



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

Tesis

**Participación de la Fosfolípido hidroperóxido glutatión
peroxidasa 2 (Gpx2) de *Saccharomyces cerevisiae* en la
función mitocondrial y la resistencia al estrés oxidativo**

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Q.F.B. Mario Moreno Jiménez

Asesores:

D.C. Alfredo Saavedra Molina

D.C. Christian Cortés Rojo

Morelia Michoacán Febrero 2016

DEDICATORIA

A mis padres Modesta Jiménez Reyna y José Luis Moreno Rodríguez por su amor, comprensión y apoyo invaluable de toda la vida y darme la oportunidad de estudiar.

A todos mis hermanos por su cariño y apoyo moral que me han brindado desde niño.

AGRADECIMIENTOS

Otorgo mis más sinceros agradecimientos a mis asesores los DC. Alfredo Saavedra Molina y Christian Cortés Rojo por haberme brindado la oportunidad de trabajar y formar parte de su equipo de investigación y asimismo por la paciencia y recomendaciones realizadas durante la elaboración de este trabajo.

Al DC. Jesús Campos García, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y formar parte de mis sinodales.

A mis sinodales: DC. Homero Reyes de la Cruz y DC. Rafael Salgado Garciglia por la confianza, observaciones y sugerencias hechas en el trabajo.

A mis compañeros y amigos de generación: Marina Viry y Chucho su ayuda invaluable y el apoyo moral que siempre me han brindado sobre todo cuando las cosas no salían bien.

A mis compañeros de laboratorio de bioquímica: Roxana, Claudia, Omar, Manju y a los vecinos de Biotecnología: Mauricio Wicho y Laura por sus consejos y camaradería. De manera especial, agradezco a la Maestra en Ciencias Alma L. Díaz Pérez por compartir su experiencia y conocimientos conmigo y por el gran apoyo que me brindó durante la fase experimental de este trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al Instituto de investigaciones Química-Biológicas, al Laboratorio Bioquímica y de Biotecnología Microbiana por haberme brindado el espacio para el desempeño del trabajo realizado.

A CONACYT por el apoyo de la beca 301108.

Summary

Oxidative stress is a condition of the cells which produce high levels of ROS and biological systems are not able to neutralize or repair damage generated by them. This condition is associated with many physiological state of cells as senescence, aging, cell death and pathological conditions of chronic degenerative diseases such as Parkinson's, diabetes, atherosclerosis and others.

S. cerevisiae is a model system widely used for studying mechanisms and proteins that are involved in responses to oxidative stress in eukaryotic cells. In this regard, there have been studies on proteins phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (Gpx1, Gpx2 and GPx3) *S. cerevisiae* where Gpx2 conclude that mutant of *S. cerevisiae* is not sensitive to stress C18: 3 and peroxides. In our working group, participation of *S. cerevisiae* proteins Gpx during aging, where it was observed that the Gpx2 mitochondrial protein is needed to maintain cell viability by preserving mitochondrial function was also determined. In this sense, this work focused on evaluating the participation of Gpx2 protein in oxidative stress resistance and preservation of mitochondrial function in the presence and absence of C18: 3 using fermentative growth conditions (glucose for C) and respiratory (glycerol as carbon source) and in conditions of oxidative stress menadione, which is an intramitochondrial ROS generator to be partially reduced by mitochondrial dehydrogenases and its electron donating oxygen to generate $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 . The results clearly indicate that Gpx2 is a protein important for maintaining cell viability during oxidative stress possibly by neutralizing H_2O_2 comprising menadione and ROOH avoiding the propagation phase of the peroxidation of lipid when grown in the presence of linolenic acid and so in vivo Gpx2 act more like a conventional glutathione peroxidase with higher affinity for H_2O_2 to the contrary ROOH to that reported previously and preserving yeast viability during stress menadione is by protecting mitochondrial respiration by Gpx2 protein effect seen in the two metabolic conditions used with glucose and glycerol as sole carbon source.

Keywords: PHGPx, Gpx2, oxidative stress, viability, mitochondrial respiration.

Resumen

El estrés oxidativo es una condición de las células donde producen concentraciones altas de ERO y los sistemas biológicos no son capaces de neutralizarlas o reparar el daño generado por estas. esta condición se asociado a muchos estados fisiológicos de las células como senescencia, envejecimiento, muerte celular y estados patológicos de enfermedades crónico degenerativas como el Parkinson, diabetes, aterosclerosis entre otras.

S. cerevisiae es un organismo modelo ampliamente utilizado para el estudio de los mecanismos y proteínas que están involucrados en las respuestas al estrés oxidativo de células eucariotas. En este sentido, se han realizado estudios sobre las proteínas fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (Gpx1, Gpx2 y Gpx3) de *S. cerevisiae* donde concluyen que la mutante Gpx2 de *S. cerevisiae* no es sensible al estrés por el C18:3 y peróxidos. En nuestro grupo de trabajo, también se determino la participación de las proteínas Gpx de *S. cerevisiae* durante el envejecimiento, donde se observó que la proteína Gpx2 mitocondrial es necesaria para mantener la viabilidad celular mediante la preservación de la función mitocondrial. En este sentido, el presente trabajo se enfocó en evaluar la participación de la proteína Gpx2 en la resistencia el estrés oxidativo y la preservación de la función mitocondrial en presencia y ausencia del C18:3 utilizando condiciones de crecimiento fermentativo (glucosa como fuente de C) y respiratorio (glicerol como fuente de C) y en condiciones de estrés oxidativo por menadiona, el cual es un generador intramitocondrial de ERO al ser reducida parcialmente por deshidrogenasas mitocondriales y donar su electrón al oxígeno para generar $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 .

Los resultados obtenidos indican claramente que Gpx2 es una proteína importante para mantener la viabilidad de la célula durante el estrés oxidativo posiblemente al neutralizar el H_2O_2 formado por la menadiona y los ROOH evitando la fase de propagación de la peroxidación de lipídica cuando se crece en

presencia del ácido linolénico y que de manera *in vivo* Gpx2 actúe más como una glutatión peroxidasa convencional con mayor afinidad por H₂O₂ que por los ROOH contrario a lo reportado anteriormente y que la preservación de la viabilidad de la levadura durante el estrés por menadiona es mediante la protección de la respiración mitocondrial por la proteína Gpx2, efecto que se observó en las dos condiciones metabólicas utilizadas con glucosa y glicerol como única fuente de carbono.

Palabras clave: PHGPx, Gpx2, estrés oxidativo, viabilidad, respiración mitocondrial.

Índice

1 INTRODUCCIÓN	1
1. 1 Estrés oxidativo.....	1
1. 1. 1 Especies reactivas de oxígeno.....	2
1. 1. 2 Producción de especies reactivas de oxígeno.....	3
1. 1. 3 Efectos de las especies reactivas de oxígeno.....	4
1. 2 Sistemas antioxidantes.....	6
1. 2. 1 Antioxidantes enzimáticos	7
1. 2. 1. 1 Superóxido dismutasa (SOD).....	7
1. 2. 1. 2 Catalasa (Cat).....	7
1. 2. 1. 3 Glutación peroxidasa (Gpx).....	7
1. 2. 1. 4 Glutación reductasa (GR).....	8
1. 2. 1. 5 Peroxirredoxinas (PRX).....	8
1. 2. 1. 6 Tiorredoxinas (TRX).....	8
1. 2. 2 Antioxidantes no enzimáticos.....	9
1. 2. 2. 1 La vitamina C (ácido ascórbico).....	9
1. 2. 2. 2 La vitamina E (α -tocoferol).....	10
1. 2. 2. 3 β -caroteno.....	10
1. 2. 2. 4 Glutación.....	10
1. 3 Levaduras.....	11

2. ANTECEDENTES	12
2. 1. <i>S. cerevisiae</i> y estrés oxidativo	12
2.2. Fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasas ((PHGPx) de <i>S. cerevisiae</i>	13
2. 3. Gpx2 de <i>S. cerevisiae</i>	15
2. 4. Glr1 de <i>S. cerevisiae</i>	15
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	19
5.1. Objetivo general.....	19
5.2. Objetivos específicos.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1. Medio de cultivo para bacterias.....	23
6. 2 Medios de cultivos de levaduras.....	24
6. 3 Crecimiento de las cepas bacterianas	25
6. 4 Crecimiento de las cepas <i>S. cerevisiae</i>	25
6. 5 Manipulación del ácido linolénico.....	25
6. 6 Cinéticas de crecimiento.....	25
6. 7 Curva de tolerancia.....	26
6. 8 Preparación de células para las determinaciones de velocidad de consumo de oxígeno y peroxidación lipídica.....	26
6. 9 Determinación de la respiración mitocondrial <i>in situ</i>	26

6. 10 Obtención de esferoplastos de las cepas de levadura.....	27
6. 11 Evaluación de la peroxidación lipídica.....	28
6. 12 Obtención de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	28
6. 13 Transformación de <i>E. coli</i>	29
6. 14 Selección de las transformantes bacterianas.....	29
6. 15 Aislamiento de ADN plasmídico bacteriano.....	29
6. 16 Purificación de fragmentos de ADN.....	30
6. 17 Reacción de ligación del ADN en los plásmidos.....	30
6. 18 Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	30
6. 19 Extracción de ADN total de levadura.....	31
6. 20 Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	31
7 Resultados	32
7. 1 Amplificación por PCR de los genes <i>GPX2</i> y <i>GLR1</i> de <i>S. cerevisiae</i>	32
7. 2 Clonación los genes <i>GPX2</i> y <i>GLR1</i> en el vector de pGEM-T Easy.....	32
7. 3 Subclonación de los genes <i>GPX2</i> y <i>GLR1</i> en el vector de expresión pYES2 de <i>S. cerevisiae</i>	33
7. 4 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con los plásmidos pYES2- <i>GPX2</i> y pYES2- <i>GLR1</i>	34
7. 5 Cinéticas de crecimiento.....	35
7. 6 curva de tolerancia a menadiona de <i>S. cerevisiae</i> en condiciones fermentativas.....	36

7. 7 curva de tolerancia a menadiona de <i>S. cerevisiae</i> en condiciones respiratorias.....	39
7. 8 Peroxidación lipídica de <i>S. cerevisiae</i>	41
7. 9 Respiración mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i>	43
8 DISCUSIÓN	48
9 CONCLUSIÓN	55
10 LITERATURA CITADA	55

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Estrés oxidativo

Los organismos anaerobios estrictos pueden vivir en ausencia de oxígeno mediante la obtención de energía en forma de ATP (trifosfato de adenosina) por medio de procesos bioquímicos que se llevan a cabo en ausencia de oxígeno, tales como la fermentación y la respiración anaerobia. Sin embargo, la acumulación de dioxígeno (O_2) en la atmósfera terrestre, permitió la evolución de una enorme variedad de organismos aeróbicos que utilizan O_2 como aceptor final de electrones durante la respiración, lo que proporciona un mayor rendimiento de energía en comparación con la fermentación y la respiración anaerobia (Camps, 2010). No obstante, muchos de los subproductos que se originan durante la respiración celular son, por naturaleza, potentes agentes oxidantes, por lo que las células aerobias tienen que pagar un precio inevitable que es la toxicidad que genera el oxígeno (Mann y Quastel, 1946; Jamieson 1998).

El O_2 es uno de los gases de mayor importancia en la tierra, constituyente de la atmósfera, del agua de mar y de la corteza terrestre, por lo mismo, la mayor parte de los seres vivos utilizan el oxígeno para respirar y obtener energía. No obstante, durante la utilización del O_2 se forman moléculas reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO) que causan daño a la célula (Morano *et al*, 2012). Por lo cual, la célula contiene mecanismos de defensa contra el daño producido por las ERO que incluyen tanto la eliminación de ERO y la reparación de las moléculas que han sido dañadas por las mismas (Kalyanaraman, 2013).

Cuando las ERO se producen en concentraciones altas y los sistemas biológicos no son capaces de neutralizarlas o reparar el daño generado por ellas, se origina una condición conocida como estrés oxidativo (Jamieson, 1998). En esta condición, las ERO pueden reaccionar con biomoléculas como ADN, proteínas y lípidos, modificando su estructura y función, lo que se ha asociado a la muerte celular, senescencia y estados patológicos como la enfermedad de

Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y diabetes, entre otras (Turrens, 2003; Lu y Finkel, 2008; Ortiz-Avila *et al.*, 2015).

1.1.1 Especies reactivas de oxígeno

El término ERO engloba una variedad de especies químicas altamente reactivas como los radicales libres y otras que no lo son pero que tienen la capacidad de oxidar a otras moléculas o generar radicales libres durante su metabolismo (**Tabla 1**). La presencia de radicales libres en los organismos biológicos se descubrió hace más de 50 años (Commoner *et al.*, 1954), después, Harman en 1956 propuso la teoría del envejecimiento por los radicales libres, la cual postula que la utilización del oxígeno en el metabolismo resulta en la producción de radicales libres como subproductos de las reacciones enzimáticas y no enzimáticas, que provocan daño oxidativo, el cual conduce al proceso degenerativo del envejecimiento y finalmente a la muerte (Harman, 1956). Sin embargo, no fue hasta el descubrimiento de la superóxido dismutasa (SOD), que los radicales adquirieron una notable relevancia en la biología (McCord y Fridovich, 1969). Numerosas investigaciones se han realizado acerca del daño oxidativo causado por los radicales sobre ADN, proteínas, lípidos y otros componentes de la célula (Beckman y Ames, 1998).

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno (ERO).

RADICALES		NO RADICALES	
$O_2^{\cdot-}$	Superóxido	H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
$\cdot OH$	Radical hidroxilo	HOCL	Ácido hipocloroso
HO_2^{\cdot}	Radical hidroperoxilo	O_3	Ozono
L^{\cdot}	Radical lípido	LOOH	Hidroperoxido del lípido
LOO^{\cdot}	Radical peroxilo lípido		
LO^{\cdot}	Radical alcohoxilo lípido		

Los radicales libres son moléculas orgánicas o inorgánicas, que se caracterizan por tener uno o más electrones desapareados en su último orbital de energía, altamente reactivas y con capacidad de existir de forma independiente, debido a esto tienen una existencia muy corta ya que pueden reaccionar con muchas moléculas (Dröge, 2002).

1.1.2 Producción de especies reactivas de oxígeno

Las ERO son producidas de forma endógena en la célula, a partir de las reacciones del metabolismo aerobio o debido a factores exógenos como radiación y toxinas (Birben *et al.*, 2012). Son producidas en gran parte en la membrana interna de la mitocondria donde se encuentra la cadena transportadora de electrones (CTE). Durante su funcionamiento, ocurre una fuga de electrones de los complejos respiratorios I y III, que reaccionan con el oxígeno produciendo las ERO (**Figura 1**) (Boveris y Cadenas, 2000).

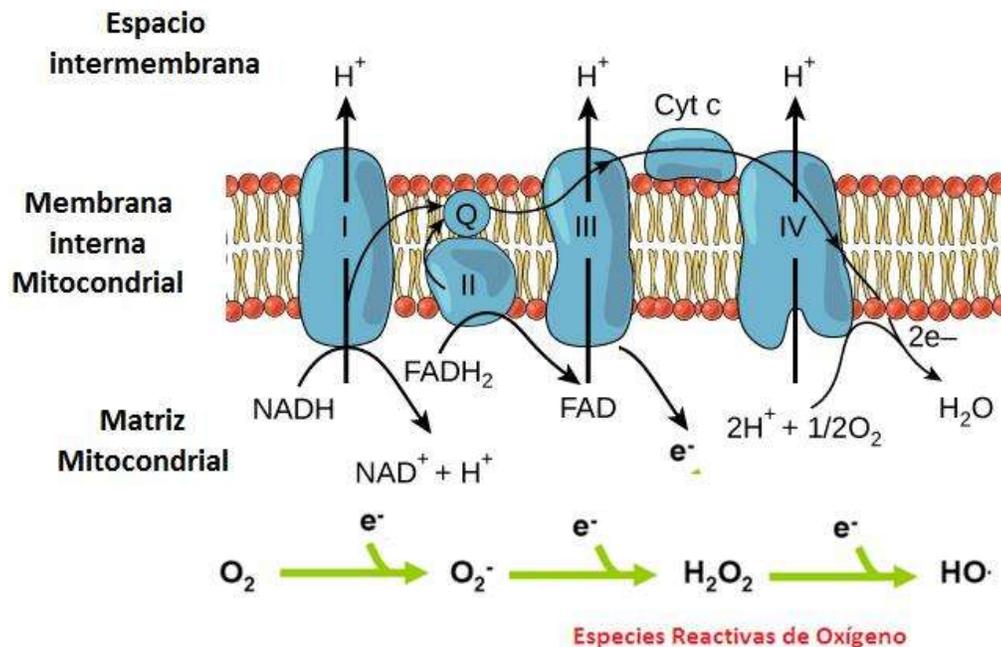


Figura 1. Producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Se ilustra el transporte de los electrones desde los equivalentes reductores NADH y FADH₂ a los complejos respiratorios hasta la reducción del oxígeno (O₂) a agua (H₂O). La fuga de electrones ocurre especialmente en los complejos I y III estos electrones pueden reaccionar con el O₂ y llevar a cabo la formación de ERO como el superóxido (O₂^{•-}), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (•OH) (Modificado de Patries *et al.*, 2008).

En las mitocondrias se consume el 90% del oxígeno celular durante la respiración aerobia, mientras que el resto es utilizado por enzimas como oxigenasas, oxidasas e hidrolasas en orgánulos como el retículo endoplasmático, peroxisomas, la membrana plasmática y el citosol (Mathews *et al.*, 2003).

La toxicidad del oxígeno deriva de su naturaleza de radical, lo que le permite sufrir reacciones químicas de oxidación/reducción. La reducción incompleta del oxígeno es la responsable de la formación de las ERO como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (**Figura 1**). La producción de ERO es un proceso natural, constante e inevitable que se lleva a cabo en todas las células (Joseph-Horne *et al.*, 2001).

1.1.3 Efectos de las especies reactivas de oxígeno

Aunque históricamente se reconoce a las ERO como moléculas que dañan a los organismos, evidencia reciente sugiere que las ERO funcionan como importantes reguladores fisiológicos de vías de señalización intracelular que van desde la estimulación de la proliferación celular (Foreman *et al.*, 2003; Geiszt y Leto, 2004), la diferenciación (Li *et al.*, 2006), la apoptosis (Cai, 2005), la estimulación del factor de crecimiento y la generación de la respuesta inflamatoria (Bae *et al.*, 1997).

Sin embargo, cuando la concentración de ERO aumenta notablemente, éstas son perjudiciales y producen daños a moléculas como ADN, proteínas y lípidos. Estas últimas moléculas son las más susceptibles al daño por ERO (**Figura 2**) (Girotti, 1985). Sin embargo, no todos los ácidos grasos son igual de susceptibles a la peroxidación, su sensibilidad depende de manera directamente proporcional al número de dobles enlaces en su cadena hidrocarbonada. Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados son resistentes a la peroxidación debido a la ausencia de hidrógenos bis alílicos, que son aquellos que están unidos al carbono que se encuentra entre dos carbonos que contienen un doble enlace y que son los que reaccionan con los radicales libres (Hulbert *et al.*, 2007).

Las ERO pueden conducir a modificaciones del ADN, especialmente el ADN mitocondrial debido a que carece de histonas y a que el ADN se encuentra cerca del sitio donde se generan las ERO en la mitocondria. El daño al ADN se puede producir por la degradación de bases púricas y pirimídicas (Ghosh y Mitchell, 1999), por roturas en el ADN de una o doble hebra, por modificaciones del azúcar, por mutaciones, deleciones y la formación de aductos con proteínas.

La mayoría de estas modificaciones del ADN son de gran importancia en distintas enfermedades y en el proceso de envejecimiento, donde la formación de 8-hidroxi-2'desoxiguanosina (8-OHdG) es el daño sufrido más conocido en el ADN, que ocurre a través del estrés oxidativo y es un biomarcador potencial para la carcinogénesis (Figura 2).

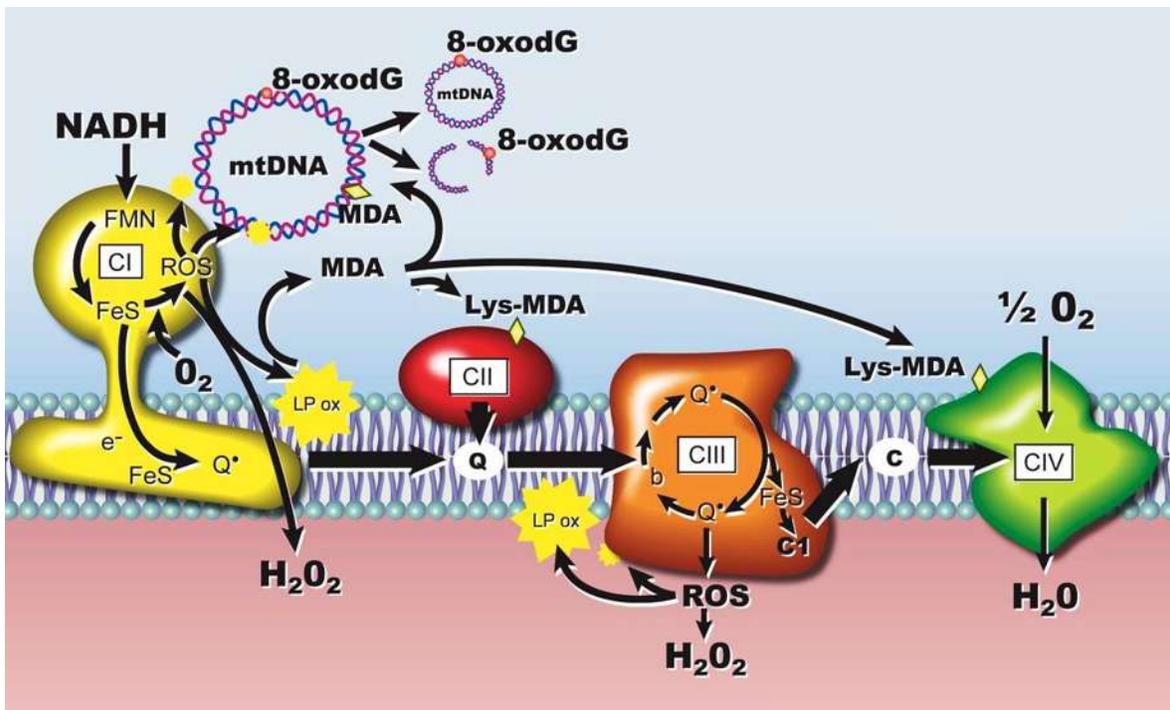


Figura 2. Daño ocasionado por las especies reactivas de oxígeno (ERO) a las biomoléculas. Se ilustra como los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria generan las ERO y como están atacan al ADN, proteínas y lípidos. Se muestra la formación del malondialdehído (MDA), producto de la peroxidación de lípidos, la formación de la 8-hidroxi-2'desoxiguanosina (8-OHdG) y la oxidación de los aminoácidos de los complejos de la cadena transporte de electrones (Tomado y modificada de Hulbert, 2007).

En las proteínas, las ERO pueden causar la fragmentación de la cadena peptídica, la alteración de su carga eléctrica, entrecruzamiento con ADN y entre las mismas proteínas y la oxidación de aminoácidos específicos como la cisteína, la metionina y la tirosina por ser particularmente más susceptibles a la oxidación. La oxidación de los residuos de las proteínas provoca cambios conformacionales, desplegamiento y la degradación de la proteína (Birben *et al.*, 2012). Las enzimas que tienen metales en sus sitios activos son especialmente más sensibles a la oxidación catalizada por metales como es el caso de los complejos de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria que contienen centros Fe-S o grupos hemos. Estas reacciones redox son conocidas como la reacción de Fenton y el ciclo de Haber-Weiss (**Figura 3**). Este tipo de reacciones, generan una importante cantidad de radicales $\cdot\text{OH}$ lo que lleva a la desnaturalización de las proteínas, pérdida de la función y la liberación de uno de sus átomos de Fe^{2+} del centro Fe-S, lo que crea un ciclo continuo de generación de ERO y liberación de Fe^{2+} que da lugar a una disfunción generalizada de la célula que puede llevar a la muerte celular (Molina-Navarro, 2005).

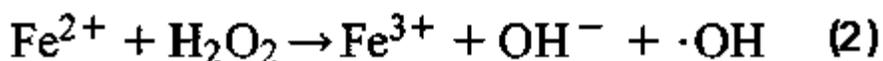
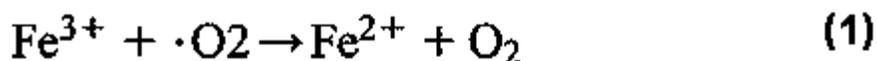


Figura 3. Generación de ERO mediante las reacciones de Haber-Weiss (1) y Fenton (2).

1. 2 Sistemas antioxidantes

Para protegerse del daño causado por el estrés oxidativo, las células poseen sistemas de defensas llamados sistemas antioxidantes. Estos sistemas de defensas son muy variados, su mecanismo de acción y el momento dónde actúan es diferente.

Un antioxidante es extremadamente difícil de definir, pero una definición amplia es "cualquier sustancia que cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con un sustrato oxidable, retrasa significativamente o

previene la oxidación de ese sustrato" (Halliwell y Gutteridge, 1999). Un antioxidante neutraliza un agente oxidante o regenera otras moléculas capaces de reaccionar con el oxidante. Los sistemas antioxidantes se pueden clasificar en enzimáticos y no enzimáticos.

1. 2. 1 Antioxidantes enzimáticos

1. 2. 1. 1 Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa (SOD) fue descubierta en 1969 por McCord y Fridovich lo que la hace la primera enzima antioxidante descrita. Las isoformas de la SOD son metaloproteínas que dismutan dos moléculas de superóxido en oxígeno y H_2O_2 . Por esta razón, no es una defensa antioxidante completa, ya que produce H_2O_2 , la cual es también en una ERO (**Figura 4**). Se han caracterizado tres tipos de SOD en humanos; la CuZn-SOD, la cual está localizada en el citosol y contiene un ión de cobre y otro de zinc, la Mn-SOD, que contiene un ión manganeso y está presente en la mitocondria (Slot *et al.*, 1986) y la SOD extracelular (EC-SOD) que contiene un ión de cobre y otro de zinc y se encuentra en la matriz extracelular (Marklund, 1984).

1. 2. 1. 2 Catalasa (CAT)

El H_2O_2 producido por la SOD se descompone directamente por la enzima catalasa, generando una molécula de H_2O y O_2 . Contiene hierro en su sitio activo, se encuentra principalmente en los peroxisomas y tiene una baja afinidad por H_2O_2 (**Figura 5**) (Chelikani *et al.*, 2004).

1. 2. 1. 3 Glutación peroxidasa (GPX)

Las enzimas GPX, tanto las formas dependiente de selenio y no dependiente de selenio, reducen el H_2O_2 a H_2O y O_2 (**Figura 4**). Son más activas a bajas concentraciones de H_2O_2 ya que tienen una afinidad alta. Las diferentes isoformas de la GPX están localizadas en los mismos lugares que la SOD, lo que sugiere que la GPX son unas de las enzimas que descompone el H_2O_2 producido por la Cu/Zn-SOD en el citosol y la Mn-SOD en la mitocondria (Halliwell y

Gutteridge, 1999). Estas enzimas pueden reducir al H_2O_2 y también los hidroperóxidos de ácidos grasos a sus respectivos alcoholes utilizando el glutatión (GSH) como donante de electrones, esto las convierte en un importante mecanismo de protección contra el daño oxidativo causado por los lípidos de las membranas (Imai y Nakagawa, 2003).

1. 2. 1. 4 Glutación reductasa (GR)

La Gpx utiliza al GSH como donador de electrones; el glutatión oxidado (GSSG) generado es reducido por la enzima glutatión reductasa (GR) utilizando al NADPH como donador de electrones para regenerar al glutatión reducido (Grant, 1996) (**Figura 4**). La actividad de la GR es un mecanismo importante para controlar el nivel de GSSG en la mitocondria, ya que la generación incontrolada de GSSG durante el estrés oxidativo puede contribuir a la disfunción mitocondrial.

1. 2. 1. 5 Peroxirredoxinas (PRX)

Las peroxirredoxinas constituyen una familia de tiol peroxidasa-específicas, que se basan en tiorredoxinas (TRX) como el donador de electrones para la reducción de H_2O_2 y de hidroperóxidos lipídicos (Chae *et al.*, 1999). La PRX3 es la isoforma ubicada exclusivamente en la mitocondria, lo que sugiere que juega un papel importante en la defensa contra el H_2O_2 producido por la cadena respiratoria mitocondrial (**Figura 4**). La PRX3 tiene una cisteína-redox sensible que tras la reacción con H_2O_2 se oxida a Cys-SOH que luego reacciona con la Cys-SH vecina de la otra subunidad (Chang *et al.*, 2004; Orrenius *et al.*, 2007).

1. 2. 1. 6 Tiorredoxinas (TRX)

Las enzimas TRX son las responsables de la regeneración del estado reducido de PRX mientras que la tiorredoxina reductasa (TRXRD) mantiene el estado reducido de TRX utilizando NADPH como equivalentes reductores (**Figura 4**). Las TRX y TRXRD se expresan como isoformas tanto en citosol (TRX1 y TRXRD1) o mitocondria (TRX2 y TRXRD2) (Enoksson *et al.*, 2005).

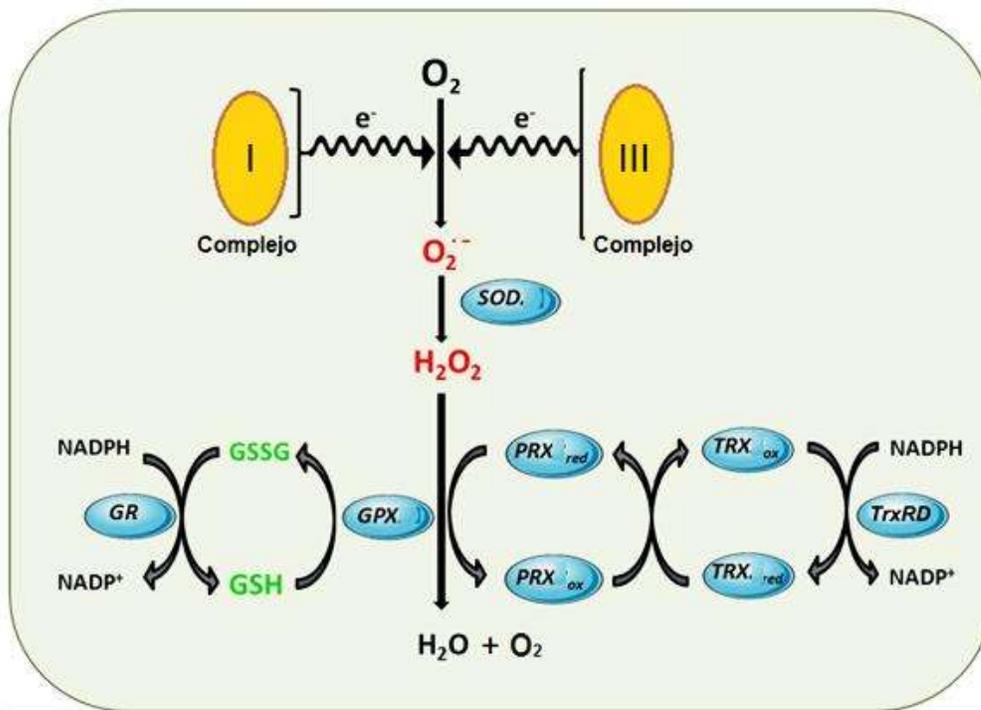


Figura 4. Sistemas de defensa antioxidante. Se muestran los sitios de generación del $O_2^{\cdot-}$ (complejo I y III de la cadena transportadora de electrones) el cual es convertido a H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa (SOD2). El H_2O_2 se reduce a H_2O y O_2 por la Glutacion peroxidasa (Gpx) y la peroxirredoxina (PRX), la enzima Gpx utiliza al glutatión como fuente de electrones que a la vez es regenerado a su forma reducida GSH por la glutatión reductasa (GR) que utiliza al NADPH como donador de electrones. La peroxirredoxina es transformada a su estado reducido por la enzima tiorredoxina (TRX) y la tiorredoxina es nuevamente reducida por la tiorredoxina reductasa (TrxRD) utilizando como donador de electrones el NADPH (Modificado de Ribas *et al.*, 2014).

1. 2. 2 Antioxidantes no enzimáticos

Además de los sistemas enzimáticos, las células contienen moléculas antioxidantes, éstas son de bajo peso molecular, tales como las vitaminas C y E, los carotenos y el GSH.

1. 2. 2. 1 La vitamina C (ácido ascórbico)

La vitamina C (ácido ascórbico) es un antioxidante hidrosoluble y su forma a pH fisiológico es el anión ascorbato, el cual puede neutralizar ERO tales como el $O_2^{\cdot-}$, el OH^{\cdot} e hidroperóxidos de lípidos (LOOH). Además, tiene un papel

fundamental en la regeneración de la vitamina E donde se consume el ascorbato pasando a radical ascorbato (Sevanian *et al.*, 1985).

1. 2. 2. 2 La vitamina E (α -tocoferol)

La vitamina E es un antioxidante liposoluble, que se concentra en el interior hidrófobo de la membrana celular y es una de las defensas contra el daño a la membrana. Es capaz de neutralizar al $O_2^{\cdot-}$, al OH^{\cdot} y a los LOOH a formas menos reactivas (White *et al.*, 1997). La vitamina E agrupa al menos 8 isómeros estructurales de tocoferoles y tocotrienoles entre ellos el α -tocoferol, el cual tiene mayor actividad antioxidante (Burton y Traber, 1990).

1. 2. 2. 3 β -caroteno

El β -caroteno, uno de los principales carotenoides de las plantas, reacciona principalmente con el $O_2^{\cdot-}$, el OH^{\cdot} y los radicales peróxido (ROO^{\cdot}) (El-Agamey *et al.*, 2004). Las propiedades antioxidantes de los carotenoides residen en su estructura formada por largas cadenas de dobles enlaces conjugados.

1. 2. 2. 4 Glutación

El glutati3n (GSH, γ -glutamyl-cisteinil-glicina), es un tripéptido con el grupo tiol (-SH) de la cisteína como grupo activo, es uno de los principales sistemas de defensa contra las ERO por lo que varios aspectos del GSH, tales como su metabolismo, bioquímica y funciones han sido revisados extensamente (Ribas *et al.*, 2014).

Las células en un estado redox óptimo tienen el 90% de glutati3n en su forma reducida GSH y el 10% restante está en su estado oxidado GSSH (Vogel *et al.*, 1999). Las mitocondrias contienen ~10-12% de la cantidad total de glutati3n; sin embargo, las mitocondrias carecen de las enzimas necesarias para la biosíntesis del GSH, por lo cual el porcentaje del GSH mitocondrial se obtiene del

transporte de GSH desde el citoplasma, el cual alcanza una concentración dentro de la mitocondria que está en un intervalo de 2-14 mM (Rebrin *et al.*, 2003).

La función antioxidante del GSH se lleva a cabo de las siguientes maneras: desintoxica la célula del H₂O₂ y los LOOH a través de la acción de las enzimas Gpx, transfiriendo su electrón al H₂O₂ para reducirlo en H₂O y O₂, quedando el glutatión en su forma oxidada GSSG, el cual es reducido nuevamente en GSH por la GSH reductasa que utiliza NADPH como el donador de electrones (**Figura 4**). Además, el GSH dona protones a los lípidos de membrana y tiene un papel en la conversión de la vitamina C y E a sus formas activas (Ribas *et al.*, 2014).

1. 3 Levaduras

La humanidad ha utilizado a las levaduras desde los comienzos de la agricultura para la producción de alimentos, bebidas alcohólicas y actualmente es utilizada en una variedad de procesos dentro de la industria de alimentos, químicos y en la investigación biológica, biomédica y ambiental (Walker, 1998).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo eucarionte que más se ha estudiado, lo que ha ayudado al entendimiento del funcionamiento de las células eucariotas y por extensión, de la biología humana. *S. cerevisiae* es un microorganismo unicelular que pertenece al reino Fungi, sub-reino Amastigomycota, donde se agrupan aquellos hongos que producen esporas sexuales y asexuales (hongos perfectos) y que son habitantes comunes de hábitats terrestres, *S. cerevisiae* está comprendido dentro de la división Ascomycota (Ascomicete) por su capacidad de producir ascosporas durante su ciclo de vida sexual (Talaro y Talaro, 1999). *S. cerevisiae* ha sido considerado como un hongo dimórfico pues produce por gemación células esféricas individuales denominadas levaduras o en ausencia de nitrógeno, estructuras pseudohifales.

El primer genoma eucariota completamente secuenciado fue el de esta levadura (Goffeau *et al.*, 1996). Este análisis reveló un tamaño de unas 13,000 kb y unos 6,275 genes, el 72 % de las secuencias corresponden a secuencias

codificantes siendo el tamaño promedio de los genes de 1,45 kb y solamente el 3.8% de los ORF's contienen intrones.

Las células de *S. cerevisiae* poseen casi todas las estructuras observadas en los eucariontes más complejos incluyendo mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, membrana plasmática y lisosomas por lo que se considera como un puente biológico entre bacterias y organismos superiores. Además, a diferencia de las células de mamíferos, poseen también vacuolas y una pared celular externa compuesta principalmente por glucano y manoproteínas (Valentín *et al.*, 1987).

Como hospedero para la producción de proteínas con interés biotecnológico, *S. cerevisiae* tiene varias ventajas sobre las bacterias (Romanos *et al.*, 1992), ya que al ser células eucariontes, permite que se lleven a cabo los procesos de expresión, maduración y modificación esas post-traduccionales característicos de las células animales necesarias para la actividad biológica de las proteínas.

S. cerevisiae se ha utilizado como un modelo para estudiar el envejecimiento (Aguilar-Toral *et al.*, 2014), la regulación de la expresión génica (Biddick y Young, 2005) apoptosis (Owsianowski *et al.*, 2008) trastornos neurodegenerativos (Miller-Fleming *et al.*, 2008) y muchos otros procesos biológicos. Por ejemplo, hasta 30% de los genes implicados en las enfermedades humanas pueden tener ortólogos en el genoma de levadura. (Foury *et al.*, 1998).

2 ANTECEDENTES

2.1 *S. cerevisiae* y el estrés oxidativo

Como se mencionó anteriormente, *S. cerevisiae* tiene cierta similitud con las células animales, por lo cual esta levadura es un organismo modelo que ha tenido un papel importante en el descubrimiento de los mecanismos que regulan la respuesta a diferentes ambientes biológicos. La utilización de este organismo para la investigación sobre el estrés oxidativo, ha resultado en la identificación de proteínas y rutas de señalización que regulan el estrés oxidativo que se conservan desde la levadura hasta mamíferos (Fabrizio y Longo, 2003). Además, se ha

demostrado que algunas proteínas de esta levadura tienen funciones intercambiables con sus homologas en mamíferos. Por lo tanto, *S. cerevisiae* es un modelo muy conveniente para el análisis de los mecanismos y proteínas involucrados en la respuesta al estrés oxidativo (Fabrizio y Longo, 2003; Kaeberlein *et al.*, 2007).

Las respuestas al estrés de *S. cerevisiae* producidas por diferentes agentes (oxidantes, metales pesados, etanol, ácidos grasos, etc), tienen mecanismos comunes aunque existen cambios genéticos y bioquímicos específicos, dependiendo del agente causante del estrés. Las respuestas del estrés oxidativo, parecen ser reguladas al menos en parte a nivel de la transcripción, induciendo los sistemas de defensas antioxidantes primarios y secundarios (Costa y Moradas-Ferreira, 2001). En estos procesos el H₂O₂ sirve como una molécula señal que activa rutas de señalización y factores de transcripción, que dan lugar a la expresión de proteínas antioxidantes para abatir o disminuir los niveles de ERO y reparar el daño producido por los oxidantes (Morano *et al.*, 2012).

Las proteínas Yap1p y Skn7p son los dos factores de transcripción de genes antioxidantes más importantes en *S. cerevisiae*; al censar el estrés oxidativo. estos factores de transcripción se activan e inducen la expresión de enzimas tales como la glutamilcisteinil sintetasa (Gsh1), la glutatión sintetasa (Gsh2), la superóxido dismutasa (Sod), la catalasa (Cat), las tiorredoxinas (Trx), la glutatión reductasa (Glr1) y las glutatión peroxidasa (Gpx) (Tsuzi *et al.*, 2004). El factor de transcripción Yap1p controla la mayor parte de los genes implicados en la resistencia a hidroperóxidos, por lo que juega un papel importante en la protección contra el estrés oxidativo. Las cepas mutantes en *YAP1* son hipersensibles a oxidantes y su sobreexpresión confiere resistencias a agentes tóxicos como el cadmio (Jamieson, 1998).

2. 2 Fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasas (Gpx) de *S. cerevisiae*

Yap1p y Skn7p regulan la transcripción de las proteínas Gpx de la levadura *S. cerevisiae*, único organismo ahora reportado que tiene tres isoformas: Gpx1,

Gpx2 y Gpx3 (Avery *et al.*, 2001). Estas enzimas han sido reportadas como una defensa antioxidante hacia el estrés por H₂O₂ de forma *in vitro* (Inoue *et al.*, 1999). Sin embargo, otro reporte sugiere que estas enzimas presentan una mayor actividad hacia los hidroperóxidos de fosfolípidos de forma *in vitro* y que las secuencias de estas enzimas tienen una mayor similitud con las fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasas (PHGPx), enzimas que a diferencia de las Gpx convencionales reducen los ácidos grasos oxidados que aún no se desprenden de las membranas (Avery *et al.*, 2001). Por lo tanto, las PHGPx son enzimas capaces de detener la peroxidación de lípidos de membrana y generalmente se considera que es la principal línea de defensa enzimática contra el daño oxidativo de la membrana (Maiorino *et al.*, 1985). Por otra parte, *S. cerevisiae* contiene en sus membranas únicamente ácidos grasos saturados y monoinsaturados, lo cual hace a las membranas resistentes a la peroxidación lipídica (Cortés-Rojo *et al.*, 2009). No obstante, una posible explicación para la ausencia de la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados junto con la expresión de tres enzimas PHGPx que realizan la reparación de los lípidos peroxidados de las membranas, podría ser que esta levadura es un organismo particularmente propenso a altos flujos de ERO que pueden ser dirigidos hacia sus propias membranas o membranas de otros organismos. En este modelo, las dos adaptaciones evolutivas, la carencia de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas y la actividad PHGPx (posiblemente junto con la capacidad de fermentar), podrían ser considerado mecanismos que ayuden a *S. cerevisiae* combatir esos flujos de ERO, así como también un posible mecanismo de competencia hacia otros organismos (Avery *et al.*, 2001).

La diferencia entre las enzimas Gpx de *S. cerevisiae* es la ubicación de cada una de ellas y la regulación de los genes ante diferentes ambientes biológicos, la enzima Gpx1 se encuentra en los peroxisomas y es inducida por privación de glucosa, la Gpx2 es mitocondrial y es inducida por estrés oxidativo y la Gpx3 se encuentra en citosol y se expresa constitutivamente (Inoue *et al.*, 1999).

2. 3 Gpx2 de *S. cerevisiae*

En las mitocondrias, Gpx2 se asocia con la membrana interna del lado de la matriz mitocondrial (Ukai *et al.*, 2011), por esto se piensa que es uno de los principales mecanismos de defensa contra el daño producido por las ERO en la mitocondria, especialmente de los hidroperóxidos de lípidos producidos durante la peroxidación lipídica cuando es crecida en presencia de ácidos grasos poliinsaturados (**Figura 5**). Además, los niveles del ARN mensajero del gen *GPX2* aumentan cuando la levadura se somete a estrés por varios agentes oxidantes tal es el caso de la menadiona que es un agente que genera un ciclo redox mitocondrial que lleva a la generación ERO ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ y $ROOH$ cuando las levaduras se crecen +C18:3), lo que refuerza más la idea de que esta enzima es una importante defensa contra el estrés oxidativo mitocondrial, sin embargo, la mutación del gen *GPX2* en *S. cerevisiae* no muestra un claro fenotipo cuando fue sometida al estrés por el H_2O_2 y peróxidos lipídicos (Inoue *et al.*, 1999; Avery *et al.*, 2001).

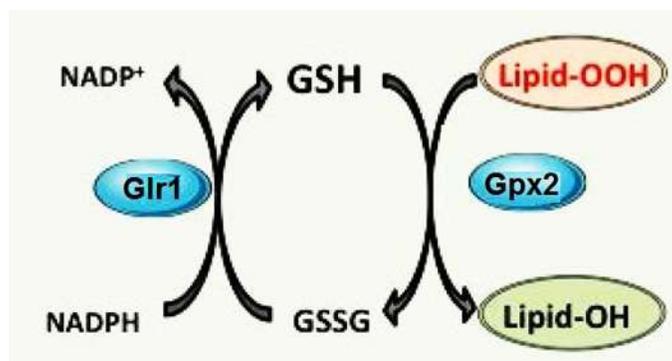


Figura 5. Reacciones enzimáticas de las proteínas Glr1 y Gpx2 de *S. cerevisiae*. Se ilustra como la enzima Gpx2 reduce los hidroperóxidos lipídicos a alcoholes utilizando como donador de electrones al GSH, el glutatión oxidado GSSG es nuevamente transformado a su estado reducido por la enzima Glr1 utilizando como cofactor el NADPH (Modificado de Ribas *et al.*, 2014).

2. 4 Glr1 de *S. cerevisiae*

Glr1 es otra enzima que está regulada por el factor transcripción Yap1p y al igual que Gpx2, es una enzima mitocondrial. Como se mencionó anteriormente, se encarga de regenerar el GSSG a GSH (**Figura 5**). Una cepa mutante en *glr1Δ*

mostró un aumento en la sensibilidad a los oxidantes incluyendo tanto peróxidos y superóxido y la concentración del glutatión oxidado aumentó significativamente (Muller, 1996). Por otra parte se conoce que esta proteína es importante para contrarrestar el estrés por peróxidos lipídicos (Evans *et al.*, 1998). Por todo esto y aunado a que esta enzima se encuentra en las mitocondrias donde se genera la mayor concentración de ERO, se puede sugerir que Glr1 es un sistema de defensa contra el estrés oxidativo importante en *S. cerevisiae* (Grant *et al.*, 1996).

Como se describió en los párrafos anteriores, Gpx2 y Glr1 parecen participar en conjunto en la neutralización del H₂O₂ y reparación de los lípidos peroxidados de las membranas mitocondriales, lo cual preserva adecuadamente la estructura y función de las membranas mitocondriales. Sin embargo la mutación del gen *GPX2* en *S. cerevisiae* no muestra un fenotipo obvio en el crecimiento de la levadura cuando fue sometida al estrés por el ácido linolénico ni peróxidos, por lo tanto, se concluyó que la proteína Gpx2 no participa en la defensa contra el estrés del ácido linolénico ni peróxidos de forma *in vivo* en la levadura. No obstante, en nuestra opinión, las condiciones utilizadas en estos experimentos no son las ideales para demostrar la participación de Gpx2, que es una enzima mitocondrial debido a los siguientes puntos: *i*) algunos estudios han evaluado el fenotipo solamente con la adición de ácidos grasos poliinsaturados al medio de cultivo pero esto, por si solo, no garantiza la generación de un ambiente de estrés oxidativo; *ii*) las condiciones utilizadas en los experimento donde se han tratado de elucidar el papel de Gpx2 son fermentativas (glucosa como fuente de carbono), donde la función mitocondrial es reprimida parcialmente; *iii*): en condiciones fermentativas la función mitocondrial no es esencial para la viabilidad de la levadura como si lo es cuando se utilizan fuentes de carbono respiratorias como el glicerol, por lo cual, el uso de glucosa como fuente de C podría enmascarar el papel protector de Gpx2 contra el estrés oxidativo producido en la mitocondria.

En condiciones aeróbicas, *S. cerevisiae* es capaz de utilizar el glicerol como única fuente de carbono y energía. La degradación del glicerol es un proceso de dos pasos; el primer paso es la fosforilación del glicerol a glicerol-3-fosfato por la

glicerol cinasa en el citosol; a continuación, el glicerol-3-fosfato entra a la mitocondria donde es oxidado a dihidroxiacetona-fosfato por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (GPD2) y concomitantemente transfiere dos electrones del FADH directamente a la cadena de transporte de electrones a nivel de la ubiquinona.

Otra aproximación experimental por la cual se puede determinar la función de una proteína es mediante su sobreexpresión. Por ejemplo, la sobreexpresión de Glr1 (Mockett *et al.*, 1999) o de Gpx1 y Gpx3 en la levadura tienen efectos protectores contra el estrés oxidativo (Mason *et al.*, 2013). Por lo tanto, esto plantea la posibilidad de que la sobreexpresión de Gpx2 y Glr1 sea benéfica cuando la levadura se expone a un estrés oxidativo inducido por la menadiona, un agente que produce estrés oxidativo mitocondrial, en presencia o ausencia de ácidos grasos poliinsaturados. Por lo tanto, en este trabajo se plantea estudiar la participación de *GPX2* y *GLR1* en el estrés oxidativo generado por la menadiona, en la levadura *S. cerevisiae* en presencia y ausencia de un ácido graso poliinsaturado ácido linolénico (C18:3) así como su participación en la función mitocondrial en dos tipos de metabolismo; fermentativo y respiratorio.

3 JUSTIFICACIÓN

S. cerevisiae tiene tres proteínas fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasas (Gpx1, Gpx2 y Gpx3), lo cual puede ser controversial ya que esta levadura es resistente a la peroxidación lipídica. Se han realizado estudios para tratar de esclarecer la función de estas proteínas, donde aparentemente la proteína Gpx2 no es importante en las condiciones de estrés utilizadas. Sin embargo, estos estudios no han tomado en cuenta que Gpx2 es una enzima mitocondrial y que las condiciones fermentativas utilizadas, podrían no dejar apreciar claramente su papel antioxidante. Por lo anterior, es de interés determinar la participación de Gpx2 en el estrés oxidativo y la función mitocondrial también en condiciones respiratorias.

4 HIPÓTESIS

La proteína Gpx2 preserva la viabilidad de *S. cerevisiae* durante el estrés oxidativo.

5 OBJETIVOS

5. 1 Objetivo general

Evaluar la participación de la proteína Gpx2 de *S. cerevisiae* en el estrés oxidativo y la función mitocondrial bajo condiciones de crecimiento fermentativo y respiratorio.

5. 2 Objetivos específicos

1. Determinar la participación de la proteína Gpx2 de *S. cerevisiae* en el estrés oxidativo bajo condiciones de crecimiento fermentativo y respiratorio.
2. Evaluar la participación de la proteína Gpx2 de *S. cerevisiae* en la función mitocondrial bajo condiciones de crecimiento fermentativo y respiratorio.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

En las Tablas 2, 3 y 4, se enlistan y describen las cepas de levaduras, bacterias y plásmidos utilizados en esta investigación. En la Tabla 5 se describen los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de *GPX2* y *GLR1*.

Tabla 2. Cepas de levaduras utilizadas en este trabajo.

Levaduras	CARACTERISTICAS	REFERENCIAS
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met 15Δ0; ura3Δ0</i>	Colección de cepas Euroscarf
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 <i>gpx2Δ</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, aco1::kanMX4</i>	Colección de cepas Euroscarf
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 <i>glr1Δ</i>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met 15Δ0; ura3Δ0, aco1::kanMX4</i>	Colección de cepas Euroscarf
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4742 (GPX2-pYES2)	BY4741 transformada con <i>GPX2</i> -pYES2	Este trabajo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 (GLR1-pYES2)	BY4741 transformada con <i>GLR1</i> -pYES2	Este trabajo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 (pYES2)	BY4741 transformada con pYES2	Este trabajo

Tabla 3. Cepas de bacterias utilizadas en este trabajo.

BACTERIAS	CARACTERISTICAS	REFERENCIAS
<i>E. coli</i> JM101	Cepa estándar de laboratorio; <i>supE</i> , <i>thi</i> , $\Delta(lac- proAB)$, [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> Z $\Delta M 15$]	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> JM101 (pYES2)	JM101 transformada con pYES2	Este trabajo
<i>E. coli</i> JM101 (GPX2-pGEM)	JM101 transformada con GPX2-pGEM	Este trabajo
<i>E. coli</i> JM101 (GPX2--pYES2)	JM101 transformada con GPX2--pYES2	Este trabajo
<i>E. coli</i> JM101 (GLR1-pGEM)	JM101 transformada con GLR1-pGEM	Este trabajo
<i>E. coli</i> JM101 (GLR1-pYES2)	JM101 transformada con GLR1-pYES2	Este trabajo

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo para la amplificación de los genes de *GPX2* y *GLR1*.

PLÁSMIDOS	CARACTERISTICAS	REFERENCIAS
pGEM-T Easy	Plásmido usado para la clonación de productos de PCR	Promega
pYES2	Vector para expresión de proteínas recombinantes en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invitrogen
GPX2-pGEM	pGEM-T Easy con el gen Gpx2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Este trabajo
GPX2-pYES2	Vector para expresión de proteínas recombinantes en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Este trabajo
GLR1-Pgem	pGEM-T Easy con el gen Glr1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Este trabajo
GLR1-pYES2	pYES2 con el gen Glr1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Este trabajo

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Gen amplificado
Gpx2 BamHI D	CCG <u>GGATCC</u> ATGCTTTCTGCAACC	54	GPX2
Gpx2 XbaI R	<u>TCTAGA</u> TTTACTTAACAGGCTTTGG	55	GPX2
Glr1 HindIII D	CCG <u>AAGCTT</u> ATGCTTTCTGCAACC	54	GLR1
Glr1 XbaI R	<u>TCTAGA</u> TCTCATAGTAACCAATTC	56	GLR1

6. 1 Medio de cultivo para bacterias

Se utilizó el medio Luria Broth (LB) (Tabla 6), para la preparación de medio sólido se añadió agar (15 g/L) previo a su esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Tabla 6. Medio de cultivo de Luria Broth.

MEDIO LB MODIFICADO

Peptona 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 5 g

Agua destilada cbp 1L

Para la preparación del agar LB con ampicilina (Xgal-IPTG), se agregaron 100 µl de la solución stock de ampicilina (100 mg/ml), 40 µl de Xgal (50 mg/ml) y 30 µl de IPTG (100 mg/ml) para 100 ml de agar.

6. 2 Medios de cultivos de levaduras

Para el cultivo de *S. cerevisiae*, fueron utilizados dos medios de cultivo: el medio YPD y medio mínimo utilizando dos fuentes de carbono: glucosa (fermentativo) y glicerol (aerobio) adicionando 1% de galactosa como inductor de la expresión de los genes insertados en los plásmidos (Tabla 7). Para la preparación del medio sólido se añadió agar (20 g/L).

Tabla 7. Medio YPD y Mínimo.

MEDIO YPD	MEDIO MÍNIMO
Extracto de levadura 10 g	YNB (sin aminoácidos) 6.7 g
Peptona 20 g	Dropout (- uracilo) 2 g
Glucosa 20 g	galactosa 20 g
Agua destilada cbp 1L	Agua destilada cbp1 L
<hr/>	
MEDIO MÍNIMO (1%Glucosa/1%Galactosa)	MEDIO MÍNIMO (Glucosa 2% /1%Galactosa)
YNB (sin aminoácidos) 6.7 g	YNB (sin aminoácidos) 6.7 g
Dropout (- uracilo) 2 g	Dropout (- uracilo) 2 g
galactosa 10 g + 10 g glucosa	galactosa 10 g 20 mL glicerol
Agua destilada cbp1 L	Agua destilada cbp1 L

6. 3 Crecimiento de las cepas bacterianas

Las cepas de *E. coli* se crecieron durante 16-18 horas a 37°C en medio LB a 180 rpm.

6. 4 Crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae*

Se tomaron 20-100 µL de cada una de las cepas almacenadas a -80 °C y se inocularon en 1mL de medio mínimo y se crecieron a 30°C con agitación a 150 rpm durante 12 h. De este inóculo se tomaron 50 µL y se sembraron en cajas de Petri con medio mínimo solido suplementado con geneticina (200 µg/mL) para las cepas mutantes y se incubaron por 72 h a 30 °C. Por último, las cepas se almacenaron a 4°C por un máximo de 3 semanas para estudios posteriores.

6. 5 Manipulación del ácido linolénico

A cada medio de cultivo antes de la inoculación de las cepas, se les añadió ácido α -linolénico 1 mM (ácido *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienoico, α -C18:3(Δ 9,12,15); pureza \geq 99%, adquirido de Sigma Chemical), disuelto en 5% del detergente Igepal CA-630 (Sigma Chemical).

6. 6 Cinéticas de crecimiento

Se tomó una colonia aislada de las cepas de levadura y se inoculó en 3 mL de medio mínimo liquido suplementado con uracilo para las cepas mutantes y control y se adiciono geneticina (200 µg/mL) para las cepas mutantes y se incubaron a 30°C con agitación a 150 rpm durante 12 h, después estos preinóculos se utilizaron para la inoculación de matraces de 250 mL con 20 mL de medio mínimo (1%Glucosa/1%Galactosa) en ausencia y presencia del C18:3 (1mM), con el volumen adecuado para partir de una densidad óptica inicial a 600_{nm} de 0.1. Por último, se incubaron con agitación a 150 rpm y 30°C, se tomó 1 mL de cada una de las muestras cada 2 h y se mido la densidad óptica a 600_{nm} hasta las 28 h.

6. 7 Curvas de tolerancia

Se tomó una colonia aislada de las cepas de levadura y se inoculó en 3 mL de medio líquido mínimo suplementado con uracilo para las cepas mutantes y control y se adicionó geneticina (200 µg/mL) para las cepas mutantes y se incubaron a 30°C con agitación a 150 rpm durante 12 h en ausencia y presencia del C18:3 (1mM), después estos preinóculos se utilizaron para la inoculación de tubos de ensayo con 3 mL de medio mínimo (1% Glucosa/1% Galactosa) o (2% Glucosa /1% Galactosa) con concentraciones crecientes de menadiona (0.2-1mM) partiendo de una densidad óptica inicial de 0.1 a 600 nm. Por último se incubaron 12 h a 30°C con agitación a 150 rpm en un rotor de tubos de ensayo y se midió la densidad óptica a 600 nm.

6. 8 Preparación de células para las determinaciones de velocidad de consumo de oxígeno y peroxidación lipídica

Se tomó una colonia aislada de las cepas de levadura y se inoculó en 3 mL de medio líquido mínimo suplementado con uracilo para las cepas mutantes y control y se adicionó geneticina (200 µg/mL) para las cepas mutantes y se incubaron a 30°C con agitación a 150 rpm durante 12 h en ausencia y presencia del C18:3 (1mM). Después, estos preinóculos se utilizaron para la inoculación de matraces de 250 mL con 20 mL de medio mínimo en ausencia o presencia de menadiona (0.4 Mm), las células procedentes de estos cultivos se lavaron tres veces con agua estéril y luego se centrifugaron a 1960 x g por 5 min a 25°C con agua desionizada y se suspendieron en una proporción de 1:1 de p/v. Las células se utilizaron inmediatamente para la determinación de la respiración mitocondrial *in situ* (Aguilar-Toral *et al.*, 2014) y peroxidación lipídica (Buege y Aust, 1978).

6. 9 Determinación de la respiración mitocondrial *in situ*

La respiración mitocondrial *in situ* fue analizada polarográficamente con un electrodo tipo Clark conectado a un monitor de oxígeno YSI5300 y a un ordenador para la adquisición de datos. En la cámara del polarógrafo se añadieron 125 mg de células (peso húmedo) y 2.5 ml de buffer MES-TEA (ácido morfoetanosulfónico

10 mM, pH 6.0 con trietanolamina), las células se mantuvieron con agitación constante. La medición del consumo oxígeno se inició en el estado 4 mediante la adición de 10 mM de glucosa. Una vez que se observó una velocidad de consumo de oxígeno estable, la respiración en estado desacoplado (estado U) se estimuló con la adición del desacoplante carbonilcianuro-*p*-triclorofenilhidrazona (CCCP) al 15 mM.

6. 10 Obtención de esferoplastos de las cepas de levadura

Los esferoplastos se generaron de acuerdo con el método reportado por Guérin y cols (1979). Primero, se lavaron las células 3 veces con agua desionizada, centrifugando a 5000 rpm por 5 minutos usando el rotor Beckman JA-10 de una centrífuga refrigerada Beckman Coulter Avanti J-E y se calculó el peso seco de las células mediante la relación: peso seco = peso húmedo/4. A continuación, las células se resuspendieron en medio SH (tris 0.1M, β mercaptoetanol 0.5M, pH 9.3 con NaOH), se incubaron a 170 rpm por 15 minutos a 32°C y se lavaron 3 veces con buffer de lavado (KCl 0.5M, tris 10mM, pH 7 con HCl). Posteriormente, las células se resuspendieron en medio de digestión (sorbitol 1.35M, EGTA 1mM, fosfato disódico 30mM, fosfato monosódico 30mM, ácido cítrico 10 mM, pH 5.8). El volumen utilizado fue de 10 ml por gramo de peso seco de levaduras. Para romper la pared celular y obtener esferoplastos, se agregó la enzima liticasa a una concentración de 10 mg por gramo de peso seco, con lo que se obtuvo una concentración final de liticasa en el medio de 1mg/ml y se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. Después, se centrifugó en el rotor JA 20 a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. A continuación, los esferoplastos se lavaron 3 veces con medio de lavado de protoplastos (sorbitol 0.75M, manitol 0.4M, tris-maleico 10mM, albúmina sérica de bovino 0.2%, pH 6.8) a 12000 rpm, 10 minutos a 4°C en cada lavado y se resuspendió con una varilla, los esferoplastos se utilizaron inmediatamente para determinar la peroxidación lipídica.

6. 11 Evaluación de la peroxidación lipídica

Para determinar este parámetro se empleó una modificación del método reportado por Buege y Aust (1978), el cual mide la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés), entre las que se encuentra el malondialdehído, un producto de lipoperoxidación por radicales libres. Posterior a la incubación durante 30 min con 50 μ M de FeSO₄ para inducir estrés oxidativo, se agregó a cada tubo 2 ml de solución ácida (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0.375% y HCl 0,25 N) y se calentaron en baño maría hirviendo, después de 30 minutos se sacaron los tubos, se enfriaron en hielo 5 minutos y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C. Por último, se extrajo 1 ml del sobrenadante y se determinó espectrofotométricamente a 532 nm la concentración de TBARS usando el coeficiente de extinción molar del malondialdehído. Los resultados se expresaron en términos de en nmoles de TBARS/mg proteína.

6. 12 Obtención de células electrocompetentes de *E. coli*

Las células de *E. coli* JM101 competentes se prepararon mediante el siguiente procedimiento: Se inoculó un tubo con 3 mL de medio CLB (medio LB líquido) con 20 μ L de la cepa JM101 de *E. coli* en glicerol, posteriormente, se incubó por 12-18 h a 37 °C toda la noche con agitación constante, después se transfirió los 3 ml de medio en un matraz de 1L con 250 mL de medio CLB y se incubó el matraz por 4 h a 37 °C con agitación constante hasta registrar una absorbancia de 0.6 a 0.8 a una longitud de onda de 600 nm, se utilizó como blanco medio CLB sin cultivo. Después, se transfirió el matraz con células a un baño de hielo por 15 min y se mezcló cada 5 min, se adicionó 40 mL del medio previamente enfriado a 6 tubos Falcon fríos y se centrifugó a 4 °C, 5500 rpm por 10 min, se descartó el medio y la pastilla se resuspendió en 5 mL de agua fría; se aforó a 40 ml y se centrifugó a 4 °C, 5500 rpm por 10 min, se descartó el agua y la pastilla se resuspendió en 5 mL de glicerol al 10 % frío, posteriormente, se mezcló la suspensión de tres tubos en un tubo, se aforó a 30 ml con glicerol al 10 % y se

centrifugó a 4 °C, 5500 rpm por 10 min y por último, las células se resuspendieron en 1.5 mL de glicerol al 10 %, y se dividieron en alícuotas de 100 µL y se almacenaron a -70 °C.

6. 13 Transformación de *E. coli*

Se realizó la electroporación para la transformación de las células competentes: A 100 µL de células competentes (*E. coli* JM101), se les agregó 2 µL de la mezcla de ligación de ADN, posteriormente, la mezcla se colocó entre los electrodos de la celda y la celda en el electroporador, se dio un pulso de 2.4 kV durante 4 miliseg. Inmediatamente, las células fueron transferidas a un tubo con 1 ml de medio CLB y se incubaron a 37 °C durante 1 h con agitación constante, por último, se plaquearon en cajas de agar LB ampicilina Xgal IPTG y se incubaron a 37 °C toda la noche.

6. 14 Selección de las transformantes bacterianas

La selección de las colonias transformantes se llevó a cabo mediante el sistema de complementación al añadir ampicilina, X-Gal e IPTG al medio de cultivo sólido. La distinción de las colonias transformantes se hizo por el color.

6. 15 Aislamiento de ADN plasmídico bacteriano

De las colonias transformantes se realizó el aislamiento del ADN plasmídico de la siguiente manera: Se creció la colonia transformante en 3 mL de medio CLB con ampicilina (100 mg/mL) de 12-18 h, el cultivo se centrifugó a 12000 rpm por 2 min y la pastilla resuspendida en 150 µL de la solución STE (sacarosa 50 mM; Tris 25 mM; EDTA 10 mM; pH 8), se agregó 20µL de lisozima (20 mg/ml); se mezcló e incubó a 37 °C durante 5 min, después se agregó 200 µL de una solución recién preparada de NaOH (0.2 N) SDS (1%) y se mezcló e incubó 5 min en hielo, después se agregó 150 µL de una solución de acetato de potasio o de sodio 3 M pH de 4.8 y se incubó 10 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min y se agregó 150 µL de fenol-cloroformo (1:1), se vortexeo por 1 min y se centrifugó 4 min a 12000 rpm, la fase superior se transfirió en un tubo limpio y se agregaron 500µL de etanol/isopropanol (60/40 %)

y se incubó 10-15 min en hielo, para después centrifugar 4 min a 12000 rpm y se desechó el sobrenadante, se lavó la pastilla 1 o 2 veces con 500 μ L de etanol al 70 % y se centrifugó 3 min a 12000 rpm, se secó la pastilla y se resuspendió en 50 μ L de H₂O estéril y por último se agregó 3 μ L de RNAsa y se incubó 30 min a 37°C. Después del aislamiento se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para confirmar el DNA del plásmidico.

6. 16 Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de la banda de ADN se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1%, para lo cual se utilizó un sistema de purificación de ADN basado en la adsorción a sílica de los ácidos nucleicos, con el kit Wizard® SV Gel y siguiendo las indicaciones del fabricante.

6. 17 Reacción de ligación del ADN en los plásmidos

Para la ligación del ADN con los plásmidos, se utilizó la enzima T4 ADN /ligasa (promega), se mezcló en hielo cantidades de vector inserto (1:3) en un volumen final de 7.5 μ L, después se añadió 2 μ L de tampón de ligasa 10x y se añadió 0.5 μ L de la enzima (1U/ μ L) y por último, la reacción se incubó por 24 h a 4 °C, los productos de la ligación fueron utilizados para la transformación de *E. coli*.

6. 18 Transformación de *S. cerevisiae*.

Se realizó la transformación de la levadura *S. cerevisiae* (cepa BY4741) con los diferentes plásmidos. La selección de las colonias transformadas se realizó mediante la auxotrofia al uracilo. Las células competentes de *S. cerevisiae* fueron obtenidas de acuerdo al siguiente protocolo: se incubó un preinóculo de *S. cerevisiae* toda la noche a 30 °C con agitación constante, después se inoculó 5 ml de medio YPD líquido y se dejó crecer a 30 °C hasta una lectura de 0.8 a 1 a una densidad óptica de 600 nm y se centrifugó 1 ml del medio a 5000 rpm 4 min a una temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 1 ml de la solución EZ1 del kit y se centrifugó a 5000 rpm por 4 minutos y se desechó el sobrenadante y después se agregó 100 μ L de la solución EZ2 del kit, después se mezcló 50 μ L de las células competentes con el ADN del plásmido (0.2-1 μ g) en un volumen de 3

μL. Se adicionó 500 μL de la solución EZ3 a la suspensión celular y se mezcló vigorosamente, se incubó la solución a 30 °C por 60-90 min y se mezcló 2 o 3 veces por inversión durante este tiempo, finalmente, se plaqueo con 275 μL de la mezcla en cada caja de Petri.

6. 19 Extracción de ADN total de levadura

Se obtuvo ADN total de la levadura mediante el siguiente el protocolo: se creció las levadura en 3 ml de medio mínimo toda la noche a 30 °C con agitación constante, después se centrifugó el cultivo a 13000 rpm por 1 min. Se resuspendieron las células en 200 μL de buffer de lisis (Tritón 2%; SDS 1%; NaCl 100 nM; Tris-HCl pH 8 10 mM; EDTA pH 8 1mM) y se agregó 0.3 g de perlas de vidrio estériles y 200 μL de fenol-cloroformo (1:1), después se mezcló en agitador tipo vortex a alta velocidad por 3 min y se centrifugó a 13000 rpm por 5 min después se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se agregó 500 μL de la mezcla etanol-isopropanol (60/40%), se mezcló por inmersión e incubó en hielo por 15 min y se centrifugó 13000 rpm por 3 minutos. Se desechó el sobrenadante y se lavó 3 veces la pastilla con 500 μL de etanol al 70%. Por último, se resuspendió la pastilla en 50 μL de H₂O con 3 μL de RNAsa y se incubó 30 minutos a 37°C.

6. 20 Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción empleadas en este trabajo fueron utilizadas siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega); las reacciones contenían 0.5 μg de ADN, 2 μL del tapón correspondiente y una unidad de la enzima 0.2 μL de BSA y se completó a un volumen final de 20 μL con agua estéril.

7 Resultados

7. 1 Amplificación por PCR de los genes *GPX2* y *GLR1* de *S. cerevisiae*

Para cumplir los objetivos planteados, primeramente se realizó la sobreexpresión de las proteínas Gpx2 y Glr1 en la levadura. Para esto, se llevaron a cabo reacciones de PCR de los genes *GPX2* y *GLR1* utilizando como molde DNA de *S. cerevisiae* y los productos de amplificación de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (**Figura 6**). Las bandas obtenidas en cada reacción de PCR son del tamaño esperado para cada gen: *GPX2* de 0.5 Kbp y *GLR1* de 1.5 Kbp (**Figura 6**).

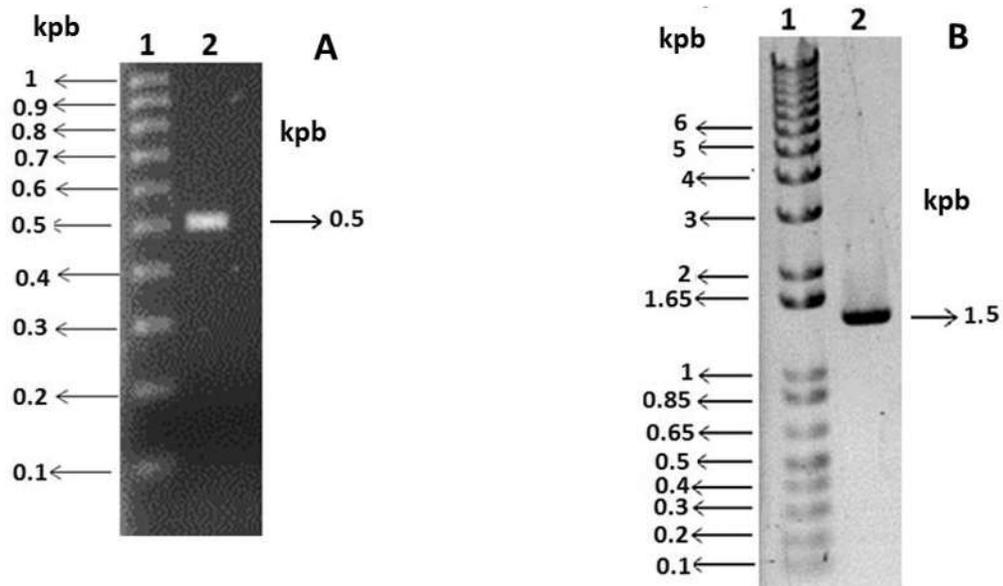


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR de los genes *GPX2* y *GLR1* de *S. cerevisiae*. En el panel **A** se observa en el carril 1 el marcador de tamaño molecular y en el carril 2 se observa una banda de amplificación de PCR aproximadamente 0.5 Kbp del gen *GPX2*. En el panel **B** en el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular y en el carril 2 se observa una banda de amplificación de PCR aproximadamente 1.5 Kbp del gen *GLR1*.

7. 2 Clonación los genes *GPX2* y *GLR1* en el vector de pGEM-T Easy

Las bandas de los productos de PCR de los genes *GPX2* y *GLR1* (**Figura 6**) se purificaron y se ligaron en el vector de clonación pGEM-T Easy, obteniéndose las construcciones pGEM-*GPX2* y pGEM-*GRL1* con las cuales se

realizó la transformación de *E. coli* utilizando como marcador de selección la resistencia a la ampicilina conferida por el plásmido. Después se aisló el DNA plasmidico de las transformantes y se realizó una digestión enzimática la cual se corrió en un gel de agarosa por electroforesis (**Figura 7**). Con estos resultados se comprueba la ligación del plásmido pGEM t Easy a los genes *GPX2* y *GLR1* con el tamaño predicho para cada gen (**Figura 7**).

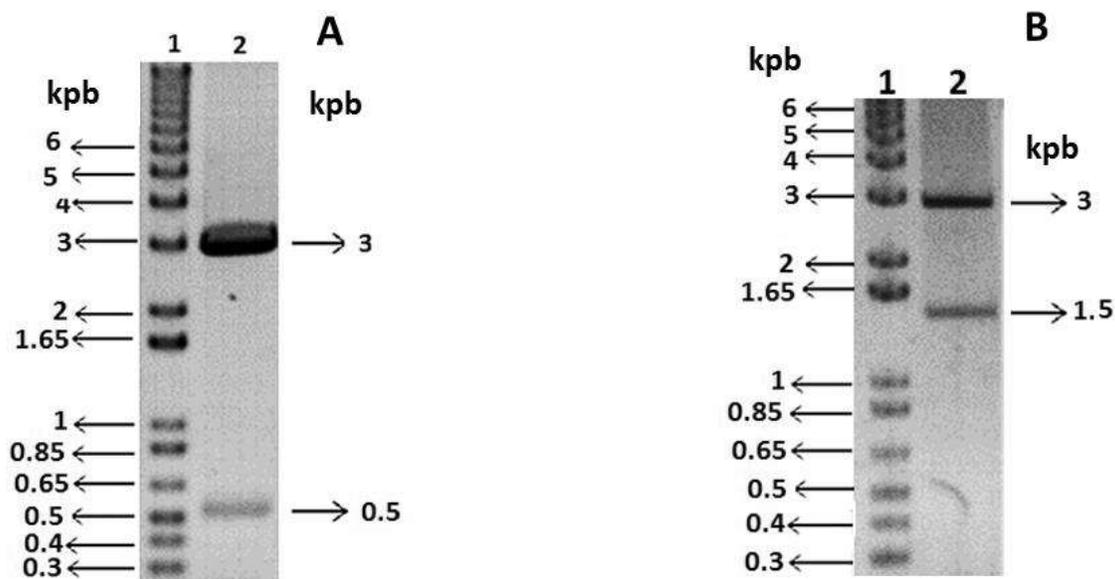


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión enzimática las construcciones pGEM-GPX2 y pGEM-GRL1. En el panel A en el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular; en el carril 2, se observa una banda en la parte superior de 3 Kpb correspondientes al plásmido pGEM y otra en la parte inferior de 0.5 Kpb correspondiente al gen *GPX2*. En el panel B en el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular; en el carril 2 se observa una banda en la parte superior de 3 Kpb correspondientes al plásmido pGEM y otra en la parte inferior de 1.5 Kpb correspondiente al gen *GLR1*.

7. 3 Subclonación de los genes *GPX2* y *GLR1* en el vector de expresión pYES2 de *S. cerevisiae*

Las bandas de los genes *GPX2* y *GLR1* se purificaron y se ligaron en el vector de expresión pYES2 de *S. cerevisiae*, obteniéndose las construcciones pYES2-*GPX2* y pYES2-*GRL1*, con las cuales se realizó la transformación de *E. coli* utilizando como marcador de selección resistencia a la ampicilina conferida

por el plásmido. Después se aisló el DNA plasmídico de las transformantes y se le realizó una digestión enzimática, la cual se corrió en un gel de agarosa por electroforesis (**Figura 8**). El patrón de restricción de los plásmidos confirma la ligación del plásmido pYES2 a los genes *GPX2* y *GLR1*, así como el tamaño esperado para cada gen (**Figura 8**).

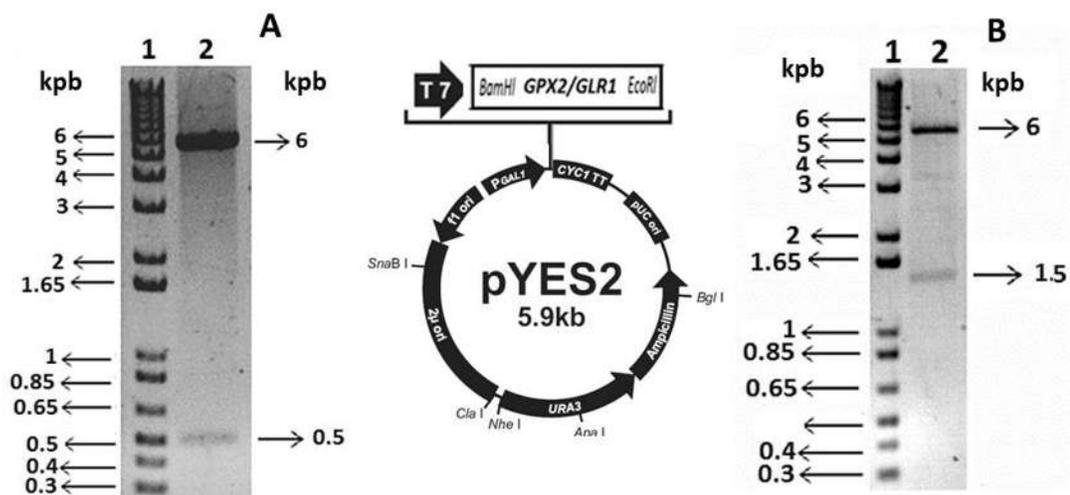


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión enzimática de las construcciones pYES2-*GPX2* y pYES2-*GLR1*. En el panel **A** en el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular; en el carril 2 se observa una banda en la parte superior de 6 Kpb correspondientes al plásmido pYES2 y otra en la parte inferior de 0.5 Kpb correspondiente al gen *GPX2*. En el panel **B** en el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular; en el carril 2 se observa una banda en la parte superior de 6 Kpb correspondientes al plásmido pYES2 y otra en la parte inferior de 1.5 Kpb correspondiente al gen *GLR1*.

7. 4 Transformación de *S. cerevisiae* con los plásmidos pYES2-*GPX2* pYES2-*GLR1*

A continuación se llevó a cabo la transformación de *S. cerevisiae* con las construcciones pYES2-*GPX2* y pYES2-*GRL1*, para lo cual se utilizó como mecanismo de selección la auxotrofia a uracilo de *S. cerevisiae*. Las levaduras transformadas con las construcciones pueden crecer en ausencia de uracilo ya que el plásmido contiene el gen *URA3*, lo cual permite la síntesis del uracilo.

Para confirmar que los plásmidos se encuentren en *S. cerevisiae*, se realizó lo siguiente: se aisló DNA total de células de *S. cerevisiae* transformadas el cual se utilizó para la transformación de *E. coli*. Posteriormente, se aisló DNA plasmidico de *E. coli* y se realizó una reacción de restricción de los plásmidos aislados (**Figura 9**).

El patrón de restricción de los plásmidos confirma que las construcciones pYES2-GPX2 y pYES2-GRL1 se encuentran en las cepas de levaduras transformadas (**Figura 9**).

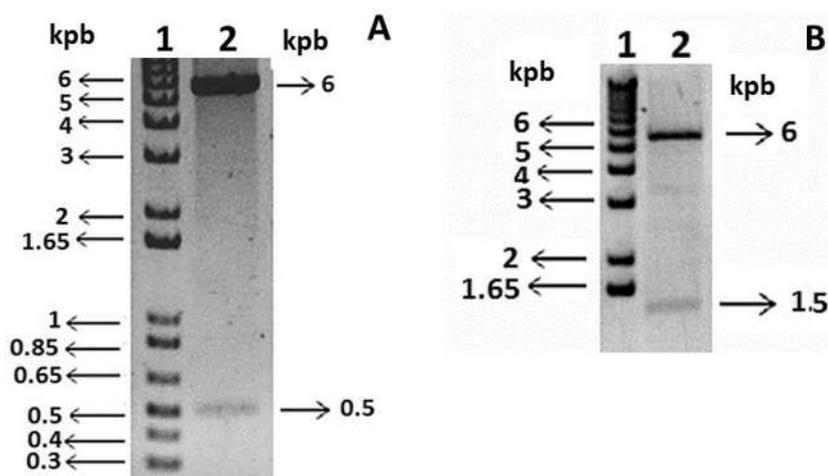


Figura 9. Caracterización de *S. cerevisiae* transformadas con los plásmidos pYES2-GPX2 pYES2-GRL1. En el panel **A**, en el carril 1, se observa el marcador de tamaño molecular; en el carril 2, se observa una banda en la parte superior de 6 Kpb correspondientes al plásmido pYES2 y otra en la parte inferior de 0.5 Kpb correspondiente al gen *GPX2*. En el panel **B**, en el carril 1, se observa el marcador de tamaño molecular, mientras que en el carril 2 se observa una banda en la parte superior de 6 Kpb correspondientes al plásmido pYES2 y otra en la parte inferior de 1.5 Kpb correspondiente al gen *GLR1*.

Con estas cepas de levadura transformadas con las construcciones pYES2-GPX2 y pYES2-GRL1 se obtuvo una batería de 6 cepas de *S. cerevisiae* (**Tabla 8**), con las cuales se procedió a realizar pruebas fenotípicas.

7. 5 Cinéticas de crecimiento

Para determinar el efecto de la mutación del gen *GPX2* en el crecimiento de la levadura, se realizaron cinéticas de crecimientos de las levaduras en ausencia (**Figura 12**) y presencia de ácido linolénico (C18:3) (**Figura 12**).

TABLA 8. Cepas utilizadas en el trabajo.

EUROSCARF	Cepa	
	Wt <i>S. cerevisiae</i>	BY4147
	<i>gpx2Δ</i>	Mutante en el gen <i>GPX2</i>
	<i>glr1Δ</i>	Mutante en el gen <i>GRL1</i>
	Wtp-YES2	Transformada con pYES2
	Wtp-GPX2	Transformada pYES2- <i>GPX2</i>
	Wtp-GLR1	Transformada pYES2- <i>GLR1</i>

Los resultados indican que la mutación de los genes *GLR1* y *GPX2* no influyen en el crecimiento de la levadura en condiciones control sin ningún tipo de estrés, así como las levaduras transformadas con las construcciones pYES2-*GPX2* y pYES2-*GRL1* no presentaron alteraciones en el crecimiento respecto a la cepa control (**Figura 12**). Además, la presencia del C18:3 tampoco afectó el crecimiento de ninguna de las cepas utilizadas confirmando lo reportado por (Avery *et al.*, 2001) de que la presencia del C18:3 no afecta el crecimiento de la *gpx2Δ* (**Figura 12**). Sin embargo, en las cinéticas realizadas en presencia del C18:3 se observó un retraso para entrar en la fase exponencial, lo cual se puede deber al proceso de adaptación de la levadura en respuesta a la presencia del C18:3 en el medio de cultivo (**Figura 12**). Por otro lado, no se observó diferencia en el crecimiento máximo de las levaduras en la presencia o ausencia del C18:3, lo que descarta alguna toxicidad ejercida por el C18:3.

7. 6 Curvas de tolerancia a menadiona en condiciones fermentativas

Para determinar el efecto del estrés inducido por la menadiona y la posible participación de la proteína Gpx2 en condiciones fermentativas, se llevaron a cabo curvas de tolerancia para todas las cepas a concentraciones de menadiona de 0.2 a 1 mM tanto en ausencia (**Figura 13**) y presencia del C18:3 (**Figura 13**).

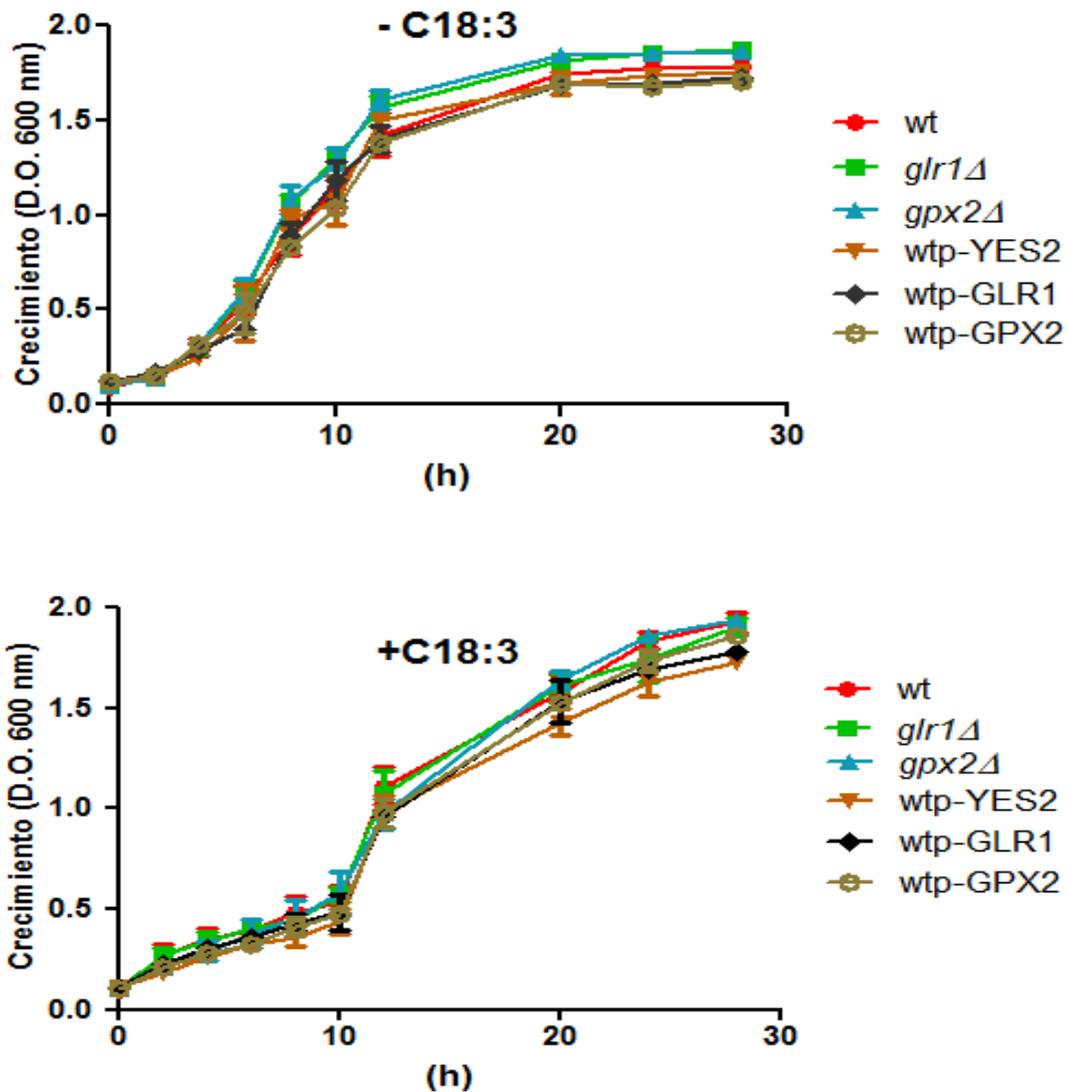


FIGURA 12. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* (\pm C18:3). Cultivos de las cepas wt, *glr1Δ*, *gpx2Δ*, wtp-YES2, wtp-GLR1 y wtp-GPX2 fueron crecidas en medio mínimo con 2% de glucosa e incubadas a 30 °C y 200 rpm. El crecimiento se determinó evaluando la D.O._{600nm} con intervalos de 2 y 4 h. Los resultados se expresan como el promedio \pm la desviación estándar de n=3.

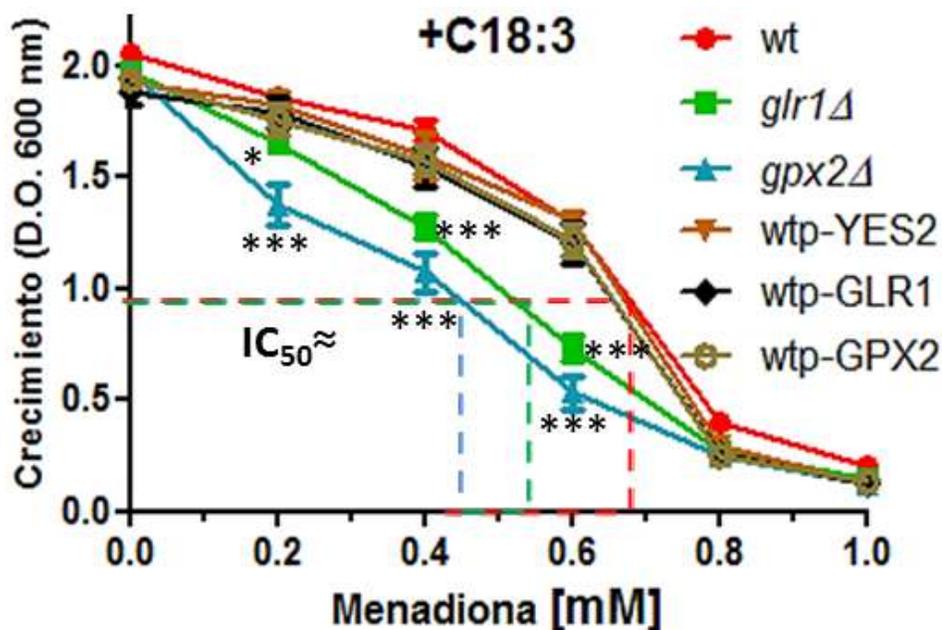
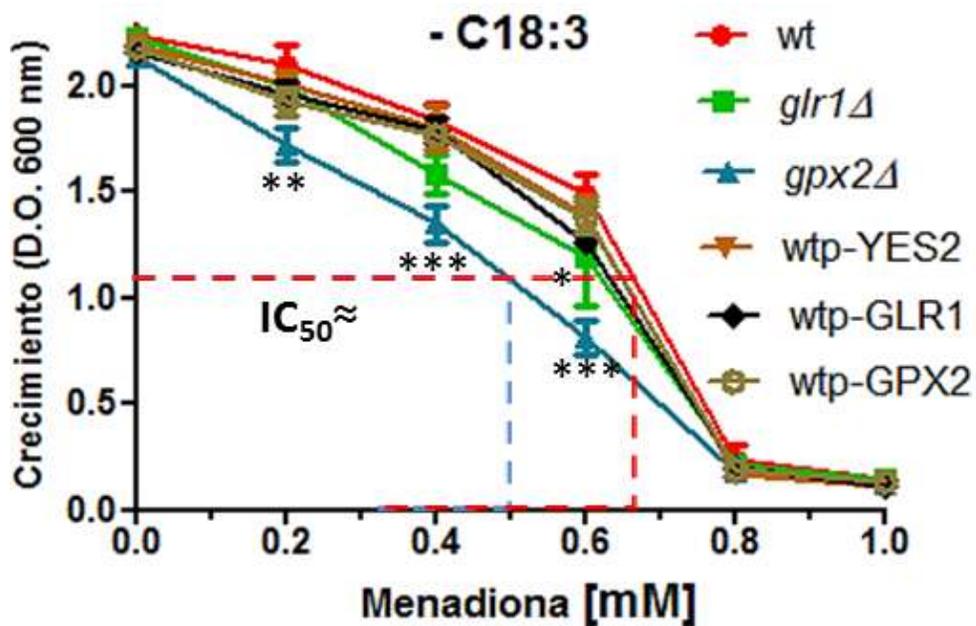


FIGURA 13. Curva de tolerancia a la menadiona de *S. cerevisiae*. Cultivos de las cepas silvestre wt, *glr1Δ*, *gpx2Δ*, wtp-YES2, wtp-GLR1 y wtp-GPX2 fueron crecidos en medio mínimo con 2% de glucosa, 1mM del C18:3, incubadas a 30 °C y 200 rpm. El crecimiento se determinó evaluando la D.O._{600nm} a las 12 h de crecimiento. Se indica la posible dosis concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de las cepas donde se observó diferencia significativa. Los resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar de n=3.

En las curvas de tolerancia se observó una disminución en el crecimiento respecto al incremento en la concentración de menadiona utilizadas, observándose una inhibición completa del crecimiento a la concentración de 1mM de menadiona en todas las cepas de levaduras independientemente de la presencia del C18:3.

En las curvas en ausencia del C18:3 se observó se que solamente la cepa mutante *gpx2Δ* presenta una sensibilidad aumentada respecto a la cepa control a concentraciones de menadiona de 0.2-0.6 mM, mientras que el crecimiento de la mutante *glr1Δ* se ve afectado solo a la concentración de 0.6 mM de menadiona y el de las cepas transformadas permaneció inalterado (**Figura 13**). Cuando las cepas se crecieron presencia del C18:3, la disminución en el crecimiento de las mutantes *gpx2Δ* y *glr1Δ* se observa a concentraciones de menadiona de 0.2-0.6 mM, siendo más clara la inhibición del crecimiento en la mutante *gpx2Δ*, mientras que las cepas transformadas no tuvieron mostraron diferencias respecto al control (**Figura 13**).

7. 7 Curvas de tolerancia a la menadiona de *S. cerevisiae* en condiciones respiratorias

Se realizaron curvas de tolerancia a menadiona en condiciones respiratorias en ausencia (**Figura 14, -C18:3**) y presencia del C18:3 (**Figura 14, +C18:3**), utilizando glicerol como fuente de carbono, en donde la respiración mitocondrial es constante y la viabilidad de la célula depende de la función mitocondrial, condición donde la participación de las proteínas Gpx2 y Glr1 puede ser esencial para mantener la viabilidad de la célula. En las curvas de tolerancia a la menadiona en ausencia del C18:3, las mutantes *glr1Δ* y *gpx2Δ* muestran una disminución significativa en el crecimiento a diferentes concentraciones de menadiona. Por otro lado, se observa que las cepas transformadas con las construcciones pYES2-GPX2 y pYES2-GRL1 crecen por encima del control. lo que sugiere que las construcciones con esos genes fueron funcionales (**Figura 14**).

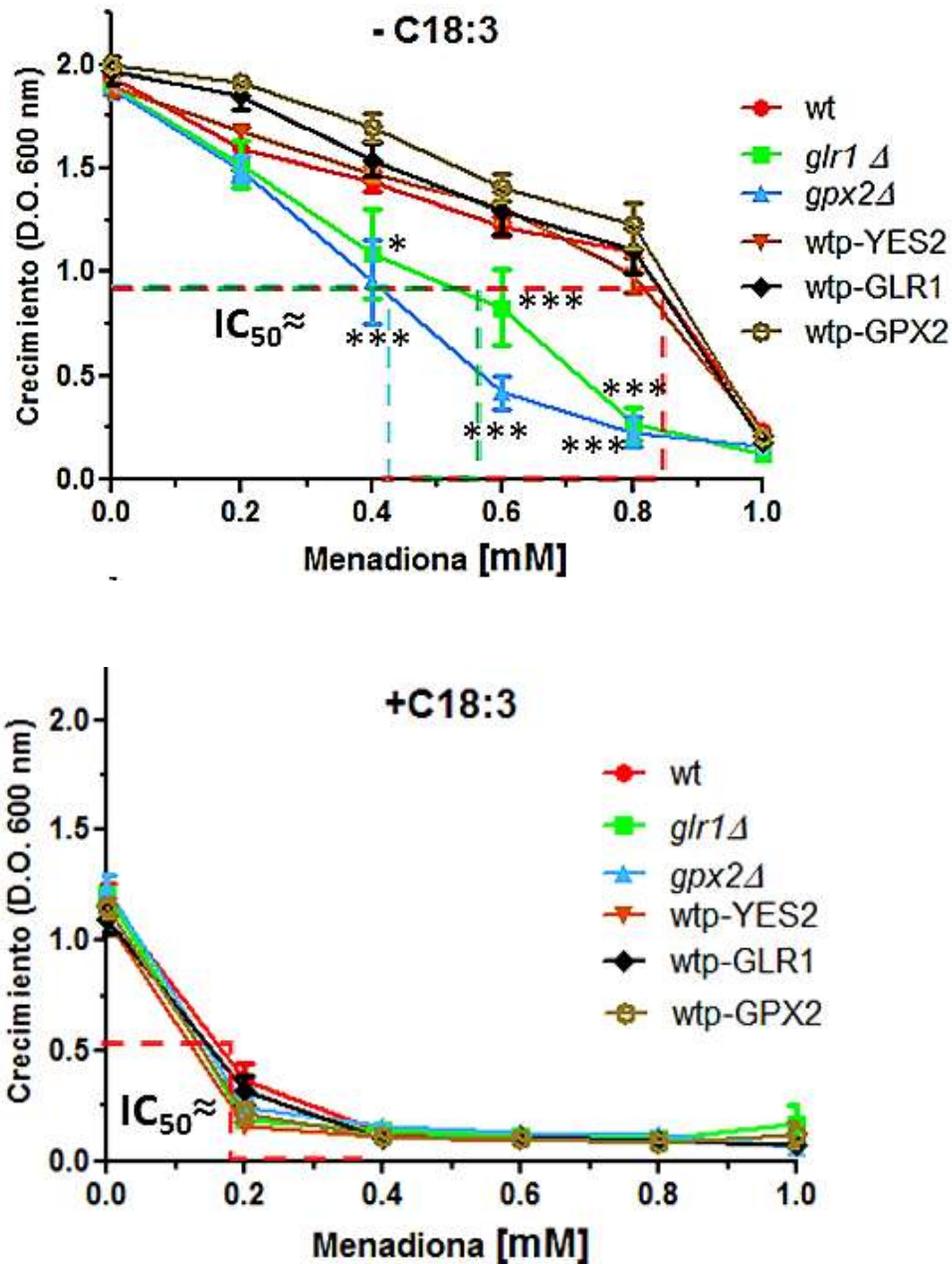


FIGURA 14. Curva de tolerancia a la menadiona de células crecidas en presencia de glicerol. Cultivos de las cepas silvestre wt, *glr1Δ*, *gpx2Δ*, wtp-YES2, wtp-GLR1 y wtp-GPX2 fueron crecidas en medio mínimo con 2% de glucosa, 1mM del C18:3, incubadas a 30 °C y 200 rpm. El crecimiento se determinó evaluando la D.O_{600nm} a las 12 h de crecimiento. Se indica la posible dosis letal de las cepas. Los resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar de n=3.

Cuando las cepas se crecieron en presencia del C18:3, el crecimiento de todas las levaduras se vio afectado drásticamente aun sin la adición de la menadiona hasta en un 50% respecto a cuándo se crecieron en ausencia del C18:3 y cuando se agregó menadiona prácticamente las levaduras no crecieron (**FIGURA 14**). Estos resultados se pueden deber a que la incorporación del C18:3 a las membranas hace más sensible a la levaduras al estrés oxidativo ejercido por la menadiona, inclusive podrían estarse convirtiendo en células *petit* incapaces de crecer en un medio respiratorio.

7. 8 Peroxidación lipídica de *S. cerevisiae*

Para determinar si Gpx2 neutraliza peróxidos lipídicos en las levaduras crecidas en presencia del C18:3 como ha sido propuesto en otros estudios, se midió el nivel de peroxidación lipídica inducida por Fe²⁺ de todas las cepas crecidas en condiciones fermentativas utilizando glucosa como fuente de carbono. Solamente se realizó en condiciones fermentativas, ya que el nivel de peroxidación lipídica no se ve influenciado por el metabolismo de la célula (**Figura 15**). Se muestran los resultados solamente en presencia del C18:3, ya que los resultados en su ausencia eran nulos.

Se observó que tanto las mutantes *glr1Δ* y *gpx2Δ* tuvieron niveles de lipoperoxidación 30% mayores que la cepa control, mientras que la cepa con el vector vacío no mostró diferencia respecto al control. Interesantemente, las cepas transformadas con las construcciones pYES2-GPX2 y pYES2-GRL1 tuvieron una disminución en la peroxidación lipídica hasta de un 25% (**Figura 15**). Estos resultados indican que las proteínas Gpx2 y Glr1 neutralizan los peróxidos lipídicos evitando la reacción en cadena de la peroxidación lipídica de las membranas, lo que resulta en una disminución en los productos de la lipoperoxidación.

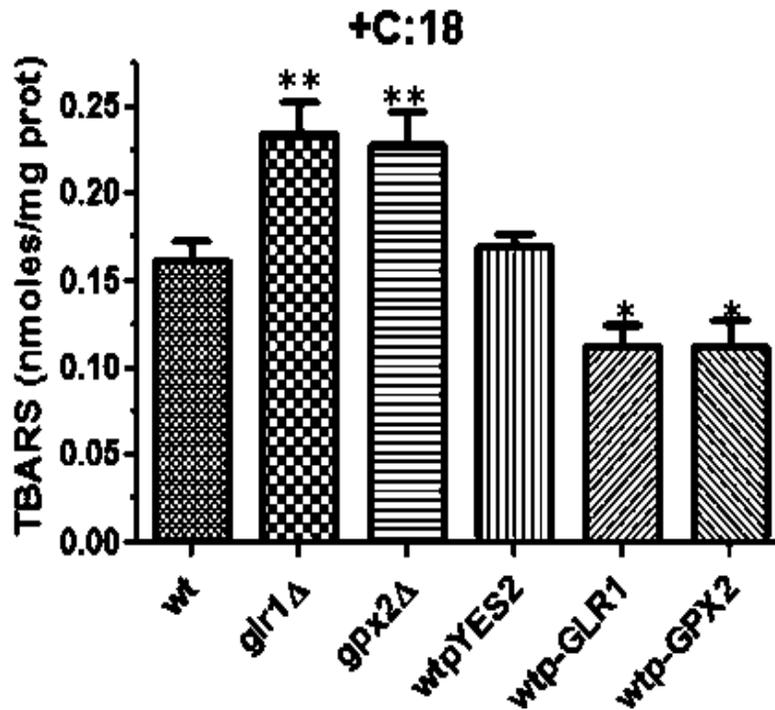


Figura 15. Peroxidación lipídica de *S. cerevisiae* en condiciones fermentativas. Las cepas wt, *glr1Δ*, *gpx2Δ*, wtp-YES2, wtp-GLR1 y wtp-GPX2 fueron crecidas en medio mínimo con 2% de glucosa, 1mM del C18:3, incubadas a 30 °C 200 rpm y 12 h de crecimiento y tratadas con 50 mM de Fe⁺². Los resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar de n=3 (*P< 0.05) (**P< 0.01).

7.9 Respiración mitocondrial de *S. cerevisiae*

Las proteínas Gpx2 y Glr1 son enzimas antioxidantes mitocondriales donde pueden llevar a cabo su papel protector ante el estrés oxidativo, por lo cual se evaluó el efecto de la mutación del gen *GPX2* en ausencia y presencia del C18:3 (**Figura 16**) en la respiración mitocondrial de las levaduras en condiciones fermentativas y respiratorias.

En ausencia del C18:3, se observó un comportamiento inesperado de la mutante *gpx2Δ*, ya que presenta una respiración mitocondrial tres veces más alta más que la cepa control, lo cual sugiere que Gpx2 podría tener una función adicional al inhibir de algún modo la biogénesis mitocondrial o la síntesis de complejos respiratorios, lo que explicaría el aumento en el consumo de oxígeno de esta mutante. Por otro lado, no se observó ningún efecto en las demás cepas (**Figura 16**).

En los resultados de la respiración mitocondrial en presencia del C18:3, se observa una inhibición de la respiración en las mutantes *glr1Δ* y *gpx2Δ*, mientras que la respiración de las cepas transformadas no presenta diferencias respecto al control (**Figura 16**). Esto sugiere que la proteína Gpx2 podría estar neutralizando los peróxidos lipídicos formados por las ERO generadas en la respiración, lo cual protegería la función de los complejos de la CTE del daño por peróxidos lipídicos. En contraste, la sobreexpresión de las proteínas podría no estar influyendo en la respiración mitocondrial debido a que el estrés ejercido por el C18:3 y las ERO generadas en la mitocondria podría ser neutralizado por la expresión basal de la proteína Gpx2, por lo que el aumento en la concentración de la proteína Gpx2 podría no ser de importancia para la mitocondria en estas condiciones.

Después, se evaluó la participación de las proteínas Gpx2 y Glr1 en la respiración mitocondrial durante el estrés por menadiona y en condiciones fermentativas utilizando glucosa como fuente de carbono en ausencia y presencia del C18:3 (**Figura 17**). La respiración de las levaduras tratadas con menadiona y crecidas en condiciones fermentativas en ausencia del C18:3 disminuyó en las

mutantes *glr1* Δ y *gpx2* Δ en un 50 y 80%, respectivamente. mientras que la respiración de las cepas transformadas con las construcciones pYES2-*GRL1* y pYES2-*GPX2* aumentó en un 30% y 50%, respectivamente (**Figura 17**). Cuando las levaduras se crecieron en presencia del C18:3, se observó que la respiración de las mutante *glr1* Δ y *gpx2* Δ disminuye drásticamente y que solo incrementa de manera significativa en la cepa transformada con las construcción pYES2-*GRL1* (**Figura 17**).

Posteriormente se evaluó si las proteínas Gpx2 y Glr1 influyen en la respiración mitocondrial durante el estrés por menadiona en condiciones respiratorias en presencia de glicerol, donde la viabilidad de célula depende de la función mitocondrial (**Figura 18**). Se muestran los resultados en ausencia del C18:3, ya que cuando se agregó menadiona en presencia del C18:3 prácticamente no se observó crecimiento (**Figura 14**).

En estas condiciones, la respiración mitocondrial fue inhibida hasta de un 30% en las mutantes *glr1* Δ y *gpx2* Δ crecidas en condiciones respiratorias. Además, la respiración no aumentó en las levaduras transformadas (**Figura 18**). Cuando las cepas de levadura crecidas en condiciones respiratorias fueron tratadas con menadiona, la respiración mitocondrial de todas las cepas se redujo drásticamente respecto a las cepas no tratadas con menadiona (**Figura 18**). Las levaduras mutantes *glr1* Δ y *gpx2* Δ mostraron una disminución severa de la respiración mitocondrial hasta de un 80 y 90%, mientras que la respiración de las cepas transformadas con las construcciones pYES2-*GRL1* y pYES2-*GPX2* aumentó entre 4 y 7 veces más que la cepa control respectivamente (**Figura 18**). Estos resultados indican claramente que Gpx2 y Glr1 son proteínas importantes para proteger la respiración mitocondrial y mantener viabilidad de la célula en condiciones respiratorias.

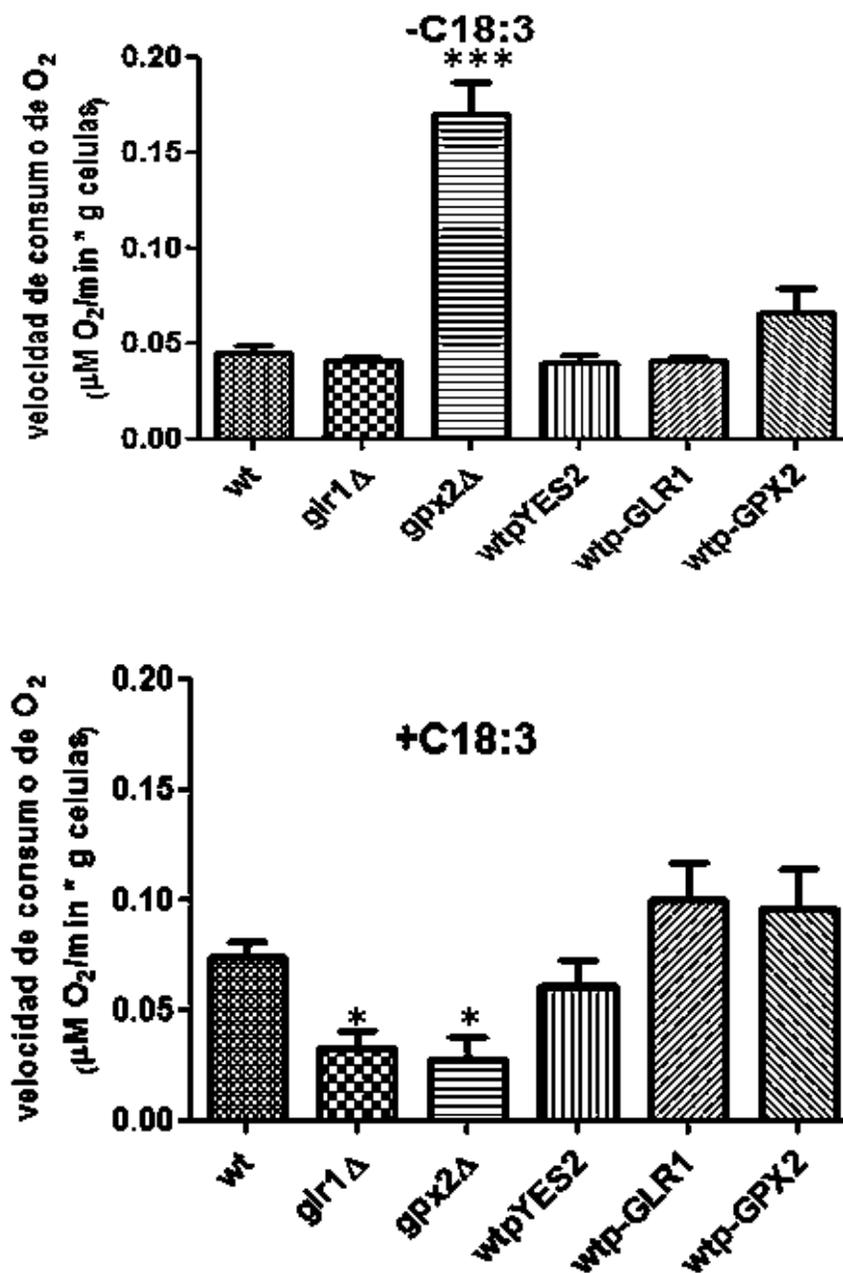


Figura 16. Respiración mitocondrial de las levaduras en estado desacoplado en condiciones fermentativas (\pm C18:3). La respiración mitocondrial de las levaduras wt, *glr1* Δ , *gpx2* Δ , wtp-YES2, wtp-GLR1 y wtp-GPX2 se expresó como el consumo de oxígeno por gramo de células. Los resultados se muestran como el promedio \pm la desviación estándar de n=3 (*P < 0.05) (**P < 0.01) (**P < 0.001).

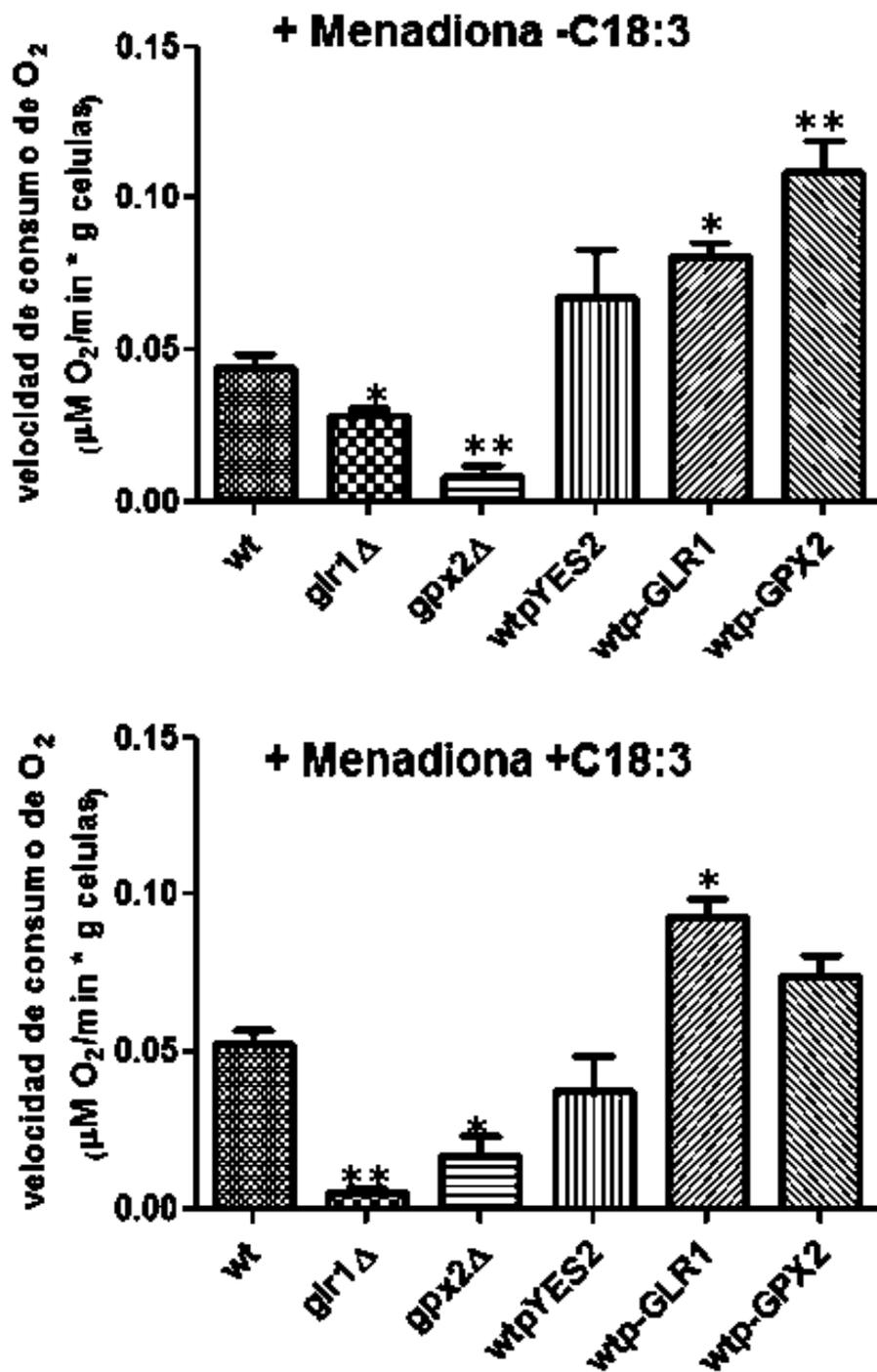


Figura 17. Efecto de la menadiona en la respiración mitocondrial de *S. cerevisiae* en estado desacoplado en condiciones fermentativas (\pm C18:3). La respiración mitocondrial de las levaduras wt, *glr1Δ*, *gpx2Δ*, wtp-YES2, wtp-GLR1 y wtp-GPX2 se expresó como el consumo de oxígeno por gramo de células. Los resultados se muestran como el promedio \pm la desviación estándar de n=3 (*P< 0.05)(**P< 0.01)(***P< 0.001).

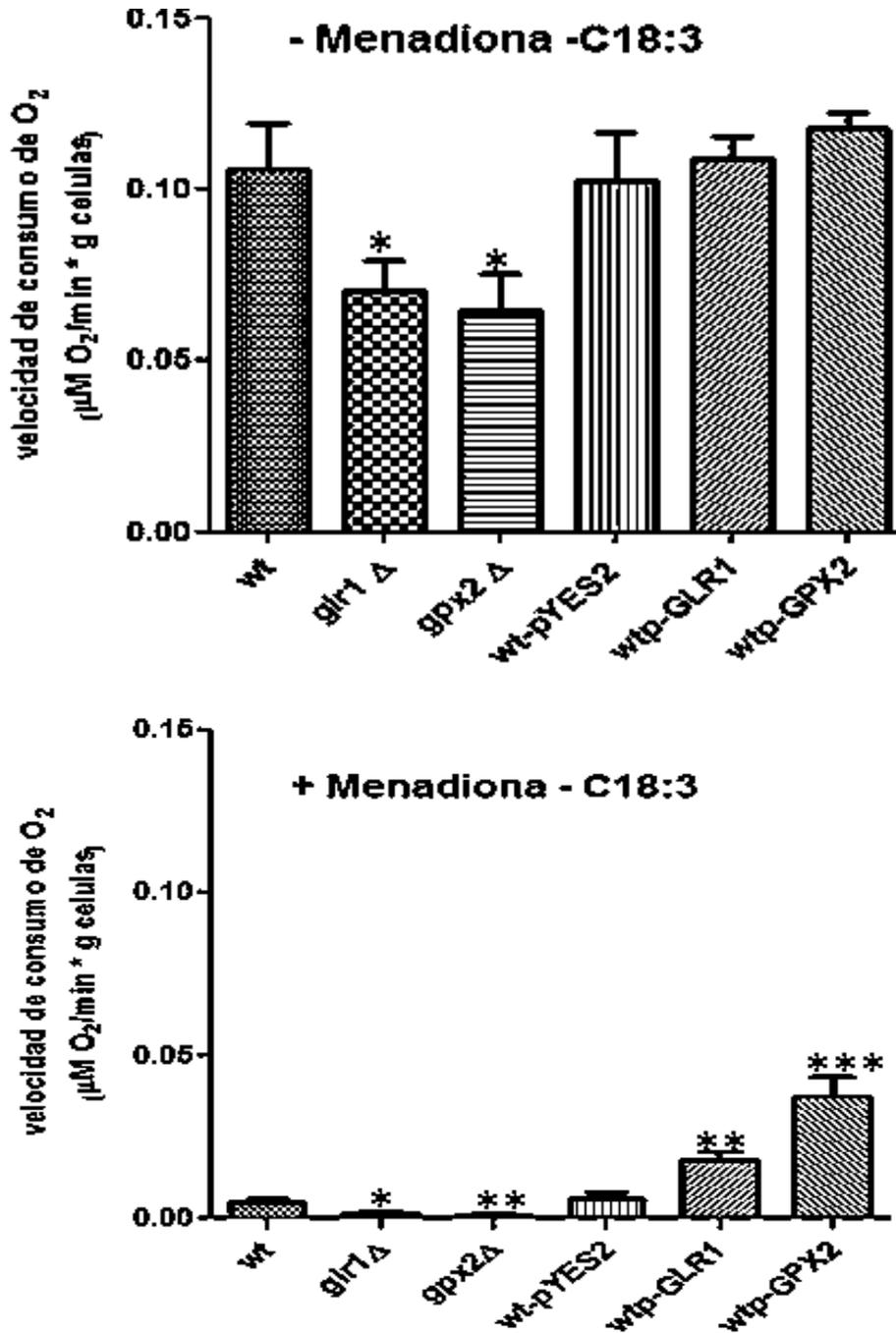


Figura 18. Efecto de la menadiona en la respiración mitocondrial de *S. cerevisiae* en el estado desacoplado en condiciones fermentativas (-C18:3). La respiración mitocondrial de las levaduras wt, *glr1Δ*, *gpx2Δ*, wtp-YES2, wtp-GLR1 y wtp-GPX2 se expresó como el consumo de oxígeno por gramo de células. Los resultados se muestran como el promedio \pm la desviación estándar de n=3 (*P< 0.05) (**P< 0.01) (**P< 0.001).

8 DISCUSIÓN

La levadura *S. cerevisiae* ha sido utilizada desde los inicios de la civilización en la elaboración de vino, pan, cerveza y bebidas destiladas y fue hasta la década de 1930 que se empezaron a realizar estudios a nivel genético con este microorganismo (Winge, 1935). En la actualidad, esta levadura es uno de los organismos modelo más ampliamente utilizados para el estudio de aspectos de gran alcance, fundamentales de la biología de células eucariotas (Duina *et al.*, 2014).

S. cerevisiae es un organismo ampliamente utilizado para el estudio de los mecanismos y proteínas que están involucrados en las respuestas al estrés oxidativo de células eucariotas (Lushchak, 2006). En este sentido, se han realizado estudios sobre las proteínas fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (Gpx1, Gpx2 y Gpx3) de *S. cerevisiae* donde han sido reportadas como una defensa antioxidante hacia el estrés por H₂O₂ de forma *in vitro* (Inoue *et al.*, 1999); sin embargo, otro reporte sugiere que estas enzimas presentan una mayor actividad hacia los hidroperóxidos de fosfolípidos de forma *in vitro* y que además, las secuencias de estas enzimas tienen mayor identidad con las fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (Avery *et al.*, 2001). En ambos estudios concluyen que la mutante Gpx2 de *S. cerevisiae* no es sensible al estrés por el C18:3 y peróxidos, no obstante los niveles de expresión del gen *GPX2* se observaron incrementados en condiciones de estrés oxidativo (Inoue *et al.*, 1999). Sin embargo, la función de Gpx2 podría haber sido enmascarada debido a las condiciones experimentales utilizadas, ya que el uso de glucosa como fuente de carbono reprime la función mitocondrial haciendo que la respiración no sea esencial en la fase exponencial de crecimiento (Gancedo, 1998). Por lo tanto, al ser Gpx2 una proteína mitocondrial (Ukai *et al.*, 2011), su mutación podría no verse reflejado en una disminución en la viabilidad celular en condiciones fermentativas, lo cual concuerda con el resultado obtenido en la Fig. 12, donde la mutación de Gpx2 no afectó el crecimiento en la fase exponencial independientemente de la presencia de C18:3

En nuestro grupo de trabajo, también se ha determinado la participación de las proteínas Gpx de *S. cerevisiae* durante el envejecimiento cronológico, donde se observó que la proteína Gpx2 es necesaria para mantener la viabilidad celular mediante la preservación de la función mitocondrial. En estas condiciones de envejecimiento, la función mitocondrial es esencial para mantener la viabilidad de la levadura dado que la célula se mantiene en fase estacionaria (Canizal-García, 2015, Tesis de Maestría). En este sentido, el presente trabajo se enfocó en evaluar la participación de la proteína Gpx2 en la resistencia al estrés oxidativo y la preservación de la función mitocondrial en presencia y ausencia del C18:3 utilizando condiciones de crecimiento fermentativo (glucosa como fuente de C) y respiratorio (glicerol como fuente de C), en condiciones de estrés oxidativo por menadiona, el cual es un generador intramitocondrial de ERO al ser reducida parcialmente por deshidrogenasas mitocondriales y donar su electrón al oxígeno para generar $O_2^{\cdot-}$ (Chaput *et al.*, 1983). Los efectos de Gpx2 se compararon con los de Glr1, la cual es una proteína que se conoce es vital para la resistencia a peróxidos lipídicos (Evans *et al.*, 1998).

En primer lugar, se observó que en condiciones fermentativas o respiratorias la mutación de los genes *GLR1* y *GPX2* no influye en el crecimiento de la levadura en ausencia de estrés oxidativo y tampoco la transformación con los plásmidos pYES2-*GRL1* y pYES2-*GPX2* (**Figura 12**). Además, la presencia del C18:3 tampoco afectó el crecimiento de ninguna de las cepas utilizadas, confirmando lo reportado por Avery *et al.* (2001) acerca de que la mutación del gen *GPX2* no afecta el crecimiento de la levadura en presencia del C18:3 (**Figura 12**), lo que indica que en las condiciones control y en presencia del C18:3 utilizando glucosa como fuente de carbono, la proteína Gpx2 no es de relevancia para el crecimiento de la levadura. Sin embargo, en las cinéticas realizadas en presencia del C18:3 se observó un retraso para entrar en la fase exponencial (**Figura 12**), lo cual se puede explicar debido a la regulación transcripcional de genes en respuesta a la presencia del C18:3 en el medio de cultivo. Por ejemplo, se ha demostrado una represión del gen *OLE1* por ácidos grasos poliinsaturados, el cual codifica para la desaturasa Δ^9 involucrada en la síntesis de ácidos grasos

monoinsaturados de membrana, por lo cual, la levadura incorpora los ácidos grasos poliinsaturados del medio de cultivo en lugar del producto de la actividad de Ole1p (Choi *et al.*, 1996). Por otro lado, en el crecimiento máximo de las levaduras, no se observaron diferencias en presencia o ausencia del C18:3, lo que descarta cualquier tipo de toxicidad ejercida por el C18:3.

Posteriormente, se evaluó la participación de la proteína Gpx2 en la resistencia al estrés oxidativo inducido por menadiona en condiciones fermentativas, en ausencia y presencia del C18:3, en donde se observó una mayor sensibilidad en las mutantes *gpx2Δ* y *glr1Δ* en un rango de concentraciones de entre 0.2-0.6 mM de menadiona, siendo el fenotipo más evidente en la mutante la *gpx2Δ* (**Figura 13**). Dado que la menadiona puede dar lugar a la generación de subproductos del radical $O_2^{\cdot -}$, tales como el H_2O_2 o el $\cdot OH$ (Chaput *et al.*, 1983), es posible que en presencia de +C18:3 se formen adicionalmente peróxidos lipídicos (ROOH) y que estas especies provoquen un daño adicional a la levadura, inhibiendo su crecimiento. En este sentido, la proteína Gpx2 podría estar neutralizando tanto el H_2O_2 y los ROOH, ya que se conoce que el sitio activo de la enzima Gpx2 contiene una seleno-cisteína que tiene la capacidad de neutralizar el peróxido de hidrogeno y peróxidos lipídicos (Tanaka *et al.*, 2005). Por lo tanto se puede sugerir que Gpx2 es una enzima importante para mantener la viabilidad de la levadura en condiciones de estrés oxidativo mitocondrial bajo un metabolismo fermentativo al neutralizar el H_2O_2 en ausencia y ROOH en presencia del +C18:3, lo cual es contrario a los reportes publicados anteriormente (Inoue *et al.*, 1999; Avery *et al.*, 2001). Esta diferencia en los resultados se puede deber al agente estresante utilizado, ya que la menadiona genera ERO por un mecanismo mediado por la NADH ubiquinona:oxidorreductasa mitocondrial (Castro *et al.*, 2008) que puede causar daño oxidativo directamente a la función mitocondrial (Chaput *et al.*, 1983), donde Gpx2 podría jugar un papel protector. La carencia de efectos de la mutación *gpx2Δ* reportada por Avery podría deberse a que la sola presencia del C18:3 podría no causar ningún daño oxidativo o uno de una magnitud insignificante comparado al ocasionado por la menadiona, (Avery *et al.*, 2001), mientras que las diferencias con el trabajo e Inoue (Inoue *et al.*, 1999),

podría ser que los oxidantes utilizados, H_2O_2 y el ter-butil hidroperóxido (*t*-BHP) podrían estar siendo neutralizados por sistemas antioxidantes como la catalasa, Gpx3 y tioredoxinas, que pueden abatir al H_2O_2 antes de que ingrese a la mitocondria (Ribas *et al.*, 2014). Además, se conoce que el H_2O_2 se descompone fácilmente en solución acuosa.

En las curvas de tolerancia a menadiona en condiciones respiratorias utilizando como fuente de carbono glicerol donde la respiración mitocondrial no es reprimida y la viabilidad de célula depende de la función mitocondrial (Grauslund y Rønnow, 2000), se observó en ausencia del C18:3 una disminución en el crecimiento de las mutantes *glr1*Δ y *gpx2*Δ. Solo bajo esta condición, se observó que las cepas transformadas con las construcciones pYES2-*GRL1* y pYES2-*GPX2* crecen por valores arriba del control (**Figura 14**), lo que sugiere que las construcciones contenidas en esos plásmidos son funcionales y pone de relieve la importancia de estas enzimas en el crecimiento respiratorio cuando se producen niveles altos de ERO a nivel mitocondrial. Además, es posible proponer que si el tiempo de exposición al estrés por menadiona se hubiera prolongado a la fase estacionaria, la viabilidad aumentada podría haber sido mayor con los genes insertados en los plásmidos, ya que, como se mencionó anteriormente, se ha descrito que Gpx2 es importante para mantener la viabilidad de la levadura en la fase estacionaria (Canizal-García 2015, Tesis de Maestría). En resumen, estos resultados indican claramente que Gpx2 es una proteína importante para mantener la viabilidad de la célula en condiciones respiratorias posiblemente al neutralizar el H_2O_2 formado por la menadiona, contrario a lo que ha reportado (Inoue *et al.*, 1999), y que de manera *in vivo*, Gpx2 actúe más como una glutatión peroxidasa convencional con una mayor afinidad por H_2O_2 que a los ROOH como se ha reportado anteriormente (Avery *et al.*, 2001). Esto además daría sentido a la existencia de una enzima con capacidad de reparar el daño en ácidos grasos poliinsaturados, ya que *S. cerevisiae* que es una levadura resistente a la peroxidación lipídica al contener solo ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Cortés-Rojo *et al.*, 2009), por lo cual, esto sugiere que el gen GPX2 fue retenido en la levadura debido a que su producto, Gpx2p, es capaz también de neutralizar

el H₂O₂. Además, esto toma más sentido si se considera que gpx2 probablemente sea uno de los mecanismos más importantes de detoxificación del H₂O₂, ya que hubiera sido de esperarse que la mutación de esta enzima no tuviera un efecto de la magnitud al que se observó en este estudio, ya que se esperaría que otras enzimas que neutralizan esta ERO tales como la catalasa o las peroxirredoxinas hubieran tomado el papel de Gpx2, lo cual habría evitado la aparición de un fenotipo de inhibición del crecimiento, cosa que no ocurrió.

En presencia del C18:3, el crecimiento de todas las cepas de levadura se vio afectado drásticamente, de tal modo que la combinación de menadiona y C18:3 previno el crecimiento (**Figura 14**). Estos resultados podrían ser debido a que el este estrés oxidativo combinado podría rebasar la capacidad de todos las defensas antioxidantes de la levadura. Esto podría ser atribuirse a un daño severo en el ADN mitocondrial, dando lugar a un fenotipo petti que haría a las levaduras incapaces de crecer en un medio respiratorio.

Para comprobar si Gpx2 neutraliza peróxidos lipídicos en las levaduras crecidas en presencia del C18:3, se midió el nivel de peroxidación lipídica de todas las cepa inducido por Fe²⁺, un catalizador de la formación de radical OH[•]. Los niveles de peroxidación lipídica incrementaron de manera importante en las mutantes *glr1Δ* y *gpx2Δ*, mientras que disminuyó en las cepas transformadas con las construcciones pYES2-*GRL1* y pYES2-*GPX2* (**Figura 15**). Estos resultados corroboran que las proteínas Gpx2 y Glr1 inhiben la peroxidación de lípidos, posiblemente neutralizando los peróxidos lipídicos y evitando la fase de propagación de dicho proceso. Esta función no ha sido reportada hasta el momento para Gpx2.

Como se mencionó anteriormente, las proteínas Gpx2 y Glr1 son enzimas antioxidantes mitocondriales donde podrían prevenir la inhibición de la CTE por estrés oxidativo. Por lo anterior, se evaluó la respiración mitocondrial en todas las cepas estudiadas. La mutante *gpx2Δ* en ausencia del C18:3 mostró un comportamiento inesperado, ya que presentó una respiración mitocondrial tres veces más alta que la cepa control. No se tiene evidencia explicar lo anterior, ya

que se esperaba que la respiración fuera similar o menor al control al no haber ninguna inducción de ningún tipo de estrés, más que solo el generado por el funcionamiento propio de la CTE (**Figura 16**). Una posible hipótesis para explicar este hallazgo es que Gpx2 funcione adicionalmente como un sensor al estrés por el H₂O₂ y que esto reprima la biogénesis mitocondrial o de complejos de la CTE como un mecanismo de retroalimentación para disminuir el funcionamiento de la CTE y por lo tanto, de la producción descontrolada de H₂O₂, por lo cual su ausencia se refleja en un incremento de la cantidad de mitocondrias y/o complejos respiratorios y un aumento en el consumo de oxígeno. Por lo tanto, se necesitan realizar más experimentos para confirmar esta hipótesis. Sin embargo, esta idea no es tan descabellada, ya que se ha reportado que otra isoforma de Gpx2, la proteína Gpx3, actúa como un sensor de estrés por el H₂O₂, al reaccionar con esta ERO y activar al factor de transcripción Yap1 que regula varios genes antioxidantes como respuesta al estrés oxidativo (Delaunay *et al.*, 2002).

En los resultados de la respiración mitocondrial en presencia del C18:3 se observó que la respiración de las mutantes *glr1Δ* y *gpx2Δ* disminuyó de manera significativa (**Figura 20**). Esto indica que neutralización de los peróxidos lipídicos por Gpx2 (**Figura 16**) podría disminuir el daño producido por la peroxidación lipídica en los complejos de la CTE que se ha observado anteriormente en levaduras crecidas en presencia de C18:3 (Cortés-Rojo *et al.*, 2009), de igual manera a como se ha observado con Glr1 a nivel de respiración mitocondrial (Yoboue *et al.*, 2012).

La razón por la cual la sobreexpresión de las proteínas Gpx2 y Glr1 no influyó en la respiración mitocondrial podría ser atribuible a que el estrés ejercido por el C18:3 puede ser menor y sea neutralizado por la expresión basal de la proteína Gpx2 y que el aumento en la concentración de la proteína Gpx2 no sea de importancia para la mitocondria en estas condiciones de la levadura de igual manera que no afecta el crecimiento de la levadura (Avery *et al.*, 2001).

En la evaluación de la respiración mitocondrial durante el estrés por menadiona en levaduras crecidas en condiciones fermentativas en ausencia del

C18:3, se observó una disminución en la respiración mitocondrial de las mutantes *glr1Δ* y *gpx2Δ* del 50 y 80%, respectivamente, mientras que este parámetro aumentó 30 y 50% en las cepas transformadas con los plásmidos pYES2-*GLR1* y pYES2-*GPX2* (**Figura 17**). Además, cuando las levaduras se crecieron en presencia del C18:3, se observó una inhibición drástica de la respiración en ambas mutantes y solo la cepa transformada con pYES2-*GLR1* mostró un nivel de respiración mitocondrial mayor que el del control (**Figura 17**). Como se mencionó anteriormente, la menadiona puede llevar a la producción de H₂O₂ y ROOH cuando las levaduras se crecen +C18:3 directamente en la mitocondria, donde pueden estar causando daño que se ve reflejado en la disminución de la respiración mitocondrial y crecimiento de las mutantes *glr1Δ* y *gpx2Δ* como se observa en las curvas de tolerancia a menadiona (**Figura 13 y 14**), por lo que la proteína Gpx2 podría neutralizar tanto el H₂O₂ y HOOR y así disminuir el daño a los complejos de la CTE tanto por el entrecruzamiento de grupos tioles de los complejos II y III (Cortés-Rojo *et al.*, 2007) como por el daño lipoperoxidativo (Cortés-Rojo *et al.*, 2009). Con estos resultados se puede concluir que Gpx2 es una proteína que preserva del daño sobre la CTE mitocondrial por el estrés por el H₂O₂ y ROOH, función que no ha sido reportada para esta proteína, mientras que esto si había sido reportado para Glr1p (Yoboue *et al.*, 2012).

La respiración mitocondrial durante el estrés por menadiona en condiciones respiratorias mostró una disminución solo en las cepas mutantes (**Figura 17**). La carencia de efecto en las cepas transformadas con los plásmidos pYES2-*GLR1* y pYES2-*GPX2* podría deberse a que el estrés oxidativo generado por el metabolismo respiratorio es neutralizado eficazmente por la proteína Gpx2 endógena y que la el aumento en la concentración de la proteína Gpx2 no repercute en la respiración de la levadura.

Cuando las cepas de levadura crecidas en condiciones respiratorias y fueron tratadas con menadiona, la respiración mitocondrial de todas las cepas disminuyó drásticamente respecto a las cepas no tratadas con menadiona (**Figura 17**), lo que deja en evidencia el daño aumentado de la menadiona en la

mitocondria. Las mutantes *glr1Δ* y *gpx2Δ* sufrieron una inhibición de la respiración mitocondrial hasta de un 80 y 90%; en contraste. las cepas transformadas con los plásmidos pYES2-*GLR1* y pYES2-*GPX2* presentaron una respiración de 4 y 7 veces mayor que la de la cepa control, respectivamente (**Figura 17**). Estos resultados indican que Gpx2 es una proteína importante para proteger la respiración mitocondrial y mantener viabilidad de la célula en condiciones de estrés oxidativo.

9 CONCLUSIÓN

La proteína Gpx2 mantiene la viabilidad de *S. cerevisiae* mediante la protección de la función mitocondrial durante el estrés oxidativo, bajo condiciones de crecimiento fermentativo y respiratorio.

10 LITERATURA CITADA

Aguilar-Toral R., Fernández-Quintero M., Ortiz-Ávila O., Hernández De La Paz L. Calderón- Cortés E., Rodríguez-Orozco A.R., Saavedra-Molina A., Calderón-Torres M., Cortés-Rojo C. (2014). Characterization of the effects of a polyunsaturated fatty acid (PUFA) on mitochondrial bioenergetics of chronologically aged yeast. *J Bioenerg Biomembr.* 46:205-220.

Avery A. M y Avery S. M (2001). Peroxidases Phospholipid Hydroperoxide Glutathione *Saccharomyces cerevisiae* Expresses Three. *J. Biol. Chem.* 276:33730-33735.

Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Baines I.C., Tekle E., Chock P.B., Rhee S.G (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272:217–221.

Beckman K. B y Ames B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 78:547–581.

Biddick R, Young E. T. (2005). Yeast mediator and its role in transcriptional regulation. *C R Biol.* 9:773-82.

Birben E, Sahiner U. M, Sackesen C, Erzurum S y Kalayci O. (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 5: 9–19.

Boveris A y Cadenas E(2000). Mitochondrial of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. *IUBMB life.* 50:245-250

Burton G y Traber M (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokenetics, and bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.* 10; 357-382.

Cai H (2005). Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc. Res.* 68, pp. 26–36.

Camps D (2010). *Bioquímica del estrés Oxidativo.* Casa del Libro Gandhi.

Castro F. A. V, Mariani D, Panek A. D, Eleutherio E. C. A, Pereira M. D. (2008). Cytotoxicity Mechanism of Two Naphthoquinones (Menadione and Plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE.* 12: e3999.

Chang T. S, Cho C. S, Park S, Yu S, Kang S. W, Rhee S. G (2004). Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic sign. *J Biol Chem.* 40:41975-84.

Chaput M, Brygier J, Lion Y, Sels A. (1983). Potentiation of oxygen toxicity by menadione in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie.* 8-9:501-12.

Chelikani P, Fita I, Loewen P. C (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* las estructuras y propiedades entre catalasas. *Ciencias de la Vida Celular y Molecular.* 61: 192-208.

Choi J. Y, Stuke J, Hwang S. Y, Martin C.E. (1996). Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *J Biol Chem.* 7:3581-9.

Commoner B, Townsend J, Pake G. E (1954) Free radicals in biological materials. *Nature.* 174:689–691.

Cortés-Rojo C, Calderón-Cortés E, Clemente-Guerrero M, Estrada-Villagómez M, Manzo-Avalos S, Mejía-Zepeda R, Boldogh I, Saavedra-Molina A (2009). Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *J Bioenerg Biomembr.* 41:15–28.

Cortés-Rojo C, Calderón-Cortés E, Clemente-Guerrero M, Manzo-Avalos S, Uribe S, Boldogh I, Saavedra-Molina A. (2007). Electron transport chain of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is inhibited by H₂O₂ at succinate-cytochrome c oxidoreductase level without lipid peroxidation involvement. *Free Radic Res.*11: 1212–1223.

Costa V y Moradas-Ferrira P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.* 22: 217-246.

Delaunay A., Pflieger D., Barrault M.B., Vinh J., Toledano M.B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox- transducer in gene activation. *Cell.* 111: 471-481.

Dröge W. (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physrev.* 1: 47-95.

Duina A. A, Miller M. E Keeney J. B. (2014). Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics.* 197(1):33-48.

El-Agamey A, Lowe G. M, McGarvey D. J, Mortensen A, Phillip D. M, Truscott T. G, Joven A. J (2004). *Arco Biochem Biophys.* 430: 37-48.

Enoksson M, Fernandes A. P, Prast S, Lillig C. H, Holmgren A, Orrenius S (2005). Overexpression of glutaredoxin 2 attenuates apoptosis by preventing cytochrome c release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327: 774–779.

Fabrizio P y Longo V. D (2003). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell.* pp73–81.

Foreman J, Demidchik V, Bothwell J. H, Mylona P, Miedema H, Torres M. A, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones J. D (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth *Nature*, 422, pp. 442–446.

Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 3:325-31.

Gancedo J. M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2:334-61.

Geiszt M y Leto T. L (2004). The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J. Biol. Chem.*, 279, pp. 51715–51718.

Ghosh R, Mitchell D.L (1999). Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding. *Nucleic Acids Res.* 27:3213–3218.

Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O, Styles, C. A y Fink, G. R (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell.* 68: 1077-1090.

Girotti A. W (1985) Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med.* 1:87–95.

Goffeau A, Barrel B. G, Bussey H, Davis R. W, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel J. D, Jacq C, Johnston M, Louis E. J, Mewes H. W, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver S. G (1996). Life with 6000 genes. *Science.* 274; 563-567.

Gomez G. M (2013). Evaluacion de la participación de las proteínas Aco1p, Lip5p, Sdh2p y Rip1p en la toxicidad generada por el etanol en *Saccharomyces cerevisiae*. Instituto de investigaciones químico-biológicas.

Grant C. M, Collinson L. P, Roe J. H, Dawes I. W. 1996. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Microbiol.* 1:171-9.

Grauslund M, Rønnow B. 2000. Carbon source-dependent transcriptional regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene, GUT2, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol.* 12:1096-100.

Halliwell B and Gutteridge JMC. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd ed.). Oxford, UK: Oxford Univ.

Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298–300.

Hulbert A. J., Pamplona R., Buffenstein R and W. A. Buttemer. (2007) Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiol Rev* 87:1175-1213.

Imai H, Nakagawa Y. (2003) Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biol Med* 34: 145–169.

Inoue Y, Matsuda T, Sugiyama K, Izawa S, Matsuda A. T (1999). Genetic Analysis of Glutathione Peroxidase in Oxidative Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274:27002-27009.

Jamieson D. J (1998). Oxidative Stress Responses of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511–1527.

Joseph-Horne, J, Hollomon, D.W, Wood, P.M (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochimica et Biophysica Acta*. *FEBS Letters.* 581: 2935-2942.

Kaeberlein M, Burtner C. R, and Kennedy B. K (2007). Recent Developments in Yeast Aging. PLoS Genet. 3(5): e84.

Kalyanaraman B. (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. Redox Biol. 1: 244–257.

Li J, Stouffs M, Serrander L, Banfi B, Bettiol E, Charnay Y, Steger K, Krause K. H, Jaconi M. E (2006). The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. Mol. Biol. Cell, 17, pp. 3978–3988.

Lu T y Finkel T. (2008). Free Radicals and Senescence. Exp Cell Res. 9: 1918–1922.

Lushchak V. I. (2006). Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. Acta Biochim Pol. 4:679-84.

Maiorino M, Roveri A, Ursini F, and Gregolin C. (1985). Enzymatic determination of membrane lipid peroxidation. J Free Radic Biol Med 1: 203–207.

Mann P. J. G y Quastel J. H. (1946). Toxic effects of oxygen and of hydrogen peroxide on brain metabolism. Biochem J. 40(1): 139–144.

Marklund S. L (1984). Extracellular superoxide dismutase en human tissues and human cell lines. J. Clin. Invest. 74; 1398-1403.

Mason R. P, Casu M, Butler N, Breda C, Campesan S, Clapp J, Green E. W, Dhulkhed D, Kyriacou C. P, Giorgini F (2013). Glutathione peroxidase activity is neuroprotective in models of Huntington's disease. Nat Genet. 45(10):1249-54.

Mathews C. K, Van Holde, K. E, Ahern, K.G. (2003). Bioquímica. Tercera edición. Addison Wesley.

McCord J.M y Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. 244: 6049–6055.

Miller-Fleming L, Giorgini F, Outeiro T. F. (2008) . Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnol J.* 3:325-38.

Mockett R. J, Sohal R. S, Orr W. C (1999). Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hyperoxia but not normoxia. *FASEB J.* 13:1733-42.

Molina-Navarro, M. (2005) Las glutaredoxinas monotiolicas como reguladoras redox de proteínas: estudios funcionales y evolutivos en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Doctorado. Facultat de medicina departament de ciencies mediques basiques. Universitat De Lleida.

Morano K. A. Grant C. M, Moye-Rowley W. S. (2012). The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 4: 1157–1195.

Muller E. G (1996). A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol Biol Cell.* 11: 1805–1813.

Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47: 143–183.

Ortiz-Avila O, Gallegos-Corona M. A, Sánchez-Briones L. A, Calderón-Cortés E, Montoya-Pérez R, Rodríguez-Orozco A. R, Campos-García J, Saavedra-Molina A, Mejía-Zepeda R, Cortés-Rojo C.(2015). Protective effects of dietary avocado oil on impaired electron transport chain function and exacerbated oxidative stress in liver mitochondria from diabetic rats. *J Bioenerg Biomembr.*

Owsianowski E, Walter D, Fahrenkrog B. 2008. Negative regulation of apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta.* (7):1303-10.

Patries M. Herst, Gabriel G. Perrone, Ian W. Dawes, Peter W. Bircham, Michael V. Berridge. (2008). Plasma membrane electron transport in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the presence of mitochondrial respiratory subunits. *FEMS Yeast Res.* 8: 897–905.

Rebrin I, Kamzalov S, Sohal R.S (2003). Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radic Biol Med.* 35(6):626-35.

Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa J. C (2014). Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol.* ; 5: 151-163.

Romanos M. A, Scorer C. A, Clare J. J (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast.* 8: 423-488.

Sevanian A, Davies K, Hochstein P (1985). Enhanced expression and functional characterization of the human ferritin H- and L-chain genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Microbiol. Biotechnol.* 63: 57-63.

Slot J. W, Geuze H. J, Freeman B. A and Rapo J.D (1986). Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab. Invest.* 55: 363-371.

Talaro, K.P, Talaro, A. (1999). Eucaryotic cells and microorganism. En: *Foundations in microbiology.* 124-160. 3a edición. Editorial Mc-Graw-Hill.

Tanaka T, Izawa S, Inoue Y. 2005. *GPX2*, encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue, codes for an atypical 2-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 51:42078-87.

Tsuzi D, Maeta K, Takatsume Y, Izawa S, Inoue Y (2004). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX2 by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7. *FEBS Letters.* 148–154.

Turrens J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552(Pt 2): 335–344.

Ukai Y, Kishimoto T, Ohdate T, Izawa S, Inoue Y (2011). Glutathione peroxidase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is distributed in mitochondria and involved in sporulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 5: 411(3):580-5.

Valentín, E., Herrero, E., Rico, H., Miragall, F, Sentandreu R (1987). Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 148, 88-94: a review. *Yeast*. 8: 423-488.

Vogel R, Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R (1999). The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required. *Neurosci Lett*. 275(2):97-100.

Walker G. M (1998). *Yeast physiology and biotechnology*. England: John Wiley & Sons Ltd. ISBN: 978-0-471-96446-9.

White E, Shannon J. S, Patterson R. E (1997). Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 6:769–77.

Winge O.(1935) On haplophase and diplophase in some *Saccharomycetes*. *C.R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol*. 21:77–111.

Yoboue E. D, Augier E, Galinier A, Blancard C, Pinson B, Casteilla L, Rigoulet M, Devin A. (2012). cAMP-induced mitochondrial compartment biogenesis: role of glutathione redox state. *J Biol Chem*. 18:14569-78.