

IMPORTANCIA DE LOS CAROTENOIDES EN LA RESPUESTA ADAPTATIVA DE ESTRÉS POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA LEVADURA *PHAFFIA RHODOZYMA*.

Sierra Gómez Pedroso Luz del Carmen y Sánchez Esquivel Sergio. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, IIB, UNAM. Ciudad Universitaria, CP 04510. Fax 5622-3855, e-mail: sersan@servidor.unam.mx

Palabras claves: carotenoides, estrés oxidativo, Phaffia rhodozyma.

Introducción. Durante la respiración se forman especies reactivas de oxígeno (ERO), una de las cuales es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas moléculas oxidan ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, dañando letalmente a las células que los producen. Para evitar estos daños, las células tienen diferentes sistemas que mantienen los niveles de ERO en condiciones basales. Dentro de estos sistemas se incluyen al glutatión (GSH), enzimas antioxidantes y en algunas células, los carotenoides (1). *Phaffia rhodozyma* es una levadura productora de carotenoides los cuales la protegen contra el estrés oxidativo (2, 3). Esta levadura es deficiente en las enzimas involucradas en la desactivación de ERO (2) y aún cuando es bien conocida la importancia del GSH en la respuesta general al estrés en levaduras, este compuesto no ha sido reportado en *P. rhodozyma*. Por esta razón el objetivo de este trabajo es evaluar la respuesta fisiológica general de *P. rhodozyma* al estrés causado por el peróxido de hidrógeno y evaluar la importancia de los carotenoides como respuesta a dicho estrés.

Metodología. Se realizaron fermentaciones con 2 cepas de la levadura *P. rhodozyma* (silvestre y albina) en medio mínimo a 22 °C. Se agregó H_2O_2 en la fase logarítmica de crecimiento (30 h de la fermentación) y se cuantificaron carotenoides, GSH, SOD y catalasa (4).

Resultados y discusión. Al agregar el H_2O_2 a las 30 h, se puede observar que en la cepa silvestre, la viabilidad fue mayor al 50%, indicando una respuesta fisiológica rápida y eficiente a las concentraciones usadas de H_2O_2 ; éstas concentraciones son mucho mayores que las que soporta *Saccharomyces cerevisiae*. Los carotenoides totales disminuyeron, ya que al reaccionar con las ERO producidas, se oxidaron. El GSH intracelular aumentó, lo cual podría deberse a la disminución de su excreción ya que el GSH extracelular disminuyó, o por un incremento en su síntesis (Cuadro 1).

La actividad de la SOD aumentó, posiblemente por una activación causada por la oxidación. Sin embargo a cantidades muy altas de H_2O_2 se inactivó, tal vez por oxidación de la proteína (Cuadro 1).

La concentración de carotenoides no aumentó al adicionar peróxido de hidrógeno, sin embargo su producción se adelantó en presencia del oxidante (datos no mostrados), sugiriendo una regulación por estrés oxidativo.

La actividad de catalasa no se observó en la fase logarítmica de la fermentación, ni se activó al agregar el H_2O_2 (datos no mostrados).

Cuadro 1 Respuesta fisiológica de P. rhodozyma (cepa silvestre) a diferentes concentraciones de H₂O₂. Adición a las 30 h

H ₂ O ₂ mM	Células viables	CT mg/mL	GSH intracelular mg/mL	GSH extracelular mg/mL	Actividad SOD
0	100%	1.4	0.9	0.544	0.788
40	80.50%	1.076	0.992	0.363	1.995
60	72.74%	0.923	0.486	0.346	1.88
80	72.74%	0.923	0.418	0.338	0.391

Como puede observarse en el cuadro 2, en ausencia de H_2O_2 , la respuesta de la cepa albina (truncada la síntesis de carotenoides), fue similar a la silvestre. Sin embargo, en presencia del oxidante, aumento la concentración de GSH extracelular (9%), lo cual pudo deberse a lisis celular o a una mayor síntesis del compuesto. También se observó un ligero incremento en la actividad de SOD, tal vez para compensar la falta de los carotenoides como antioxidantes.

Cuadro 2. Respuesta de las cepas silvestre y albina, al H₂O₂. Adición a las 30 h.

Cepa/ mM H ₂ O ₂	Células Viables	CT mg/mL	GSH extracelular mg/mL	GSH intracelular mg/mL	Actividad SOD
WT/0	100%	1.55	0.536	0.9	0.788
WT/ 40	89.50%	1	0.356	0.888	0.79
Alb/0	100%	0	0.451	0.875	0.819
Alb/0	82.38%	0	0.49	0.8	0.83

Conclusiones. Conjuntando los resultados, con el hecho de que la mutante albina no sobrevive igual que la silvestre, podemos pensar que los carotenoides tienen un papel esencial en la sobrevivencia de *P. rhodozyma* frente al estrés oxidativo causado por peróxido de hidrógeno.

Bibliografía.

- (1) Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P & Mager W. (1996) The molecular defenses against reactive oxygen species in yeast. *Mol. Microbiol.* 14: 651-658.
- (2) Schroeder WA & Johnson EA (1993) Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 907-912.
- (3) Schroeder WA & Johnson EA (1995) Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *J Ind Microbiol.* 14: 502-507.
- (4) Flores-Cotera, LB, R Martín (2001) Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:183-191.