coordinación trigonal de 4 o 6 átomos de cobre en su forma reducida (Cu I); el Cu (II) y la plata se coordinan con el Acep1 mediante una coordinación geométrica diferente (Fürst and Hamer, 1989). Se ha reportado que la unión del Zn o Cd es diferente a la del Cu o Ag, estos metales al parecer prefieren una coordinación tetraédrica vía tioles. Por lo tanto, es claro que las diferencias en la coordinación química de los metales dictan la especificidad de la activación del gen en respuesta a la actividad redox (Thorvaldsen *et al.*, 1994).

El ion Ag^{+1} , fue el único metal no divalente con el que se experimento, tuvo un mayor efecto tóxico en la levadura *D. hansenii*, se puede observar claramente el cambio en la μ_{max} en el periodo posterior a la inducción, a pesar

de este efecto hay que destacar que en ninguna de las cinéticas inducidas con metales hubo una muerte celular drástica en la que la velocidad específica de crecimiento disminuyera del valor de su μ_{Max} que tuvo un promedio de 0.3 hr^{-1} . La adición de AgNO_3 produjo un efecto tóxico en el crecimiento de *D. hansenii* afectando el patrón de actividad SOD, en donde se puede establecer que el efecto principal está dado por la disminución de la actividad de la DhSODC1 y la MnSOD. Este resultado nos indica que el homodímero DhSODC1 es el encargado de funcionar en estas circunstancias como quelante de metales, mientras que el DhSODC2 continúa inalterada y permaneciendo con la función antioxidante.

En relación a la regulación post-transcripcional se sabe que una proteína, chaperona de cobre (CCS- copper chaperone for SOD), está involucrada en la transferencia de los iones metálicos activo de la CuZnSOD. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que la CCS reconoce a la CuZnSODs para la inserción del metal aún se desconoce. Recientemente se ha propuesto dos modelos para el estado de oligomerización durante la transferencia del cobre: 1) un heterodímero constituido por un monómero de la CCS y un monómero de la SOD (Lamb *et al.*, 2000), y 2) un dímero de dímeros que involucran interacciones entre los dos homodímeros (Hall *et al.*, 2000). Se cree que la inserción del cobre por la CCS a la SOD involucra la cooperación entre tres diferentes regiones de la CCS: un dominio I amino-terminal que es homólogo al Atx1p de las metalchaperonas, una porción central (dominio II)

homólogo a la SOD1, y un péptido corto en el extremo carboxi-terminal que es único en las moléculas de CCS (dominio III). Se ha postulado que en dominio II participa en el reconocimiento de la SOD1 (Casareno *et al.*, 1998), mientras que fragmentos pequeños de los extremo amino- y carboxi-terminal de la CCS facilitan la unión y liberación del cobre en la CuZnSOD (Schmidth *et al.*, 1999a). La homología entre el dominio II de la CCS y la SOD1 esta alrededor del 50% en términos de identidad y 60% en términos de similitud (Casareno *et al.*, 1998). De acuerdo a los resultados encontrados en el presente trabajo, la pregunta que salta a la vista es si la CCS en el caso de *D. hansenii* es capaz de funcionar en la transferencia de todos los iones metálicos o existen chaperonas metal-específicas para la incorporación de otros iones metálicos a la SOD1? A la fecha, en la literatura no existen reportes que describan el modo de inserción de los iones plata a la SOD1, aunque se ha demostrado *in vivo* su incorporación a la misma. Como resultado de la sustitución de los iones cobre por iones de plata en el sitio activo de la SOD1, la enzima pierde su capacidad antioxidante (se inactiva) dejando lugar únicamente a su función quelante. De aquí que la importancia de la SOD1 como detoxificante de iones metálicos es fundamental. Si bien, a partir de nuestros resultados no se puede establecer la presencia de la proteína inmunoreactiva, si se observó disminución de la actividad de la enzima, por lo que es probable, que al igual que se ha demostrado con la plata, estos metales sean incorporados a la SOD, puesto que se observó en la mayoría de los experimentos de exposición una disminución en la actividad de la enzima.

De acuerdo a estos resultados se puede establecer que el periodo corto de efecto tóxico durante el crecimiento celular, se puede deber a la activación del sistema de los genes *cup1* y *sod1* que codifican para las metalotioneínas y Cu,Zn SOD respectivamente, obteniendo así una sobre-expresión de estas enzimas capaces de detoxificar la célula y poder mantener la homeostasis celular, por lo anterior podríamos considerar a *D. hansenii* como una posible herramienta en Biorremediación.

7.3 Experimentos de inducción mediante sustancias pro-oxidantes.

El efecto causado por ditranol en la cinética de crecimiento de *D. hansenii* puede ser considerado el de mayor toxico, los valores finales de su velocidad específica de crecimiento tuvieron una tendencia en la cual si se hubiese seguido monitoreando probablemente encontraríamos valores que reflejarían una pendiente negativa.

Debaryomyces hansenii mostró mayor resistencia a concentraciones de hipoclorito de sodio, en comparación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ambas cultivadas con el mismo medio en las pruebas de difusión en agar, este efecto también fue visible durante el crecimiento en bioreactor, sin embargo este inductor afectó el patrón de actividad SOD en donde DhSODC2 fue disminuida.

CONCLUSIONES.

- De acuerdo al planteamiento metodológico descrito en el punto 5.2, se logró estandarizar con un alto grado de reproducibilidad, el método de cultivo en un fermentador de 2 litros, con condiciones de agitación, aireación y temperatura controladas, lo que nos permitió determinar las características normales de crecimiento de *D. hansenii*.
- Las concentraciones de los inductores utilizadas fueron las adecuadas ya que permitieron observar una respuesta inmediata de los efectos en el crecimiento y patrón electroforetico, sin llegar a ser letales para la célula de la levadura.
- Las inducciones con CuSO_4 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ muestran un ligero efecto toxico en el crecimiento, presentando cada uno patrones de bandeo de actividad SOD particulares.
- La adición de sales de AgNO_3 produjo un efecto toxico con una tendencia letal, afectando el patrón de actividad.
- El efecto en el crecimiento producido por ditranol fue toxico, modificándose el patrón electroforetico, particularmente de la SODC y SODM, afectando su expresión o actividad.

- La adición de hipoclorito de sodio (NaOCl) tuvo un efecto ligero en el crecimiento sin embargo el patrón y la actividad de la SODC se modifica y la forma 2 se ve disminuida.
- De acuerdo a estos resultados parciales podemos concluir que el periodo corto de efecto tóxico durante el crecimiento celular, se puede deber a la activación del sistema de los genes *cup1* y *sod1* que codifican para las metalotioneínas y SODC respectivamente, obteniendo así una sobreexpresión de estas proteínas capaces de detoxificar la célula y poder mantener la homeostasis celular, por lo anterior podríamos considerar a *D. hansenii* como una posible herramienta en Biorremediación.
- Conociendo el comportamiento en los niveles de expresión y actividad de la SODC bajo el efecto de ciertos inductores, se puede manipular los cultivos para producir más enzimas ó enzima con mayor actividad.

BIBLIOGRAFÍA.

- Ahearn, D. G. Roth, F. J. and Meyers, S. P. (1962). A comparative study of marine and terrestrial strains of *Rhodotorula*. *Canadian Journal of Microbiol.*, 8:121-132.
- Amano, A. Shizukuishi, S., Tamagawa, H. Tsunemitsu, A., Maekawa, K. Y. Tsunawa, S. 1990. Effects of temperature stress on expression fimbriae and superoxide dismutase by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection FEBS Lett.* 272:217-220.
- Benov, H. and Fridovich, I. 1971. *Arch. Biochem. Biophys.*, 327(2):249-253.
- Carri, M. T. Galiazzo, F., Ciriolo, M.R. and Rotilio G., 1991, Evidence for co-regulation of Cu,Zn superoxide dismutase and methallothionein gene expression in yeast through transcriptional control by copper via the ACE1 factor. *FEBS Lett.* 2278, 263-266.
- Casareno, L. R. B., Waggoner, D. and Gitlin, J.D. (1998). The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 273,23625-23628.
- Christofferson, J. O. Schütz, A., Skerfving, S., Ahlgren, L., and Mattsson, S., Ellis, K. J., Yasumura, S. and Morgan, W. D., Eds., Bocardo. 1987. *In vivo Body Composition Studies Press, Oxford, 334.*
- Ciriolo, M.R., Civitareale, P. Carri, M.T., De Martino, A. Galiazzo, F. and Rotilio, G. (1994) Purification and Characterization of Ag,Zn Superoxide Dismutase from *Saccharomyces cerevisiae* Exposed to silver. *J. Biol. Chem.* (269):25783-25787.
- Corson, L.B.; Folmer, J.; Strain, J.J.; Culotta, V.C. and Cleveland, D.W. 1999. Oxidative stress and iron are implicated in fragmenting vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae* lacking Cu,Zn superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 274, 27590-27596.
- Cousins, R. (1994). Metal elements and gene expression. *Annu. Rev. Nutr.* Vol. (14):449-469.

- Culotta, V.C.; Klomp, L.W.J.; Strain, J.; Casareno, R.L.B.; Krems, B.; Gitlin, J.D. (2000). The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272,23469-23472.
- Davenport, R.R. (1980). *Biology and Activities of Yeast*. The society for applied bacteriology symposium, series No. 9. Academic Press Inc. N. Y. 1-27.
- De Freitas, J.M.; Liba, A.; Meneghini, R.; Valentine, J.S. and Grallas E.B. 2000. Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. Role of oxidative stress in iron metabolism. *J. Biol. Chem.* 275, 11645-11649.
- Desideri, A. (1988). Differential binding of anions to the active site of Cu, Zn Superoxide Dismutase. A study of the Co,Zn Enzyme Derivative. *Journal of inorganic Biochemistry* (33):277-283.
- Endo, T.; Fujii, T.; Sato, K.; Taniguchi, N. and Fujii, J. 2000. A pivotal role of Zn-binding residues in the function of the copper chaperone for SOD1. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 276, 999-1004.
- Finnen, M. J., Lawrence, C. M., Shuster, S. 1984. Inhibition of dithranol inflammation by free radical scavengers. *Lancet* 2: 1129-1130.
- Galiazzo, F., Ciriolo, M. R., Carri, M. T., Civitareale, P. Marmocchi, L. And Rotilio, G. 1991. Activation and induction by copper of Cu,Zn superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*, presence of an inactive proenzyme in anaerobic yeast. *Eur. J. Biochem.*, 196:545-549.
- Goodsell, D. S. 1996. *Our molecular nature: the body's motors, machines and messages*. Springer-Verlag N. Y. 183.
- Grzelak, A; Skierski, J. and Bartosz, G. 2001. Decreased antioxidant defense during replicative aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* studied using the 'baby machine' method. *FEBS Lett.* 492, 123-126.
- Hall, L.T.; Sanchez, R.J.; Holloway, S.P.; Zhu, H.; Stine, J.E.; Lyons, T.J.; Demeler, B.; Schirf, V.; Hansen, J.C.; Nersissian, A.M.; Valentine, J.S.; Hart, P.J. (2000). X-ray crystallographic and analytical ultracentrifugation analyses of truncated and full-length yeast copper chaperones for SOD (Lys7): A dimer-dimer model of Lys7-SOD association and copper delivery. *Biochem.* 39,3611-3623.

- Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Free Radicals in Biology and Medicine. 1999. Oxford Science Publications. Third edition. New York. 936.
- Hernández-Saavedra, N. Y. 1990. Aislamiento y caracterización de levaduras marinas aisladas en la costa occidental de B.C.S., México. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala-UNAM. 111.
- Hernández-Saavedra, N. Y. 1992. Efecto de la salinidad en la composición de y concentración de osmoreguladores en levaduras halotolerantes. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 120.
- Hernández-Saavedra, N. Y. 1997. Caracterización de la enzima superóxido dismutasa tipo Cu,Zn de la levadura marina *Debaryomyces hansenii*, y clonación de la secuencia que la codifica a partir de ADNc. Ph. D. Thesis. CIBNOR. México. 70.
- Hernández-Saavedra, N. Y., Egly, J. M. and Ochoa-Ochoa, J. L. 1998 Cloning and sequencing of a cDNA encoding a copper-zinc superoxide dismutase enzyme from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 14:573-581.
- Hernández-Saavedra, N. Y., and Ochoa-Ochoa, J. L. 1999. Copper-zinc superoxide dismutase from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 15:657-668.
- Hiromura, M.; Sonoda, T. and Sakurai, H. 2000. Molecular cloning and characterization of a copper chaperone for copper/zinc superoxide dismutase from rat. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 275, 394-400.
- Hong, Z., Lo Verde, P. Thakur, A. Hammarskjöld, M.L. and Rekosh, D. 1992. *Exp. Parasitol.*, 75:308-332.
- Hsieh, G., Acosta D., (1991) Dithranol-induced cytotoxicity in primary cultures of rat epidermal keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* (107):16-26.
- Jacob, R. M. 1996, Risk assessment of metals; Chang L. W. Magos L. Suzuki T., *Toxicology of metals*, Boca Raton; 14.

- Jakubowski W.; Bilinski, T. and Bartoz, G. 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Rad. Med.* 28, 659-664.
- Klenner, G.S.; Lee, M.H.; Clark, M.E.; Maciejewski, D.; McGrath, D.; Rabizadeh, S.; Lyons, T.; Bredsen, D.; Jenner, P. and Maki, R.A. 2000. The copper transport protein Atox1 promotes neuronal survival. *J. Biol. Chem.* 275, 580-584.
- Kohlmeyer J., and Kohlmeyer E. (1979). *Marine ecology: The higher fungi*. Academic Press, New York. 325.
- Kurtzman, C. P. 1994. *Yeast*, 10:1727-1740.
- Lamarre, C.; LeMay, J.D.; Deslauriers, N. and Bourbonnais, Y. 2001. *Candida albicans* express an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon de entry and during the stationary phase. *J. Biol. Chem.* 276, 43784-43791.
- Lamb, A.L.; Torres, A.S.; O'Halloran, T.V.; Rosenzweig, A.C. (2000). Heterodimer formation between superoxide dismutase and its copper chaperone. *Biochem.* 39,14720-14727.
- Lamb, A.L.; Torres, A.S.; O'Halloran, T.V.; Rosenzweig, A.C. (2001). Heterodimer structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Natural Structure Biology.* 8, 751-755.
- Lippard, S.J. (1999). Free copper ions in the cell? *Science.* 284,748-749.
- Lyons, T.J. (1998). Studies of the metal binding properties and reactivity of yeast copper,zinc superoxide dismutase, the effect of Lys7p on the properties, and the implications for amyotrophic lateral sclerosis. Ph.D. thesis. University of California Los Angeles. Volume 5909B of Dissertations Abstracts International. p:4803.
- Lyons, T.J.; Nersissian, A.; Huang, H.; Yeom, H.; Nishida, C.R.; Graden, J.A.. and Gralla, E.B. 2000. The metal binding properties of the zinc site of the yeast copper zinc superoxide dismutase: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Inorg. Chem.* 5, 189-203.

- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. 1998. Bioquímica, McGraw-Hill. Segunda reimpresión, Madrid. 1283.
- McCord, J. M. and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244(22):6049-6055.
- Medina, J. J. 1996. The clock of ages, Cambridge University Press. Great Britain. 332.
- Meyers, R. A. 1995. Molecular Biology and Biotechnology. VCH Publishers Inc. New York. 523.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. and Remacle, J. 1994. *Free Rad. Biol. Med.*, 17(3):235-248.
- Ochoa-Ochoa, J. L., Ramírez-Orozco, M. Hernández-Saavedra N. Y. y Hernández-Saavedra D. 1995. *J. Mar. Biotechnol.*, 3:224-227.
- Phaff, H. J., (1986). Ecology of yeasts with actual and potential value in biotechnology. *Microb. Ecol.* 12:31-42.
- Rae, T.D.; Torres, A.S.; Pufhal, R.A. and O'Halloran, T.V. 2001. Mechanisms of Cu,Zn superoxide dismutase activation by the human metallochaperone hCCS. *B. Biol. Chem.* 276, 5166-5176.
- Ramírez-Orozco M. 1999. Evaluación del rendimiento celular y actividades de superóxido dismutasa en *Debaryomyces hansenii*. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. La Paz.
- Rapoport, A., Muter, O. (1995). Biosorption of hexavalent chromium by yeasts. *Process Biochemistry* 30(2):145-149.
- Rose, A. H. (1976) Chemical microbiology, 3rd. edn. Plenum press. New York.

- Schmidt, P.J.; Kunts, C.; and Culotta, V.C. 2000. Copper activation of superoxide dismutase 1 (SOD1) in vivo. Role for protein-protein interactions with the copper chaperone for SOD1. *J. Biol. Chem.* 275, 33771-33776.
- Schmidt, P.J.; Rae, T.D.; Pufahl, R.A.; Hamma, T.; Strain, J.; O'Halloran, T.V. and Culotta, V.C. (1999). Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 274,23719-23725.
- Schmidt, P.J.; Ramos-Gomez, M. and Culotta, V.C. (1999). A gain of superoxide dismutase (SOD) activity obtained with CCS, the copper metallochaperone for SOD1. *J. Biol. Chem.* 274,36952-36956.
- Skerfving, S., Ahlgren, L. Christofferson J.O., Haeger-Aronsen, B., Mattson, S., Schütz, A. and Lindberg, G., *Nutr. Res., Suppl.* 1, 601-607, 1985.
- Srinivasan, C.; Liba, A.; Imlay, J.; Valentine J.S. and Gralla E.B. 2000. Yeast lacking superoxide dismutase(s) shows elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J. Biol. Chem.* 275, 29187-29192.
- Stebbing, A. (1984) Dynamics of growth control in a marine yeast subjected to perturbation. *Journal of General Microbiology* (130):1799-1808.
- Strain, J. J. Hannigan, B. M. and McKenna, P. G. 1991. *J. Biomed. Sci.* 2:19-24.
- Sturtz, L.A.; Diekert, K.; Jensen, L.T.; Lill, R and Culotta, V.C. 2001. A fraction of yeast Cu,Zn superoxide dismutase and its metallochaperone, ccs, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for sod1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J. boil. Chem.* 276, 38084-38089.
- Tanaka, Y.; Hibino, T.; Hayashi, Y.; Tanaka, A.; Kishitani, S., Yokota, S. and Takabe, T. 1999. Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts. *Plant Sci.* 148, 131-138.
- Torres, A.S.; Brown, N.M.; Lemont, L.E. and O'Halloran, T.V. 2001. Post translational regulation of sod1 activity by CCS: a dioxigen requeriment. *Abstracts of papers American Chemical Society.* 222, INOR153.

- Uden H. V., and Fell, J. W. (1968). Marine yeasts. *Advances in Microbiology of the sea*, 10:167-201.
- Walker, M. G. 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Jhon Wiley & sons Ltd. Reprinted 2000, Chichester, 349.
- Warner, H. R. 1995. *Free. Rad. Biol. Med.*, 17:249-258.
- Wawryn, J.; Krzepilko, A.; Myszka, A and Bilinski, T. 1999. Deficiency in superoxide dismutases shortens life span of yeast cells. *Acta Biochimica Polonica*. 46(2), 249-253.
- Wei, J.P., Srinivasan, C.; Han, H. Valentine, J.S. and Gralla, E.B. 2001. Evidence of a novel role of copper-zinc superoxide dismutase in zinc metabolism. *J. Biol. Chem.* 276, 44798-44803.
- Youn, H. D., Kim, E. Poe, J. H. Hah, Y. C. and kang, S. O. 1996. *Biochem. J.*, 318:889-896.

APÉNDICE I.

Conteo de células en la cámara de Neubauer.

1. Tomar 500 μL de cultivo.
2. Realizar diluciones seriadas 1:3 en una microplaca.
3. Tomar 10 μL de la dilución a contar y colocarlos en la ranura de la cámara.
4. Enfocar con el objetivo 4X del microscopio para centrar la cámara a la vista.
5. Cambiar al objetivo 10X, 40X para observar el cuadro central y el cuadro individual de conteo respectivamente.
6. Ajustar la luz y el diafragma de manera que se permita observar las células correctamente.
7. Determinar la esquina superior o inferior que no se contare.
8. Realizar la cuenta en 5 cuadros.
9. Multiplicar la cuenta por 5.
10. Multiplicar la cuenta por 1×10^4 .
11. Finalmente multiplicar el número de células por mL. Por el factor de dilución.