BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZACIÓN DE LA CATALASA PEROXIDASA DE *USTILAGO MAYDIS*: UNA ENZIMA MULTIFUNCIONAL

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

MARISOL UBALDO AGUILAR

DIRECTORA: LUCERO ROMERO AGUILAR

CODIRECTORA: LAURA MORALES LARA

MAYO 2025

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS - BUAP

Fecha: 05 de abril, 2025

SECRETARIO(A) ACADÉMICO (A)
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, BUAP
P r e s e n t e

*Por este conducto informo a usted, que el (a) alumno (a): **Marisol Ubaldo Aguilar** con número de matrícula **201921761** del programa de la Licenciatura en Biotecnología, ha terminado el proyecto de investigación de tesis, el cual presentará con el siguiente título:*

"Caracterización de la catalasa peroxidasa de Ustilago maydis: una enzima multifuncional"

Por lo anterior considero que el (a) alumno (a) puede realizar los trámites pertinentes para la revisión de tesis y posteriormente presentar su Examen de Grado.

Así mismo, se proponen a los siguientes profesores como revisores de tesis:

- *Dra. Lucero Romero Aguilar (Facultad de Medicina, UNAM)*
- *Dra. Rocío Pérez y Terrón (Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP)*
- *Dr. Armando Mena Contla (Facultad de Ciencias Químicas, BUAP)*

Nota: En caso de no tener propuesta de revisores de tesis, serán designados por el Comité Académico de la Licenciatura.

Sin otro particular por el momento aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Dra. Laura Morales Lara, Facultad de Ciencias Químicas, BUAP	Dra. Lucero Romero Aguilar, Facultad de Medicina, UNAM

BUAP

Oficio No. FCBSAC/096/2025
Oficio de Modalidad de Titulación
Por Examen Profesional por Tesis

Mtro. Juan Manuel Rosas Tapia
Director de Administración Escolar, BUAP
P R E S E N T E

At'n: Psic. Marcela Juárez Zenteno
Jefa del Departamento de Titulación

*Por este medio, me permito hacer de su conocimiento que la alumna **MARISOL UBALDO AGUILAR** con número de matrícula **201921761** de la Licenciatura en Biotecnología, presentará examen profesional el día **05 de junio de 2025 a las 13:00 horas,** mismo que **será presencial.***

Informar a los miembros del sínodo evaluador:

NOMBRE	CARGO
D.C. ROCIO PEREZ Y TERRON	PRESIDENTE
D.C. LUCERO ROMERO AGUILAR	SECRETARIO
D.C. ARMANDO MENA CONTLA	VOCAL

Nota: este documento tiene vigencia por 6 meses a partir de la fecha de su expedición.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su atención y apoyo, quedo de usted.

A t e n t a m e n t e
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 20 de mayo de 2025

Dr. Salvador Galicia Isasmendi
Director
Oficio No. FCBLBT/096/2025
Oficio de Modalidad de Titulación
Por Examen Profesional por Tesis

C.c.p Archivo
*D'SGI/D'CACP/aoav**

Facultad de Ciencias Biológicas
Edif. 1 BIO 1, Ciudad Universitaria, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7097, 7085, 7084 y 7086

Dedicatoria

A las mujeres de mi vida, ***Marisol Aguilar Espinosa*** y ***Vanessa Ubaldo Aguilar***, siempre mi ejemplo de fortaleza, perseverancia, paciencia, inteligencia y amor.

A mi estrella favorita en el cielo, ***Miguel Aguilar Martínez***, a pesar de ya no estar aquí conmigo desde hace tiempo, me enseñaste a luchar por mis sueños y nunca dudar de mí.

Agradecimientos

A todas las personas que, con su invaluable apoyo, hicieron posible la culminación de este proyecto, expreso mi más sincero reconocimiento:

En primer lugar, a la Dra. Lucero Romero Aguilar, directora de esta tesis, cuyo liderazgo académico y compromiso guiaron cada fase de este trabajo. Al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, al M. Héctor Vázquez Meza y al Dr. Daniel Uribe Ramírez, cuyos conocimientos especializados y dedicación fueron pilares para superar los desafíos teóricos y experimentales que surgieron en el camino.

A la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular al Departamento de Bioquímica, por brindarme las oportunidades y recursos para desarrollar esta investigación. De igual forma, al Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, espacio donde germinaron puntos clave de este proyecto. Agradezco especialmente al M. Miguel Ángel Rosas Paz, mentor incansable en el campo de la biología molecular, cuya paciencia para resolver mis dudas y su apoyo fraterno en la vida científica marcaron un antes y un después en mi formación. A la Dra. Claudia Segal Kischinevzky y al Dr. James Enrique González Flores, por abrir generosamente las puertas de su laboratorio y facilitar las condiciones para que este trabajo alcanzara sus objetivos.

A mi alma mater, la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, y de manera muy especial a la Dra. Laura Morales Lara, por creer en mi potencial desde los inicios y por ser un faro de inspiración profesional y humana. Su confianza incondicional fue el motor que impulsó este sueño. Al Dr. Ricardo Darío Peña Moreno, por sus consejos durante mi formación en la licenciatura.

A docentes que marcaron mi estancia en la universidad, la Dra. Abigail Martínez Torres, el Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes.

A mis colegas y mentores del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química: a la M. Sofía Angélica García Vargas, por sus enseñanzas meticulosas y por sembrar en mí la pasión por el rigor científico; y al M. Daniel Juárez Serrano,

por iniciarme con paciencia en las técnicas bioquímicas que hoy son la base de mi formación práctica.

A mi familia, cimiento de mi existencia:

A mi madre, Marisol Aguilar Espinosa, y a mi hermana, Vanessa Ubaldo Aguilar, mi luz en los momentos más oscuros. Gracias por ser mi sostén emocional, por inculcarme valores que trascienden lo académico y por acompañarme en cada paso rodeada de amor y convicción.

A mi padre, José, a pesar de las circunstancias gracias por estar presente siempre, me has enseñado mucho de esta vida y siempre me has alentado a luchar por lo que he soñado desde pequeña, gracias, por tanto, junto con mamá y Vane, este logro es nuestro.

A mi abuelita Evelia y a mis hermanos, Carlos y Arturo, por su amor incondicional, por su comprensión en días de estrés y por recordarme siempre de lo que soy capaz. Carlos, gracias por ser ese hermano mayor cuyo apoyo marcó mi camino cuando más lo necesité.

A mi abuelito Miguel, desde que tengo memoria me ha alentado y creído en mí, lo cual me acompaña siempre a pesar de ya no estar conmigo.

A mis amigos y colegas de viaje:

Aranzazú y Rodrigo, amigos y compañeros de viaje en esta aventura universitaria. Gracias por transformar la nostalgia del foráneo en un hogar, por convertir el estrés en risas compartidas, por caminar a mi lado en lo profesional como en lo personal, crecimos juntos. Termino siendo un idilio que sin duda volvería a revivir con ustedes, este logro es también el suyo.

A Diana, Pao, Dana, Ale y Gio, colegas en la aventura científica, gracias por compartir no solo protocolos, sino también cafés, anécdotas y esa complicidad única de quienes entienden la magia y la locura detrás de la investigación.

A mis amigas de vida, Yessica, Fátima, Marianette, y Aranza, por tejer a mi lado una amistad que trasciende el tiempo. Gracias por motivarme a perseguir mis sueños

incluso cuando dudaba, por creer en mí con una convicción inquebrantable y por ser las primeras en alentar mi vocación científica con ese entusiasmo que solo las amistades genuinas saben dar.

A mis pequeñas Chispita, Ness, Kali y Choco, guardianas de las madrugadas de escritura, cuyas miradas llenas de amor y travesuras renovaron mis energías en cada regreso a casa.

A Luis, cómplice de sueños y realidades, por estar presente incluso en mis silencios, por creer en mí con una fe inquebrantable, por amar cada logro y tropiezo como si fueran suyos.

Finalmente, reconozco el apoyo financiero brindado por los proyectos UNAM-PAPIIT IA200923 (LRA, JP) e IA204923 (JG), recursos indispensables para la ejecución técnica de esta investigación.

A cada persona aquí mencionada, y a quienes indirectamente aportaron a este trabajo, les debo la certeza de que los logros académicos no son individuales, sino tributos colectivos al poder de la colaboración humana.

Abreviaturas

AOX - Oxidasa alterna

BSA - Albumina suero bovino

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementario

CIV - Citocromo C oxidasa

CN - Cianuro

Cat-px - Catalasa peroxidasa

DEPC - Dietilo pirocarbonato

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

H_2O_2 - Peróxido de hidrógeno

HEPES - Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico

NADP - Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH - Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato

PBS - Phosphate-buffered saline (Tampón fosfato salino)

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa

PMSF - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PQ - Paraquat

PTS1 - Señal de localización peroxisomal tipo 1

RNA - Ácido ribonucleico

ROS - Especies reactivas de oxígeno

RT - Transcripción inversa

SDS - Dodecilsulfato de sodio

YPD - Levadura, peptona y dextrosa

nOg - n-octil-galato

Índice

Dedicatoria **4**

Agradecimientos **5**

Abreviaturas **8**

Índice **10**

Abstract **13**

Resumen **13**

1 Introducción **14**

1.1 Especies reactivas de oxígeno 14

1.2 Las catalasas 15

1.2.1 Las catalasas fúngicas 16

1.2.2 Las catalasas peroxidasas 17

1.2.3 La catalasa peroxidasa y la reacción de Fenton 18

2 Antecedentes **19**

2.1 Generalidades de Ustilago maydis 19

2.2 Ciclo de vida de Ustilago maydis 21

2.3 Sistema antioxidante de Ustilago maydis 23

2.4 Catalasas de Ustilago maydis 24

2.5 Moléculas antioxidantes 24

2.6 La catalasa peroxidasa en levaduras 25

2.6 Agentes prooxidantes: H_2O_2, paraquat 25

3 Justificación **26**

4 Objetivos **27**

4.1 Objetivo general 27

4.2 Objetivos particulares 27

5 Materiales y métodos 28

5.1 Diseño experimental 28
5.2 Microorganismo 28
5.3 Mantenimiento de la cepa 29
5.4 Cultivo de Ustilago maydis 29
5.5 Curva de crecimiento celular 29
5.6 Determinación del crecimiento vegetativo 30
5.7 Determinación del consumo de oxígeno 30
5.8 Fijación de células 31
5.9 Obtención de extracto celular clarificado 31
5.10 Determinación de unidades formadoras de colonia 32
5.11 Determinación de proteína 32
5.12 Determinación de la actividad enzimática de cat-px 33
5.13 Análisis de la temperatura sobre la actividad de la catalasa-peroxidasa 33
5.14 Determinación del pH sobre la catalasa-peroxidasa 34
5.15 Extracción de RNA total 34
5.16 Cuantificación de RNA 36
5.17 Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante 36
5.18 Tratamiento con DNAsa 37
5.19 Síntesis de cDNA 38
5.20 qRT-PCR 39
5.21 Microscopía confocal 39

6 Resultados 41

6.1 Efecto del H_2O_2 en el crecimiento celular vegetativo. 41
6.2 Análisis de la morfología y viabilidad celular. 42
6.3 Efecto del H_2O_2 sobre el consumo de oxígeno 45
6.4 Determinación de los parámetros cinéticos Km y Vmax 47
6.5 Efecto de la temperatura sobre la catalasa peroxidasa 50
6.6 Efecto del H_2O_2 en la expresión génica de la catalasa peroxidasa 51

7 Discusión 53

7.1 El estrés oxidante afecta el crecimiento de Ustilago maydis 53

7.2 Efecto del peróxido de hidrógeno en la respiración de Ustilago maydis .. 53

7.3 Determinación de los parámetros cinéticos Km y Vmax 54

7.4 Efecto del H_2O_2 en la expresión genética de catalasa-peroxidasa 56

8 Conclusiones 58

9 Perspectivas 60

10 Referencias 61

11 Anexos 67

11.1 Preparación de las soluciones 67

Caracterización de la catalasa peroxidasa de *Ustilago maydis*: una enzima multifuncional

Abstract

Ustilago maydis is a promising model organism for biotechnology and biochemistry due to its high similarity to higher eukaryotes, it is not pathogenic to humans, and its genome has been fully sequenced. This yeast has a catalase-peroxidase (cat-px) that confers protection against oxidative stress, contributing to preventing lipid, protein, and DNA oxidation. This research aimed to characterize kinetically the cat-px of *U. maydis* and the physiological responses under oxidative stress induced by hydrogen peroxide. Cell viability, specific activity, and expression of the cat-px gene were analyzed under different stress conditions induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) for 24 h. The *U. maydis* cat-px has a higher specific activity at low H_2O_2 concentrations than control cells. The enzyme was sensitive to 40 ºC and showed no activity at pH 6. The expression of the cat-px gene was dependent on H_2O_2 concentration, with lower expression of cat-px at higher concentrations of H_2O_2. Cell viability was reduced by 60% at high H_2O_2 concentrations. Moreover, the presence of H_2O_2 induces morphological changes in *U. maydis*, with thinner cells observed compared to the control.

Resumen

Ustilago maydis es un organismo modelo prometedor para la biotecnología y la bioquímica debido a su alta similitud con eucariotas superiores. Además, su genoma ha sido completamente secuenciado y no es patógeno para humanos. Esta levadura contiene un sistema antioxidante completo entre el que se destaca la presencia de una catalasa-peroxidasa (cat-px). Esta investigación tuvo como objetivo caracterizar cinéticamente la cat-px de *U. maydis* y las respuestas bajo estrés oxidativo inducido mediante un agente químico. Se analizó la viabilidad celular, la actividad específica de la cat-px y la expresión del gen de la cat-px en condiciones de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La cat-px de *U. maydis* presenta actividad específica más alta a bajas concentraciones de H_2O_2 que las células

control cuando las células fueron incubadas por 24 horas. La enzima perdió un 70% de actividad a 40 ºC y no mostró actividad a pH 6. La expresión del gen cat-px fue dependiente de la concentración de H_2O_2, con una menor expresión a concentraciones más altas. La viabilidad celular se redujo en un 60% a 40 mM de H_2O_2. Además, la presencia de H_2O_2 induce cambios morfológicos, observándose células delgadas en comparación con el control.

1 Introducción

1.1 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas inestables que contienen oxígeno y tienen un electrón desapareado lo que las convierte en radicales libres, además de reaccionar fácilmente con otras moléculas de la célula. Se producen como subproductos normales del metabolismo celular y desempeñan un papel importante en la señalización celular y la respuesta inmune. Pueden llegar a ser dañinas y perjudiciales a la célula si no se controlan adecuadamente, ya que el desbalance entre la síntesis de ROS y el sistema de defensa antioxidante en los sistemas vivos provoca una ruptura en la función celular (Zabłocka & Janusz, 2008).

Parte fundamental en la producción de las especies reactivas de oxígeno son los complejos respiratorios del I al III, la mitocondria, los peroxisomas, la NADPH oxidasa, el óxido nítrico sintetasa desacoplada y el sistema del citocromo P450. A bajas concentraciones las ROS son moduladores cruciales de las funciones celulares, son esenciales en la señalización celular, la inducción de la respuesta miogénica, la defensa contra agentes infecciosos, mientras que el exceso de las ROS puede alterar la función celular normal y promover el daño irreversible a lípidos, ácidos nucleicos y a proteínas celulares (Fernandez-Checa et al., 1997).

Las acciones protectoras contra los ROS son llevadas a cabo por varias enzimas: la superóxido dismutasa, la catalasa, el sistema del glutatión compuesto por la glutatión (peroxidasa y la glutatión reductasa y el sistema de la tiorredoxina) (Holley et al., 2011). También por compuestos no enzimáticos como la vitamina E, el ascorbato, el glutatión, la transferrina, y la ceruloplasmina.

1.2 Las catalasas

La catalasa descompone a dos moléculas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y lo rompe en dos moléculas de agua H_2O y una de oxígeno en una reacción de dos pasos. La reacción se representa en la figura 1.

a) $Fe(III) + H_2O_2 \xrightarrow{\textbf{catalasa}} Fe(III)(P^+) + H_2O + O_2 \longrightarrow Fe(IV)(P^-)(O_2) + H_2O$

b) $[Fe\ (IV) - O] + H_2O \xrightarrow{\textbf{catalasa}} Fe\ (III) + H_2O + O_2$

Figura 1. Pasos de la reacción catalítica de catalasa. a) En el primer paso la enzima en su forma de hierro Fe (III) reacciona con el peróxido de hidrógeno y forma un complejo hierro en estado de oxidación con un oxígeno unido y libera una molécula de agua. b) El oxiferril se reduce mediante una transferencia de dos electrones, el donador de electrones es una segunda molécula de peróxido de hidrógeno. La reacción regenera la forma original de la enzima Fe (III), liberando otra molécula de agua y una de oxígeno. Modificada y traducida de (Nandi et al., 2019)

La catalasa es una hemoproteína que contiene cuatro grupos hemo, una enzima ubicua que se encuentra en casi todos los organismos aerobios.

Por otra parte, la catalasa es importante en la patogenicidad de hongos y para el desarrollo de varios patógenos humanos y vegetales, incluidos *Candida albicans, Aspergillus fumigatus y Blumeria graminis* durante la colonización del huésped (Wysong et al., 1998; Xu y Pan, 2000; París et al., 2003).

En la literatura, de acuerdo con sus propiedades físicas y bioquímicas se han descrito cuatro tipos generales de catalasas: las catalasas hemo monofuncionales (catalasa clásica) (Schomburg et al., 1994); la catalasa-peroxidasa (catalasa atípica) catalasas no hemo (pseudocatalasas) y catalasas menores. (Sooch et al., 2017)

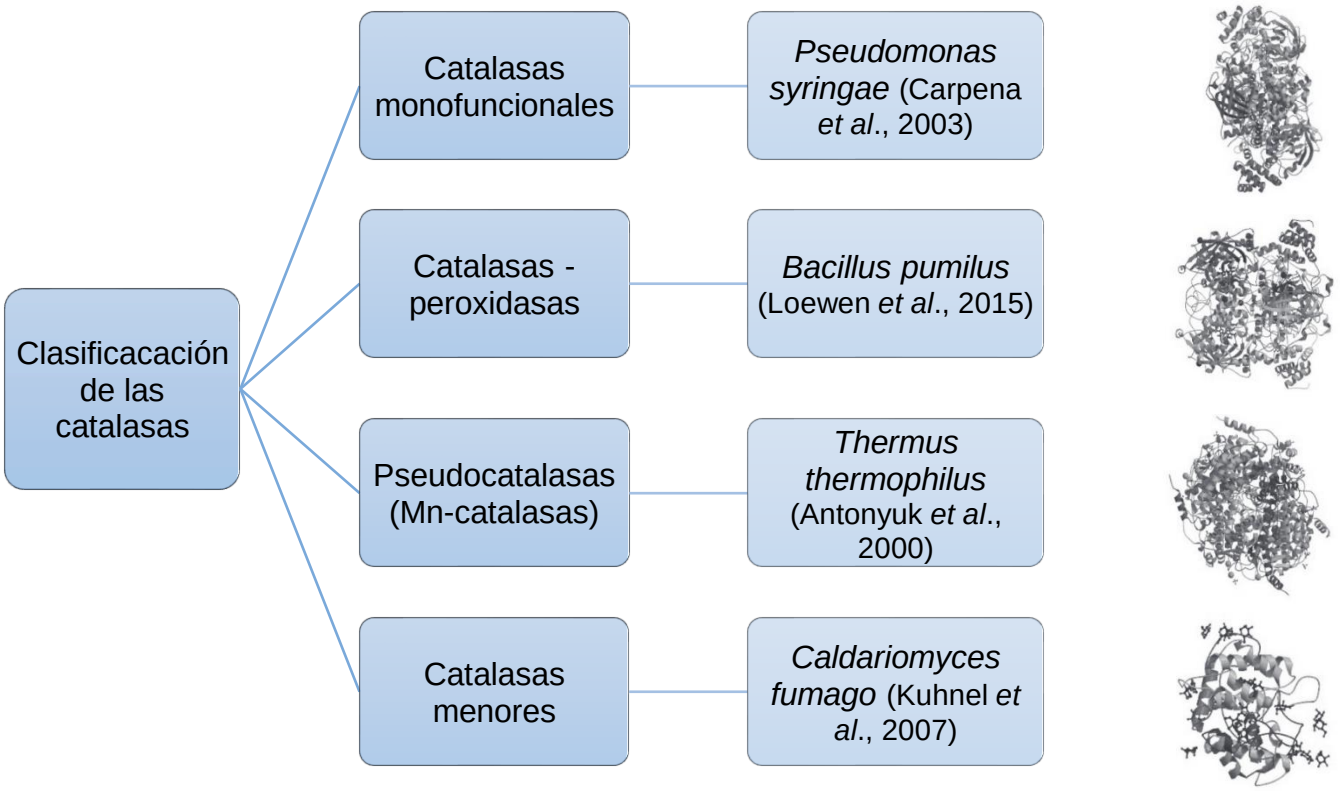


Figura 2. Tipos de catalasas. Traducida y modificada de *Catalases: Types, Structure, Applications and Future Outlook* (Sooch et al., 2017).

1.2.1 Las catalasas fúngicas

Las catalasas fúngicas son enzimas hemo-mono-funcionales clave en la descomposición del agua y el oxígeno, protegiendo a las células del daño oxidativo. Estas enzimas, especialmente las mono-funcionales de tipo hem catalasa, se encuentran en organismos como *Saccharomyces cerevisae* y *Neurospora crassa*. Se localizan mayormente en peroxisomas, aunque también se han observado en el citosol de algunas eucariotas (Sooch et al., 2017). Comparadas con las de otros organismos, las catalasas fúngicas son únicas en su diversidad y especialización funcional. En los hongos ascomicetos filamentosos, por ejemplo, existen dos formas principales de catalasas de subunidad grande (L1 y L2). La subunidad L2, es extracelular e inducible por múltiples estímulos, es crucial para la proliferación y la diferenciación celular, mientras que la subunidad L1, no es inducible y presentes en esporas asexuales, son vitales para la germinación de las esporas (Hansberg et al.,

2012). Además, los hongos presentan varias catalasas de subunidad pequeña, algunas de las cuales están inhibidas por su sustrato, el H_2O_2, y otras se activan por su sustrato, el H_2O_2, y evitan la inhibición por unión con el NADPH.

El mecanismo exacto de acción del NADPH no está claro, por lo que el H_2O_2 es la fuente tanto oxidante como reductora (Putnam, et al., 2000). Por lo que este perfil estructural y funcional único podría ser el resultado de eventos de transferencia de genes de bacterias primordiales a hongos que ocurrieron antes de la separación de estos dos filos. Las catalasas fúngicas tienen un alto valor en biotecnología, especialmente en procesos industriales donde la degradación de H_2O_2 es esencial, como en la descomposición de lignina por peroxidasas secretadas. Se clasifican principalmente en catalasas de subunidad grande y pequeña, cada una con propiedades distintas que reflejan la complejidad de la ecología y fisiología de los hongos (Hansberg et al., 2012).

1.2.2 Las catalasas peroxidasas

La importancia de las catalasas peroxidasas radica en su capacidad para mantener el equilibrio redox y prevenir daños celulares causados por especies reactivas de oxígeno, lo que las convierte en una pieza fundamental en la respuesta antioxidante de los organismos.

Las catalasas-peroxidasas son enzimas bifuncionales únicas que exhiben tanto actividad de catalasa, descomponiendo el H_2O_2 en agua y oxígeno, como actividad de peroxidasa, oxidando su principal sustrato el H_2O_2, además de tener otros sustratos según la estructura y el tipo de cat-px, estos sustratos pueden ser: peróxidos orgánicos en bacterias y levaduras bajo condiciones de estrés oxidativo extremo (Linnemer & Visser, 2016); ácidos grasos oxidados en bacterias patógenas compuestos nitrogenados en bacterias (Binkley, 1988), y compuestos fenólicos (Loewen, P. C., & Switala, J.,1987). A diferencia de las catalasas monofuncionales, que son tetraméricas, las cat-px son enzimas diméricas con un grupo hemo β en cada subunidad, unido a un aducto covalente formado por tirosina, metionina y triptófano. Esta estructura les permite realizar reacciones de peroxidación, que son útiles en la degradación de compuestos fenólicos y otros procesos redox (Sooch

et al., 2017). Se encuentran principalmente en bacterias y hongos, desempeñando un papel crucial en la protección contra el estrés oxidativo causado por el H_2O_2.
La importancia de las cat-px radica en la bioremediación, particularmente en el tratamiento de efluentes ricos en peróxido de hidrógeno y compuestos fenólicos. Además de tener potencial en la aplicación en síntesis de productos farmacéuticos y en procesos biocatalíticos que requieren reacciones específicas de oxidación y reducción (Sooch et al., 2017).

1.2.3 La catalasa peroxidasa y la reacción de Fenton

La cat-px tiene un papel importante en la reacción de Fenton, proceso que involucra la producción de radicales hidroxilos altamente reactivos mediante la interacción entre H_2O_2 y iones metálicos como el hierro en su estado reducido (Fe^{2+}).

$$\xrightarrow{\text{Cat-px}} \quad Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^-$$

Figura 3. Ecuación de Fenton. El H_2O_2 es reducido en presencia de Fe^{2+} produciendo radicales hidroxilo (OH), que son extremadamente reactivos y causan daño oxidativo.

El objetivo de la cat-px es regular la concentración de H_2O_2, siendo el sustrato clave para la generación de radicales hidroxilo (Takio et al., 2021), así mismo, la presencia de metales pesados como el Fe^{2+} intensifica la reacción de Fenton debido a la alta afinidad por el H_2O_2. Al reducir las concentraciones de H_2O_2, la enzima limita la formación de radicales hidroxilo (OH) que se producen el reacción de Fenton, además de que la actividad peroxidasa puede oxidar otras moléculas, generando una defensa antioxidante en sistemas biológicos (Fita et al., 2015).

Un ejemplo del papel de cat-px es en *Mycobacterium tuberculosis*, donde la cat-px protege al organismo al descomponer H_2O_2 antes de que participe en la reacción de Fenton (Wang et al., 1998).

2 Antecedentes

2.1 Generalidades de Ustilago maydis

Ustilago maydis es un hongo patógeno de plantas monocotiledóneas a nivel mundial, coloquialmente en México es conocido como huitlacoche. Es un hongo fácil de reconocer debido a que forma agallas o tumores de diferentes tamaños en las plantas de maíz; estas agallas son carnosas cuando están jóvenes y polvosas cuando están en la madurez, estos polvos contienen las esporas que después serán liberadas e iniciara nuevamente el ciclo de vida del hongo. La coloración de este hongo es oscura y se debe a las esporas melanizadas, conocidas como teliosporas. Este hongo puede ser reconocido en la planta antes de la formación del tumor porque produce clorosis en las hojas, deformidades en el maíz, un tamaño más pequeño en las plantas, y acumulación de antocianinas, sin embargo, no mata la planta.

Respecto a su clasificación taxonómica, *U. maydis* pertenece al orden de los *Ustilaginales*, de la familia *Ustilaginaceae*, del género *Ustilago*, de la especie *Ustilago maydis* (DC.) Corda, 1842. *U. maydis* DC Corda es el miembro más conocido de este grupo, el cual es el patógeno específico del maíz (*Zea mays*) y del teosinte (*Zea mexicana)*. *U. maydis* pertenece al grupo de parásitos biotróficos conocido como tizones que dependen del tejido vivo para la proliferación y el desarrollo. A diferencia de los basidiomicetos típicos, no tiene un cuerpo fructífero real. Durante su ciclo de vida produce un gran saco que contiene telioesporas diploides en reposo. Estas esporas germinan y forman basidioesporas haploides por meiosis. Las hifas haploides de tipo de apareamiento opuesto pueden fusionarse y formar una célula dicariótica filamentosa.

Económicamente, la enfermedad del carbón del maíz causa cada año graves daños y pérdidas en el maíz, uno de los principales cultivos de cereales del mundo. Sin embargo, en México y Centroamérica, el carbón de maíz se considera un manjar culinario (huitlacoche). Nutricionalmente, el huitlacoche se compone de (en base seca): proteínas entre 11.5 y 16.4%, grasas del 2.7 a 6.5%, carbohidratos del 55.1 al 66.5%. Se han identificado alrededor de 27 tipos de carbohidratos, entre ellos destacan la glucosa, fructosa, glicerol, sorbitol y manitol (Aydoğdu & Gölükçü, 2017).

El porcentaje restante de nutrientes está representado por vitaminas, como la riboflavina, la biotina, la niacina y el ácido fólico, y los metabolitos secundarios con capacidad antioxidante.

Por otra parte, *U. maydis* se ha descrito como un excelente sistema modelo para estudiar las interacciones huésped-patógeno y ha sido estudiado durante más de 100 años; debido a que contiene un genoma haploide de aproximadamente 20.5 Mb y está organizado en 23 cromosomas. *U. maydis* también es conocido como el "hongo del maíz", es un patógeno vegetal que tiene la capacidad de causar enfermedades en plantas de maíz, al ser un patógeno ubicuo del maíz y un hongo basidiomiceto no utiliza virulencia agresiva para matar a su huésped, pertenece a los parásitos biotróficos que dependen del tejido vivo para proliferación y desarrollo. (Kamper et. al. 2006). Este organismo puede cultivarse fácilmente en condiciones de laboratorio en plantas jóvenes de maíz y en medios sintéticos, donde crece como una levadura unicelular. Es susceptible de manipulaciones moleculares, como la transformación y el reemplazo de genes homólogos (Kämper et al., 2006). La investigación genética molecular con *U. maydis* se centra en las vías de señalización que influyen en la virulencia, el papel del apareamiento en la patogénesis y la recombinación homóloga (la unión Holliday), una estructura recombinante del ADN, que se observó por primera vez en esta especie (Vollmeister et al., 2012). *U. maydis* también sirve como modelo importante para otros basidiomicetos fitopatógenos con los que es más difícil trabajar en el laboratorio, como los hongos *Puccinia* y *Exserohilum* causantes de la roya y el tizón (Kämper et al., 2006). De igual importancia, *U. maydis* comparte un número significativo de proteínas con los humanos, lo que hace que sea un modelo atractivo para explorar principios biológicos conservados entre hongos y mamíferos. (Steinberg & Perez-Martin, 2008)

Figura 4. Maíz infectado por *U.maydis*, huitlacoche. Obtenido de Castillo, A. (2021).

2.2 Ciclo de vida de Ustilago maydis

El ciclo de vida de este hongo consta de dos fases: la fase saprofítica asexual y una fase patogénica sexual. La primera fase ocurre en suelo húmedo y rico en materia orgánica, donde las esporas de *U. maydis* germinan y producen hifas, estas hifas se reproducen por gemación y pueden sobrevivir durante varios años en el suelo. Mientras que la segunda fase inicia cuando las esporas entran en contacto con las plantas de maíz jóvenes. Las esporas germinan y las hifas penetran en los tejidos vegetales donde se desarrollan y forman estructuras en forma de tumor, estas estructuras contienen basidios, estructuras reproductivas del hongo. Los basidios producen basidioesporas, que son las esporas sexuales de *U. maydis*. Estas se liberan al aire y pueden infectar nuevas plantas de maíz, completando su ciclo de vida.

De igual importancia es su variabilidad genética, pues se han identificado diferentes cepas y alelos que controlan el ciclo de vida del hongo, especialmente en los genes implicados en el apareamiento, como los loci de apareamiento α y β, que regulan la formación de hifas infectivas y el proceso de patogénesis. El locus α controla la fusión de células haploides y el locus β controla la patogenicidad del dicarión resultante, se han sintetizado diploides que son homocigotos α y heterocigotos β (α=β≠); estos son solo patógenos y producen telioesporas que germinaran con

meiosis, no se pueden cruzar con haploides de tipo de apareamiento opuesto. Los diploides que son heterocigotos α y homocigotos β (α+β=) no producen hifas de infección en el medio de apareamiento y no son patógenos. (*Holliday (1974)*). Esta diversidad genética asegura que el hongo mantenga una alta capacidad de adaptación y supervivencia (Tsuzuki et al., 2022).

El proceso de conjugación de *U. maydis* es clave en la patogenicidad, sólo las células dicarióticas pueden infectar plantas e inducir síntomas de enfermedad. Se basa en el reconocimiento y apareamiento, en células haploides participan el locus α (determina la producción de feromonas y sus receptores) y locus β (codifica un factor de transcripción heterodimérico necesario para el crecimiento filamentoso patógeno), una vez que se reconocieron los pares de apareamiento compatibles, las feromonas secretadas se unen a los receptores de las células del tipo de opuesto, iniciando cascadas de señalización que desencadenan la formación del tubo de conjugación, siendo la siguiente etapa. Las dos células haploides desarrollan tubos de conjugación uno hacía el otro, guiados por gradientes de feromonas, lo que finalmente conduce a la fusión celular y la formación de una célula dicariótica, este dicarión contiene dos núcleos separados, uno de cada compañero de apareamiento, lo que da paso a la tercera etapa. La célula dicariótica sufre cambios morfológicos, pasando de una levadura a una forma filamentosa, este crecimiento filamentoso está regido por la activación del locus β, el cual requiere la presencia de ambos alelos β compatibles. Por último, estas hifas dicarióticas invaden la planta huésped, a través de estomas o heridas. Una vez dentro del huésped, el hongo prolifera, induce la formación de tumores y completa su ciclo sexual formando telioesporas diploides dentro de los tumores.

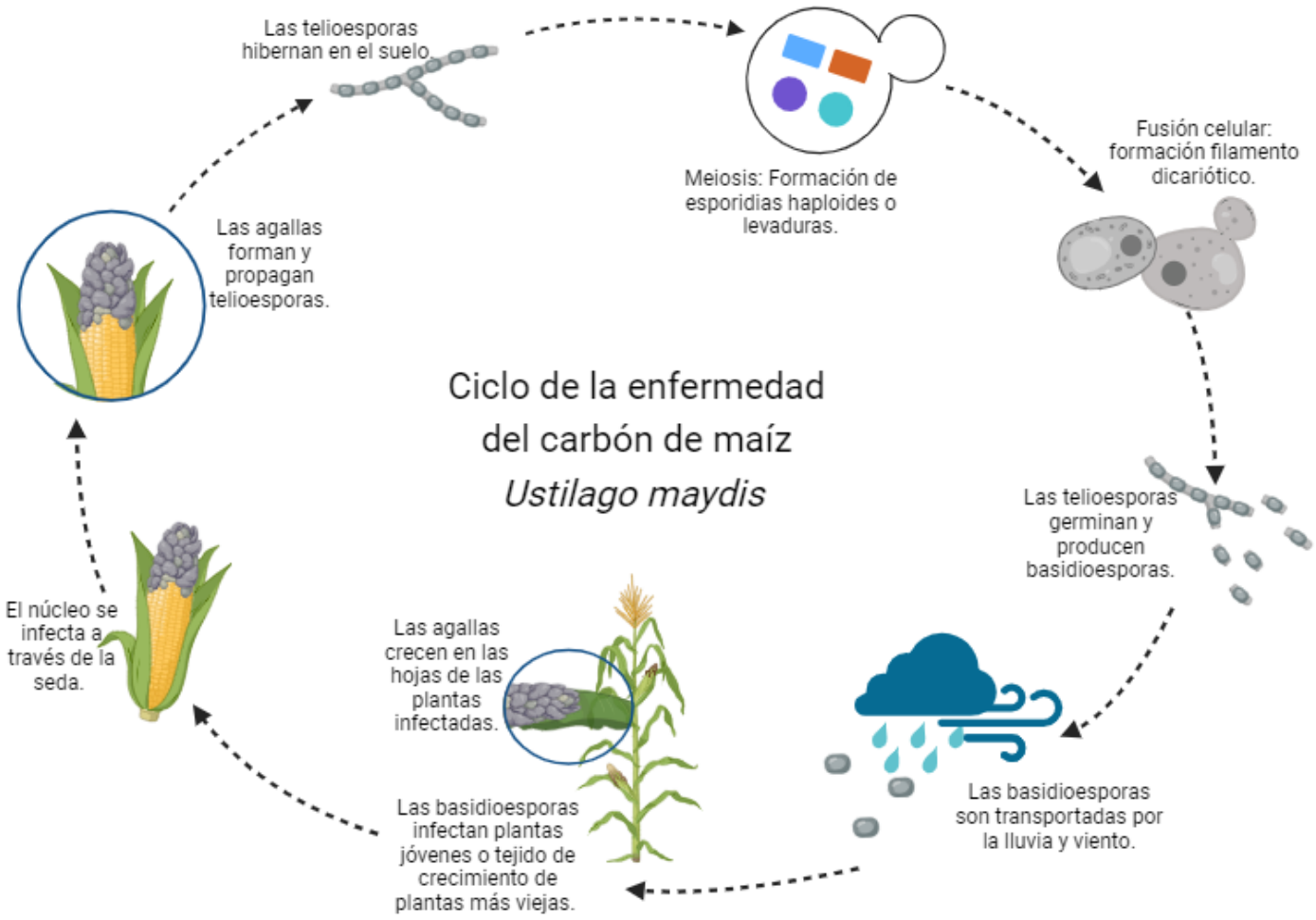


Figura 5. Ciclo de vida de *U. maydis*. Elaboración propia.

2.3 Sistema antioxidante de Ustilago maydis

El sistema antioxidante que tiene *U. maydis* tiene un papel crucial en su supervivencia y patogenicidad. Incluye una variedad de enzimas y moléculas antioxidantes que protegen al hongo del daño oxidativo causado por el estrés ambiental y la respuesta al hospedero. Dentro del sistema enzimático clave se encuentran una catalasa-peroxidasa, una superóxido dismutasa citosólica y dos mitocondriales así como las enzimas del sistema del glutatión y la tiorredoxina, las cuales trabajan en conjunto para eliminar los radicales libres y las ROS que puedan dañar las células del hongo. Además de este sistema enzimático, también cuenta con moléculas antioxidantes como el glutatión necesario para la correcta función del

sistema enzimático del glutatión, el ácido ascórbico, y los carotenoides que neutralizan los ROS.

2.4 Catalasas de Ustilago maydis

Dentro del genoma de aproximadamente 20.5 Mb de *U. maydis* y que codifica alrededor de 6,500 genes (Kämper et al., 2006) (Estrada-Luna et al., s/f), se han descrito tres catalasas: Cat1 (UMAG_02316) localizada en el cromosoma 5, involucrada en la detoxificación de H_2O_2 y esencial para la resistencia al estrés oxidativo durante la infección de la planta huésped, se expresa en condiciones de estrés oxidativo y durante la fase dicariótica; Cat2 (UMAG_05311) localizada en el cromosoma 19, tiene función similar a Cat1 pero con un papel menos prominente en la patogenicidad, su expresión es inducible bajo condiciones de estrés oxidativo (*Whole genome - Ustilago_maydis - Ensembl Genomes 60*); Cat3 (UMAG_11197) localizada en el cromosoma 1, es la menos estudiada pero se cree que está relacionada con la fase saprofítica. Estas catalasas se localizan principalmente en los peroxisomas, modelos fúngicos como U. maydis cuentan con señal de localización peroxisomal tipo 1 (PTS1), la cual es una secuencia tripeptídica en el extremo C-terminal. Esta señal es reconocida por receptores citosólicos que transportan las proteínas al interior de los perosixomas (Kämper et al., 2006).

2.5 Moléculas antioxidantes

Las moléculas antioxidantes son compuestos que retrasan o previenen la oxidación de otras moléculas, neutralizando los ROS y evitando el daño celular. Estos son: vitamina C, vitamina E, compuestos fenólicos, melaninas, y el glutatión.

La actividad antioxidante de varios compuestos naturales y sintéticos está comprendida en una transición redox que implica la donación de un solo electrón (o átomo de hidrógeno, equivalente a la donación de un electrón o más y un H^+) a una especie radical libre.

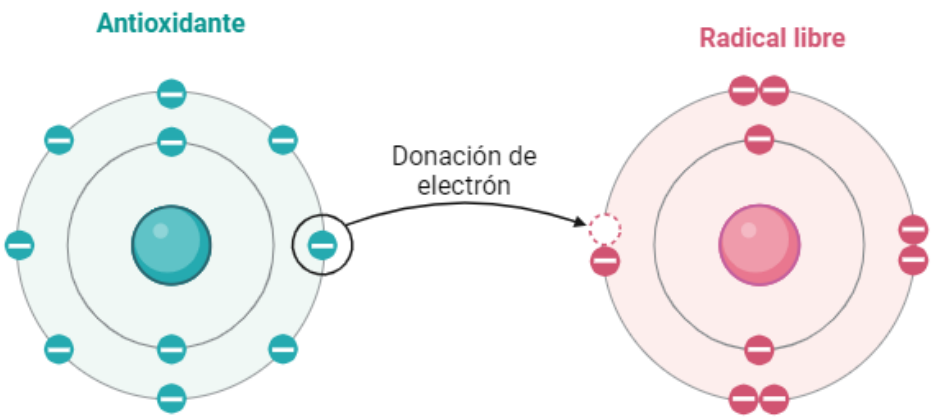


Fig. 6. Transferencia de electrones en la actividad antioxidante.

2.6 La catalasa peroxidasa en levaduras

La catalasa peroxidasa desempeña un papel crucial en las levaduras, incluido *U. maydis*, son enzimas hemo dependientes que combinan la actividad de catalasa y peroxidasa, protegiendo así al hongo de estrés oxidativo. Las cat-px pueden estar presentes en el citoplasma o asociadas a la pared celular, dependiendo del modelo fúngico (Beltrán-García et al., s/f). Por ejemplo, en *Aspergillus fumigatus* la cat-px contribuye a la resistencia frente a ROS generadas por el sistema inmune del hospedero, favoreciendo su patogenicidad.

2.6 Agentes prooxidantes: H_2O_2, paraquat

A la oxidasa alterna en células fúngicas, vegetales, y protozooarios, se le ha conferido un papel importante en la protección contra el aumento de la concentración de ROS producidas por los complejos respiratorios I, II y III. Sin embargo, en un estudio realizado con cuatro diferentes cepas de *U. maydis* inducidas a estrés oxidativo con paraquat se concluyó que la AOX no participa en la respuesta antioxidante. Por otra parte, se demostró que el peróxido de hidrógeno tiene repercusión en las proteínas del citosol y de las mitocondrias, lo cual resulta en un daño en el ADN y provoca apoptosis (Romero-Aguilar et al., 2022).

3 Justificación

Las catalasas son enzimas antioxidantes esenciales que catalizan la descomposición del H_2O_2 en agua y oxígeno. Desempeñan un papel crucial en la protección celular frente al estrés oxidativo. En hongos patógenos como *Candida albicans* y *Candida glabrata*, las catalasas no solo contribuyen a la detoxificación del H_2O_2 generado durante la interacción con el huésped, sino que también participan en la evasión de las defensas inmunitarias del hospedero, facilitando así la infección (Shin et al., 2018; Toth et al., 2015). Esto es relevante ya que las enzimas antioxidantes como las catalasas juegan un rol clave en la capacidad del hongo para colonizar al huésped y evadir sus mecanismos de defensa, además de que no mata a la planta (Lanver et al., 2017).

En el caso de *U. maydis* las catalasas son fundamentales para su virulencia. Este hongo enfrenta un ambiente altamente tóxico debido a la generación de ROS por parte de la planta durante el proceso de defensa (Molina & Kahmann, 2007). Además, se ha sugerido que las catalasas pueden tener actividad antigénica, lo que las convierte en potenciales herramientas diagnósticas para la detección de infecciones por *U. maydis* (Ibeas et al., 2001).

El objetivo de esta investigación es realizar la caracterización y el estudio cinético de la catalasa peroxidasa de *Ustilago maydis*, evaluando su desempeño frente a condiciones prooxidantes. Con este estudio se tendrá una mejor comprensión de las estrategias antioxidantes de este fitopatógeno lo que contribuirá al desarrollo de estrategias de control más efectivas contra las infecciones fúngicas en cultivos. Así mismo, el conocimiento generado sobre esta enzima multifuncional podría ser extrapolado a otros hongos fitopatógenos, contribuyendo a una mayor comprensión de la biología de las interacciones huésped-patógeno.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Caracterizar la cinética enzimática de la catalasa-peroxidasa del fitopatógeno *Ustilago maydis* bajo estrés prooxidativo así como las adaptaciones fisiológicas de la levadura en las mismas condiciones.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto del H_2O_2 sobre la producción de biomasa en *U. maydis.*
2. Determinar la viabilidad celular.
3. Determinar el efecto del H_2O_2 sobre la morfología de *U. maydis*.
4. Determinar el efecto del H_2O_2 sobre la respiración celular.
5. Obtener los parámetros cinéticos K_m y V_{max} para la catalasa-peroxidasa de *U. maydis a pH 7.0*.
6. Determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la catalasa-peroxidasa.
7. Determinar el efecto del pH de 6.0 sobre la actividad catalítica de la cat-px.
8. Determinar la expresión del gen codificante para la catalasa-peroxidasa por qRT-PCR.

5 Materiales y métodos

5.1 Diseño experimental

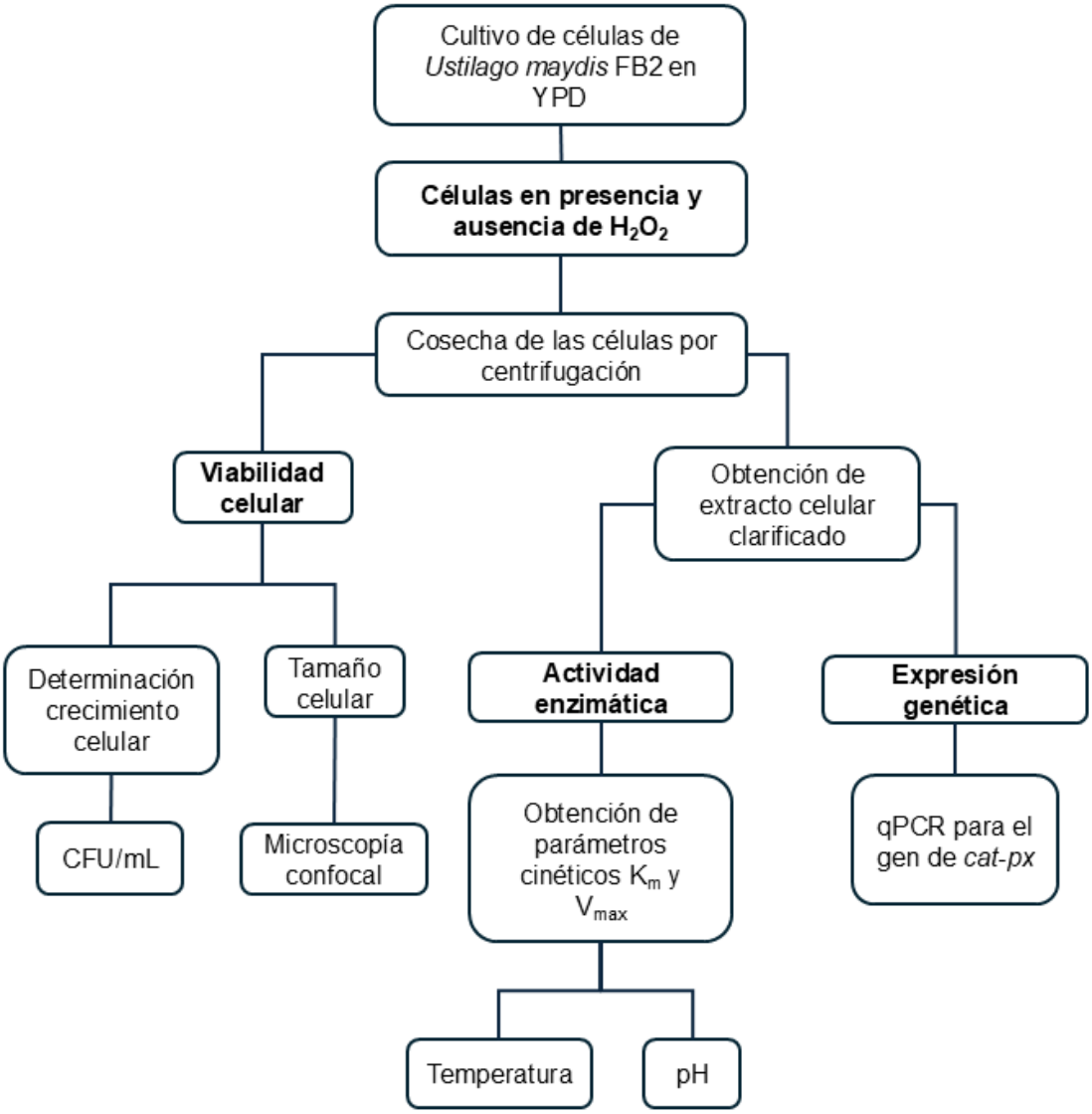


Figura 7. Estrategia experimental realizada en esta investigación. Elaboración propia.

5.2 Microorganismo

Se utilizaron dos cepas de *U. maydis,* la mutante FB2:otef:aox1-Gfp (1814) o la cepa silvestre FB2 (a2b2).

5.3 Mantenimiento de la cepa

1. Las cepas se conservaron en glicerol al 25% y se guardaron a -70 ºC.
2. Se reactivaron en el medio YPD-sólido (glucosa 0.5%, extracto de levadura 0.5%, bactopeptona 0.25%, y agar 2%, pH 7).

5.4 Cultivo de Ustilago maydis

1. Las células se cultivaron en 50 mL de medio líquido YPD a 28 ºC, con agitación continua a 180 rpm durante 24 h.
2. Las células se recuperaron por centrifugación (Thermo Scientific, megafuge 16) a 4500 rpm durante 8 minutos a 4 ºC.
3. Se lavaron una vez con agua destilada estéril, y se suspendieron en agua destilada estéril de acuerdo con la relación 1:1 (p/v) (1 mL H_2O/gramo de peso húmedo).
4. Se determinó la absorbancia de la suspensión celular en un espectrofotómetro (Thermospectronic, génesis 20) utilizando una longitud de onda de 600 nm.
5. Los cultivos de trabajo se inocularon con 60 unidades de densidad óptica por litro (DO_{600nm} 0.06 UA/mL en medio líquido YPD).

5.5 Curva de crecimiento celular

Se realizaron curvas de crecimiento utilizando la cepa FB2:otef:aox1-Gfp (1814) en cinco condiciones: 0, 10, 20, 30, y 50 mM de H_2O_2.

1. La curva de crecimiento se inició inoculando 100 mL del medio YPD-líquido, con 160 UA/L de células (DO_{600nm} de 0.16 UA/mL). Se realizó así para incrementar el crecimiento celular a partir de la fase logarítmica.
2. A las 4 horas de iniciado el cultivo se adicionaron las diferentes concentraciones de H_2O_2.
3. Se tomaron alícuotas de 1 mL del cultivo cada dos horas, y se les determinó la DO a 600nm. El crecimiento celular se registró durante 24 h registrando la DO a 600nm. Cada determinación se realizó por duplicado.

5.6 Determinación del crecimiento vegetativo

El crecimiento vegetativo de las cinco condiciones experimentales antes descritas se determinó cuantificando la biomasa seca a las 24 horas de incubación de cada condición.

1. En un tubo de microfuga prepesado, se tomó una alícuota de 1mL proveniente del medio de cultivo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 minutos en la centrífuga de mesa (Thermo Scientific, megafuge 16), al término se retiró el sobrenadante.
2. Se lavaron las células con 1 mL de agua destilada estéril.
3. Se repitió la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se secó el tubo con absorbente cuidando de no tocar las células. Los tubos conteniendo las células se colocaron en una estufa de calor a 70 ºC durante 72 horas.

La biomasa seca producida se determinó por diferencia de pesos y los datos se normalizaron por litro.

5.7 Determinación del consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se determinó en células enteras tratadas por 24 y 8 horas con las diferentes concentraciones de H_2O_2 (10, 20, 30, 50 mM) y células no tratadas (control) utilizando un electrodo tipo Clark con un monitor de oxígeno (YSI 5300A) conectado a una interfase que convierte los datos analógicos en digitales. El volumen de análisis fue de 1.5 mL, la determinación se realizó a 25 ºC.

1. Se adicionó 1.4 mL del amortiguador KME (KCl 100 mM, MOPS 50 mM, EGTA 0.5 mM). Se esperó a que se estabilizará la lectura al 100% de oxigenación o se llevó a este porcentaje utilizando el monitor YSI. Una vez ajustado el porcentaje de oxígeno contenido se adicionó 20 μL de células suspendidas de acuerdo con la relación 1:1 (p/v).
2. Para analizar la integridad de la cadena de transporte de electrones, se adicionó 1 mM de cianuro (CN^-) de potasio para inhibir el complejo respiratorio de la citocromo c oxidasa (CIV) y 5 µM de n-octil galato (nOg), para inhibir la oxidasa alterna (AOX).

3. Los datos se normalizaron tomando en cuenta el consumo de oxígeno disuelto 273 nmol O2 en 1.4 mL del amortiguador por parte de las células y la cantidad de peso seco en gramos de biomasa seca en el ensayo.

5.8 Fijación de células

Después de 24 h, las células tratadas con las cinco condiciones anteriormente descritas se recuperaron.

Se adicionó formaldehído al 4% concentración final, se agitó en vortex y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche a 4 ºC.

1. Al término de la incubación, las células fijadas se lavaron con agua destilada dos veces, las células se recuperaron por centrifugación a 3, 000 rpm en una centrífuga de mesa no refrigerada y se reservaron hasta su usó a 4 ºC.

5.9 Obtención de extracto celular clarificado

1. Las células se cultivaron y cosecharon como se describió en el punto 5.4.
2. Las células fueron resuspendidas siguiendo la relación 1:1 (p/v) en el amortiguador de lisis que contenía 50 mM KH_2PO_4, 40 mM HEPES, 5 mM EDTA, 20% glicerol, 1 mM PMSF, y cóctel inhibidor de proteasas (Roche).
3. Las células se lisaron con perlas de vidrio de 0.5 mm en el mini-beadbeater (Biospec) con 8 ciclos de 30 segundos a 4,800 osc/min con 1 minuto de descanso en baño de agua fría a 4 ºC, por cada minuto de lisis mecánica para evitar la desnaturalización de las proteínas por sobrecalentamiento.
4. Después de la lisis celular, se retiraron las perlas por decantación.
5. La muestra se centrifugó por 10 minutos a 10,000 rpm a 4 ºC en la centrífuga de mesa refrigerada (SCILOGEX, D3024R).
6. Se recuperó el primer clarificado por decantación y se centrifugó por 20 minutos a 15,000 rpm a 4 ºC (SCILOGEX, D3024R).
7. Una vez obtenido los extractos clarificados, se realizaron alícuotas y se mantuvieron en frío a 4 ºC o se conservaron a -70 ºC hasta su uso.

5.10 Determinación de unidades formadoras de colonia

La capacidad de proliferación se determinó para cada tratamiento de 24 h por la técnica de unidades formadoras de colonias (CFU/mL).

1. Las células cultivadas en YPD, con o sin H_2O_2 se cosecharon y se les determinó la DO_{600nm}.
2. Las células se ajustaron a una DO de 0.05 UA/mL.
3. Se prosiguió a hacer diluciones seriadas base 10. La DO_{600nm} final fue de 5×10^{-4} cel/mL.
4. En cada placa de YPD-agar se colocaron 10 µL de la dilución y se esparció con una varilla, hasta la completa absorción de la muestra.
5. Las placas se incubaron de 24 a 48 horas, una vez que se observaron colonias estas fueron contadas. Los datos se normalizaron en CFU/mL tomando en cuenta las diluciones seriadas.

5.11 Determinación de proteína

El contenido de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry, 1951). Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar de proteína.

1. Se prepararon los siguientes reactivos de acuerdo con el número de muestras a cuantificar su proteína: BSA (1 mg/mL), DOC (desoxicolato de sodio) 0.4 %, reactivo A: Na_2CO_3 2 % y NaOH 0.1 N. Reactivo B: tartrato de sodio potasio. Reactivo C: $CuSO_4$ 1% y reactivo D se prepara antes de utilizarse siguiendo la proporción 10:1:1 del reactivo A: B: C y Folin 1N.
2. La curva estándar se realizó con 0, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg de BSA a partir de un estándar de 1 mg/mL.
3. En tubos de ensayo se colocó 10 µL de la muestra y junto con la curva de BSA se llevó a un volumen de 500 µL con DOC 0.4 %, después se adicionó 1.5 mL del reactivo D.
4. Se agitó en el vortex cada tubo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

5. Al término de la incubación a cada tubo, se le agregó 150 µL de Folin 1N. Se agitó en el vortex cada tubo y se incubó durante 30 minutos.
6. Se leyó la DO en una celda de plástico a 660 nm.

5.12 Determinación de la actividad enzimática de cat-px

La determinación de la actividad enzimática de la cat-px se midió espectrofotométricamente a 240 nm y 25 ºC, de acuerdo con el método establecido por Aebi (Aebi, 1974).

I) En una celda de cuarzo se colocaron los componentes de la reacción en el siguiente orden: 990 µL de amortiguador de fosfatos 0.2 M, pH 7.4 (24 mM KH_2PO_4 y 116 mM K_2HPO_4), 1 µL de tritón-X100 al 0.01% y 10 µL del extracto citosólico clarificado.

1. La reacción se inició adicionando a los diez segundos 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, ó 50 mM de H_2O_2. La actividad de la cat-px se registró como el decaimiento de la absorbancia a 240 nm causada por el consumo del H_2O_2.
2. Los datos se normalizaron por los microgramos de proteína en el ensayo.
3. La actividad específica se determinó utilizando el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 que es de 43.6 M^{-1} cm^{-1}.

5.13 Análisis de la temperatura sobre la actividad de la catalasa-peroxidasa

1. Las alícuotas del extracto citosólico clarificado fueron incubadas en un baño maría a 35, 40 y 45 ºC, durante 5, 10, 15 y 20 minutos.
2. Al término de cada incubación, inmediatamente se determinó la actividad de la cat-px siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.13. Se utilizó una concentración de 15 mM de H_2O_2 para todas las temperaturas probadas.
3. Los datos se normalizaron como se describió en el apartado 5.13.

5.14 Determinación del pH sobre la catalasa-peroxidasa

El efecto del pH sobre la cat-px se analizó determinando la actividad específica en el amortiguador de citratos 100 mM, pH 6.0 (82 mM citrato de sodio dihidratado y 17.5 mM de ácido cítrico).

1. Como control se determinó la actividad en el amortiguador de fosfatos 200 mM pH 7.4, como se describió en el apartado 5.13.
2. La actividad específica a pH 6.0 se normalizó considerando la proteína contenida en el ensayo y el coeficiente de extinción molar para el H_2O_2.

5.15 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se estandarizó de acuerdo con el método de fenol-cloroformo descrito por Schmitt (Schmitt, et al 1990). Durante la extracción se trabajó con guantes, material previamente esterilizado y un área designada exclusiva para extracción de RNA.

1. Previo a la extracción de RNA fue necesario preparar: tubos *safe-lock* de 2 mL con 45 mm de microperlas de vidrio (450-600 µm), 450 µL de fenol (fenol saturado Amresco 0981) pH 4.5 y 40 µL de SDS 10 %.
2. Las células se cultivaron y cosecharon como fue descrito en el punto 5.4.
3. Una vez obtenida la suspensión celular se lavó dos veces con agua DEPC (H_2O y dietilpirocarbonato al 1 %) y se mantuvo en frío hasta iniciar la extracción.
4. La suspensión celular se centrifugó 5 minutos a 2500 rpm. Al término se eliminó el sobrenadante y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo.
5. Las células se suspendieron con 1 mL de amortiguador AE (acetato de sodio 50 mM y EDTA 10 mM) a 4 ºC, agitando en vortex.
6. La muestra se centrifugó 5 segundos a 14,000 rpm y se eliminó el sobrenadante.
7. El pellet celular se suspendió con 500 µL de amortiguador AE, 5 µL de DEPC y agitando en vortex por 5 segundos.

8. La suspensión celular se transfirió a los tubos previamente preparados en el paso 1 de este apartado. Se mezclaron con vortex durante 30 segundos.
9. Inmediatamente pasados los 30 segundos se inició la extracción, la suspensión celular se incubó durante 5 minutos a 65 ºC, pasado el tiempo se agitó en vortex durante 30 segundos. Este ciclo se repitió 2 veces.
10. Una vez repetido el paso, la suspensión celular se enfrió durante 3 minutos en el ultracongelador REVCO.
11. Después de enfriar, la suspensión celular se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm y con cuidado se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo.
12. Se agregaron 500 µL de la solución PCI, pH 4.5 (fenol, cloroformo, alcohol isoamílico 25:24:1 v/v) y se agitó en el vortex durante 15 segundos.
13. Se continuó con una centrifugación durante 5 minutos a 14,000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo.
14. Se realizó una segunda extracción con PCI pH 4.5, repitiendo los pasos 8 y 9.
15. Se agregaron 500 µL de cloroformo-isoamílico y se agitó en vortex durante 15 segundos.
16. Se centrifugó durante 5 minutos a 14,000 rpm y se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo.
17. Se adicionó a la fase acuosa recuperada 10 volúmenes de acetato de sodio 3M (50 µL) y 2.5 volúmenes de etanol frío al 95 % (1.250 mL). Se incubó mínimo 30 minutos o incluso toda la noche a -70 ºC.
18. Al término de la incubación, la muestra se centrifugó en frío durante 5 minutos a 14,000 rpm, 4 ºC. Al término, se eliminó el sobrenadante y se reservó el pellet.
19. El pellet se lavó con 500 µL de etanol al 75 % dos veces. El RNA se recuperó centrifugando por 3 minutos a 14,000 rpm. El etanol se retiró cuidando no llevarse el pellet. El etanol sobrante se evaporó dejando abiertos los tubos a temperatura ambiente. Cuidando no secar demasiado.

20. Una vez evaporado el etanol, el RNA se resuspendió con 25 µL de agua inyectable estéril.
21. El RNA se cuantificó y posteriormente se almacenó a -70 ºC hasta su uso.

5.16 Cuantificación de RNA

La cuantificación se realizó en un nano espectrofotómetro (NanoPhotometer P-Class, P300 IMPLEN) a 260 nm.

1. Se colocó 1 µL del RNA previamente extraído, ver apartado 5.16 en la celda del nano espectrofotómetro.
2. Los datos obtenidos se ajustaron a una concentración de 2 µg/µL, mediante una relación del RNA total obtenido en 1 µL. A continuación, se muestra un ejemplo de un resultado obtenido.

Muestra	µg/µL de RNA	Para 2 µg/µL
1	2.738 µg	0.730 µL

En la cual, tenemos que en 1 µL hay 2.738 µg de RNA, para obtener 2 µg/ µL = $\frac{(2\ \mu g)(1\ \mu L)}{2.738\ \mu g} = 0.730\ \mu g$

3. La integridad del RNA se verificó mediante una electroforesis desnaturalizante.

5.17 Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante

Para verificar la integridad y calidad del RNA previamente extraído en el apartado 5.16, se realizó una electroforesis con un gel de agarosa al 1 % en condiciones desnaturalizante.

1. Se pesó 0.5 g de agarosa en un matraz Erlenmeyer y se resuspendió en 50 mL del amortiguador TAE (Tris base, ácido acético y EDTA). La agarosa se disolvió calentándola en el microondas hasta obtener una solución transparente. Posteriormente la mezcla se vertió en la bandeja de solidificación del gel y se colocó un peine para generar los pozos.
2. Una vez sólido el gel, se cargó cada pozo con 2 µg de muestra extraída en el apartado 5.16, más 1 µL de GelRed (Biotium), y tres volúmenes

de amortiguador de carga de gel (1–2X de formamida al 95 %, EDTA de 18 mM y SDS al 0.025 %, xileno-cianol y azul de bromofeno, adquirido en Invitrogen) con respecto al volumen de RNA cargado en el gel.

3. El gel se corrió de 95-100 mA durante 30 minutos o hasta observar las bandas definidas.
4. El RNA en el gel se visualizó mediante luz ultravioleta, verificando que las bandas coincidan con el marcador, visualizando la banda 18S y 28S de RNA ribosomal a 1.9 y 5 kb respectivamente.

5.18 Tratamiento con DNAsa

Una vez verificada la integridad del RNA, se procede a tratar las muestras con DNAsa, para lo cual se ocupa el kit RQ1 RNase-Free DNase de Promega el cual contiene lo siguiente: amortiguador de reacción DNAsa 10x (Tris-HCl 400 mM, pH 8.0, $MgSO_4$ 100 mM, $CaCl_2$ 10 mM), RQ1 DNAsa (HEPES 10 mM pH 7.5, glicerol 50 % (v/v), $CaCl_2$ 10 mM y $MgCl_2$ 10 mM) y solución de STOP (EGTA 20mM, pH 8.0).

1. En tubos de 600 µL, se colocaron los siguientes volúmenes:

RNA (extraído en el apartado 5.16)	2 µL
DNAsa 10x amortiguador de reacción	2 µL
Agua inyectable	10 µL
RQ1 DNAsa	2 µL

Obteniendo hasta este paso un volumen final de 16 µL. Continuar en 2.

2. A continuación, los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37 ºC.
3. Pasado el tiempo de incubación, se detuvo la reacción con 2 µL de la solución de STOP incubando durante 10 minutos a 65 ºC en baño maría.
4. Las muestras se almacenaron a -70 ºC hasta su uso.

5.19 Síntesis de cDNA

Se realizó de acuerdo con el protocolo del kit RevertAid RT de Thermo Scientific. Es importante descongelar los reactivos lentamente a 4 ºC.

1. En un tubo estéril se añadieron las siguientes soluciones en el siguiente orden:
   a. RNA templado 500 ng 5 µL
   b. Primer oligo (dT) 1 µL
   c. Agua inyectable 6 µL

   El volumen final hasta este paso fue de 12 µL. Continuar en 2.

2. La mezcla se homogenizó suavemente con la micropipeta y se centrifugó a 2,000 rpm para bajar los residuos, finalmente se incubó 5 minutos a 65 ºC.
3. Pasado el tiempo, se dejó enfriar en hielo. Posteriormente se añadieron los siguientes componentes en el orden descrito a continuación:
   a. 5x amortiguador de reacción 4 µL
   b. Riboblock inhibidor de RNAsa 1 µL
   c. dnTP mix 10 mM 2 µL
   d. Revert Aid H Minus RT 1 µL

   Obteniendo un volumen final de 20 µL, con los volúmenes del paso 1 y 3. Continuar en 5.

4. Se mezcló suavemente con la pipeta, y se incubó durante 60 minutos a 42 ºC.
5. Al término, la mezcla se incubó durante 5 minutos a 70 ºC para terminar la reacción.
6. El cDNA sintetizado se verificó por PCR. Continuar en inciso 5.21.

5.20 qRT-PCR

Se utilizaron las muestras obtenidas en el apartado 5.20, se trabajó en una campana de extracción, en condiciones de esterilidad y con guantes y se utilizó el kit SYBR green de KAPA fast (Roche).

1. Se realizó la mezcla con el colorante de detección SYBR, agua inyectable, oligos (Actina y cat-px) (sintetizados en IBT SiBioTec v.2.0. 2024 y Sigma Aldrich, respectivamente) y el cDNA sintetizado (5.20). Para cada reacción se colocó:

   a. Sybr green 5 µL
   b. Agua inyectable 3 µL
   c. Oligos 1 µL

2. En una placa de 72 pozos, se colocaron tubos de 100 µL, y se cargaron con 9 µL de la mezcla realizada en el paso 1, y se agregó 1 µL de cDNA.
3. El análisis RT-qPCR se realizó utilizando el equipo Rotor-Gene Q (Qiagen), utilizando los ajustes de perfil: 94 ºC durante 5 min (1 ciclo), 94 ºC durante 15 segundos, 58 ºC durante 20 segundos y 72 ºC durante 20 segundos (35 ciclos).

5.21 Microscopía confocal

Las células fijadas en el apartado 5.8 se ocuparon para microscopía confocal, se usó el colorante calcoflúor.

1. Las células se colocaron en el portaobjetos tratado Silane-prep de Sigma, y se les adiciono 1 µL de calcoflúor, después se cubrieron con un cubreobjetos.
2. Una vez puesto el colorante, inmediatamente se fotografiaron con un microscopio confocal (Zeiss LSM5 Pascal, Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Alemania), con el objetivo de inmersión en aceite 100x. Se utilizaron rangos de detección de 405-430 nm.

3. Las células fueron medidas en el programa ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ ij/, 1997–2016).

6 Resultados

6.1 Efecto del H_2O_2 en el crecimiento celular vegetativo.

La respuesta de *U. maydis* bajo diferentes condiciones de estrés causadas por las diferentes concentraciones de H_2O_2 :10, 20, 30 y 50 mM fue analizada mediante curvas de crecimiento registrando la DO a 600_{nm} como se describió en materiales y métodos. Se observó un efecto negativo sobre el crecimiento celular cuando las células fueron incubadas con 30 y 50 mM de H_2O_2. Mientras que con 10 y 20 mM de H_2O_2 no se afectó el crecimiento celular registrado por densidad óptica a 600 $_{nm}$ (Figura 6). Debido al efecto negativo sobre el crecimiento observado, se decidió continuar con un análisis de la viabilidad celular, el crecimiento vegetativo y la morfología celular.

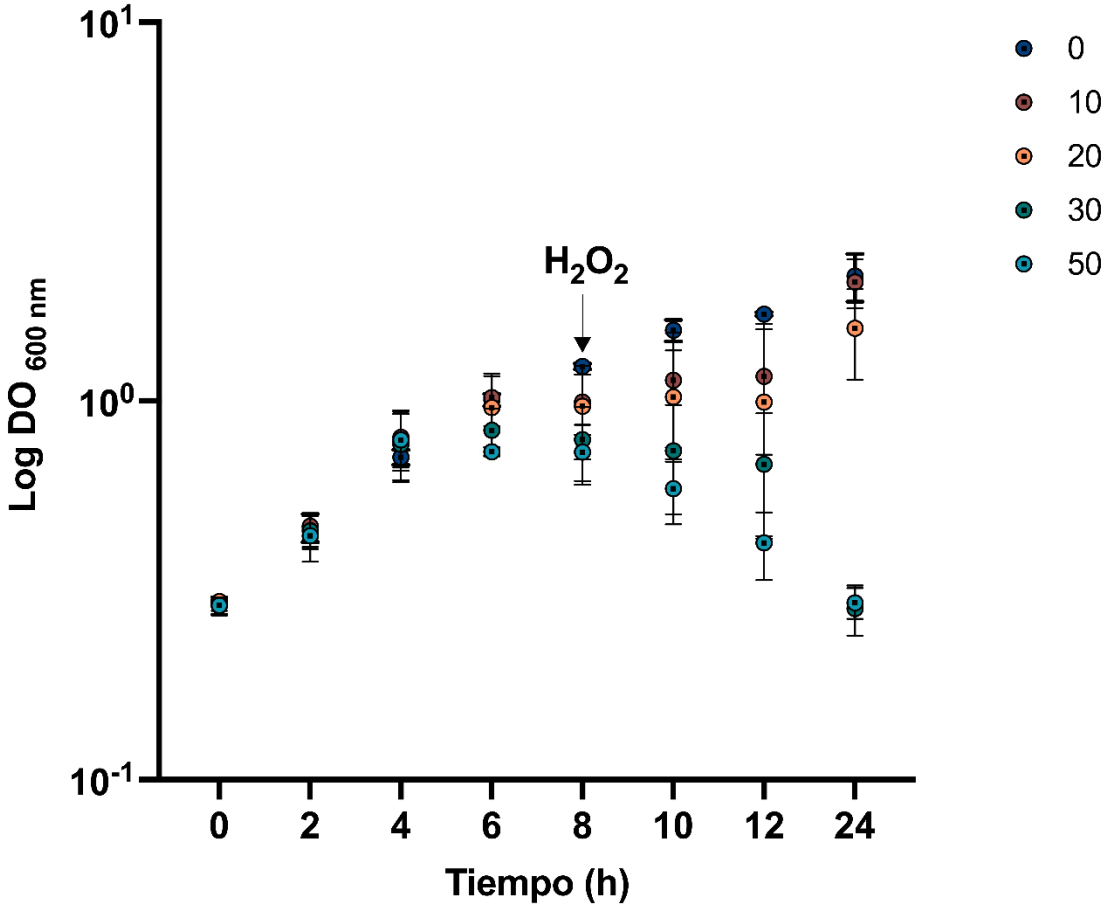


Figura 8. Efecto del H_2O_2 en el crecimiento de *U. maydis*. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de H_2O_2 e incubadas por 24 h. Azul fuerte: control, café: 10 mM, naranja: 20 mM, verde: 30 mM y azul claro: 50 mM, (n=4 ± SD).

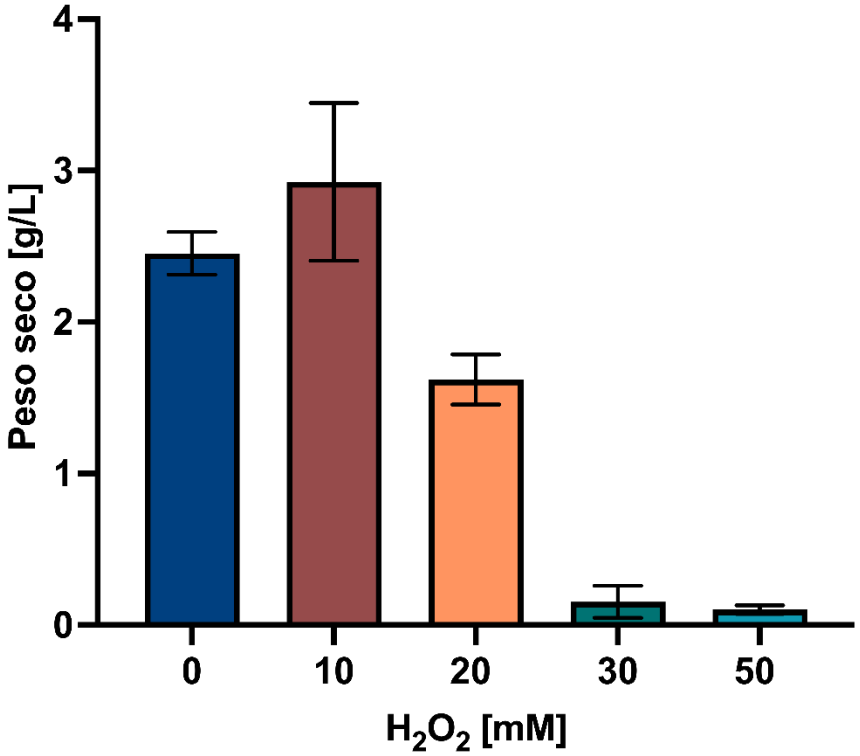


Figura 9. Efecto del H_2O_2 sobre la producción de biomasa de *U. maydis*. Azul fuerte: control, café: 10 mM, naranja: 20 mM, verde: 30 mM y azul claro: 50 mM, (n=4 ± SD).

6.2 Análisis de la morfología y viabilidad celular.

Para analizar la morfología celular de *U. maydis* control y tratadas con H_2O_2, las células se fijaron después de incubarlas durante 24 h bajo estrés oxidativo. Después se observaron en el microscopio confocal campo claro utilizando el objetivo de 100x. Otro grupo de las células cultivadas en condiciones de estrés y su respectivo control se cosecharon y se lavaron con agua estéril, se resuspendieron a una concentración final de 5 x 10^{-4} DO_{600nm} y se incubó en YPD sólido por la técnica de barrido. Las CFU se contaron después de 48 h. Se observó que el H_2O_2 daña a las células probablemente a nivel de DNA impidiendo que las células tratadas con altas concentraciones de H_2O_2 como lo son 30 y 50 mM de H_2O_2 sean viables. Con 30 mM de H_2O_2 se observó una pérdida de la viabilidad del 97.87% con respecto al control mientras que con 50 mM de H_2O_2 la viabilidad fue de cero (Figura 8c) y con 10 y 20 mM de H_2O_2 la viabilidad es similar al control (Figura 8c).

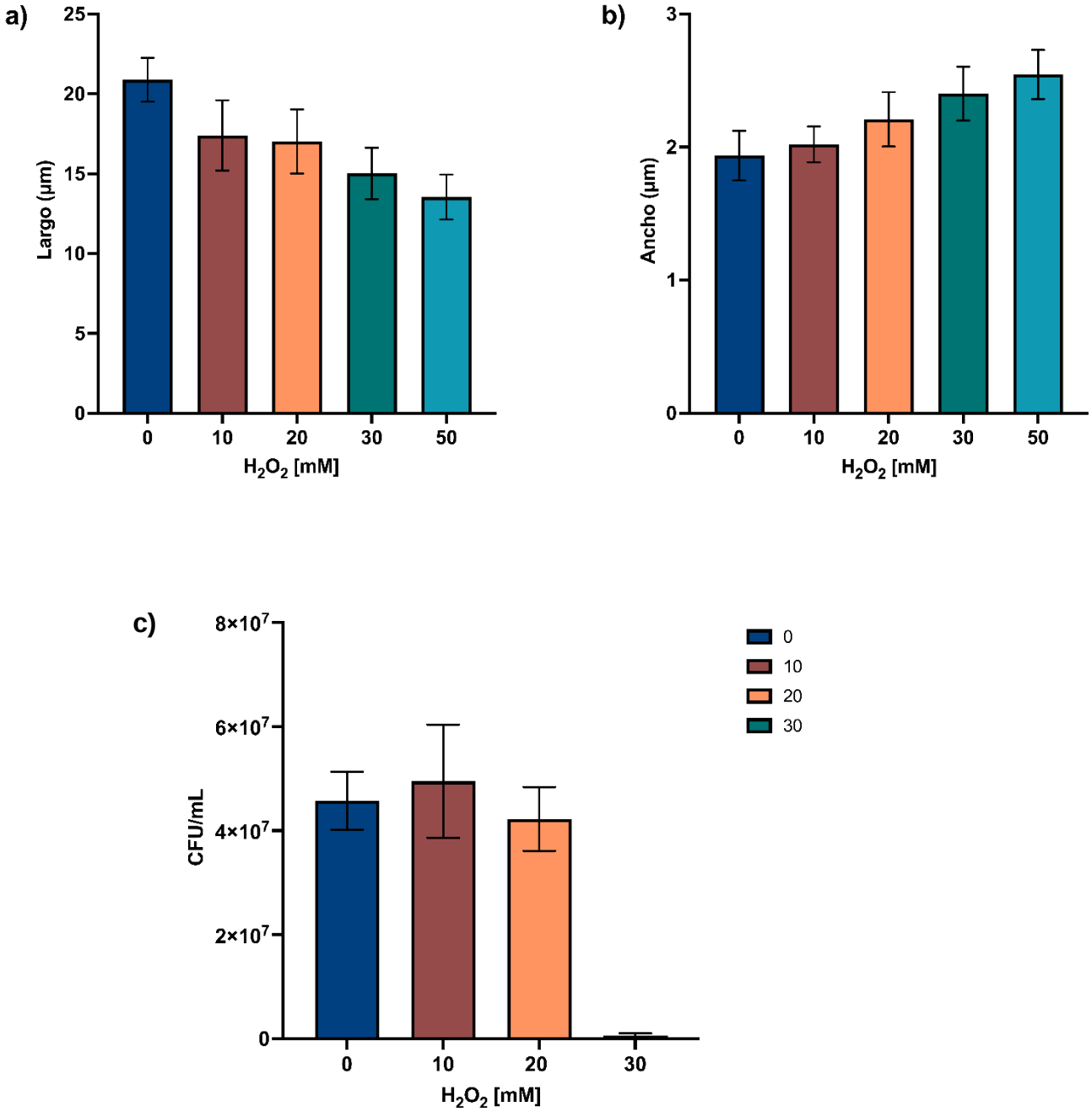


Figura 10. Análisis de la morfología y la proliferación celular de *U. maydis*. Análisis de la morfología: a) Largo y b) ancho. c) Unidades formadoras de colonias por mililitro. Las células incubadas con 30 mM de H_2O_2 durante 24 h son inviables. (n=3 ± SEM).

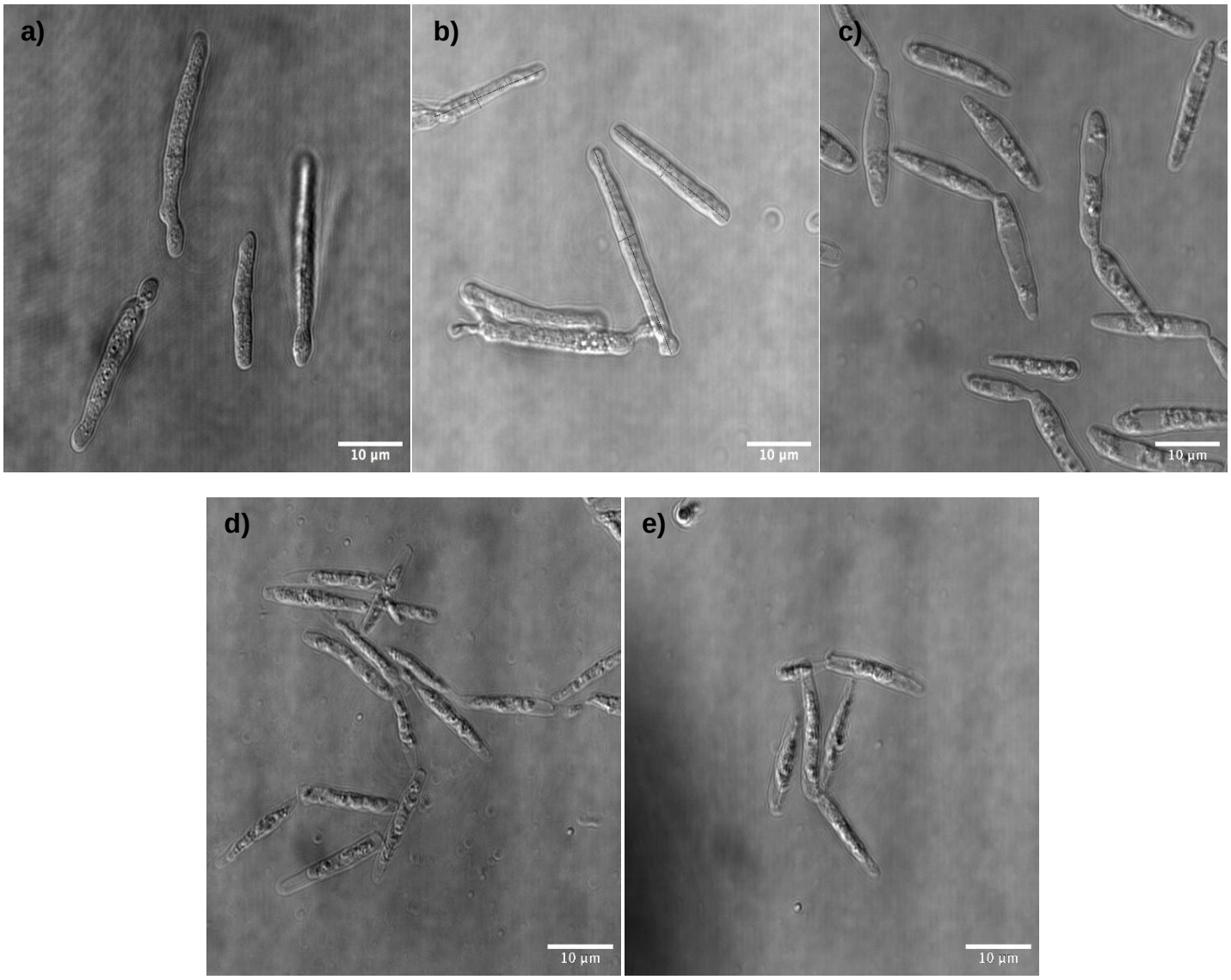


Figura 11. Microscopía de las células de *U. maydis* tratadas con H_2O_2 después de 24 h. a) Células control. b) 10 mM. c) 20 mM d) 30 mM y e) 50 mM de H_2O_2

6.3 Efecto del H_2O_2 sobre el consumo de oxígeno

Para complementar el análisis de la respuesta de las mitocondrias de las células de *U. maydis* a diferentes condiciones de estrés causadas por las diferentes concentraciones de H_2O_2: 10, 20, 30 y 50 mM se determinó el consumo de oxígeno a las 8 y 24 h, en ambos casos se les agregó los inhibidores cianuro de potasio (CN) y n-octilgallato (n-Og) para ver el comportamiento en la cadena respiratoria entre células control y células estresadas. A partir de las 8 h, hay una disminución del consumo de oxígeno en las concentraciones de 30 y 50 mM de H_2O_2 de 75.11 y 89.74% respectivamente, con respecto al control, (Figura 9a). A las 24 h, la pérdida de capacidad respiratoria es más evidente, se alcanza una pérdida en la capacidad respiratoria de 94.07%, (Figura 9b). El control a las 24 horas mantiene una tasa alta de respiración, indicando que el estrés oxidativo causado en *U. maydis* por el H_2O_2 afecta negativamente las actividades de los complejos respiratorios. Se aprecia que el efecto inhibitorio de H_2O_2 sobre la respiración es significativo en comparación al control, especialmente a concentraciones más altas.

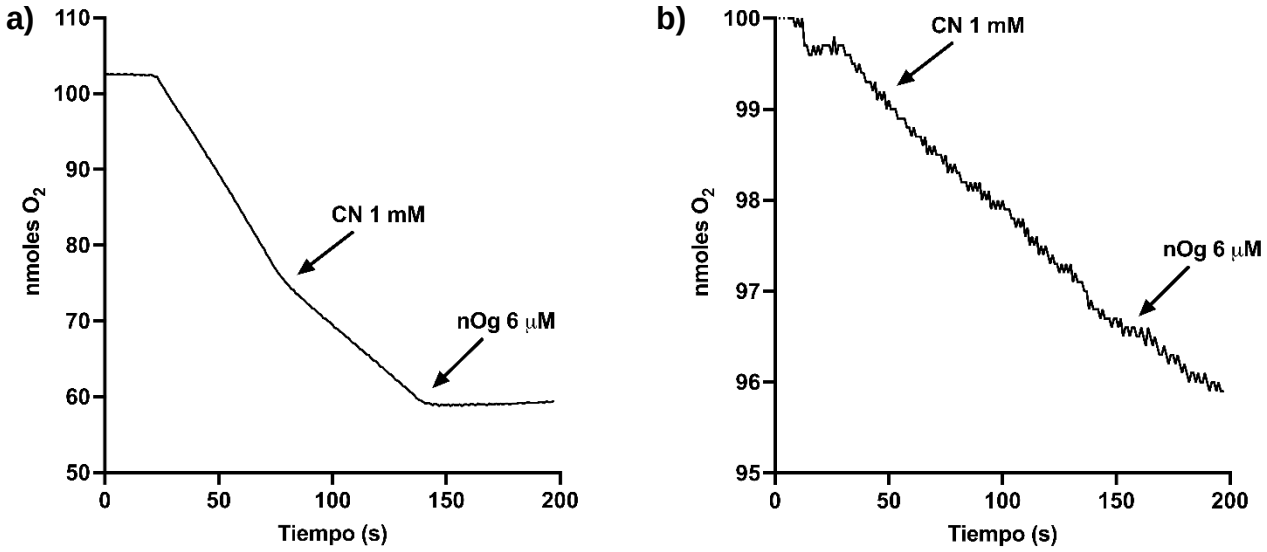


Figura 12. Evaluación del consumo de oxígeno en células de *U. maydis* mediante inhibición química de la respiración mitocondrial. a) Tasa de respiración basal de células control de *U. maydis* b) Células estresadas con 50 mM de H_2O_2 durante 24 h. En ambos casos, se aplicaron los inhibidores cianuro (CN), que bloquea la cadena de transporte de electrones al inhibir la citocromo c oxidasa, y n-octilgalato (nOg), un inhibidor de la actividad catalasa.

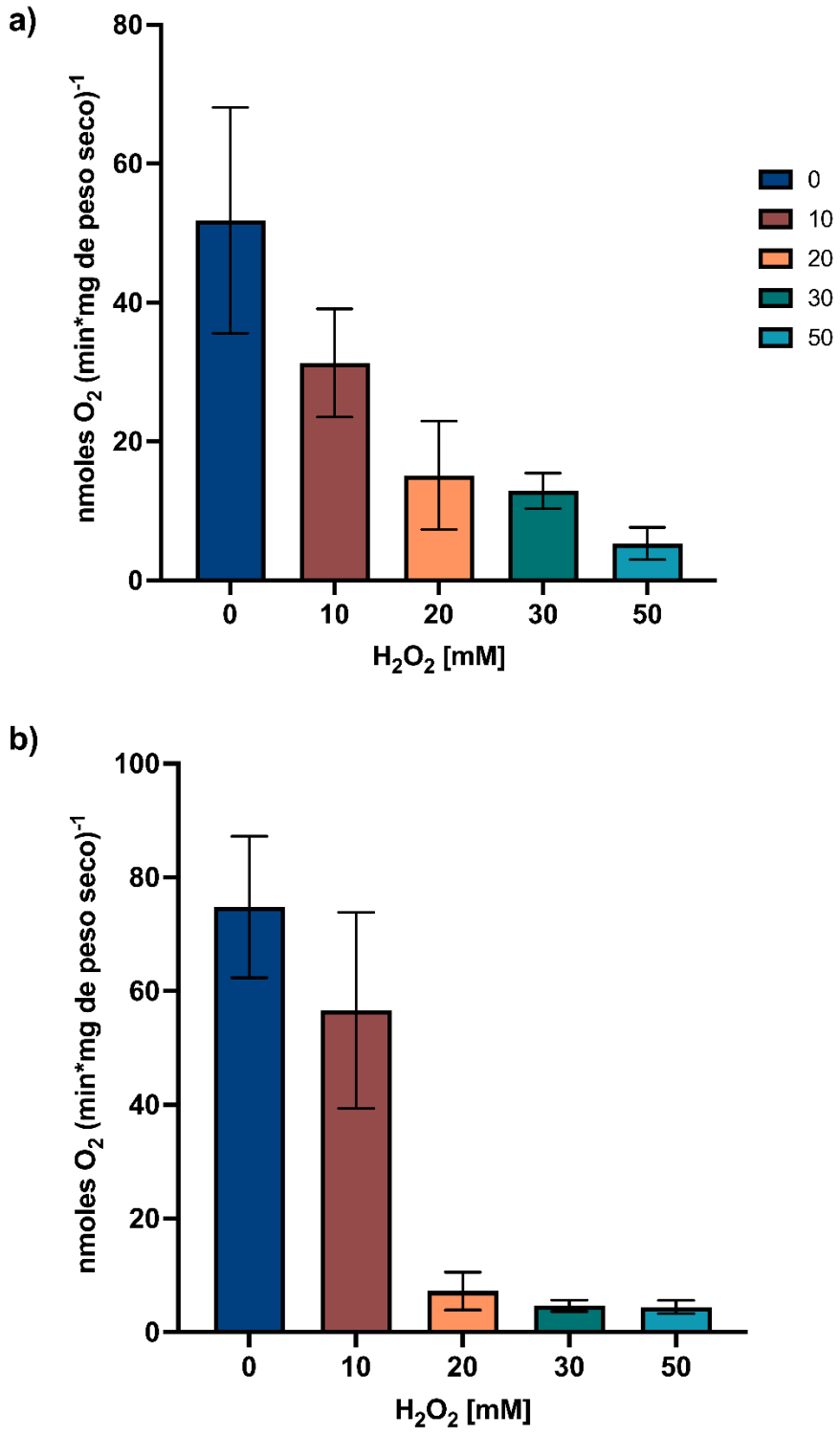


Figura 13. Efecto del H_2O_2 sobre el consumo de oxígeno de *U. maydis*. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de H_2O_2. a) Células incubadas durante 8 h. b) Células incubadas durante 24 h. (n=3 ± SD).

6.4 Determinación de los parámetros cinéticos Km y Vmax

Para tener un aproximado de la afinidad de cat-px por su sustrato el H_2O_2, se realizaron ensayos acoplados con diferentes concentraciones de sustrato. La concentración en la cual hubo más actividad fue a 15 mM del sustrato. Después se realizaron ensayos de cinética enzimática para determinar la K_m y V_{max} de la cat-px a pH 7 y pH 6. Los datos se ajustaron a un modelo cinético del tipo Michaelis-Menten; cuando se ensayó a pH de 7, el valor de la V_{max} fue de 8.776 µmol/min/mg de proteína. Mientras que, a pH de 6, los datos se analizaron con el mismo modelo, pero no se obtuvo un buen ajuste, debido a que se obtuvo una K_m y V_{max} muy altas, y junto con los datos experimentales obtenidos no se logró llegar a la V_{max}.

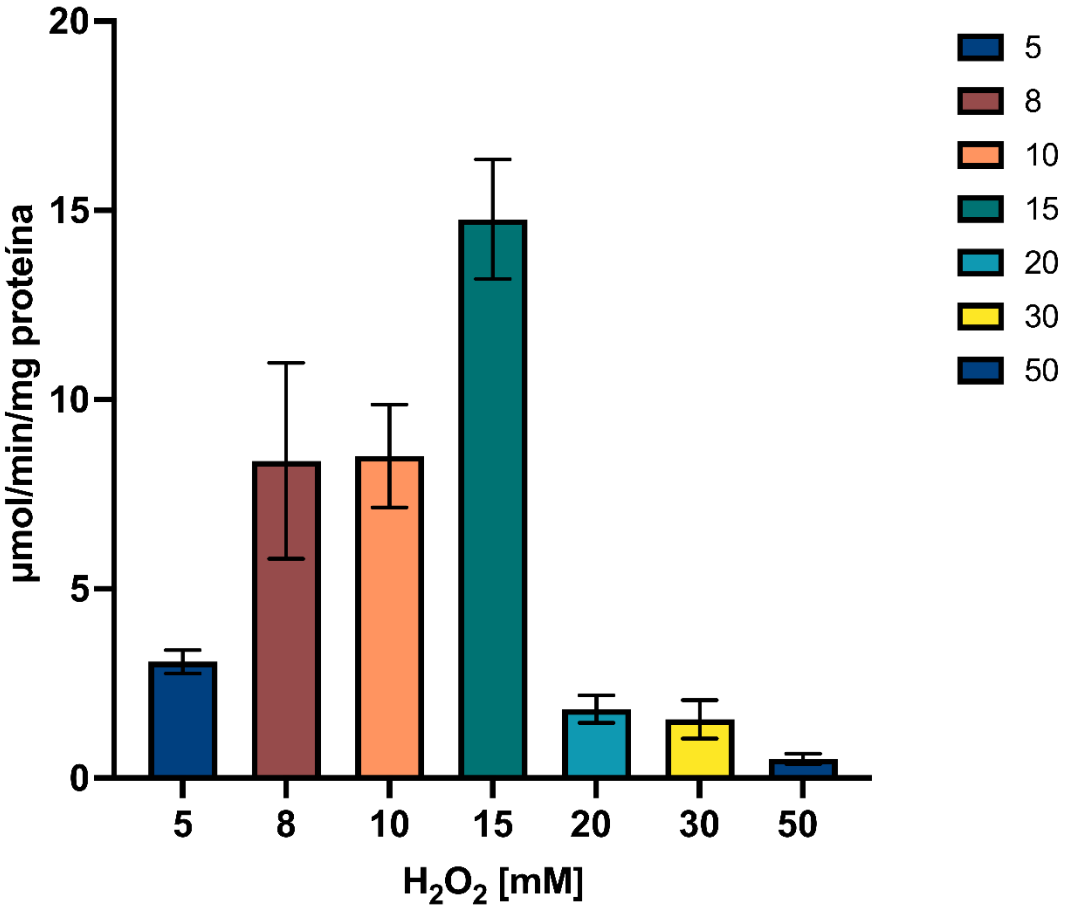
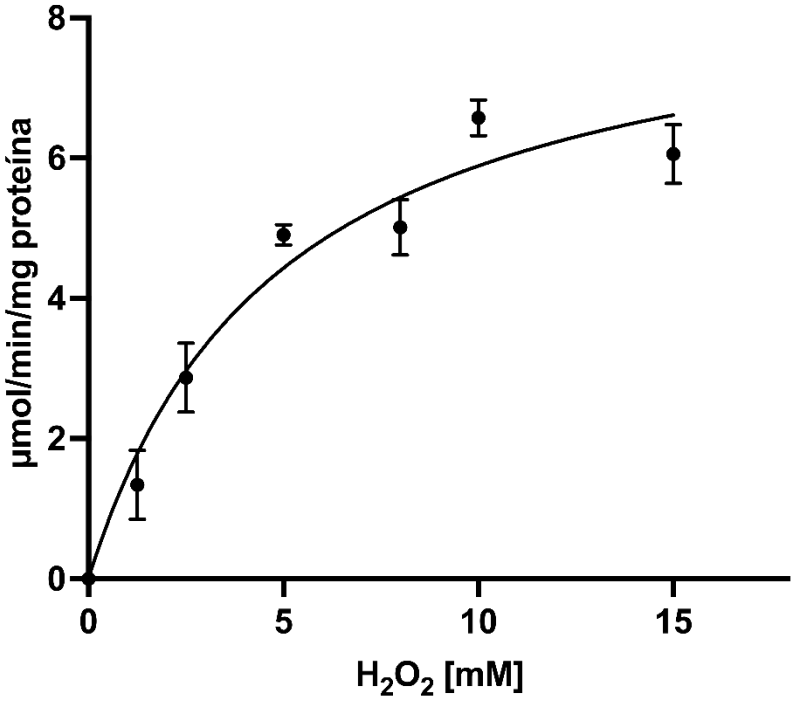
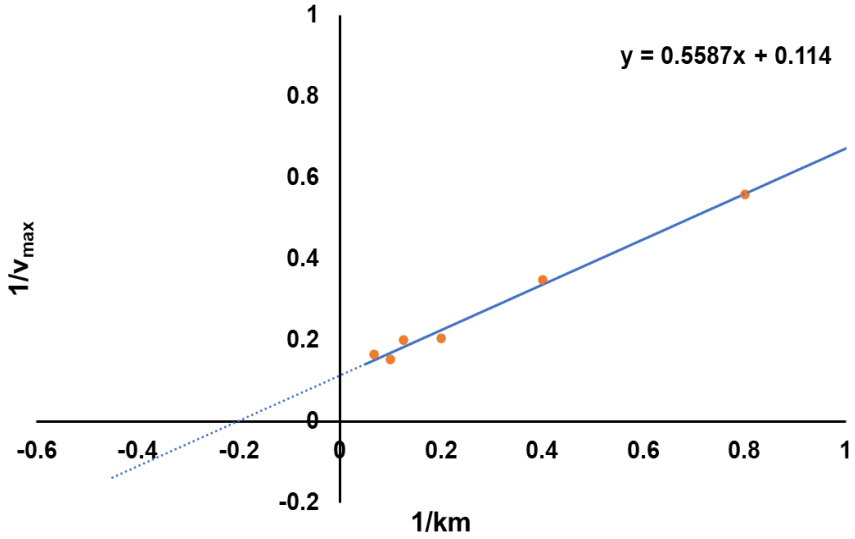


Figura 14. Determinación de la afinidad de cat-px por su sustrato: H_2O_2. Se obtuvieron las actividades para cat-px usando un amortiguador de fosfatos a pH = 7. (n=3 ± SD).

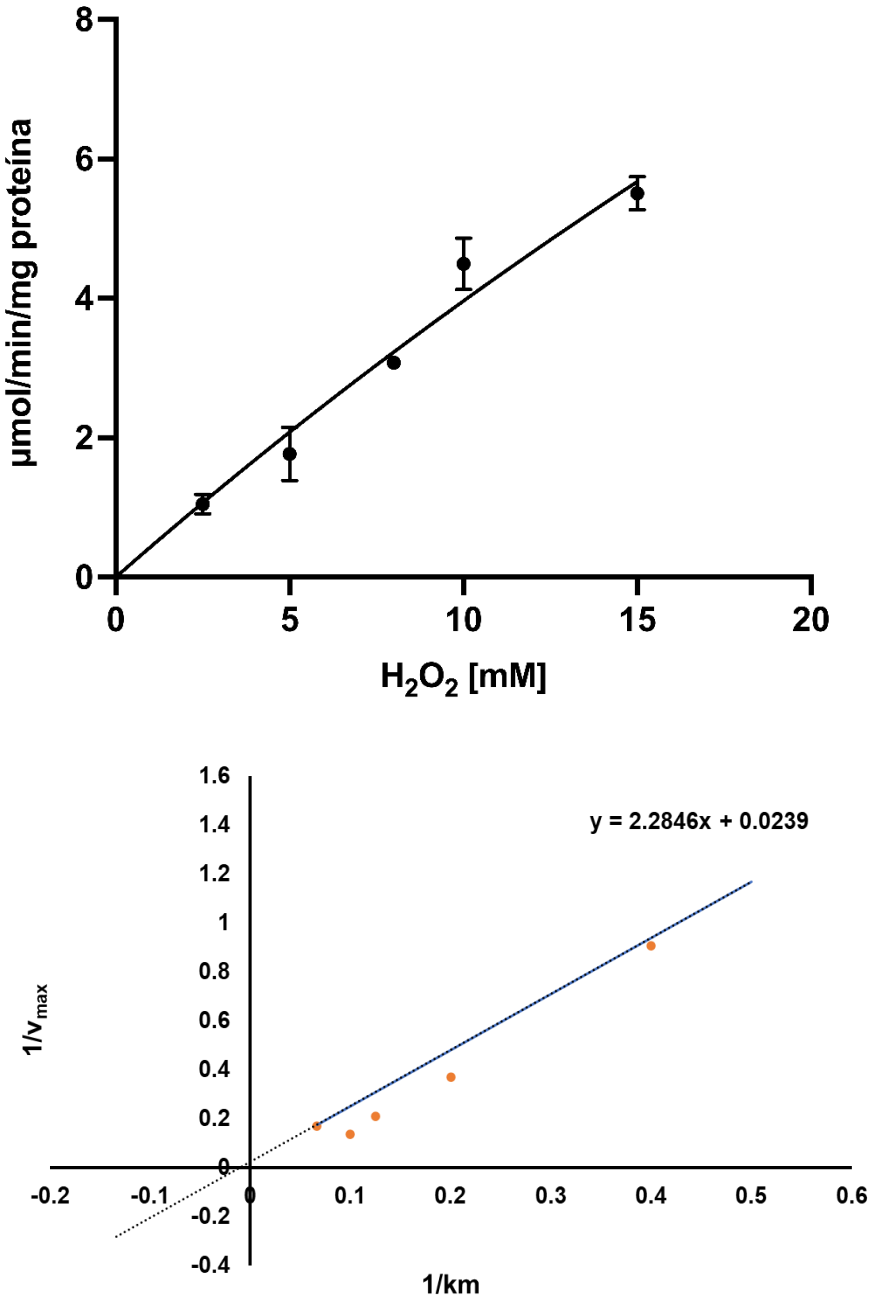
a)





pH 7	
V_{max}	8.8 ± 0.9 µmol/min/mg proteína
K_m	4.9 ± 1. 0 mM

b)



pH 6	
V_{max}	41.80 ± 48.35 µmol*min*mg proteína
K_m	95 ± 123.82 mM

Figura 15. Determinación de la V_{max} y K_m de la cat-px de *U. maydis*. Ajuste a un modelo cinético del tipo Michaelis-Menten, a) pH 7 y b) pH 6. (n=3 ± SD).

6.5 Efecto de la temperatura sobre la catalasa peroxidasa

Para saber cómo afecta la temperatura a la cat-px, se realizaron ensayos a diferentes temperaturas: 25, 35 y 40, 50 °C, en las cuales se tomaron alícuotas y se incubaron a diferentes tiempos: 5, 10 y 20 minutos (Figura 15) y se les determinó la actividad enzimática. Se pudo observar que, a temperatura ambiente no presentan un cambio relevante en los diferentes tiempos (Figura 15a), mientras que, a los 20 minutos en la temperatura de 40 ºC hay un decaimiento del 75 % respecto a la actividad ensayada a temperatura ambiente (Figura 13).

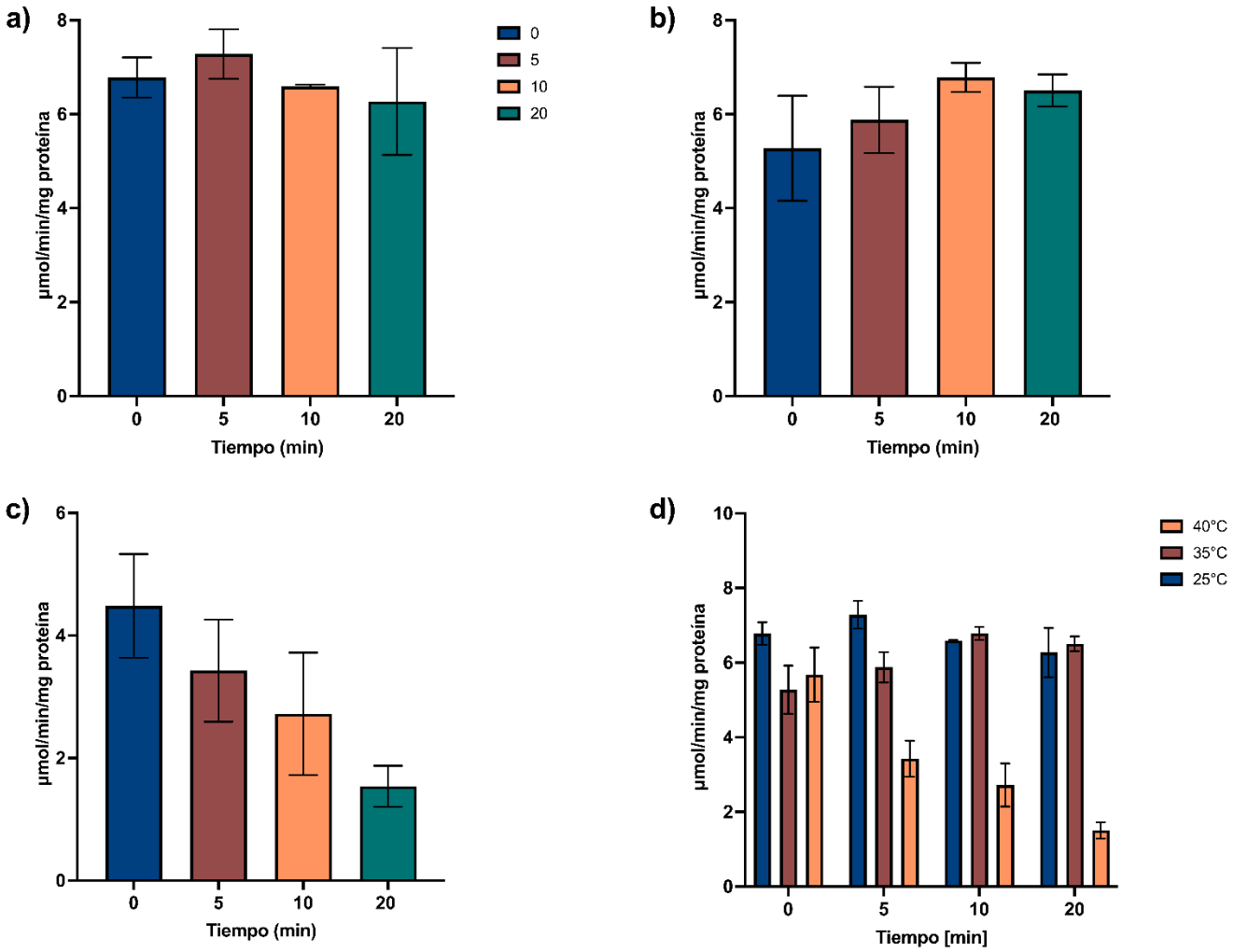


Figura 16. Efecto de la temperatura sobre la cat-px. Para las tres condiciones se usó un amortiguador de fosfatos pH 7 y 15 mM de H_2O_2; el extracto celular fue incubado bajo las diferentes temperaturas en los tiempos: 0, 5, 10 y 20 minutos. a) 25° C. b) 35° C. c) 40° C. d) Resumen de las temperaturas (n=3 ± SD).

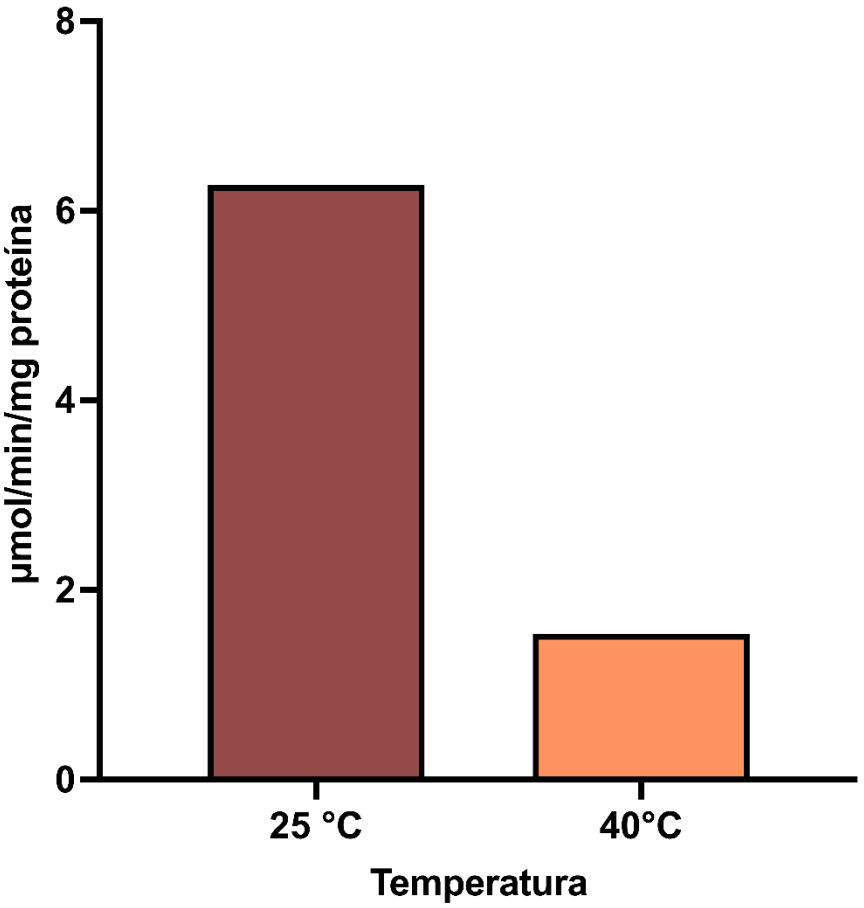


Figura 17. Comparación del efecto de la temperatura sobre la actividad de la cat-px. La actividad enzimática a 40 ºC bajo un 75 % respecto a la temperatura ambiente. (n=3 ± SD).

6.6 Efecto del H_2O_2 en la expresión génica de la catalasa peroxidasa

Para observar la expresión del gen de cat-px bajo las diferentes condiciones de estrés se realizaron qPCR, tratando a las células que fueron incubadas con las diferentes concentraciones de H_2O_2, para obtener un RNA de calidad y tener buenos resultados. Se observó un aumento en la expresión del gen en la condición donde las células se incubaron durante 24 h con 10 mM de H_2O_2. Bajo esta condición se había observado un cambio positivo en la viabilidad y biomasa producida (Figura 9).

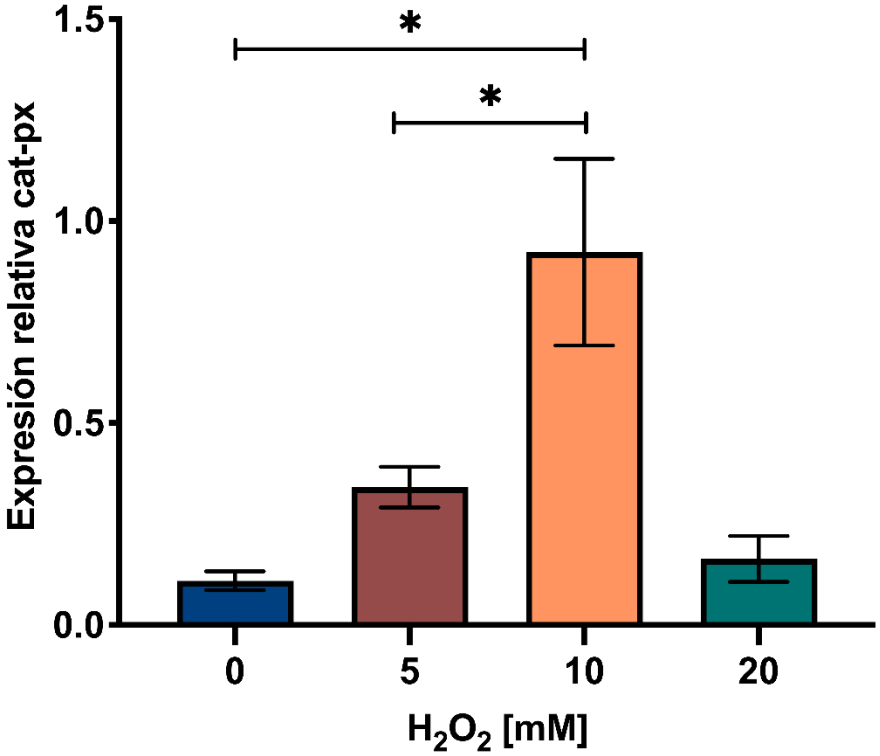


Figura 18. Efecto del H_2O_2 en la expresión genética de la cat-px (n=3 ± SD). Los asteriscos indican diferencias significativas en la expresión génica en comparación con el control ($p < 0.05$, análisis estadístico mediante t-student). La condición marcada con tres asteriscos (***) presenta una expresión significativamente mayor que las demás, lo que sugiere una fuerte inducción de la catpx bajo esa condición específica.

7 Discusión

7.1 El estrés oxidante afecta el crecimiento de Ustilago maydis

El estrés prooxidante provocado por el H_2O_2 afecta el crecimiento en levaduras, por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae* se ha visto que induce una respuesta hormética dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición, con una correlación positiva entre la actividad de la catalasa y la capacidad bajo estrés oxidativo (Vasylkovska et al., 2015), así mismo, induce una acumulación de formas inactivas de enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa como respuesta de protección transitoria contra el estrés oxidativo subsecuente (Bayliak et al., 2007). Por otro lado, el sistema antioxidante puede verse afectado como, por ejemplo, *Debaryomyces hansenii* tiene mayor sensibilidad al estrés inducido por H_2O_2 que *S. cerevisiae*, obteniendo niveles más bajos de glutatión y actividades antioxidantes, por ende, muestra diferencias en su capacidad defensiva (Navarrete et al., 2009).

De acuerdo con los resultados las células de *U. maydis* tratadas con 20 mM de H_2O_2 tienen una reducción significativa del crecimiento (Figura 8), lo cual podría estar explicado por factores relacionados con la toxicidad del H_2O_2 que supera la capacidad de los mecanismos antioxidantes celulares de *U. maydis*, por lo tanto las ROS generadas por la presencia de H_2O_2 podrían estar activando respuestas y daño celular como lo son la oxidación del DNA lo cual explicaría la capacidad proliferativa cuando se cultivó a *U. maydis* en las concentraciones de 30 y 50 mM (Figura 8 y 10).

También podemos concluir que hay un efecto dosis-dependiente, a medida que aumenta la concentración de H_2O_2, mayor acumulación de ROS y menor capacidad celular de detoxificación. Se ha reportado que algunas levaduras toleran concentraciones bajas de peróxidos (1-5 mM) pero a mayores concentraciones, pierden la viabilidad similar a lo observado en las células de *U. maydis*.

7.2 Efecto del peróxido de hidrógeno en la respiración de Ustilago maydis

En el consumo de oxígeno de las células control (figura 13 a) se observa que U. maydis utiliza la vía citocromica como principal ruta para la fosforilación oxidativa,

al adicionar el CN se aprecia una caída drástica de ≈70%, confirmando que la citocromo C oxidasa es la vía dominante, mientras que, la respiración que queda sugiere la presencia de la vía alterna que permite un flujo residual de electrones, al añadir n-octil-galato (n-Og) se inhibe la ruta alterna (AOX) dando resultado una respiración residual muy baja o prácticamente nula, lo que confirma la participación de ambas vías en el proceso global. Tras 24 horas de estrés oxidativo (figura 13 b) las células han sufrido daños oxidativos en lípidos, DNA mitocondrial y proteínas entre las que se encuentran las de los complejos respiratorios, al oxidarse se obtiene una respiración inestable y lenta respecto al control, estudios en hongos como *Aspergillus nidulans* sugieren que la exposición a H_2O_2 altera la membrana mitocondrial, afectando la fosforilación oxidativa (Molina & Kahmann, 2007); así mismo, en *U. maydis*, se ha reportado que el estrés oxidativo crónico induce fragmentación mitocondrial y apoptosis (Pérez-Martín et al., 2006), lo que explicaría la disminución respiratoria.

Esta respuesta ha inducido mecanismos alternativos para disminuir la formación de ROS; al adicionar n-Og nos indica que la célula está usando más activamente la AOX para sobrellevar el estrés, la inhibición de la AOX impacta el descenso gradual, aunque no se observa un punto de quiebre tan marcado como en las células control, es posible que, bajo estrés, parte del Complejo IV esté dañado o la actividad de la citocromo oxidasa esté disminuida, de modo que la AOX haya tomado un rol de mayor importancia. (Schafer & Buettner, 2001)

7.3 Determinación de los parámetros cinéticos Km y Vmax

Respecto a la sección 6.4, la bibliografía señala que los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}, respectivamente) de otras catalasas purificadas y no purificadas en modelos como bacterias y levaduras son los siguientes: la catalasa de *Thermoleophilum album* K_m 15 mM y V_{max} de 11 mM/mg para el H_2O_2 (Allgood & Perry, 1986), catalasa de *Rhodospirillum rubrum* S1 K_m 30.4 mM y V_{max} 2564 U (Kang et al., 2006), catalasa de *Aspergillus niger* K_m 21.4 mM (Sarı & Karakuş, 2020). En el presente

trabajo, se caracterizaron los parámetros cinéticos de la catalasa-peroxidasa no purificada de *U. maydis*.

Catalasa peroxidasa de U. maydis		
pH	6	7
V_{max}	41.8 ± 48.3 µmol*min*mg proteína	8.8 ± 0.9 µmol*min*mg proteína
K_m	95 ± 123.824 mM	4.9 ± 1. 0 mM

Tabla 1. Parámetros cinéticos obtenidos para el H_2O_2 de la catalasa-peroxidasa sin purificar de *U. maydis*

La afinidad por el sustrato, en la figura 14, respecto al pH 7 la K_m para 5 mM señala una afinidad moderada por el H_2O_2 acorde con lo descrito para otras catalasas y catalasas-peroxidasas fúngicas, cuyos K_m se encuentran en el rango milimolar (Zamocky et al., 2008). Por otro lado, respecto al pH 6 la K_m sube a 95 mM, indicando una drástica reducción en la afinidad por el sustrato, lo cual puede relacionarse con la ionización de grupo aminoácidos clave en el sitio activo o en la periferia de la enzima, que afecta la unión del H_2O_2 (Lane & Gross, 1999). De igual manera, la presencia de otras proteínas en el extracto podría influir en el microambiente, reduciendo la eficiencia de unión al sustrato.

Los valores de la V_{max} a pH 7 se encuentran dentro de los valores para un extracto crudo con actividad cat-px. A pH ácido, la V_{max} es mayor, sin embargo, debido a los ensayos realizados se deduce que algunas isoformas de peroxidasas o catalasas podrían activarse o que, en ciertas condiciones del medio promuevan una conformación enzimática más activa, aunque con mucha menos afinidad.

El pH tiene impacto en la estructura y la carga de la enzima, pues las cat-px y enzimas afines tienen grupos hemo y residuos críticos, que participan en la unión y descomposición del H_2O_2 (Klotz & Loewen, 2003). Por otro lado, un cambio de pH puede alterar el estado de protonación de estos residuos, modificando la interacción con el sustrato y, por ende, los valores cinéticos de K_m y V_{max}. De igual manera, al usar un extracto crudo el pH puede afectar a otras enzimas o cofactores que participan indirectamente en la reacción, aumentando la complejidad de la interpretación.

Dentro de los ensayos realizados, se determinó que 15 mM es la concentración de H_2O_2 que producía mayor actividad catalítica en la curva de saturación preliminar (figura 13). A pH, esta concentración se sitúa por encima de la Km ≈5 mM, lo que indica que la enzima opera cerca de su máxima velocidad. Sin embargo, a pH la Km es mucho mayor ≈95 mM, por lo tanto, 15 mM está por debajo de la saturación, por lo que la enzima no alcanza su V_{max} real, probablemente a concentraciones más altas del sustrato en este pH ácido se podrían observar otros efectos, como inhibición por exceso de peróxido o mayor inestabilidad del extracto. Es común observar que la afinidad por el sustrato (K_m) varíe más drásticamente que la V_{max}, lo que coincide con los resultados obtenidos en esta investigación (Sarkari et al., 2016).

En hongos fitopatógenos como U. maydis, la literatura señala la existencia de múltiples isoformas o actividades de cat-px moduladas por factores de estrés (Basse & Steinberg, 2004). Lo cual justifica la variabilidad en la K_m y V_{max} en los extractos.

7.4 Efecto del H_2O_2 en la expresión genética de catalasa-peroxidasa

Se ha visto en *Candida albicans* que el estrés provocado por H_2O_2 puede activar rápidamente la expresión de la cat-px, sin embargo, esta puede disminuir con el tiempo, debido a factores ambientales y la dependencia a glucosa que ayudan a modular su expresión (*The Expression of the Pathogenic Yeast Candida albicans Catalase Gene in Response to Hydrogen Peroxide - Nakagawa - 1999 - Microbiology and Immunology - Wiley Online Library*, s/f).

Los resultados obtenidos después de 24 horas bajo estrés, figura 17, se observa un bajo nivel de expresión en la condición control (barra azul), una expresión intermedia en otra condición (barra café), una expresión máxima en la barra naranja y un nivel más bajo en la barra verde, en ensayos previos se han utilizado concentraciones crecientes de H_2O_2, por lo tanto, la barra naranja corresponde a la concentración óptima del sustrato, la cuál induce fuertemente la transcripción de la cat-px. Así mismo, el pico de expresión sugiere que existe una inducción transcripcional notable de la cat-px bajo esa condición de estrés oxidativo (posiblemente de 10-15 mM de

H_2O_2), lo cual lleva a la célula a producir más enzima para desintoxicar el exceso de H_2O_2; sugiriendo que estas concentraciones tengan la posibilidad de un efecto hormético sobre *U. maydis*.

Tomando en cuenta los parámetros cinéticos obtenidos anteriormente, en la figura 17 señala que, cuando la concentración de H_2O_2 se acerca o supera la K_m, en pH de 7, se induce fuertemente la transcripción de la enzima, como consecuencia la célula aumenta la producción de cat-px para manejar eficientemente el H_2O_2 en un rango donde la enzima es cinéticamente competente. Esto coincide con la elección de 15 mM de H_2O_2 como la concentración óptima para la actividad máxima observada en ensayos de saturación.

Por otro lado, si la concentración de H_2O_2 es demasiado alta y prolongada a tiempos más largos, la transcripción podría verse inhibida por daños en el ADN, estrés generalizado o mecanismos regulatorios más complejos.

Los resultados globales sugieren que, existe una zona óptima de inducción en la cual la cat-px se expresa fuertemente junto con un aumento de su actividad enzimática, observada en los ensayos cinéticos; y por encima de ese rango el daño oxidativo puede superar la capacidad de la célula de adaptarse, como consecuencia hay menor expresión y viabilidad celular. En otros hongos fitopatógenos, se ha descrito un pico de expresión de catalasas y peroxidasas en rangos intermedios de estrés oxidativo, coincidiendo con la fase en la que el organismo puede montar una respuesta eficiente (Herrero et al., 2008). Estudios en *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* muestran que la inducción de genes antioxidantes (incluyendo catalasa) se regula por vías de señalización específicas (Yap1, Skn7, etc.), que responden de forma no lineal a la concentración de ROS (Zhao et al., 2020).

8 Conclusiones

1. El peróxido de hidrógeno ejerce un efecto dependiente de la concentración sobre *Ustilago maydis*, afectando tanto su desarrollo vegetativo como la supervivencia celular. A 40 mM, la viabilidad disminuye en un 60 %, acompañada de alteraciones morfológicas notables como un adelgazamiento celular.
2. Bajo condiciones de estrés oxidativo, el consumo de oxígeno se ve reducido debido a la inhibición de complejos fundamentales de la cadena respiratoria, especialmente CIV y AOX. Este efecto se acentúa con el uso de inhibidores como cianuro (CN^-) y n-octilgallato, lo cual revela una alta sensibilidad mitocondrial al H_2O_2.
3. En estudios cinéticos, la catalasa-peroxidasa mostró un K_m de 5 mM y una V_{max} de 8.8 µmol* min* mg de proteína a pH 7, lo que indica una afinidad intermedia por el sustrato y una cinética que sigue adecuadamente el modelo de Michaelis-Menten. A pH 6, sin embargo, su actividad es prácticamente nula.
4. La enzima presentó una marcada sensibilidad térmica, perdiendo hasta el 75% de su actividad a 40 ºC. Esto sugiere que su funcionamiento se encuentra limitado a un rango de temperatura cercano al fisiológico, disminuyendo drásticamente bajo estrés térmico.
5. La expresión del gen cat-px se activa de forma óptima ante concentraciones moderadas de H_2O_2 (alrededor de 15 mM), alcanzando un pico de transcripción. No obstante, niveles superiores conducen a una reducción en la expresión, posiblemente por daño oxidativo al material genético o mecanismos reguladores que limitan su transcripción. Sigue un patrón que refleja la respuesta adaptativa de *U. maydis* a concentraciones moderadas de H_2O_2, aumentando drásticamente en la condición donde la célula todavía puede responder eficazmente al estrés.
6. Más allá de su función detoxificante, la cat-px desempeña un papel central en la respuesta del hongo frente al estrés, involucrándose en procesos de adaptación que abarcan desde modificaciones en la morfología hasta ajustes

en la regulación génica y el metabolismo, consolidándose como un elemento crucial para la supervivencia celular.

9 Perspectivas

Se plantea utilizar técnicas como inmunolocalización o fusiones con proteínas fluorescentes para identificar en qué regiones de la célula se encuentra la cat-px, especialmente cuando la célula enfrenta estrés oxidativo.

Otra línea de estudio consiste en generar cepas mutantes que sobreexpresen o carezcan del gen cat-px, con el objetivo de analizar cómo afecta esta enzima a la virulencia del hongo, su sistema antioxidante y su capacidad de sobrevivir en condiciones adversas, tanto en laboratorio como durante la infección de plantas.

La purificación de la cat-px permitiría llevar a cabo ensayos cinéticos detallados sin interferencias de otras proteínas celulares, lo cual facilitaría una caracterización más precisa de su comportamiento enzimático.

Evaluar inhibidores específicos tanto para la función peroxidasa como para la actividad catalasa permitiría comprobar si existen dominios funcionales separados, lo que ayudaría a entender mejor la doble funcionalidad que presenta esta enzima.

También sería útil profundizar en cómo se relaciona la cat-px con otras enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa o la tiorredoxina, analizando su interacción dentro de las rutas de señalización redox del hongo.

Ampliar estos estudios a catalasas peroxidasas de otros hongos fitopatógenos permitiría comparar sus estructuras, mecanismos de regulación y funciones, lo que podría ayudar a identificar posibles blancos con valor terapéutico o agronómico.

Finalmente, explorar aplicaciones prácticas de la cat-px como marcador de estrés oxidativo o como objetivo en el desarrollo de agentes antifúngicos selectivos podría abrir nuevas oportunidades en el campo de la biotecnología agrícola.

10 Referencias

Aydoğdu, M., & Gölükçü, M. (2017). Nutritional value of huitlacoche, maize mushroom caused by *Ustilago maydis*. *Food Science and Technology*, *37*, 531–535. https://doi.org/10.1590/1678-457X.19416

Fernandez-Checa, J. C., Kaplowitz, N., Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Miranda, M., Mari, M., Ardite, E., & Morales, Allgood, G. S., & Perry, J. J. (1986). Characterization of a manganese-containing catalase from the obligate thermophile Thermoleophilum album. *Journal of Bacteriology*, *168*(2), 563–567. https://doi.org/10.1128/jb.168.2.563-567.1986

Basse, C. W., & Steinberg, G. (2004). Ustilago maydis, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, *5*(2), 83–92. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00210.x

Bayliak, M., Semchyshyn, H., & Lushchak, V. (2007). Possible accumulation of non-active molecules of catalase and superoxide dismutase in S. cerevisiae cells under hydrogen peroxide induced stress. *Open Life Sciences*, *2*(3), 326–336. https://doi.org/10.2478/s11535-007-0021-2

Beltrán-García, M. J., Ogura-Fujii, T., Cp, M., Manzo-Sánchez, G., de Yucatán, & Cp, M. (s/f). *Catalasas de Hongos Fitopatógenos: ¿Factores de Virulencia y Resistencia a los Fungicidas?*

Binkley, R. W. (1988). *<no title>*.

Estrada-Luna, A. A., López, A. C., Aboites, E. R., Ambriz, A. G., & Herrera, R. (s/f). Revista Electrónica Nova Scientia. . . *ISSN*, *2*.

Fita, I., Loewen, P. C., & Carpena, X. (2015). Catalase-Peroxidase: KATG. En R. A. Scott (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* (2a ed., pp. 1–14). Wiley. https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc2273

Gómez-Sánchez, R., Rose, J., Guimarães, R., Mari, M., Papinski, D., Rieter, E., Geerts, W. J., Hardenberg, R., Kraft, C., Ungermann, C., & Reggiori, F. (2018). Atg9 establishes Atg2-dependent contact sites between the endoplasmic reticulum and phagophores. *Journal of Cell Biology*, *217*(8), 2743–2763. https://doi.org/10.1083/jcb.201710116

Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., & Cabiscol, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1780*(11), 1217–1235. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.004

Holliday (1974)- Ustilago maydis ciclo de vida.pdf. (s/f).

Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A. B., De Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., … Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen Ustilago maydis. *Nature*, *444*(7115), 97–101. https://doi.org/10.1038/nature05248

Kang, Y.-S., Lee, D.-H., Yoon, B.-J., & Oh, D.-C. (2006). Purification and characterization of a catalase from photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum S1 grown under anaerobic conditions. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, *44*(2), 185–191.

Klotz, M. G., & Loewen, P. C. (2003). The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: Evidence for multiple lateral transfer of genes between

prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Molecular Biology and Evolution*, *20*(7), 1098–1112. https://doi.org/10.1093/molbev/msg129

Lane, P., & Gross, S. S. (1999). Cell signaling by nitric oxide. *Seminars in Nephrology*, *19*(3), 215–229.

Linnemer, L., & Visser, M. (2016). The Most Cited Articles from the Top-5 Journals (1991-2015). *SSRN Electronic Journal*. https://doi.org/10.2139/ssrn.2821483

Molina, L., & Kahmann, R. (s/f). *An Ustilago maydis Gene Involved in H2O2 Detoxification Is Required for Virulence*. Recuperado el 27 de enero de 2025, de https://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.052332

Nandi, A., Yan, L.-J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, 1–19. https://doi.org/10.1155/2019/9613090

Navarrete, C., Siles, A., Martínez, J. L., Calero, F., & Ramos, J. (2009). Oxidative stress sensitivity in Debaryomyces hansenii. *FEMS Yeast Research*, *9*(4), 582–590. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00500.x

Sarı, E. B., & Karakuş, Y. Y. (2020). Aspergillus niger Katalazının Üretimi, Üçlü-Faz Ayırma ile Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *24*(1), Article 1. https://doi.org/10.19113/sdufenbed.559988

Sarkari, P., Feldbrügge, M., & Schipper, K. (2016). The Corn Smut Fungus Ustilago maydis as an Alternative Expression System for Biopharmaceuticals. En M. Schmoll & C. Dattenböck (Eds.), *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications* (pp. 183–200). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0_7

Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*, *30*(11), 1191–1212. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00480-4

Sooch, B. S., Kauldhar, B. S., & Puri, M. (2017). Types, Structure, Applications and Future Outlook. En R. C. Ray & C. M. Rosell (Eds.), *Microbial Enzyme Technology in Food Applications* (1a ed., pp. 241–254). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781315368405-15

Takio, N., Yadav, M., & Yadav, H. S. (2021). Catalase-mediated remediation of environmental pollutants and potential application – a review. *Biocatalysis and Biotransformation*, *39*(6), 389–407. https://doi.org/10.1080/10242422.2021.1932838

The Expression of the Pathogenic Yeast Candida albicans Catalase Gene in Response to Hydrogen Peroxide—Nakagawa—1999—Microbiology and Immunology—Wiley Online Library. (s/f). Recuperado el 8 de diciembre de 2024, de https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1348-0421.1999.tb02452.x

Vasylkovska, R., Burdylyuk, N., & Semchyshyn, H. (2015). Involvement of Catalase in Saccharomyces Cerevisiae Hormetic Response to Hydrogen Peroxide. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*, *2*(1), Article 1. https://doi.org/10.15330/jpnu.2.1.107-114

Wang, J.-Y., Burger, R. M., & Drlica, K. (1998). Role of Superoxide in Catalase-Peroxidase-Mediated Isoniazid Action against Mycobacteria. *Antimicrobial*

Agents and Chemotherapy, *42*(3), 709–711. https://doi.org/10.1128/aac.42.3.709

Whole genome—Ustilago_maydis—Ensembl Genomes 60. (s/f). Recuperado el 3 de febrero de 2025, de https://fungi.ensembl.org/Ustilago_maydis/Location/Genome?db=;g=UMAG_05311;r=19:175907-176833;t=KIS66311

Zamocky, M., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants & Redox Signaling*, *10*(9), 1527–1548. https://doi.org/10.1089/ars.2008.2046

Zhao, Y., Lim, J., Xu, J., Yu, J., & Zheng, W. (2020). Nitric oxide as a developmental and metabolic signal in filamentous fungi. *Molecular Microbiology*, *113*(5), 872–882. https://doi.org/10.1111/mmi.14465

A. (1997). GSH transport in mitochondria: Defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.273.1.G7

Hansberg, W., Salas-Lizana, R., & Domínguez, L. (2012). Fungal catalases: Function, phylogenetic origin and structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *525*(2), 170–180. https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.014

Holley, A. K., Bakthavatchalu, V., Velez-Roman, J. M., & St. Clair, D. K. (2011). Manganese Superoxide Dismutase: Guardian of the Powerhouse. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/ijms12107114

Putnam, C. D. et al. (s/f). *Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism*.

Steinberg, G., & Perez-Martin, J. (2008). Ustilago maydis, a new fungal model system for cell biology. *Trends in Cell Biology*, *18*(2), 61–67. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.11.008

Tsuzuki, Y., Takada, T., & Ohara, M. (2022). *Which life history strategy can maintain high genetic diversity in plants?* (p. 2022.04.26.489613). bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2022.04.26.489613

Zabłocka, A., & Janusz, M. (2008). [The two faces of reactive oxygen species]. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, *62*, 118–124.

11 Anexos

11.1 Preparación de las soluciones

Amortiguador de fosfato de sodio 0.2 M, - pH 7.0

Para 100 mL, pesar 2.71 g de KH_2PO_4 y 3.48 g de K_2HPO_4, antes de aforar a 100mL. Ajustar pH 7.0 y guardar en frío.

Amortiguador de lisis celular (50 mM KH_2PO_4, 40 mM HEPES, 5 mM EDTA, 20% glicerol) pH 7.0

Para preparar 50 mL pesar 0.340 g de KH_2PO_4, 0.558 g de HEPES, 0.0930g de EDTA, y añadir glicerol para una concentración final de 20%. Ajustar pH a 7.0, guardar en frío.

Amortiguador de respiración KME (100mM KCl, 50mM MOPS, 0.5mM EGTA)

Para preparar 100 mL pesar 0.7455g de KCl, 1.04 g de MOPS, y 0.019 g de EGTA, ajustar pH 7.1 y afora a 100 mL.

Amortiguador de citratos (1M, - ph 6)

Para preparar 80 mL de amortiguador, pesa 11.76 g de citrato de sodio dihidratado y 10.32 g de ácido cítrico.

Preparación de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)

Para preparar un stock de 500 mM, en un volumen final de 100 µL pesar 0.0087 g de PMSF, adicionar 99 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y, mantener a temperatura ambiente hasta su uso de una sola vez. Desechar el sobrante.

Stock de glicerol

Pesar el glicerol necesario considerando su densidad (g/L) y adicionar el volumen necesario.

Agua DEPC

Mezclar H_2O con DEPC 1%, agitar toda la noche en agitador magnético y esterilizar en autoclave. Mantener siempre en esterilidad.