

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA.**

**“Análisis de la expresión diferencial del proteoma de
Rhizopus oryzae ENHE bajo condiciones de estrés en
presencia y ausencia de pentaclorofenol”**

TESIS

Para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología.

PRESENTA

Q.F.B. Arturo Ruiz Lara.

DIRECTORA: Dra. Araceli Tomasini Campocosio.

ASESORES: Dr. Francisco Fierro Fierro.

Dr. Jesús Antonio Oria Hernández.

JULIO DE 2016

“La maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado de CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo consejo. Con el No. de registro 001465”

Este trabajo fue financiado por el CONACyT, a través de la beca de maestría No. 574225

DEDICATORIA

A mi familia:

Por estar siempre en los momentos importantes de mi vida, por todo el esfuerzo que han realizado para que yo pudiera continuar con mis estudios, así como los consejos que han sido de gran ayuda para mi formación y crecimiento.

A mis hijos:

Quienes son mi mayor motivación para nunca rendirme y seguir superándome día a día para poder llegar a ser un buen ejemplo para ellos.

Gracias por confiar en mi y darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida.

Iztapalapa, D.F. a 22 de Julio 2005

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Iztapalapa aprobó
la tesis

**“Análisis de la expresión diferencial del proteoma de
Rhizopus oryzae ENHE bajo condiciones de estrés en
presencia y ausencia de pentaclorofenol”**

que presentó

Arturo Ruiz Lara

Comité tutorial:

Directora: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Asesor: Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesor: Dr. Jesús Antonio Oria Hernández

Jurado:

Presidente: Dr. Francisco Fierro Fierro



Secretario: M. en B. Ulises Carrasco Navarro



Vocal: Dr. Horacio Reyes Vivas



Vocal: Dr. Jesús Antonio Oria Hernández



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa por permitirme realizar la maestría en biotecnología, así como a los profesores que participaron en mi formación.

A la Dra. Araceli Tomasini por darme la oportunidad y confianza de trabajar en este proyecto, así como su apoyo brindado durante la realización de la tesis.

Al Dr. Jesús A. Oria y al Dr. Horacio Reyes Vivas del Laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría por ser parte importante de mi formación académica, por todas sus enseñanzas y por todos los momentos agradables que he vivido con ellos.

Al M. en B. Ulises Carrasco por su apoyo en la realización de algunas técnicas utilizadas en éste trabajo y por tener siempre la disposición de resolver cualquier duda que tuviera.

A los compañeros y amigos del Laboratorio de Ingeniería Genética y metabolitos secundarios de la UAM-I que me estuvieron apoyando y compartieron con migo éste proceso.

RESUMEN

En este trabajo se utilizó al zigomiceto, *Rhizopus oryzae*, que fue aislado de un aserradero en Puebla a partir de suelo contaminado con pentaclorofenol (PCF), un xenobiótico de alta persistencia y toxicidad que se encuentra en el medio ambiente. Se ha demostrado que este hongo produce enzimas especializadas, involucradas en la degradación de tóxicos provenientes de efluentes industriales, entre ellos el PCF.

En el presente trabajo se realizó un análisis de expresión diferencial de las proteínas intracelulares de *R. oryzae*, al crecer al hongo en presencia y ausencia de PCF con la finalidad de identificar las proteínas que se estén expresando en presencia del PCF y tratar de relacionarlas con los metabolitos encontrados producto de su degradación.

Mediante la utilización de la técnica de electroforesis bidimensional para la separación de las proteínas, se obtuvo el perfil proteómico de ambas condiciones analizadas. Se realizó el análisis de los perfiles obtenidos con el software PDQuest y se escindieron los *spots* que se expresaron solo cuando era adicionado PCF al medio de cultivo y algunos que se dejaban de expresar después de ser adicionado el contaminante, posteriormente se mandaron a analizar con la técnica de espectrometría de masas MS/MS para su secuenciación y posterior identificación de las proteínas.

De las proteínas que se identificaron correspondientes a aquellos *spots* que solo se expresaron cuando se adicionaba el PCF al medio de cultivo, se encontró que la mayoría estaba relacionada con la respuesta al estrés que provoca el contaminante en el microorganismo, además de algunas enzimas con actividad oxidorreductasa que posiblemente podrían estar relacionadas con la formación de un metabolito producto de degradación del PCF, el pentacloroanisol que ya ha sido identificado con anterioridad.

Se demostró el porque el hongo deja de crecer al momento de adicionar el PCF al medio de cultivo, ya que los *spots* que se dejan de expresar al momento de adicionar el contaminante, corresponden a proteínas involucradas en el metabolismo energético del hongo. Cabe reiterar que se encontraron mas de una proteína por spot, por lo que es recomendable realizar en estudios posteriores geles de 13 centímetros con la finalidad de obtener una identificación de las proteínas con una mayor precisión.

ABSTRACT

We study *Rhizopus oryzae* ENHE, a zigomycete isolated of a sawmill industry of Puebla in which floors are contaminated with pentachlorophenol (PCP), one of xenobiotics with main persistence and toxicity present in environment. This fungus produce enzymes involves in the degradation of xenobiotic toxics derived from waster water industry like PCP.

In this work, we analyze the differential expression of intracellular proteins from *R. oryzae* ENHE, which was cultivated in the absence and presence of PCP. The aim of analysis was to identify the expression of proteins associated to the presence of PCP and related them with the generated metabolites resulting from the xenobiotic degradation.

The proteomic profile of both conditions was performed with 2D-electrophoresis assays. The profiles were analyzed by PDQuest software and the identified spots expressed only under the presence of PCF were cleaved. We also isolated several spots that were suppressed in the presence of the pollutant. The identification of these proteins was achieved by mass spectrometry sequencing.

It was found that the expressed proteins with PCP are related to stress response induced by the pollutant over the microorganism. We also identify some oxidoreductases enzymes probably related with the metabolites generation of PCP degradation. Moreover, the suppressed proteins in the presence of PCP correspond to enzymes involved in the energetic metabolism of fungus; strongly suggesting that their lost probably induce to this organism turns to the lag phase.

For the relevance to comment is that we found more than a protein to each one spot, therefore, it is recommended for later studies the employ of 13 cm gels in order to separate the proteins in 2D-electrophoresis with better resolution.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIV
1. Introducción.....	1
1.1 Compuestos Tóxicos.....	1
1.2 Pentaclorofenol(PCF).....	2
1.3 Toxicidad del PCF.....	3
1.4 <i>Rhizopus oryzae</i>	4
1.5 Biodegradación de compuestos tóxicos.....	6
1.6 Proteómica.....	9
1.7 Herramientas de la proteómica.....	10
1.8 Tipos de Proteómica.....	13
2. Antecedentes.....	15
3. Justificación.....	16
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos.....	17
5.1 General.....	17
5.2 Específicos.....	17
6. Metodología.....	18
6.1 Microorganismo.....	18
6.2 Obtención de la muestra.....	19
6.2.1 Esporulación de <i>Rhizopus oryzae</i> ENHE.....	19
6.2.2 Colecta de esporas del medio (PDA).....	19
6.2.3 Conteo de esporas.....	20
6.2.4 Medio de cultivo y crecimiento de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	20
6.2.5 Separación del medio de cultivo de la biomasa.....	21
6.3 Procesamiento de la muestra.....	21
6.3.1 Extracción de las proteínas intracelulares de <i>R. oryzae</i> ENHE....	21

6.4 Cuantificación de proteínas de la muestra.....	23
6.5 Precipitación de proteínas.....	23
6.6 Electroforesis SDS-PAGE.....	24
6.7 Electroforesis Bidimensional (2D-PAGE).....	27
6.7.1 Primera dimensión, isoelectroenfoque (IEF).....	27
6.7.2 Segunda dimensión SDS-PAGE.....	29
6.8 Tinción (2D-PAGE).....	30
6.8.1 Tinción con Coomassie Blue Silver.....	30
6.9 Fotodocumentación.....	30
6.10 Análisis de los geles en doble dimensión con el software PDQuest...	31
6.11 Escisión de los spots y análisis por LC/MS/MS.....	32
7. Resultados y discusión.....	33
7.1 Determinación de la concentración de proteínas de la muestra.....	33
7.2 SDS-PAGE 12%.....	34
7.3 Electroforesis bidimensional de la muestra.....	35
7.4 Análisis de los geles en doble dimensión con el software PDQuest.....	38
7.5 Identificación de las proteínas por LC/MS/MS.....	41
7.5.1 Proteínas identificadas.....	42
7.6 Función y clasificación de las proteínas.....	45
7.7 Proteínas expresadas solo en presencia de PCF.....	47
7.7.1 Involucradas en el proceso catabólico de polisacáridos.....	48
7.7.2 Relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo.....	49
7.7.3 Otras proteínas expresadas en presencia de PCF.....	50
7.8 Proteínas cuya expresión se reprime en presencia de PCF.....	52
8. Conclusiones.....	54
9. Bibliografía.....	55
Anexos.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ensayo de proteína de Bradford a 595 nm.....	23
Tabla 2. Preparación del gel de resolución 12%.....	25
Tabla 3. Preparación del gel concentrador 4%.....	25
Tabla 4. Orden en que se cargaron las muestras en la SDS-PAGE al 12%.....	26
Tabla 5. Preparación de la muestra para el IEF.....	28
Tabla 6. Cambios de voltaje establecidos en el Isoelectroenfoque.....	28
Tabla 7. Composición del amortiguador de equilibrio 1.....	28
Tabla 8. Composición del amortiguador de equilibrio 2.....	29
Tabla 9. Concentración de proteína promedio de las condiciones analizadas.....	33
Tabla 10. Proteínas que se expresan solo cuando se adiciona PCF al medio de cultivo, microorganismo con el que se relaciona y el <i>spot</i> en el que se encuentran, en ambos tiempos de análisis.....	44
Tabla 11. Proteínas que se expresan en ausencia de PCF en el medio de cultivo, a las 157 horas de cultivo.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del Pentaclorofenol.....	3
Figura 2. Morfología del género <i>Rhizopus</i>	6
Figura 3. Esquema de reacción en la degradación del PCF por <i>M. ramosissimus</i> IM6203.....	8
Figura 4. Pasos en la electroforesis bidimensional.....	11
Figura 5. Esquema representativo de un análisis proteómico.....	12
Figura 6. Tipos de proteómica.....	14
Figura 7. Diagrama de flujo donde se muestra el desarrollo experimental que se llevó a cabo con las muestras proteicas intracelulares de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	18
Figura 8. Esquema representativo de la extracción de las proteínas intracelulares de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	22
Figura 9. Curva de calibración con el método de Bradford.....	33
Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE al 12%.....	34
Figura 11. Grafica que representa los cambios de voltaje durante el tiempo de corrida del IEF.....	35
Figura 12. Electroforesis 2D-PAGE correspondiente al proteoma de <i>R. oryzae</i> ...	37
Figura 13. Electroforesis 2D-PAGE en la que se cargo un total de 200 µg de muestra.....	38
Figura 14. Geles master del proteoma de <i>R. oryzae</i> ENHE cultivado a 157 horas, sin y con PCF.....	39
Figura 15. Geles master del proteoma de <i>R. oryzae</i> ENHE cultivado a 444 horas, sin y con PCF.....	39
Figura 16. <i>spots</i> seleccionados con el software PDQuest para su análisis, a las 157 y 444 horas de crecimiento.....	40
Figura 17. Gel master correspondiente a las 157 horas de cultivo sin PCF.....	41
Figura 18. Geles donde se indica los <i>spots</i> que se mandaron a analizar con su número asignado.....	42
Figura 19. Clasificación funcional de las proteínas identificadas expresadas	

solo en presencia de PCF..... 47

Figura 20. Clasificación funcional de las proteínas que se identificaron comoaquellas que no se expresan en presencia de PCF en el medio de cultivo.... 52

ABREVIATURAS

[]	Concentración
1DE	Electroforesis unidimensional
2DE	Electroforesis bidimensional
BSA	Albumina sérica bovina
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)-dimethylamonio]-1-propano sulfonato
DTT	Ditiotreitol
H ₂ O _d	Agua destilada
IEF	Isoelectroenfoque
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
KDa	Kilodaltones
M	Molar
metOH	Metanol
mM	mili Molar
MPM	Marcador de peso molecular
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCF	Pentaclorofenol
PDA	Agar Papa Dextrosa
PSA	Persulfato de amonio
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
T	Tiourea
TEMED	N,N,N',N'-tetraetiletilendiamina
Tris	2-amino-2-hydroximetil-1,3-propanodiol
U	Urea
v	Volts

1. INTRODUCCIÓN.

Existen una gran variedad de microorganismos en el medio ambiente, éstos pueden provenir de fuentes naturales como ríos, mares, lagunas, suelos entre otros. Muchos de ellos han sido utilizados para beneficio de los seres humanos.

Estos microorganismos generalmente son aislados de sus fuentes nativas, para posteriormente estudiar sus condiciones de crecimiento y producción de tal forma que se consigan obtener productos (como metabolitos primarios, metabolitos secundarios, enzimas) que puedan ser utilizados en diferentes industrias como por ejemplo alimenticia, farmacéutica, textil, así como en procesos de biorremediación entre otras.

Una gran rama de la investigación se ha dedicado al aislamiento de microorganismos a partir de efluentes y suelos contaminados con compuestos tóxicos. Se ha observado que estos microorganismos son capaces de crecer en ese ambiente y, por lo tanto, pueden utilizar y/o degradar los compuestos tóxicos presentes en su medio (Singh y col., 1999).

La aplicación de algunos microorganismos para la remoción de una gran variedad de compuestos tóxicos (de origen natural o sintético) ha despertado interés en el ramo de la biotecnología ambiental. Este proceso, conocido como biorremediación, permite que algunos microorganismos degraden dichos compuestos ya sea involucrando rutas bioquímicas secundarias o bien empleándolos como única fuente de carbono y energía, o removiendo dichos compuestos por procesos como la biosorción (Commandeur, 1991; Turco y col., 2003).

1.1 COMPUESTOS TÓXICOS

En nuestros días, los seres humanos y su entorno estamos sufriendo las consecuencias de la contaminación ambiental por la presencia de compuestos tóxicos naturales y xenobióticos, estos últimos creados por el hombre. Ejemplo

de estos son los herbicidas, pesticidas, insecticidas y conservadores utilizados para evitar el ataque microbiano, combatir plagas y preservar los materiales. Por otro lado, existen varios procesos industriales que generan, como residuo de sus procesos, compuestos tóxicos para los seres vivos. Algunos de estos tipos de compuestos son clorofenoles, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos clorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos y colorantes tipo azo (Sutherland, 1992; Bumpus y col., 1993; Reedy, 1995; Esposito, y col., 1998; Szewczyk, y col., 2003). Por ejemplo, en el caso de la industria papelera se forman compuestos tóxicos como los clorofenoles, entre ellos el pentaclorofenol (PCF) (Wegman y Hofstee, 1979).

1.2 PENTACLOROFENOL (PCF)

Los clorofenoles son un grupo de compuestos contaminantes encontrados en el aire, suelo y agua. Este tipo de compuestos se encuentra como producto secundario en las aguas de desecho de diversos efluentes industriales, como el efluente del blanqueo de la pulpa, durante el proceso de fabricación de papel. El PCF (Fig. 1) pertenece a la familia de los clorofenoles, es soluble en disolventes orgánicos polares y presenta solubilidad limitada en agua y en disolventes no polares. Es un sólido de color café grisáceo cuando su pureza es limitada, y cristalino de color blanco, con un punto de fusión de 190°C, cuando su pureza es superior al 98% (Seiler, 1991).

En un principio, el PCF fue sintetizado para la eliminación de una gran variedad de plagas (plantas indeseadas, algas, insectos, hongos, bacterias, etc.) (Crosby, 1981), también fue usado como conservador de la madera. Debido a que es tóxico y recalcitrante, es considerado dentro de los principales contaminantes por la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos de Norteamérica -*US Environmental Protection Agency (EPA)*- (Keither y Teilard, 1979; Moos y col., 1983). Actualmente su uso ya está prohibido en la mayoría de los países industrializados y solo se permite su uso en maderas destinadas a fabricación de barcos.

Las propiedades físico-químicas que presenta lo vuelven muy persistente en el ambiente por lo que su eliminación es muy difícil. (Roy, 1997; Fahr y col., 1999).

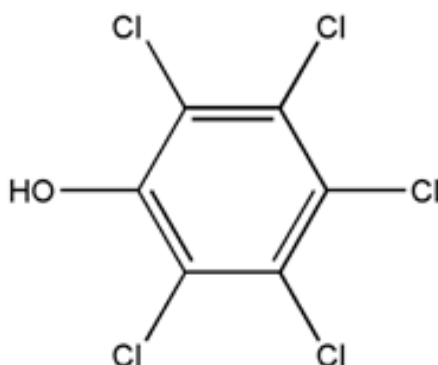


Figura 1. Estructura química del Pentaclorofenol (Tomada de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/447/cap4.html>).

1.3 TOXICIDAD DEL PCF

El uso desmedido del PCF durante el siglo XX causó que este xenobiótico se volviera ubicuo en el medio ambiente y por consiguiente se mantuviera en contacto directo con el ser humano y otros organismos. La principal vía de exposición para el ser humano es a través del consumo de agua o alimentos contaminados (Hattemer y Travis, 1989) y el contacto dérmico directo con el contaminante a través de suelos contaminados u objetos de madera tratados, todo ello sumado a la inhalación del plaguicida, ha contribuido considerablemente a la intoxicación de los seres humanos (Demers y col., 2006; Meissner y Schweinsberg, 1996; Fernández y col., 2004).

En el cuerpo humano, el PCF es absorbido a través del tracto gastrointestinal o por la piel. Después de la absorción, el PCF se distribuye a todos los tejidos y órganos (principalmente el hígado), y a fluidos corporales como sangre, orina, fluidos seminales y leche (Geyer y col., 1987). A nivel celular, el efecto tóxico del PCF se relaciona con la disminución de la síntesis de ATP por medio del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Weinbach, 1954; Weinbach, 1956; Escher y col., 1996); también se ha comprobado que puede llegar a formar aductos con nucleósidos y nucleótidos en el ADN (Vaidyanathan y col.,

2007). Es por esta última actividad citotóxica que el PCF es clasificado como probable carcinógeno humano por la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA).

Por la toxicidad del PCF y la acumulación en suelo y agua debido a su difícil degradación, se han realizado gran cantidad de estudios para degradarlo y/o removerlo. Entre estos estudios están los basados en la biotecnología, es decir mediante la intervención de microorganismos, obteniéndose hasta ahora valiosos resultados que, mediante el apoyo de conocimientos aportados por disciplinas afines, permitirán aplicarlos en casos reales.

En años recientes, se ha demostrado que los hongos juegan un papel importante en la eliminación de residuos peligrosos y pueden utilizarse en la biorremediación de sitios contaminados (Montiel y col., 2004; Marcial y col., 2006). Por esta razón el estudio de este tipo de microorganismos es una oportunidad para mejorar la calidad del medio ambiente en el planeta.

1.4 *Rhizopus oryzae*.

Rhizopus oryzae es un hongo filamentoso perteneciente a los Zigomicetos, del orden de los mucorales. El género *Rhizopus* se estableció por primera vez en 1820 con la descripción de *Rhizopus nigricans* (Ehrenberg, 1820), y es conocido por producir una gran variedad de metabolitos (ácidos orgánicos) tales como ácido láctico, ácido fumárico y en menor medida ácido málico, además de etanol y enzimas hidrolíticas (glucoamilasas, poligalacturonasas) (Takahashi y col., 1978; Hang, 1989; Carta y col., 1999; Saito y col., 2003; Maas y col., 2006; Thongchul y col., 2010; Prescott y Dunn, 1959). *R. oryzae* se utiliza a menudo en Asia para la fermentación de alimentos y para la fabricación de bebidas alcohólicas y alimentos como el ragi y el tempeh (Hesseltine, 1983).

Las cepas de *R. oryzae* son generalmente consideradas seguras, sin embargo, *R. oryzae* también se conoce por ser un patógeno humano oportunista y tiene

una alta prevalencia en infecciones cutáneas (Roden y col., 2005; Ribes y col., 2000).

R. oryzae tiene una distribución mundial con una elevada prevalencia en las regiones tropicales y subtropicales. Se ha aislado a partir de muchos sustratos, incluyendo una gran variedad de suelos, materia orgánica en descomposición y estiércol (Domsch y col., 1980). Es capaz de crecer en una amplia gama de fuentes de carbono, por ejemplo, glicerol, etanol, ácido láctico, glucosa, manosa, fructosa, sacarosa, xilosa, celobiosa, ácidos grasos, y aceites (Ban y col., 2001; Maas y col., 2006; Park y col., 2004; Skory, 2000; Yin y col., 1997). Todos los azúcares mencionados se han utilizado como sustrato para la producción de ácido láctico o fumárico. Por otra parte, *R. oryzae* tiene actividades amilolítica (Amadioha, 1998), xilanolítica (Bakir y col., 2001), pectinolítica (Saito y col., 2003), y celulolítica (Amedioha, 1993; Murashima y col., 2002; Karmakar y Ray, 2010), permitiéndole la conversión de residuos agrícolas poliméricos. Es capaz de crecer bien en un amplio rango de temperatura (hasta 40 °C) y de pH (de 4 a 9), lo que indica un comportamiento robusto y un alto potencial de aplicación en procesos de biorremediación.

La morfología del género *Rhizopus* se caracteriza por la formación de esporangióforos, y se clasifica principalmente por el tamaño de esporangios y esporangiosporas, así como por la ramificación del rizoide (Fig, 2). Se han establecido tres grupos: el grupo *stolonifer*, *R. oryzae*, y el grupo *microsporus*, con la re-integración de muchas especies (Yuang y Jong, 1984; Schipper y Samson, 1994; Weitzman y col., 1996).

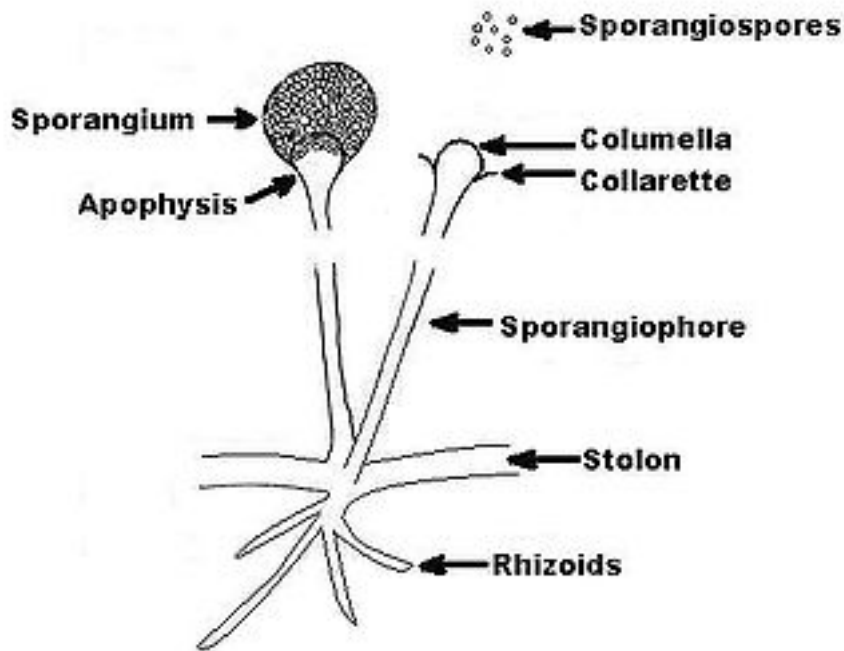


Fig. 2 Morfología del género *Rhizopus* (Tomada de <https://es.wikipedia.org/wiki/Rhizopus>).

1.5 BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS TÓXICOS

La eliminación de compuestos tóxicos (sintéticos y naturales) puede darse de forma natural, ya sea por medios abióticos (químicos o físicos) y/o bióticos (por la intervención de microorganismos y plantas). La eliminación abiótica puede ser por foto-descomposición, volatilización a la atmósfera, percolación e intercambio suelo y agua. La eliminación biótica puede ser por biosorción y/o biodegradación, esta última se refiere a la transformación de los tóxicos por medio de plantas y microorganismos (aerobios y anaerobios) convirtiéndolos en otras moléculas, y en el mejor de los casos la mineralización, es decir la formación de CO_2 , H_2O e iones inorgánicos (Prince, 2003; Dua y col., 2002).

Muchas especies microbianas del suelo y ambientes acuáticos son capaces de transformar diversos compuestos tóxicos que se acumulan en el ambiente. En

este estudio nos enfocaremos a la capacidad que presentan los hongos filamentosos.

Varias especies de basidiomicetos, tanto hongos de pudrición blanca como café, tienen la capacidad de degradar una gran cantidad de contaminantes ambientales como hidrocarburos, colorantes de tipo azo, nitrotoluenos, bifenilos policlorados y clorofenoles como el pentaclorofenol (Aitken, 1993; Nicell, 1993). Como ejemplos de hongos de pudrición café se puede mencionar a *Tyromyces palustris*, *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, y de pudrición blanca a *Bjerkandera* sp., *Phlebia radiata*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pleurotus eryngii*, *P. ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium*, el cual ha sido de los más estudiados (Bumpus, 1993; Rabinovich y col., 2004; Eriksson y col., 1990; Moreira y col., 1997; Scott y col., 2003).

La capacidad de degradar compuestos xenobióticos no se limita tan solo a los basidiomicetos, se han encontrado otros hongos de las Clases Ascomicetos y Zigomicetos que son capaces de degradar este tipo de compuestos en altas concentraciones, por ejemplo, hongos del género *Fusarium*, *Candida*, *Agaricus* y *Rhizopus* (Lamar, 1992; Chivukula y col., 1995; Nagarathama y Bajpai, 1999; Tomasini, y col. 2001). Estos hongos presentan algunas ventajas sobre los basidiomicetos, en cuanto a su velocidad de crecimiento y sistemas enzimáticos diferentes.

Szewczyk y Długónski (2009), estudiaron la degradación de PCF utilizando *Mucor ramosissimus* en medio Sabouraud, encontrando concentraciones traza de 2,3,5-6-tetraclorofenol (2,3,5-6-TCF); 2,3,4-6-tetraclorofenol (2,3,4-6-TCF); y pentacloroetoxibenceno (PCEB) después de siete días de incubación. La transformación del PCF a tetraclorohidroquinona (TCHQ) por el hongo fue adjudicada a un sistema enzimático inducible asociado con un citocromo P-450, sugiriendo que la degradación del PCF por *M. ramosissimus* puede darse por dos vías. En la primera, existe una inserción de grupos hidroxilo en el anillo aromático con una simultánea remoción de iones cloro (decloración oxidativa), mientras que en la segunda los grupos hidroxilo de los clorofenoles son metilados formando anisoles (Fig. 3).

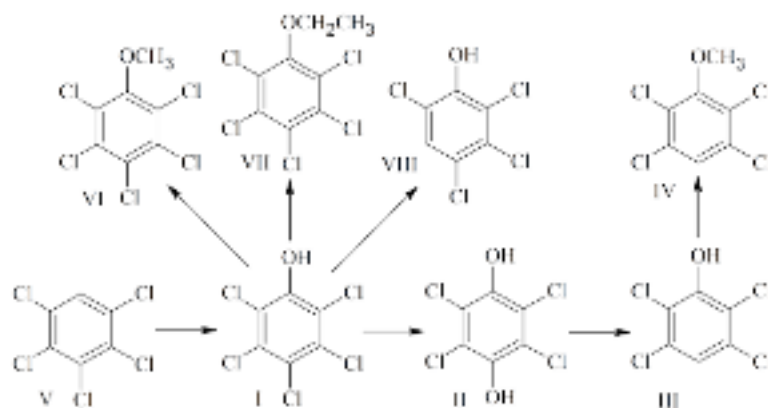


Fig. 3 Esquema de reacción en la degradación de PCF por *M. ramosissimus* IM 6203 (Szewczyk y Długónski, 2009). Donde I: pentaclorofenol; II: tetraclorohidroquinona; III: 2,3,5,6-tetraclorofenol; IV: 2,3,5,6-tetraclorometoxibenceno; V: pentaclorobenceno; VI: pentacloroanisol; VII: pentacloroetoxibenceno; VIII: 2,3,4,6- tetraclorofenol.

Posteriormente, Carvalho y col. (2011) utilizando como modelo a *Mucor plumbeus* identificaron los intermediarios formados durante la degradación de PCF. Estos intermediarios fueron principalmente moléculas conjugadas producto de un metabolismo de degradación en fase II (glucosa-PCF, glucosa-TCHQ, ribosa-TCHQ, sulfato-TCHQ, glucosa-TrCHQ); aunque también se identificaron moléculas di-conjugadas (sulfato-glucosa-PCF y sulfato-glucosa-TCHQ) y clorofenoles libres, tales como: tetraclorohidroquinona (TCHQ) y 2,3,6- triclorohidroquinona (2,3,6-TrCHQ). Sin embargo, no correlacionaron la degradación del PCF con la actividad de enzimas extracelulares ni tampoco con la del citocromo P-450.

Por su parte, León-Santesteban y col. (2014) demostraron que la degradación del PCF por *R. oryzae* ENHE se lleva a cabo principalmente en el interior de las células y escasamente en el caldo de cultivo. Además, encontraron que en un medio mínimo con 2 mg de PCF, glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$, como fuentes de carbono y nitrógeno, *R. oryzae* produjo 0.116 μg de pentacloroanisol, 10.46 μg de compuestos aromáticos clorados y 6 compuestos más, uno de ellos aparentemente 2,3,4,6-tetraclorofenol. Los mismos autores reportaron indicios de que el otro compuesto es un lactato del PCF y los otros 4 no fueron

identificados. Sin embargo, al utilizar al ácido glutámico y NaNO_3 como fuentes de carbono y nitrógeno, encontraron que el hongo produjo 6.81 μg de pentacloroanisol, 2.89 μg de compuestos aromáticos clorados entre ellos el triclorohidroquinona y el 3,4,5-triclorofenol, más un compuesto no identificado en la biomasa y tres compuestos no identificados en el caldo de cultivo, estos últimos con un bajo nivel de detección. También se cultivó a *R. oryzae* en un reactor de tanque agitado, y los resultados indicaron que posiblemente algunas variables de cultivo controlables en un reactor, tales como la aireación y la agitación, pueden influir en la formación de productos de degradación de PCF que no son fácilmente observables en un cultivo en matraz.

1.6 PROTEÓMICA.

La proteómica es un poderoso método de análisis para el estudio de muestras proteicas complejas. Es una tecnología relativamente reciente que comenzó a usarse a finales de los años 70 como herramienta analítica para la separación y caracterización proteica (O'Farrell, 1975; Bravo y Celis 1984). El proteoma es el total de proteínas codificadas por el genoma; el término proteoma fue mencionado por primera vez por Marck Wilkins en 1994 (Wilkins y col., 1996; Poon y col., 2001). A diferencia del genoma que es esencialmente constante a lo largo de la vida, las proteínas se expresan y modifican en los organismos dependiendo del estado metabólico o de la etapa del desarrollo. Por esta razón, el proteoma presenta un carácter dinámico que permite estudiar y entender cambios y procesos fisiológicos o patológicos (Gariglio y col., 2010).

La proteómica permite realizar el análisis del conjunto de todas las proteínas presentes en una muestra (célula, tejido, órgano o fluido y en cualquier muestra que contenga proteínas) en un momento dado. Además permite identificar modificaciones post-traduccionales, producto de cambios fisiológicos o fisiopatológicos.

1.7 HERRAMIENTAS DE LA PROTEÓMICA.

Una de las principales herramientas de la proteómica es la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) (Anderson y col., 2000; Celis y col., 1998). Esta técnica constituye actualmente el método más eficiente para la separación de mezclas proteicas muy complejas, hasta de miles de proteínas, en un solo experimento. La 2D-PAGE se ha venido utilizando desde hace tres décadas, y está basada en la separación de las proteínas en función de su carga en primera instancia (primera dimensión), seguida de la separación de las proteínas por su masa molecular (segunda dimensión). La separación en la primera dimensión se realiza mediante isoelectroenfoque, técnica en que las proteínas migran y se separan en un gradiente de pH hasta alcanzar una posición en la que su carga neta es cero, es decir, su punto isoeléctrico (pI). En la segunda dimensión, las proteínas se separan por su masa molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (Fig. 4). La 2D-PAGE y el isoelectroenfoque, en combinación con la identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS) (Aebersold y col., 2003), es actualmente la combinación de técnicas más utilizada para realizar un análisis proteómico.

A pesar de que existen tecnologías alternativas prometedoras, por ejemplo, la tecnología multidimensional para la identificación de proteínas (MudPIT), el etiquetado con isótopos estables (SILAC), y los arrays de proteínas (Aebersold y col., 2003; Washburn y col., 2001), la 2D-PAGE es la técnica de preferencia que se puede aplicar de forma rutinaria al análisis en paralelo de muestras para identificar perfiles de expresión cuantitativos de grandes conjuntos de mezclas de proteínas complejas, tales como lisados de células enteras.

Posteriormente la detección de las proteínas se basa en la tinción de estos geles con azul de Coomassie, Coomassie Coloidal, con plata o tinciones más sensibles como SYPRO Ruby (Gil, 2003). El Azul Brillante de Coomassie (CBB) es un tinte comúnmente utilizado para la visualización de las proteínas separadas por SDS-PAGE, ofrece un procedimiento de tinción simple y alta capacidad de cuantificación. Además, es completamente compatible con la identificación de proteínas por espectrometría de masas. Pero a pesar de estas

ventajas, se considera que es menos sensible que la tinción basada en sales de plata o en fluorescencia y, por tanto, se han hecho varias mejoras del protocolo original descrito por Fazekas y col. (1963) para aumentar la sensibilidad del CBB. Se introdujeron dos modificaciones importantes para mejorar la detección de proteínas de baja abundancia mediante la conversión de las moléculas de colorante en partículas coloidales; Neuhoff y col. (1988) aplicaron 20 % de metanol y concentraciones más altas de sulfato de amonio en la solución de tinción basado en el colorante CBB G-250; Candiano y col. (2004) establecieron la tinción azul de plata usando CBB G-250 con ácido fosfórico en presencia de sulfato de amonio y metanol. Sin embargo, todas estas modificaciones solo permiten una detección de aproximadamente 10 ng de proteína (Dyballa y Metzger, 2009).

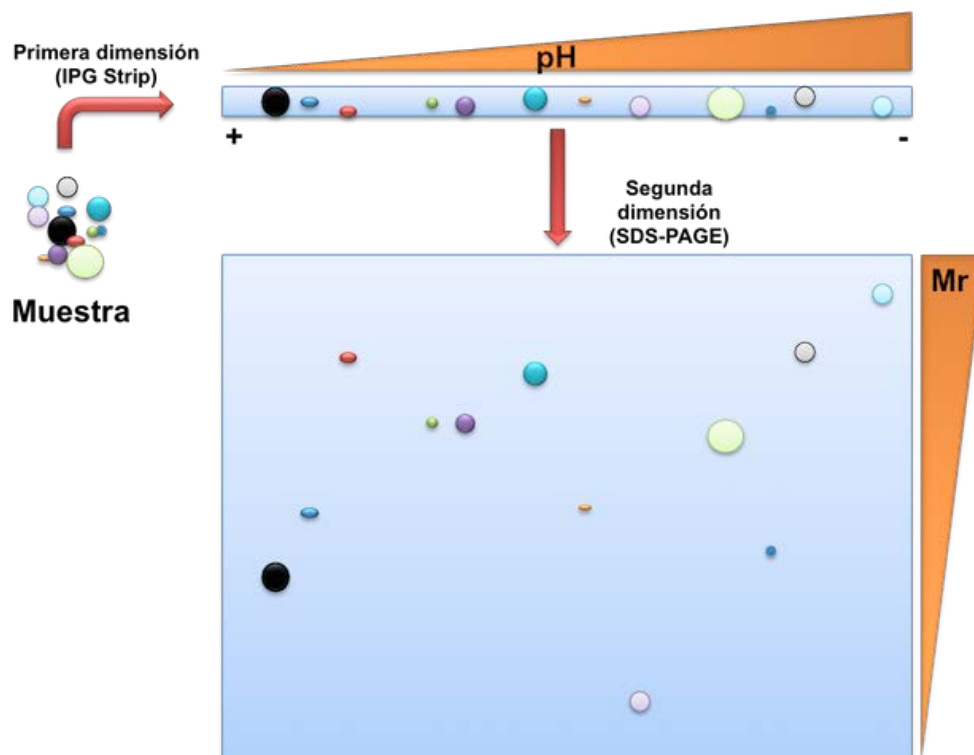


Figura 4. Pasos en la electroforesis bidimensional (Tomada de <https://proteomeplus.wordpress.com>).

Además de la electroforesis bidimensional, la proteómica combina otras técnicas y metodologías, como el análisis computacional de imágenes digitales, la espectrometría de masas y la bioinformática. El análisis es tanto cualitativo como cuantitativo y permite detectar variaciones en la expresión proteica, por

ejemplo, en respuesta a algún estímulo (como el tratamiento con un fármaco), o entre dos estados fisiológicos diferentes (normal contra patológico). En esta misma forma, la proteómica permite detectar la existencia de distintas isoformas de una proteína, y analizar las posibles variaciones en su expresión (Fig. 5).



Figura 5. Esquema representativo de un análisis proteómico, partiendo de una electroforesis 2-D.

El objetivo final de cualquier estudio proteómico va más allá de catalogar a las proteínas expresadas en un tipo celular en diferentes condiciones. Intenta llegar a comprender mejor los mecanismos metabólicos y las vías de señalización y regulación implicados en la biología celular que puedan ayudar a entender los mecanismos por los que se lleva a cabo un determinado proceso celular. Recientes avances en las tecnologías proteómicas ofrecen una gran oportunidad para revelar las fluctuaciones de las proteínas y las enzimas de hongos, responsables de su adaptación metabólica a una gran variedad de condiciones ambientales (Linda y Gaetano, 2015), entre ellas las relacionadas a xenobióticos. La proteómica permite además la identificación de proteínas específicas implicadas en la adaptación a determinadas condiciones ambientales, y la mejor interpretación de los mecanismos de regulación implicados en la biología celular. Por último, la proteómica intenta crear un

mapa tridimensional celular que indique la localización de cada proteína, los procesos y cambios a los que estas pueden verse sometidas bajo determinadas circunstancias, como translocaciones, procesos de proteólisis, fosforilaciones (fosfoproteoma), interacción entre distintas proteínas (interactoma), etc. y que ayuden a comprender mejor los mecanismos moleculares implicados en cualquier proceso fisiológico o patológico.

1.8 TIPOS DE PROTEÓMICA.

Existen 3 tipos de proteómica: proteómica de expresión, proteómica estructural y proteómica funcional como se muestra en la figura 6 (Lau y col., 2003).

La proteómica de expresión permite la separación e identificación de las proteínas expresadas por una célula, tejido u organismo. Se puede comparar por ejemplo, el patrón de expresión proteico de un cultivo microbiano crecido en ausencia y presencia de un agente que provoque estrés al microorganismo (estudios cuantitativos de la expresión proteica). La proteómica estructural, o interactómica, estudia las interacciones entre proteínas intentando conocer la estructura de posibles complejos proteicos macromoleculares, llegando a crear diversos mapas de vías de señalización que ayuden a entender mejor los mecanismos celulares. Por último, la proteómica funcional estudia los mecanismos de compartimentalización y translocación proteicos para conocer las distintas localizaciones subcelulares de las proteínas, con el fin de entender mejor su función y conocer cómo poder actuar frente a ellas en caso de que se estén estudiando dianas terapéuticas.



Figura 6. Tipos de proteómica.

En este trabajo, utilizaremos la proteómica como una herramienta para la identificación de las proteínas intracelulares de *Rhizopus oryzae* ENHE crecido con y sin PCF mediante la separación de las proteínas por medio de geles bidimensionales.

2. ANTECEDENTES.

Debido al aumento de compuestos tóxicos en efluentes industriales, sobre todo en las aguas contaminadas provenientes de las industrias químicas y petroquímicas, además de la mala disposición de estos residuos, desde hace varios años se ha buscado la forma de eliminar estos compuestos del medio ambiente, ya sea por métodos físicos, químicos o biológicos.

La actividad industrial produce una gran cantidad de compuestos fenólicos (Klein y Lee, 1987), entre los cuales se encuentra el pentaclorofenol (PCF), que proviene de las aguas residuales de la industria del papel y de los aserraderos (Wegman y Hofstee, 1979).

Es por esta razón que en el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa se ha estudiado la forma de eliminar el PCF mediante la utilización de dos cepas fúngicas del *phylum Zygomycete* capaces de crecer en medios contaminados. Estas cepas fueron identificadas por técnicas de secuencia 18s rDNA como, *Rhizopus oryzae* ENHE-1877, que se aisló del suelo de un aserradero en Puebla (León-Santiesteban y col., 2008) y *Amylomyces roixii*- CDBB-H-1883, anteriormente identificado como *Rhizopus nigricans* (Tomasini y col., 2001), aislado de un efluente de la industria del papel (Montiel y col., 2004). Ambos microorganismos son capaces de eliminar del medio y degradar el PCF.

Se demostró que al inmovilizar la cepa de *R. oryzae* ENHE en fibra de nylon saturada con PCF en medio de cultivo Melin-Norkrands modificado, se logra una remoción del PCF del 92 % partiendo de una concentración inicial de 25 mg PCF L⁻¹ en 72 h (León-Santiesteban, 2010). En el 2008, también encontraron actividad tirosinasa y Lignina peroxidasa en *R. oryzae* ENHE. También se demostró que la remoción de PCF por este hongo se lleva a cabo por procesos de sorción, así como degradación del compuesto a nivel tanto intracelular como extracelular, pero las enzimas involucradas en el proceso de degradación aún no están determinadas.

3. JUSTIFICACIÓN.

Los hongos filamentosos han mostrado tener capacidad para degradar compuestos tóxicos, además tienen la característica de crecer en el suelo en condiciones estresantes y de poder usar como fuente de carbono substratos baratos o incluso desechos tóxicos como por ejemplo bagacillo de caña, paja, salvado de trigo, clorofenoles e hidrocarburos aromáticos. Por ello, el empleo de hongos representa una vía prometedora para ayudar a resolver problemas de contaminación. Los hongos filamentosos pueden aplicarse en procesos tanto para remover sustancias tóxicas provenientes de efluentes industriales como en biorremediación de suelos.

En el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa se ha demostrado que *R. oryzae* ENHE es capaz de eliminar del medio el PCF, y que probablemente una tirosinasa está involucrada en el proceso de remoción de este tóxico. No se sabe qué otras enzimas puedan estar involucradas, aunque ya se conocen algunos de los metabolitos formados. Es importante identificar todas las proteínas (incluidas las tirosinasas) involucradas en dicho proceso, ya que con esta información se podría mejorar la capacidad de *R. oryzae* ENHE-1877 de degradar el PCF a través de técnicas moleculares.

El presente proyecto plantea el estudio de los cambios en el proteoma intracelular de *R. oryzae* ENHE-1877 cuando se cultiva en presencia de PCF. La realización de los geles de doble dimensión de las proteínas de *R. oryzae* ENHE, brindará una información importante sobre las proteínas intracelulares de este hongo y sus cambios de abundancia en condiciones de presencia de PCF, entre ellas las proteínas que puedan estar involucradas en procesos de tolerancia, sorción y degradación de compuestos tóxicos.

4. HIPÓTESIS.

El análisis de la expresión diferencial del proteoma de *R. oryzae* ENHE-1877 cultivado con o sin PCF permitirá establecer comparaciones entre ambas condiciones ambientales. Se obtendrá información importante sobre el cambio en la expresión de las proteínas intracelulares de este hongo que puedan estar relacionadas con su capacidad de adaptación a medios hostiles.

5. OBJETIVOS.

5.1 GENERAL:

Estudiar el proteoma intracelular de *R. oryzae* ENHE-1877 en presencia y ausencia de pentaclorofenol.

5.2 ESPECÍFICOS:

a) Estandarizar la 2D-PAGE de muestras proteicas intracelulares de *R. oryzae* ENHE-1877 en dos diferentes condiciones de cultivo.

b) Realizar el análisis proteómico comparativo de las electroforesis bidimensionales intracelulares de *R. oryzae* ENHE-1877 en dos diferentes condiciones de cultivo.

c) Analizar las proteínas que muestren diferente abundancia en presencia o ausencia de PCF, y tratar de elucidar su papel en la formación de los metabolitos encontrados como producto de la degradación del PCP.

6. METODOLOGÍA.

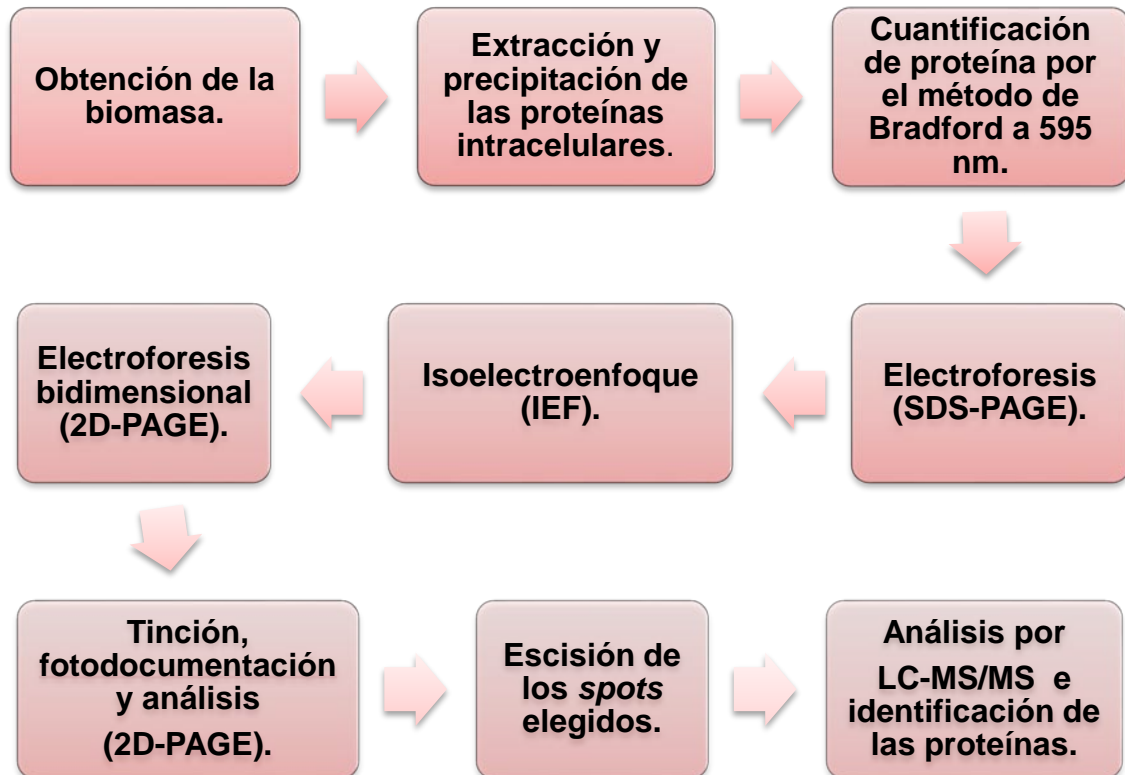


Figura 7. Diagrama de flujo donde se muestra el desarrollo experimental que se llevó a cabo con las muestras proteicas intracelulares de *Rhizopus oryzae* ENHE-1877.

6.1 MICROORGANISMO

La cepa de *Rhizopus oryzae* ENHE-1877 utilizada para los experimentos se aisló de un suelo contaminado con PCF de un aserradero en Puebla (León-Santiesteban y col., 2008), en el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario de la UAM-I. El hongo inicialmente fue identificado molecularmente como *R. oryzae*, debido a que tenía un 100% de identidad en 604 nucleótidos de la secuencia 18S rDNA con la cepa reportada en el centro nacional de investigación biotecnológica (NCBI) se le denominó cepa ENHE. Recientemente la cepa de *R. oryzae* ENHE se resguardó en la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV) bajo el acrónimo (CDBB-H-1877).

6.2 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

6.2.1 ESPORULACIÓN DE *Rhizopus oryzae* ENHE.

La esporulación de *R. oryzae* ENHE se llevó a cabo utilizando como medio Agar Papa Dextrosa (PDA), en 12 matraces Erlenmeyer de 250 ml previamente esterilizados, adicionando a cada uno un volumen de 40 ml del medio. Se inocularon con 200 μ l de una solución de esporas conservadas en glicerol al 40% a -20 °C. La incubación se realizó durante 5 días a 30 °C para obtener una máxima esporulación.

6.2.2 COLECTA DE ESPORAS DEL MEDIO (PDA).

Para obtener la suspensión de las esporas, se adicionaron 8 ml de una solución de Tween 80 al 1 % (v/v) a uno de los matraces y con un agitador magnético se levantaron las esporas del micelio, reuniendo así todas las esporas obtenidas. La suspensión de esporas se pasó a cada uno de los matraces hasta recuperar las esporas de los 12 matraces en uno solo.

Posteriormente en tubos ependorf de 1.5 ml se adicionaron 750 μ l de la suspensión de esporas y 750 μ l de agua destilada estéril, se centrifugó durante 15 minutos a 14000 rpm. Terminado el proceso se eliminó el sobrenadante, se adicionaron 500 μ l de agua destilada estéril a cada uno de los tubos, se agitaron y el resultante de todos los tubos se juntó en un solo tubo de 15 ml.

La suspensión de esporas obtenida se filtró a vacío con una gasa previamente esterilizada, posteriormente se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos y se eliminó el 50 % del sobrenadante, se repuso el volumen con H₂O destilada estéril y se re suspendieron las esporas por medio de agitación con un vórtex. El proceso de centrifugación se realizó 2 veces, finalmente se eliminó el 50 % del sobrenadante y se concentró la suspensión disminuyendo su volumen a la mitad.

6.2.3 CONTEO DE ESPORAS.

Para realizar el conteo de las esporas, se realizó una dilución 1:10 de la suspensión obtenida, en donde se tomaron 100 μ l de la suspensión de esporas concentrada y 900 μ l de agua destilada. Con esta dilución se realizó el conteo en la cámara de Neubauer, la concentración de esporas se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Esporas/mL} = (\text{promedio de esporas}) (\text{factor de dilución}) (25) (10,000)$$

6.2.4 MEDIO DE CULTIVO Y CRECIMIENTO DE *R. oryzae* ENHE.

El medio de cultivo utilizado fue el medio Lee al doble de concentración, modificado, se utilizó ácido glutámico y NaNO_3 como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente; el pH se ajustó a 5.3 con HCl.

Composición del medio Lee modificado:

Ác. glutámico	5 g / L
KH_2PO_4	5 g / L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4 g / L
NaNO_3	2.5 g / L
NaCl	10 g / L

El medio se preparó con agua destilada 1 L.

Preparado el medio se esterilizó a 15 lb/pulg-2 durante 15 minutos y fue distribuido en 12 matraces Erlenmeyer de 250 ml previamente esterilizados, adicionando a cada uno 40 ml del medio Lee, posteriormente se inocularon los matraces con una concentración de 5×10^7 esporas de *R. oryzae* ENHE.

Una vez inoculado el medio, se incubó durante 156 horas a 30 °C y a 125 rpm (tiempo en el que se alcanza una biomasa de 1 mg ml⁻¹). A las 156 h se

adicionaron 3.2 ml de una solución de pentaclorofenol (PCF) a 500 ppm, para obtener una concentración final de 40 mg PCF L⁻¹. Se tomaron muestras a las 157 h, al momento de adicionar el PCF, y a las 444 h. En estudios previos, León-Santiesteban y col. (2014) reportaron la presencia de metabolitos producto de la degradación del PCF como pentacloroanisol y algunos compuestos aromáticos clorados a las 444 horas, por otro lado, observaron que al adicionar la concentración de PCF mencionada, el hongo dejó de crecer induciéndose la fase estacionaria de crecimiento.

6.2.5 SEPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE LA BIOMASA.

Terminados los periodos de incubación correspondientes, se separó la biomasa del medio de cultivo, filtrándola a vacío. Posteriormente la biomasa se lavó con solución fisiológica (NaCl 0.9%) para retirar restos del medio de cultivo. Finalmente se concentró y almaceno la biomasa a -70 °C.

6.3 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

6.3.1 EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS INTRACELULARES DE *R. oryzae* ENHE.

La extracción de proteínas intracelulares se realizó por la técnica descrita por (Jami y col., 2010) con algunas modificaciones. Se llevó a cabo la disrupción de la biomasa de manera mecánica, para lo cual se criogenizó con N₂ líquido y se maceró con ayuda de un mortero y pistilo, hasta obtener un polvo fino. A 1 g del polvo de la biomasa se le adicionaron 5 ml (proporción 0.2 g/ml) de amortiguador de fosfatos [10 mM (K₂HPO₄:KH₂PO₄); 0.07 % (p/v) 1,4-ditiotreitol (DTT); inhibidor de proteasas (sigma-Aldrich) 5 µl/ml; pH 7.4] y se dejó en agitación constante 12 h, con la finalidad de solubilizar el contenido proteico. Posteriormente se centrifugó a 13000 x g durante 5 minutos y se rescató el sobrenadante. Se precipitaron las proteínas con un volumen 1:1 de 20 % (p/v) TCA/acetona conteniendo 0.14 % (p/v) de DTT y las proteínas disueltas en el amortiguador de solubilización, la mezcla se dejó durante toda la noche a -20 °C. La solución con proteínas se centrifugó a 4000 rpm durante

15 minutos a 4 °C y se decantó el sobrenadante. El pellet formado en la parte inferior de los tubos se lavó 2 veces con acetona fría, agitándolo ligeramente cuidando el no resuspender el pellet, se realizó un tercer lavado con acetona al 80 % (v/v) con agua milli-Q (Fernández-Acero y col., 2006). Finalmente se dejaron los tubos destapados hasta que se evaporó la acetona (Fig. 8).

Para continuar con el estudio proteómico, el pellet se re- suspendió en 500 µl de amortiguador de hidratación (urea 8 M; tiourea 2 M; CHAPS 4 %; DTT 100 mM; anfolitos 0.02 %), la muestra se sónico en frío y en intervalos de 30 segundos, durante 5 minutos, para asegurar que toda la proteína se solubilizara.

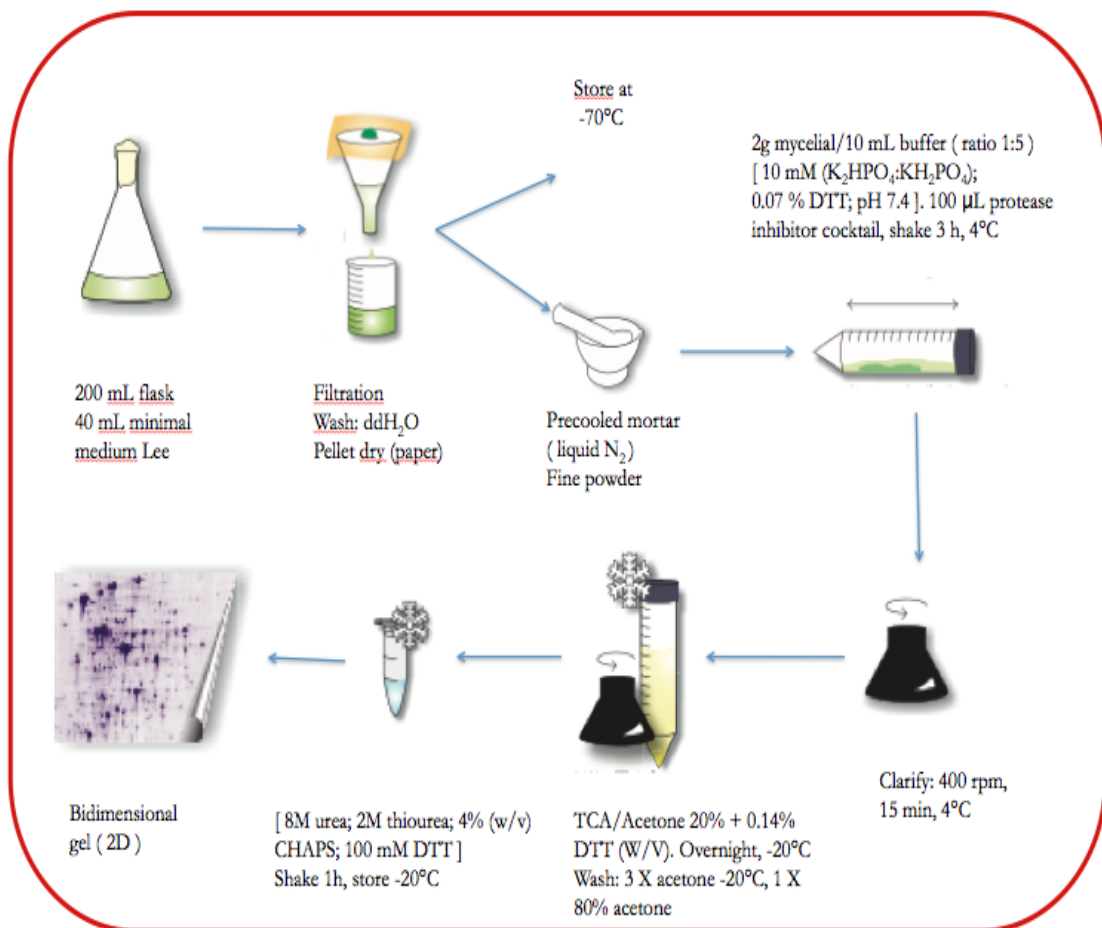


Figura 8. Esquema representativo de la extracción de las proteínas intracelulares de *R. oryzae* ENHE partiendo de la biomasa del hongo, hasta la obtención de los 2D-PAGE.

6.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MUESTRA.

6.4.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO COLORIMÉTRICO DE BRADFORD.

La evaluación de la concentración del contenido proteico de la muestra se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita (Bio-Rad, Protein Assay, bulletin 9004), la cual se basa en el método de Bradford. Consiste en la adición de un colorante ácido (reactivo de Bradford) a la solución de proteína y la posterior lectura a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro. La posterior comparación con una curva estándar, proporciona una medida relativa de la concentración de proteína. El ensayo de proteínas de Bradford, se basa en la unión y el cambio diferencial del colorante sobre la muestra, producida en respuesta a diversas concentraciones de proteína (Bradford, 1976). Se realizó una dilución 1:100 de las 4 condiciones establecidas, se llevó a un volumen final de 200 μ l y se cuantificó la proteína presente en la muestra por triplicado. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 595 nm. Las muestras que se analizaron se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Ensayo de proteína de Bradford a 595 nm.

reactivo	
Agua destilada	158.4 μ l
Muestra problema	1.6 μ l
Reactivo de Bradford	40 μ l

La muestra problema corresponde a las dos condiciones analizadas en ambos tiempos. Agitar suavemente y reposar 5 minutos a temperatura ambiente antes de realizar la lectura.

6.5 PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS.

Debido a que algunas muestras quedaron diluidas (poca proteína en un gran volumen), fue necesario precipitar y concentrar la muestra para obtener 40 μ g

de proteína que es la cantidad que se cargó en los carriles del gel de una dimensión (SDS-PAGE).

Se tomó una alícuota, correspondiente a 40 µg de proteína, del sobrenadante de la muestra y se aplicó el método de metanol/cloroformo/agua para la precipitación de las proteínas del proteoma de *R. oryzae*. En forma general, el procedimiento fue el siguiente.

Método de metanol/cloroformo/agua (establecido para 100 µl de muestra):

- Adicionar 400 µl de MetOH y colocar en el vórtex durante 10 minutos.
- Adicionar 100 µl de Cloroformo y colocar en el vórtex durante 10 minutos.
- Adicionar 300 µl de H₂O y colocar en el vórtex durante 5 minutos.
- Centrifugar 5 minutos a 13200 rpm.
- Eliminar la capa acuosa superior y adicionar 400 µl de MetOH.
- Colocar en el vórtex durante 5 minutos.
- Centrifugar 10 minutos a 13200 rpm.
- Remover el MetOH sin tocar la pastilla.
- Retirar el MetOH en un concentrador *Speed vac*.

Terminado el método de precipitación, se resuspendió directamente en 5 µl de amortiguador de carga 4X (glicerol 25 % v/v; SDS 20 % [50 % v/v]; amortiguador pH 6.8 [25 % v/v]; azul de bromofenol 1 mg/ml) y se sonicó en frío durante 30 segundos.

6.6 ELECTROFORESIS SDS-PAGE (1D-PAGE).

La electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) se realizó con el método de Laemmli en (1970). Los geles de poliacrilamida se componen de dos fases que difieren en sus características, tales como: pH, fuerza iónica y función. La fase superior sirve para concentrar la muestra en el límite que separa las dos fases y permitir que las proteínas entren de manera homogénea a la siguiente fase del gel. La fase de resolución desempeña el papel principal de la electroforesis, separa las proteínas en función de su masa

molecular. Diferentes concentraciones de poliacrilamida se utilizan para la separación de proteínas de diferentes pesos en KDa. Para la preparación de la electroforesis SDS-PAGE se siguió el siguiente protocolo:

1.- Las placas de vidrio donde se polimeriza el gel se lavaron perfectamente con agua y detergente suave y posteriormente se enjuagan con agua destilada y etanol.

2.- Se montó el par de placas de vidrio en el equipo formador de geles (caster) y se adicionó agua para asegurar que no tuviera fugas y la polimerización se llevara a cabo adecuadamente.

3.- Se eliminó el agua y se preparó la mezcla de soluciones correspondientes para los geles SDS-PAGE (gel de resolución y gel concentrador). La preparación de los geles se muestra en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Preparación del gel de resolución 12 % (5 ml).

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	1.7 ml
4x Amortiguador pH 8.8 (1.5 M Trizma/0.4 % SDS)	1.3 ml
30 % Acrilamida/bis	2.0 ml
TEMED	2 µl
10 % PSA	50 µl

Tabla 3. Preparación del gel concentrador 4 % (2 ml).

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	1.1 ml
4x Amortiguador pH 6.8 (0.5 M Trizma/0.4 % SDS)	0.50 ml
30 % Acrilamida/bis	0.33 ml
TEMED	2 µl
10 % PSA	20 µl

Los reactivos son adicionados en el orden descrito.

4.-Primero se prepararon 5 ml de la mezcla del gel de resolución, se agitaron perfectamente en el vórtex y se adicionaron entre los vidrios; se agregó un poco de etanol para formar un nivel, se esperó de 10 a 15 minutos a que polimerizara la mezcla y se retiró el etanol.

5.- Se preparó la mezcla del gel concentrador y se adicionó sobre la mezcla del gel de resolución ya polimerizada; se colocó la peineta formadora de los pozos y se esperó 15 minutos a su polimerización.

6.- La peineta se retiró para posteriormente, montar el gel en la cámara de electroforesis; se adicionó el amortiguador de Laemmli (25 mM Tris/192 mM Glicina/1 % SDS) y se lavaron los pozos con el mismo amortiguador.

7.- Se realizó una SDS-PAGE al 12 % en la cual se cargaron los carriles con la cantidad de 40 µg de la alícuota de la muestra de proteínas con la que se estaba trabajando.

Preparación de las muestras:

Se prepararon las muestras a cargar en tubos plásticos de 0.5 ml, posteriormente se colocaron en baño María a ebullición durante 3 minutos y se centrifugaron durante 30 segundos, se colocaron las muestra en los pozos del gel previamente situado en la cámara de Electroforesis con Amortiguador de Laemmli. Las muestras quedaron cargadas en el gel como se indica en la tabla 4.

Tabla 4. Orden en el que se cargaron las muestras en la SDS-PAGE al 12 %.

Carril	Amortiguador de Carga	DTT [1 M] µl	Muestra
1	5	1	MPM* 1 µl
2	5	1	40 µg de muestra de 157 h sin PCF
3	5	1	40 µg de muestra de 157 h con PCF
4	5	1	40 µg de muestra de 432 h sin PCF
5	5	1	30 µg de muestra de 432 h con PCF

*Marcadores de Peso Molecular

La electroforesis se inició aplicando al gel 100 Volts durante 30 minutos a 4 °C, después se aumentó el voltaje a 120 Volts hasta que el frente llegó a la parte inferior del gel sin que se saliera del mismo.

Se prosiguió a desmontar y teñir el gel colocándolo en un recipiente donde se lavó 3 veces con agua destilada, posteriormente se adicionaron al gel 120 ml de solución fijadora (40 % etanol; 10 % ác. acético) y se incubó a temperatura ambiente durante una hora, después se eliminó la solución fijadora y se lavó 3 veces el gel con agua destilada, agitando suave mente, finalmente se adicionó Coomassie blue silver (azul de Coomassie G-250 0.12 %; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 %; MetOH 20 %; H_3PO_4 10 %) y se colocó en agitación constante durante toda la noche. Por último, se destiñó el gel colocándolo en agitación con agua destilada durante 1 hora. El gel desteñido se guardó en un recipiente con agua hasta su posterior foto documentación.

6.7 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D-PAGE).

6.7.1 PRIMERA DIMENSIÓN: ISOELECTROENFOQUE (IEF).

Para realizar el Isoelectroenfoque se utilizaron Tiras IPG (Bio-Rad) de 7 centímetros y con un gradiente de pH inmovilizado con un rango de 3 -10, y el equipo PROTEAN® IEFCell (Bio-Rad).

Para la preparación del Isoelectroenfoque se siguió el siguiente protocolo:

1.- Se preparó la solución a cargar utilizando el amortiguador de rehidratación/solubilización como base, llevando a un volumen final de 200 μL , se agitó y colocó entre los electrodos, cuidando el no dejar burbujas ya que pueden afectar el análisis, las muestras quedaron cargadas como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Preparación de la muestra para el IEF (Mezcla por tira IPG).

Muestra	200 µg
DTT [2 M]	1.5 µl
Anfolitos (Bio-Rad)	1.25 µl
Azul de Bromo fenol	0.25 µl
Amortiguador de hidratación (Urea 8 M / Tiourea 2 M/CHAPS 4 %)	C.b.p. 160 µl

2.- A las tiras de IPG (gradiente de pH 3-10) se les quitó la mica protectora, se colocaron de tal manera que el gel esté en contacto con la muestra entre los electrodos y cuidando que se encuentren en la polaridad correcta; por último, se cubren con 1 ml de aceite mineral y se cierra el sistema con la tapa de la cámara del IEF, los cambios de voltaje establecidos para las muestras se indican en la tabla 6.

Tabla 6. Programación del isoelectroenfonque.

Rehidratación	50 v	12 horas/20 °C	lineal
Paso 1	250 v	20 minutos	Rápida
Paso 2	4000 v	2 horas	Lineal
Paso 3	4000 v	2 horas	Rápida
Mantenimiento (opcional)	500 v	Hasta 8 horas	Mantenimiento

Terminada la corrida, las tiras se retiraron de la cámara de IEF, se eliminó el exceso de aceite mineral y se procedió a incubarlas en los siguientes amortiguadores de equilibrio (tablas 7 y 8).

Tabla 7. Composición del amortiguador de equilibrio 1.

Reactivo	Cantidad para 5 ml
Tris/HCl	295.5 mg
Urea	2.4 g
Tiourea	760 mg

SDS	100 mg
DTT [2 M]	50 μ l
Ajustar el pH a 8.8 con HCl.	

Tabla 8. Composición del amortiguador de equilibrio 2.

Reactivo	Cantidad para 5 ml
Tris/HCl	295.5 mg
Urea	2.4 g
Tiourea	760 mg
SDS	100 mg
Iodoacetamida	30 mg
Ajustar el pH a 8.8 con HCl.	

Se incubaron las tiras en 1 ml de Amortiguador de equilibrio 1 durante 20 minutos a 25 °C con ligera agitación. Al término de la incubación se eliminó el exceso del amortiguador 1 y se incubaron durante 20 minutos a 25 °C, en oscuridad y con ligera agitación, en el Amortiguador de equilibrio 2. Terminada la incubación se prosiguió a realizar la segunda dimensión.

6.7.2 SEGUNDA DIMENSIÓN: SDS-PAGE.

Se llevó a cabo la segunda dimensión por SDS-PAGE a una concentración de poli(acrilamida) de 12 % en la cámara de electroforesis Mini-PROTEAN®Tetra Cell (Bio-Rad). Se preparó el gel de resolución dejando un espacio de 1.5 cm en la parte superior, de tal manera que se pueda colocar la tira de IPG previamente procesada en ese espacio.

Se montó la cámara de electroforesis y se colocó la tira de IPG en la parte superior del gel ya polimerizado. Posteriormente, se llenó con agarosa de bajo punto de fusión (agarosa 0.4 % p/v) y se corrió a 120 Volts a 4 °C hasta que el frente llegó a la parte inferior del gel cuidando que éste no se salga. Terminada la corrida, se desmontó el gel de la cámara y se tiñó por la técnica de

Coomassie blue silver (Candiano y col., 2004) como se indica en el siguiente apartado.

6.8 TINCIÓN DE LOS 2D-PAGE.

6.8.1 TINCIÓN CON COOMASSIE BLUE SILVER.

Una vez desmontado el gel de la cámara de electroforesis, se lavó 3 veces con agua Milli-Q teniendo cuidado de no agitarlo demasiado para evitar la ruptura del mismo. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante una hora y en agitación constante en solución fijadora (40 % etanol; 10 % ác. acético), después se eliminó la solución fijadora y se lavó 3 veces el gel con agua destilada, agitando suavemente. Finalmente se adicionó Coomassie blue silver (azul de Coomassie G-250 0.12 %; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 %; MetOH 20 %; H_3PO_4 10 %) y se colocó en agitación constante durante toda la noche. Por último, se destiñó el gel colocándolo en agitación con agua destilada durante una hora (Candiano y col., 2004). El gel desteñido se guardó en un recipiente con agua hasta su posterior foto documentación.

6.9 FOTODOCUMENTACIÓN

Los geles de primera y segunda dimensión fueron fotodocumentados utilizando un sistema analizador de imágenes para electroforesis en una y dos dimensiones Gel Doc™ XR+ Imaging System (Bio Rad). Las imágenes fueron digitalizadas y corregidas con el software Image Lab ® y PD-Quest 2-D Analysis (Bio Rad).

La fotodocumentación se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo:

-Obtención de la imagen: El gel se coloca y orienta en el centro de la cámara de tal manera que el escáner digitalice la imagen por completo y en perfecta alineación, se cierra el equipo y se coloca en la modalidad de luz blanca.

-Optimización de la imagen: Una vez que el escáner ha obtenido la imagen del gel, es necesario reducir el ruido y el fondo con la finalidad de obtener una resolución óptima de la imagen.

-Análisis de la imagen: Optimizada la imagen se guarda para un posterior análisis de los geles.

6.10 ANÁLISIS DE LOS GELES EN DOBLE DIMENSIÓN CON EL SOFTWARE PDQuest.

Los geles obtenidos se analizaron con ayuda del software PDQuest, y se obtuvo el gel master de cada condición a analizar, para lo cual se realizó un triplicado de cada condición. El análisis de ambas condiciones se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1.- Guardar las imágenes de los geles 2D en formato TIF, el cual es compatible con la versión del software PDQuest advanced.
- 2.- Con ayuda del software recortar las imágenes correspondientes a una misma condición o tratamiento, procurando dejar las mismas dimensiones y orientación.
- 3.- Con el asistente de detección de spots, seleccionar los parámetros adecuados para poder identificar todos los *spots* de los geles analizados de una misma condición e integrarlos en una sola imagen. Si es necesario, modificar los parámetros hasta obtener un buen resultado.
- 4.- Después de haber detectado los *spots* de un conjunto de geles, editar la imagen obtenida de manera manual, indicando al equipo los *spots* que de verdad pertenecen y eliminando de la imagen aquellos que no.
- 5.- Realizar el *match* y corregir de manera manual los resultados de la detección automática, haciendo coincidir todos los *spots* de las imágenes.

Obtenidas las imágenes correspondientes a los geles master de ambas condiciones y en los dos tiempos de análisis, se realizó una comparación entre experimentos. Se compararon los geles master a un tiempo específico en ambas condiciones de crecimiento, con la finalidad de analizar los datos para

determinar que *spots* son estadísticamente diferentes en cuanto a nivel de expresión. También se identificaron los *spots* presentes en una sola condición a un mismo tiempo.

6.11 ESCISIÓN DE LOS SPOTS Y ANALISIS POR LC/MS/MS.

La escisión de los *spots* de interés se llevó a cabo en campana estéril de flujo laminar. Para evitar la contaminación con queratina o algún otro contaminante que pudiera interferir con el análisis de las muestras se utilizaron guantes de nitrilo y cubre boca. La escisión se llevó a cabo sobre una placa de vidrio previamente lavada con detergente SDS y enjuagada con etanol, los *spots* escindidos se almacenaron en tubos eppendorf de 0.5 ml previamente esterilizados y lavados con acetonitrilo. Finalmente se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

Los *spots* elegidos se mandaron a analizar al “Institut De Reserches Cliniques De Montreal” ubicado en Montreal, Canadá. Con la finalidad de realizar un análisis proteómico por LC-MS/MS en un LTQ-Orbitrap (Thermo), para su secuenciación y posterior identificación de cada una de las proteínas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MUESTRA.

La proteína presente en los extractos proteicos obtenidos de la biomasa de *R. oryzae* ENHE se determinó por el método de Bradford. Se hicieron tres réplicas de cada extracto y se utilizó el valor medio como referencia.

La curva de calibración obtenida con la técnica de Bradford se muestra en la Fig. 9.

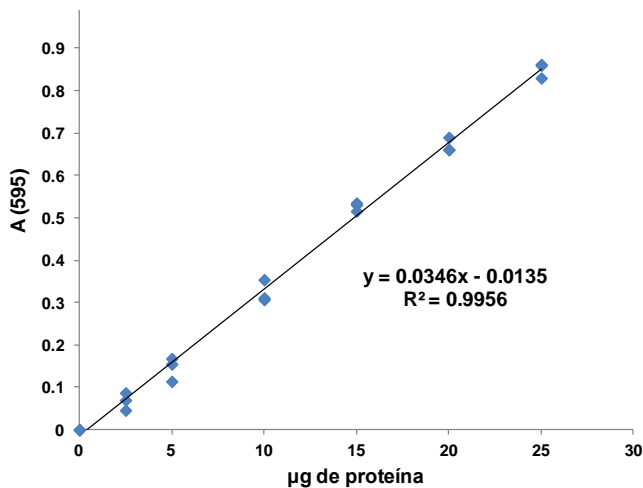


Figura 9. Curva de calibración con el método de Bradford.

La concentración de proteína promedio en los extractos obtenidos a las diferentes condiciones de crecimiento, 157 y 444 h y con y sin adición de PCF, se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Concentración de proteína promedio de las condiciones analizadas.

Condición	Concentración de proteína (µg/µl)
157 horas sin PCF	1.0
157 horas con PCF	0.71
442 horas sin PCF	0.77
442 horas con PCF	0.3

Las concentraciones promedio de proteína intracelular son las que se toman en cuenta para cargar cantidades de proteína conocidas en la electroforesis bidimensional, así como para realizar el isoelectroenfoque.

Al utilizar el procedimiento basado en la solubilización de las proteínas con un amortiguador a base de fosfatos y su posterior precipitación con TCA/Acetona 80% descrito por Fernández-Acero y colaboradores (2006), se logró obtener el extracto de proteína intracelular para realizar el análisis 2D-PAGE correspondiente.

7.2 SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis al 12 % de concentración de poliacrilamida (Fig. 10) de las dos condiciones ensayadas en ambos tiempos. Se observó una mayor cantidad de bandas en los carriles correspondientes a la muestra del cultivo de *R. oryzae* ENHE crecido sin el PCF, lo que en primera instancia podría indicar una mayor cantidad de proteínas.

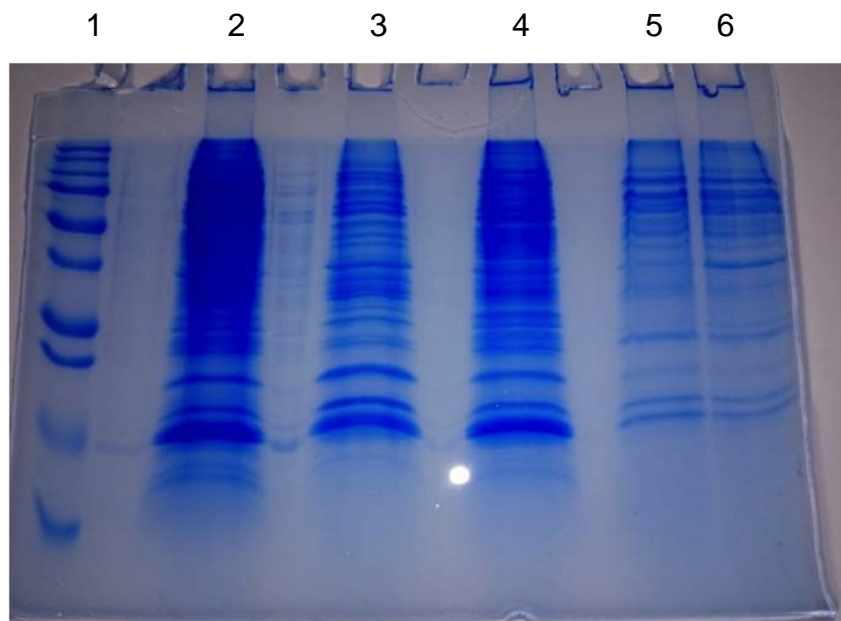


Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE 12 %, carril 1) marcador de peso molecular. 2) 40 μ g de muestra a 157 h sin PCF. 3) 40 μ g de muestra a 157 h con PCF. 4) 40 μ g de muestra a 442 h sin PCF. 5 y 6) 30 μ g de muestra a 442 h con PCF.

7.3 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE LA MUESTRA.

Una vez estandarizado el método de cuantificación de las proteínas, pasamos a analizar las muestras mediante electroforesis bidimensional. La estandarización de un método de cuantificación de proteínas obtenidas de muestras proteicas intracelulares de *R. oryzae* ENHE, nos permitió cargar concentraciones conocidas e iguales de la muestra, para poder analizar posteriormente los geles bidimensionales obtenidos.

Se realizó el IEF de la muestra correspondiente a 157 horas de cultivo sin PCF, durante el proceso se separaron a las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico, obteniendo una buena corrida de la muestra (Fig. 11). Lo cual indica que el método de precipitación de las proteínas fue el adecuado para la muestra, ya que se logró eliminar las sales o algún otro contaminante que pudiera interferir con los cambios de voltaje durante el corrimiento. Por lo tanto, se aplicó la misma metodología para las siguientes muestras.

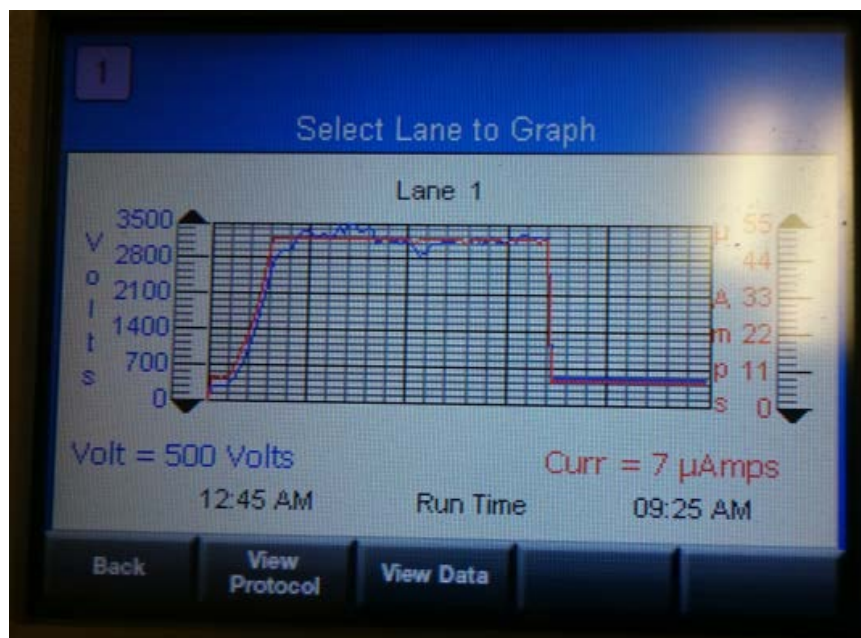


Figura 11. Gráfica que representa los cambios de voltaje durante el tiempo de corrida del IEF. En color rojo, cambios de voltaje establecidos en el equipo. En color azul, cambios de voltaje que se dieron en la muestra.

Se realizó la 2D-PAGE al 12 % de poliacrilamida cargando un total de 200 µg de proteína correspondiente a 157 horas sin PCF, el gel se tiñó con la técnica de Coomassie Blue Silver. La técnica de tinción descrita por (Candiano y col., 2004), la cual tiene una sensibilidad de aproximadamente 10 ng/mm², exhibió un tinte de mucha más rápida absorción (80 % en la primera hora de coloración), permitiendo observar una buena separación e integridad de los *spots*. En la Figura 12 se observa que la mayor parte de las proteínas se encuentran en la zona que corresponde a puntos isoeléctricos entre 4 y 7. La menor sensibilidad de la tinción Coomassie Blue Silver, en comparación con la obtenida con las sales de plata, es compensada con la compatibilidad que tiene la técnica con la espectrometría de masas (Rabilloud y Lelong. 2011).

Se cree que el mayor nivel de ácido fosfórico y un pH final ácido ayuda en la protonación de los últimos residuos disociados de Asp y Glu en las colas de los polipéptidos. Por lo que se favoreció, en gran medida, el anclaje iónico de las moléculas de colorante al resto de proteína. Tales uniones, sin embargo, deben ser seguidas por la asociación hidrófoba considerable con los residuos aromáticos y básicos, especialmente la arginina, a lo largo de la cadena principal del polipéptido (Compton y col., 1985).

Por otro lado, se comprobó la necesidad de utilizar agentes caotrópicos en el amortiguador de solubilización/rehidratación como la urea y tiourea, que, junto con agentes desnaturalizantes y detergentes, dan como resultado un aumento en la solubilidad de las proteínas (Rabilloud y col., 2010).

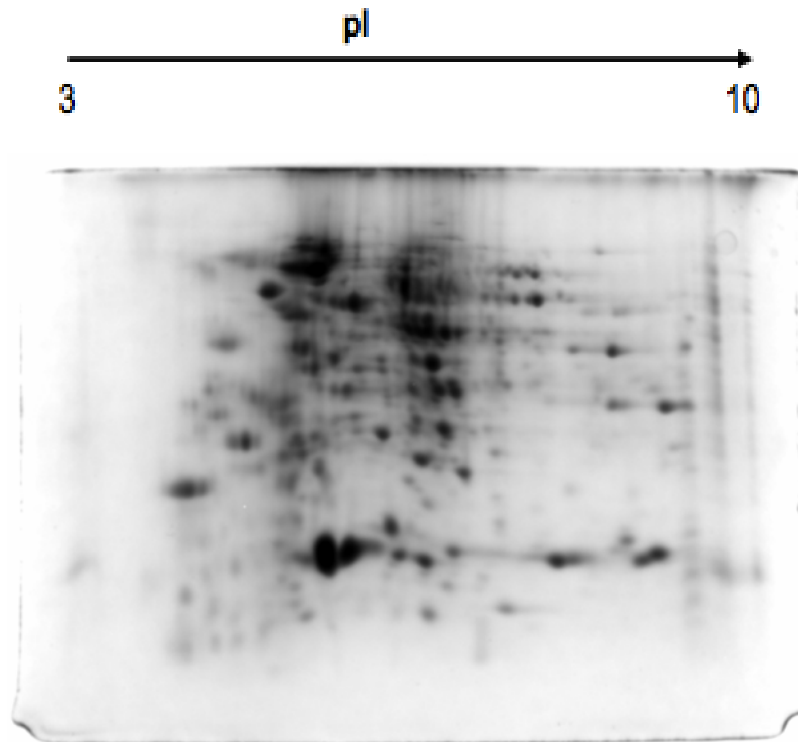
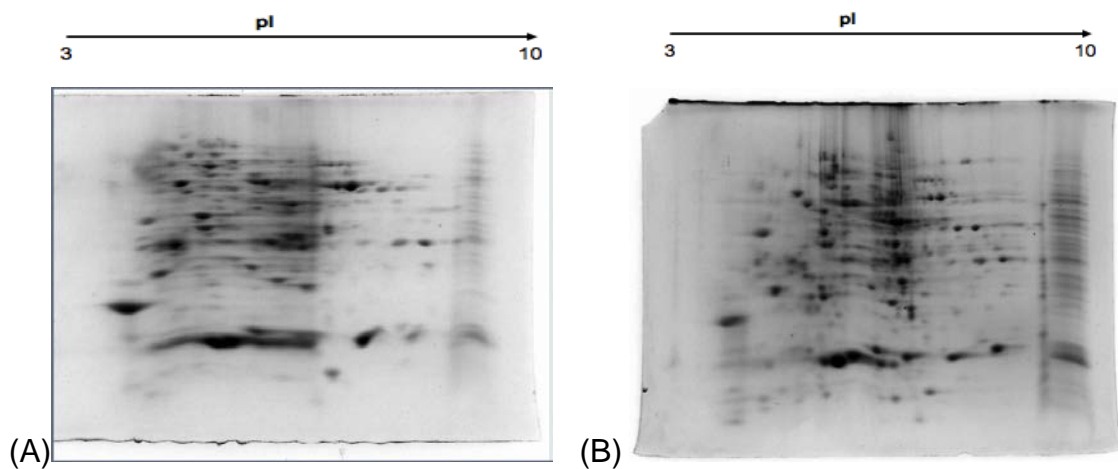


Figura 12. Electroforesis 2D-PAGE correspondiente al proteoma de *R. oryzae* ENHE en la que se cargó un total de 200 μ g de muestra proveniente de un cultivo de 157 h en ausencia de PCF. El gel fue teñido con la técnica de Coomassie Blue Silver.

Después de optimizar la 2D-PAGE para la muestra de proteínas intracelulares de *R. oryzae*, se obtuvieron los proteomas de las condiciones restantes aplicando la misma metodología (Fig. 13).



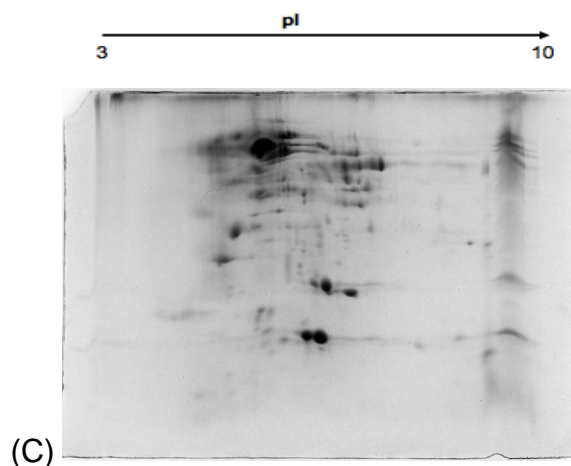


Figura 13. Electroforesis 2D-PAGE en la que se cargó un total de 200 μg de muestra. (A) cultivo de 157 h al que se le adicionó PCF a las 156 h de crecimiento de *R. oryzae* ENHE. (B) Cultivo a las 444 h sin PCF. (C) Cultivo a las 444 h con PCF, todas las condiciones se realizaron por triplicado.

7.4 ANÁLISIS DE LOS GELES 2D CON EL SOFTWARE PDQuest.

Los geles obtenidos se analizaron con ayuda del software PDQuest, obteniéndose el gel master de cada condición a analizar. Los *spots* de proteínas a partir de las réplicas de los geles se compararon entre sí y se incluyeron en una imagen sintética llamada gel master, el cual incluye toda la información acerca de los *spots* de todos los geles correspondientes a una misma condición.

De las muestras tomadas a las 157 horas, se observaron un total de 147 spots en la muestra donde el hongo creció sin pentaclorofenol, y un total de 110 spots cuando el hongo creció con pentaclorofenol (Fig. 14). Los resultados muestran que en los cultivos que crecieron con pentaclorofenol, la expresión de proteínas disminuye drásticamente, además el hongo deja de crecer al ser adicionado el PCF, lo que sugiere que posiblemente algunas proteínas del metabolismo energético se dejen de expresar. A nivel celular, el efecto tóxico del PCF se relaciona con la disminución de la síntesis de ATP por medio del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, aumentando la demanda de energía, lo que afecta la estructura de la pared celular y citoesqueleto, induciendo una significativa respuesta de estrés (Carvalho y col., 2013).

Además, se ha comprobado que el PCF puede llegar a formar aductos con nucleósidos y nucleótidos en el ADN. Pueden ser razones por las cuales el hongo deja de crecer cuando se adiciona el PCF.

En las muestras tomadas a las 442 horas de cultivo, se observaron en total 273 *spots* al crecer al hongo sin pentaclorofenol y 115 *spots* en presencia de pentaclorofenol (Fig. 15). Los resultados obtenidos muestran un patrón similar al del cultivo que se creció durante 157 horas, es decir, mayor cantidad de *spots* en los cultivos a los que no se les adicionó el PCF. Por otro lado, hay proteínas que se expresan solo cuando el hongo creció en presencia del PCF.

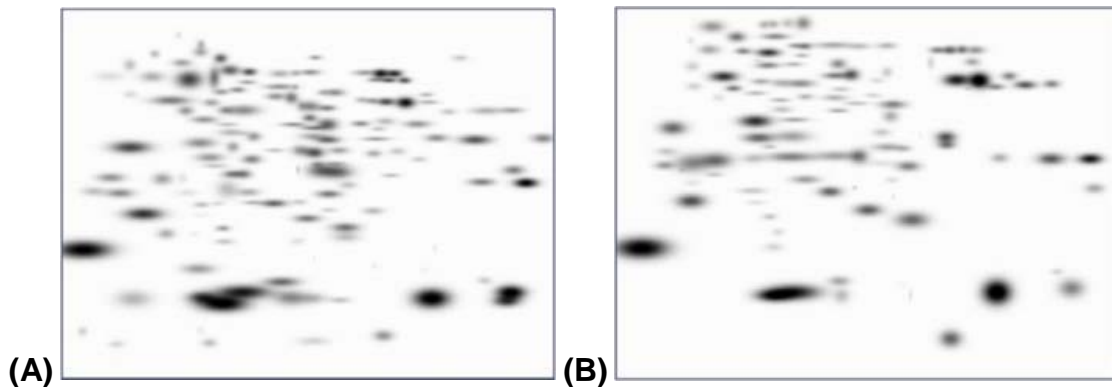


Figura 14. Geles master del proteoma de *R. oryzae* ENHE cultivado a 157 horas. **(A)** sin pentaclorofenol, se identificaron 147 *spots*. **(B)** con pentaclorofenol, se identificaron 110 *spots*.

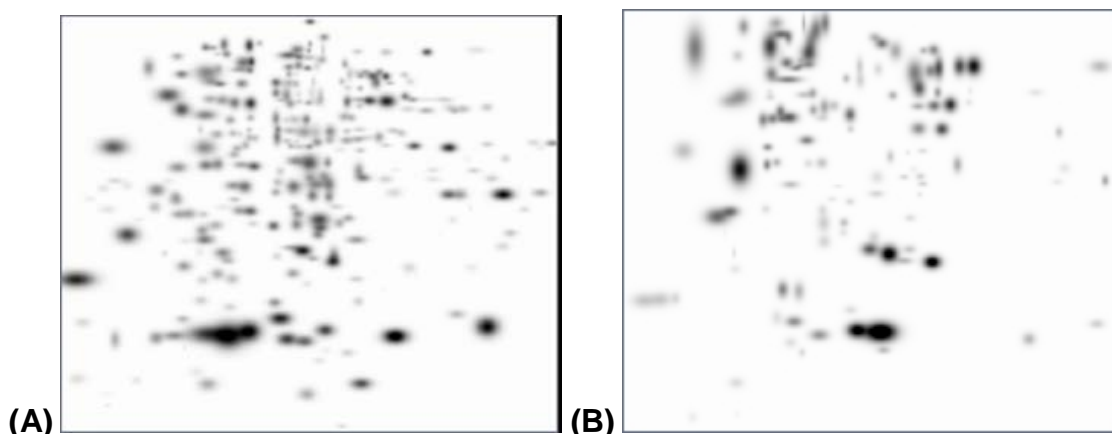


Figura 15. Geles master del proteoma de *R. oryzae* ENHE cultivado a 444 horas. **(A)** sin pentaclorofenol, se identificaron 273 *spots*. **(B)** con pentaclorofenol, se identificaron 115 *spots*. Las imágenes correspondientes a

los geles master de ambas condiciones se obtuvieron con la ayuda del software PDQuest.

Con ayuda del software PDQuest se lograron identificar 15 *spots* que están presentes únicamente cuando *R. oryzae* crece en presencia de PCF, 9 correspondientes a las 157 horas de cultivo, y 6 a las 444 horas (Fig. 16). Estos *spots* se escindieron de los geles para la posterior identificación de las proteínas que contienen; dichas proteínas pueden estar relacionadas con la capacidad del hongo a adaptarse al PCF, incluyendo proteínas que participen en el proceso de remoción del compuesto.

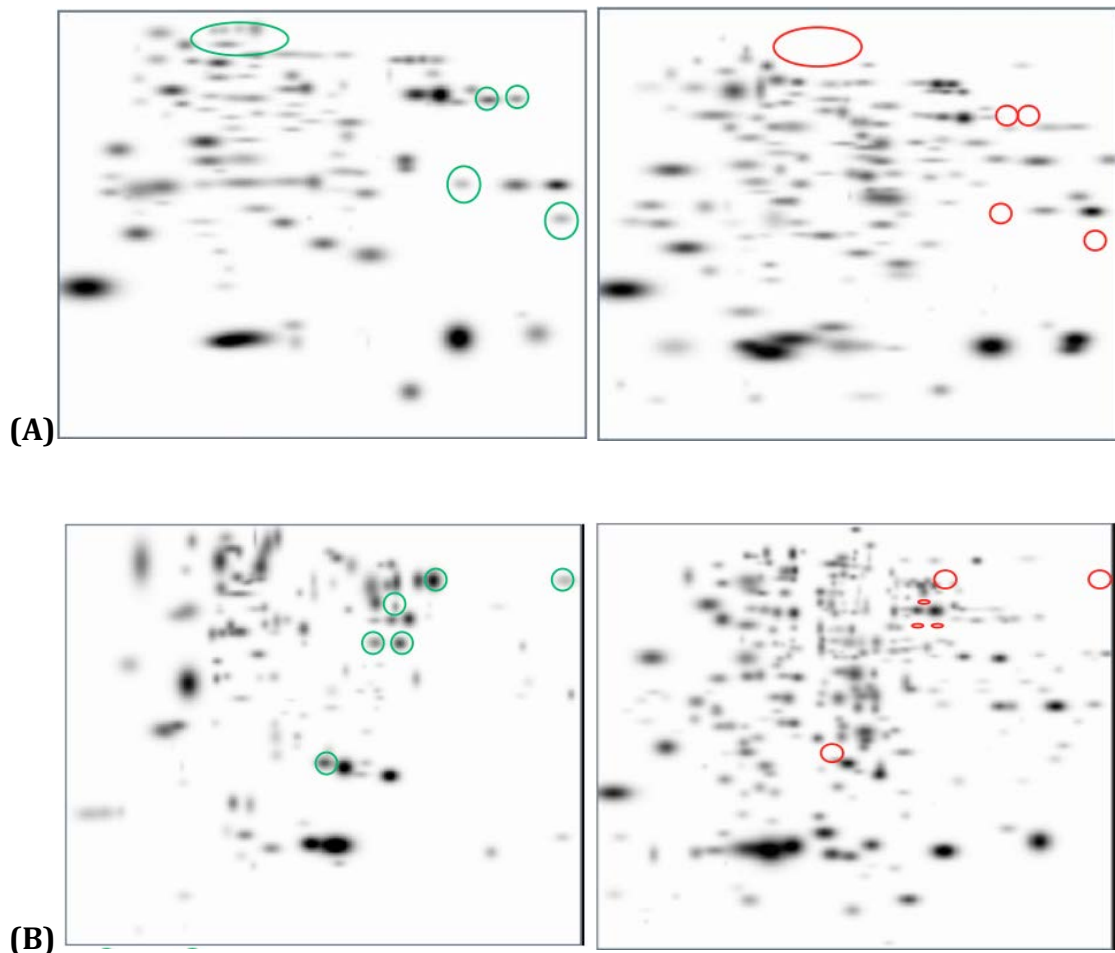


Figura 16. *spots* seleccionados con el software PDQuest para su análisis. **(A)**. 157 horas de crecimiento. **(B)**. 444 horas de crecimiento. Del lado izquierdo de ambas imágenes, se observan los *spots* que se escindieron y mandaron a analizar, correspondientes a los cultivos que se crecieron con PCF. Del lado derecho se observan los geles master correspondientes a los cultivos sin PCF,

los círculos rojos indican la ausencia de los *spots* que no estaban presentes en esa condición.

Se mandaron a analizar también 5 *spots* que en las muestras correspondientes a las 157 horas de crecimiento en cultivos sin PCF y que se dejaron de expresar en los cultivos a los que se adicionó PCF (Fig. 17), con la finalidad de corroborar que esas proteínas están relacionadas con el metabolismo energético del hongo.

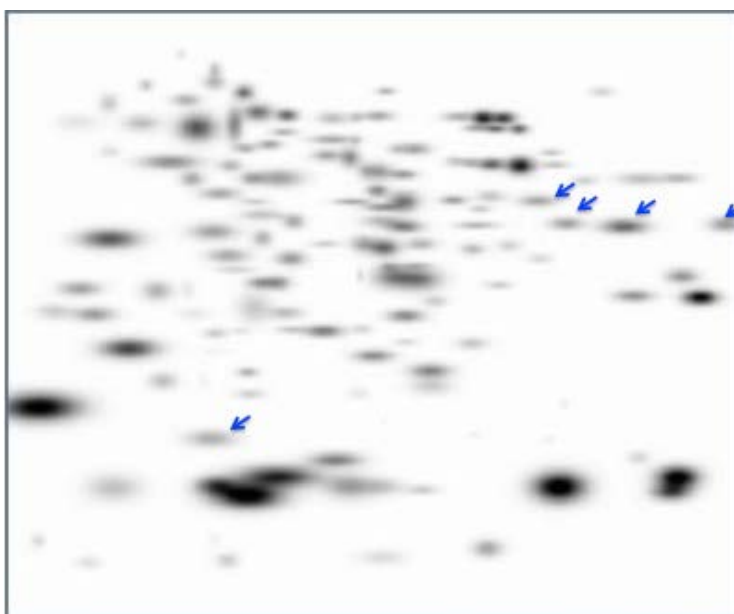


Figura 17. Gel master correspondiente a las 157 horas de cultivo sin PCF. Las flechas representan los *spots* analizados, dichos *spots* están ausentes en las muestras de los cultivos en que fue adicionado PCF.

7.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS POR LC-MS/MS.

De los 20 *spots* que se enviaron para su identificación mediante espectrometría de masas (Fig. 18), 6 de ellos (números 1,2,8,9,12 y 13) no pudieron ser analizados debido a que tenían un tamaño menor a 3x3 milímetros de diámetro, lo que dificulta el tratamiento de los *spots* y no garantiza un buen resultado. Los restantes, 14 *spots*, se identificaron y los resultados de las secuencias obtenidas se muestran en la siguiente sección 7.5.1.

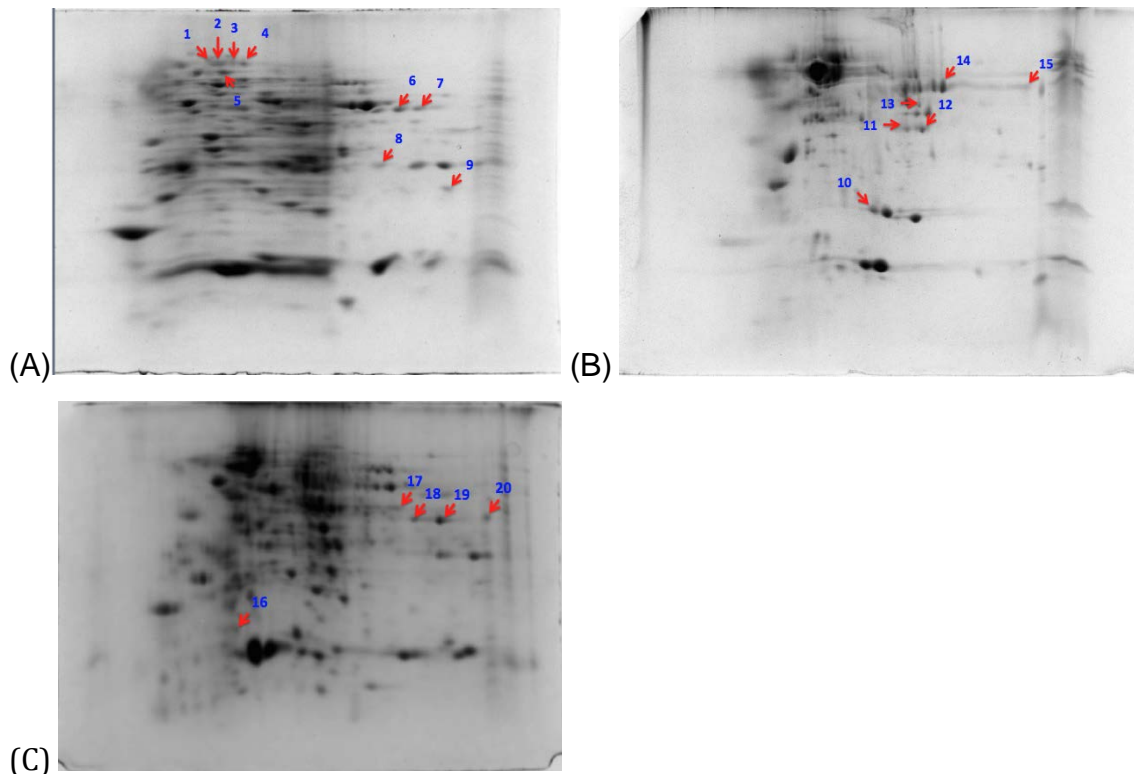


Figura 18. Geles donde se indican los *spots* que se enviaron para el análisis mediante espectrometría de masas, con su número asignado. **(A)** y **(B)**. Representan los *spots* que se expresan solo cuando es adicionado PCF al medio a las 157 y 444 horas respectivamente. **(C)**. Representa el grupo de *spots* que se dejaron de expresar cuando se adicionó PCF, a las 157 horas del cultivo.

7.5.1 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

Los espectros de masas en tándem obtenidos de la fragmentación y secuenciación fueron extraídos y analizados mediante el software Mascot (Matrix Science, London, UK; versión 2.5.1). Mascot es una base de datos creada como punto de referencia para la identificación, caracterización y cuantificación de proteínas a partir de datos de espectrometría de masas.

Las secuencias obtenidas se exportaron y compararon en la base de datos de NCBI *Rhizopus oryzae* taxid 64495, y en la base de datos de hongos en general, debido a que la cepa con que se trabajó, es una cepa aislada y no de colección, y por tanto no corresponde exactamente a la cepa de *R. oryzae* cuyo

genoma esta secuenciado y que está presente en la base de datos. Se realizó la búsqueda en Mascot aplicando los parámetros siguientes: la digestión se llevó a cabo con la endoproteasa tripsina, se permitió una tolerancia de error de masas de 0.60 Dalton para los iones fragmentados y una tolerancia de 10 ppm de los iones péptido, la carbamidometilación de cisteína se especificó como modificación fija y la oxidación de la metionina se especificó como una modificación variable.

Posteriormente, los resultados se validaron de manera manual, tomando en cuenta los siguientes criterios:

Se utilizó el software Scaffold (versión Scaffold_4.4.8, Proteoma Software Inc., Portland, OR) para validar las identificaciones de péptidos y proteínas basados en las secuencias MS/MS. Las identificaciones de los péptidos fueron aceptadas si podían establecerse en más del 95 % de probabilidad por el algoritmo peptid prophet (Keller y col., 2002). La identificación de las proteínas fue aceptada si podían establecerse en más del 99,0 % de probabilidad y contenían al menos 5 fragmentos de péptidos identificados dentro de la secuencia. La probabilidad de que fuera la proteína identificada, se asignó por el algoritmo protein prophet (Nesvizhskii y col., 2003). Las proteínas que contienen péptidos similares y no pueden ser diferenciados en base al análisis MS/MS solo se agruparon para satisfacer los principios de la parsimonia.

Con las especificaciones definidas arriba, se identificaron 24 proteínas. La identificación se obtuvo al comparar las secuencias contra la base de datos de hongos en general, debido a que se obtuvo un mayor porcentaje de cobertura y mayor número de péptidos identificados (Anexo 1), en comparación a la base de datos de *R. oryzae*.

De las proteínas identificadas, 10 corresponden a proteínas que se expresan solo cuando es adicionado PCF al medio, en ambos tiempos, y se muestran en la tabla 10. Catorce corresponden a proteínas que se dejan de expresar después de ser adicionado el PCF a las 157 horas de cultivo, y se muestran en la tabla 11.

Tabla 10. Proteínas que se expresan solo cuando se adiciona PCF al medio de cultivo, indicándose el número de *spot* y el microorganismo al que corresponde la proteína con la cual se obtiene una mayor identidad.

spot número	Tiempo de cultivo (h)	Proteína	microorganismo
3	157	proteína de control de la división celular Dipeptidil peptidasa-5	<i>S. cerevisiae</i> <i>A. nidulans</i>
4	157	proteína de control de la división celular	<i>S. cerevisiae</i>
5	157	Catalasa B	<i>A. nidulans</i>
6	157	Adenosil homocisteinasa ATP sintasa subunidad alfa, mitocondrial	<i>C. albicans</i> <i>S. pombe</i>
7	157	1,3(4)-beta-glucanasa ATP sintasa subunidad alfa, mitocondrial	<i>R. oryzae</i> <i>S. pombe</i>
10	444	Glucoamilasa 1	<i>R. oryzae</i>
11	444	transaldolasa	<i>S. pombe</i>
14	444	Glucoamilasa 1	<i>R. oryzae</i>
15	444	Peroxiredoxina pmp20 1,2-dihidroxi-3-ceto-5-dioxigenasa metiltiopenteno Glucoamilasa 1	<i>A. nidulans</i> <i>A. nidulans</i> <i>R. oryzae</i>

Tabla 11. Proteínas que se expresan en ausencia de PCF en el medio, a las 157 horas de cultivo.

# spot	Proteína	microorganismo
16	Proteína de unión a GTP	<i>A. gossypii</i>
17	Fosfoglicerato quinasa 1 Fosfoglicerato quinasa 2 Fosfoglicerato quinasa 3 Fumarato hidratasa, mitocondrial 2-metilcitrato sintasa, mitocondrial Citrato sintasa	<i>R. niveus</i> <i>R. niveus</i> <i>R. oryzae</i> <i>R. oryzae</i> <i>A. nidulans</i> <i>R. oryzae</i>
18	Peptidil-prolil-cis-transisomerasa D	<i>R. delemar</i>

	Alcohol deshidrogenasa 1	<i>A. nidulans</i>
	Formiato deshidrogenasa	<i>A. nidulans</i>
	Proteína similar a rhizopuspepsina	<i>R. oryzae</i>
19	Aldehído deshidrogenasa	<i>A. nidulans</i>
	Proteína similar a rhizopuspepsina	<i>R. oryzae</i>
20	Piruvato carboxilasa	<i>R. oryzae</i>
	Factor de elongación 1-alfa	<i>R. oryzae</i>
	Aldehído deshidrogenasa	<i>A. nidulans</i>

Se puede observar que proteínas similares fueron identificadas en distintos spots y que presentan actividades funcionales parecidas. Esta característica de encontrar las mismas proteínas expresada en diferentes spots es común en los hongos, y pueden resultar de modificaciones post-traduccionales del mismo gen (proteólisis, glicosilación, fosforilación etc.) (Mann y Jensen, 2003) o de la presencia de isoformas relacionadas con las secuencias codificadas por genes diferentes parálogos (Vodisch y col., 2009), o un mismo gen a través del proceso de splicing alternativo (Chen y col., 2014; Stamm y col., 2010).

Cabe señalar que la presencia de varias proteínas en un mismo spot no permite en algunos casos determinar cuál o cuáles de ellas presentan realmente cambios significativos en su abundancia entre las condiciones estudiadas. Será necesario hacer estudios adicionales para determinar si realmente las proteínas de las tablas 10 y 11 se expresan de manera diferencial en presencia y ausencia de PCF.

7.6 FUNCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Se definió la función de cada una de las proteínas con base en la ontología de los genes (GOA, siglas del inglés Gene Ontology Annotation), utilizando bases de datos como Uniprot, NCBI, GO PANTHER, Quick GO como consulta. Estas bases de datos proporcionan información funcional y acceso a la secuencia de las proteínas con una alta calidad integral y son de libre acceso (Barell y col., 2009).

La ontología de genes (GO) establece descripciones consistentes de los productos génicos anotados en bases de datos diferentes, agrupando tres ontologías que corresponden con tres aspectos diferentes de la biología celular: función molecular, proceso biológico y componente o localización sub-celular. Aunque la GO incluye fundamentalmente conceptos que se refieren al nivel sub-celular y celular, abarca también niveles superiores, como los correspondientes a sistemas órganos y a organismos (Ashburner y col., 2000; Balakrishnan y col., 2013).

Los procesos biológicos (PBs) implican generalmente transformaciones químicas o físicas que ocurren por la acción de un conjunto de funciones moleculares organizadas; es decir, el objeto que va a un PB sufre transformaciones que lo convierten en algo diferente. Los PBs pueden ser de un nivel más elevado o abstracto, como son el “crecimiento celular” o la “transducción de señales”, o de un nivel menor o más específico como son el “metabolismo de pirimidinas” o la “biosíntesis de AMPc”.

La función molecular (FM) describe actividades que ocurren a nivel molecular; sus términos representan a las actividades y no a las entidades (moléculas o complejos moleculares) que llevan a cabo las acciones, sin especificar cuándo, dónde, o en qué contexto ocurren. Para evitar confusiones entre los nombres de los productos génicos y las FMs, muchos términos incorporan la palabra (actividad).

Componente celular (CC) se refiere al espacio celular donde se encuentra el producto génico. Un componente celular puede ser una estructura anatómica, como el retículo endoplasmático, el núcleo celular, o una estructura molecular más simple formada por productos génicos, como un ribosoma o un dímero proteico.

La función molecular, proceso biológico y componente celular de cada una de las proteínas identificadas se describen en el Anexo 2.

7.7 PROTEÍNAS EXPRESADAS SOLO EN PRESENCIA DE PCF

Las proteínas expresadas solo en medios con PCF se clasificaron de acuerdo a su función (Fig. 19).

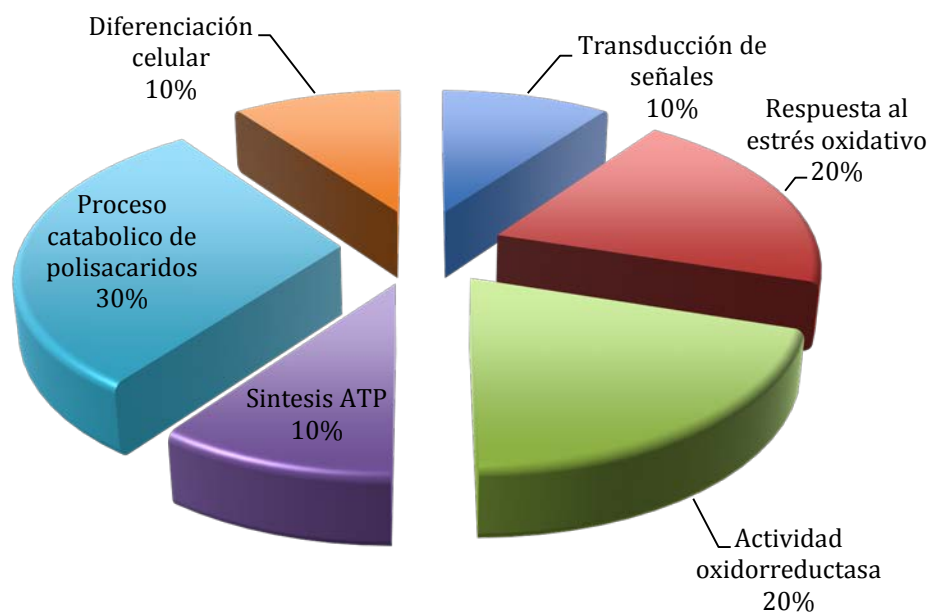


Figura 19. Clasificación funcional de las proteínas identificadas expresadas solo en presencia de PCF.

Dentro de las proteínas que se expresan solo cuando es adicionado el PCF, se encontró que la mayoría están relacionadas con el proceso catabólico de polisacáridos, respuesta al estrés oxidativo y proteínas con actividad oxidorreductasa (40 %). Estas últimas eran esperadas, ya que la degradación de PCF debería incluir actividades oxidasa. Además, los metabolitos encontrados por León-Santesteban y col. (2014), producto de la degradación del PCF por *R. oryzae*, suponen la presencia de enzimas especializadas en dicha función. Harms y col., (2011) reportaron que enzimas como monooxigenasas, fenoloxidasas, deshalogenasas y transferasas están involucradas en procesos de biorremediación.

7.7.1 PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESO CATABÓLICO DE POLISACÁRIDOS.

La glucoamilasa (GA), que se encontró en más de un *spot*, es una enzima de tipo hidrolasa (exo), cataliza la liberación de β -D-glucosa de los extremos no reductores de almidón y sustratos relacionados hidrolizando los enlaces alfa-1,4 y alfa-1,6 glucosídicos (Coutinho y Reilly, 1997; Sauer y col., 2000). La GA es una proteína modular que consiste en un dominio catalítico C-terminal, clasificado como un miembro de la familia de las glucósido hidrolasas 15, además presenta un dominio de unión a almidón (Henrissat, 1991). La mayoría de los dominios de unión a almidón conocidos en las GAs se encuentran en el extremo C-terminal, pero en *R. oryzae* se encuentran en el N-terminal (Ashikari y col., 1986). Dentro de su secuencia presenta múltiples sitios de glicosilación, relacionados con la estabilidad de la enzima (Norouzian y col., 2006), además de la presencia de una secuencia señal en el extremo N-terminal. Las proteínas que presentan una secuencia señal generalmente son dirigidas al retículo endoplásmico y, finalmente, destinadas a ser secretadas o ser componente de la membrana celular.

Se identificó una β -glucanasa perteneciente a la familia de las glucósido hidrolasas 16 (Henrissat, 1991), la cual presenta cierta similitud con la glucoamilasa, es decir, esta enzima presenta actividad hidrolasa, cataliza la hidrólisis de cualquier enlace glicosílico, además de la presencia de una secuencia señal dentro de su secuencia lo que igualmente sugiere que está destinada a ser secretada.

Finalmente se encontró una transaldolasa la cual está implicada en la ruta de las pentosas fosfato en la etapa no oxidativa, transfiere una unidad C3 de la sedoheptulosa-7-fosfato a gliceraldehído-3-fosfato, con lo que se formarán la (tetrosa) eritrosa-4-fosfato, además de uno de los primeros productos finales, la (hexosa) fructosa-6-fosfato, la cual se dirigirá hacia la glucólisis (Miosga y col., 1993). Por otro lado, esta enzima al tener actividad transferasa, puede catalizar la transferencia de un grupo químico, por ejemplo un metilo o un grupo glicosilo a partir de un compuesto donante a un compuesto aceptor, por lo tanto, podría

estar relacionada con la transferencia del grupo metilo en la formación del pentacloroanisol formado durante la vía de degradación del PCF, donde los grupos hidroxilo de los clorefenoles son metilados formando anisoles, como lo propusieron Szewczyc y Dlugonski , (2009).

7.7.2 PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO Y ACTIVIDAD OXIDORREDUCTASA.

El PCF ha sido previamente reportado como causante de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como la per oxidación de lípidos (Dong y col., 2009). La presencia de proteínas relacionadas con una respuesta ante el estrés, sugiere que el PCF desencadena una respuesta de este tipo en *R. oryzae* para contrarrestar la producción de ROS. Tales efectos, como la sobreacumulación y expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, ya se han atribuido con anterioridad al PCF (Fang y col., 2010).

La catalasa B es una enzima antioxidante que tiene la función de proteger a las células de los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno, catalizando la reacción de peróxido a oxígeno molecular y agua, reduciendo o eliminando la toxicidad de los radicales superóxido, peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilo (Bai y Cederbaum, 2001). El peróxido de hidrógeno se produce como consecuencia del metabolismo oxidativo celular a través de los metales de transición. El peróxido de hidrógeno es capaz de dañar una amplia variedad de moléculas dentro de una célula, llevando al estrés oxidativo y a la muerte celular. Las catalasas actúan para neutralizar la toxicidad de peróxido de hidrógeno, y son producidas por todos los organismos aeróbicos que van desde las bacterias hasta el hombre. La peroxirredoxina es una enzima con actividad peroxidasa, cataliza la oxidación de un sustrato mediante la reducción de peróxido a agua (Echalier y col., 2005), y al igual que la catalasa está relacionada con la desintoxicación oxidante celular además de la respuesta celular al estrés osmótico. Se encuentra localizada en los peroxisomas, un pequeño orgánulo eucariota especializado en llevar a cabo reacciones de oxidación. Contiene principalmente peroxidasas, oxidasas y catalasas, la β -oxidación de los ácidos grasos es otra función importante de los

peroxisomas. En las plantas y los hongos esta degradación se produce sólo en este compartimento celular. Ambas proteínas presentan actividad oxidorreductasa.

La adenosil homocisteinasa es una enzima que actúa como inhibidor competitivo de reacciones metil transferasas, por lo tanto, desempeña un papel clave en el control de metilaciones a través de la regulación por concentración intracelular de la misma enzima. Está involucrada en las reacciones químicas que implican la transferencia de unidades de un carbono en varios estados de oxidación, y se encuentra ubicada en el citoplasma de las células. Es una proteína altamente conservada (Sganga y col., 1992) del tipo hidrolasa que interviene en el ciclo del metilo activado, responsable de la hidratación reversible de S-adenosil-L-homocisteína en adenosina y homocisteína, para su actividad es dependiente del cofactor NAD⁺.

La 1,2-dihidroxi-3-ceto-5-dioxigenasa metiltiopenteno es una enzima con actividad oxidorreductasa involucrada en el proceso de biosíntesis de la metionina a partir de 5-metiltioadenosina (MTA). Esta vía es responsable del control estricto de la concentración de MTA, el cual es un potente inhibidor de la biosíntesis de poliaminas y reacciones de transmetilación (Dai y col., 2001).

Ambas enzimas están relacionadas con procesos de metilación, por lo tanto, como anteriormente se describió, podrían estar relacionadas con la formación del pentacloroanisol a partir del PCF.

7.7.3 OTRAS PROTEÍNAS EXPRESADAS EN PRESENCIA DE PCF.

Además de las proteínas previamente descritas se encontraron otras con funciones variables. Por ejemplo, la proteína relacionada con el control de la división celular, que está involucrada en el desmontaje del cabezal, la degradación de las proteínas ubiquitinadas y exportación de proteínas mal plegadas desde el retículo endoplásmico al citoplasma. Actúa como una chaperona que recoge sustratos ubiquitinados. Tiene un papel en la vía de degradación asociada al retículo endoplasmático asociado (ERAD). Es un

componente del complejo de control de calidad ribosomal (RQC), un complejo de ribosomas asociados que media la ubiquitinación y la extracción de las cadenas nacientes sintetizadas de forma incompleta para la degradación proteasomal (Brandman y col., 2012). Esta proteína además está relacionada con la respuesta a estímulos externos, provocando la autofagia, proceso en el que las células digieren partes de su propio citoplasma, permitiendo así el reciclado de los componentes macromoleculares en condiciones de estrés celular y remodelación de la estructura intracelular para la diferenciación celular. Presenta sitios conservados relacionados con actividad ATPasa asociados a una amplia variedad de actividades celulares, como el transporte de las proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico hacia el citoplasma, para ser degradadas por el proteasoma (Ye y col., 2001). Como se verá más adelante, el PCF afecta a enzimas cuya función está relacionada con el plegamiento de las proteínas para su correcto funcionamiento, por lo que podemos suponer que esta proteína se expresa como consecuencia del incorrecto funcionamiento intracelular provocado por el PCF.

Se encontró una probable dipeptidil peptidasa la cual es una aminopeptidasa extracelular que elimina residuos de aminoácidos N-terminales de una cadena polipeptídica. Pertenece a la familia de las serina peptidasas, presenta múltiples sitios de glicosilación, es ubicua y se encuentra en los virus, bacterias y eucariotas (Rawlings y Barrett, 1994).

También se identificó una ATP sintasa subunidad alfa mitocondrial, la cual es una proteína implicada en el transporte de iones de hidrógeno a través de la membrana interna de las mitocondrias, y se utiliza para procesos como la síntesis de ATP, y en bacterias para la rotación flagelar (Futai y col., 1989). Carvalho y colaboradores (2013) reportaron la capacidad que tiene el PCF para desacoplar la fosforilación oxidativa llevada a cabo en la mitocondria, incrementando así la demanda de energía, lo que se puede relacionar con la sobreexpresión de la ATP sintasa en presencia de PCF.

7.8 PROTEÍNAS CUYA EXPRESIÓN SE REPRIME EN PRESENCIA DE PCF

Se encontró que la mayoría de las proteínas que se dejan de expresar al momento de adicionar PCF al medio de cultivo corresponden a proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos. Se realizó una clasificación específica indicando el proceso celular en el que están involucradas (Fig. 20).

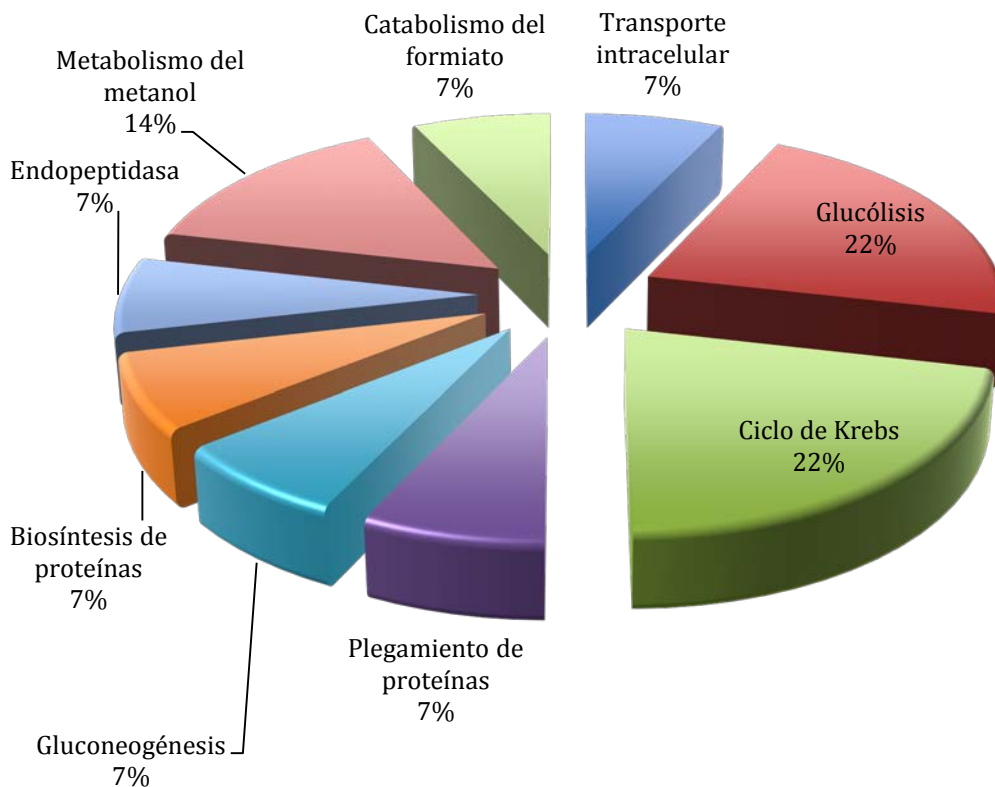


Figura 20. Clasificación funcional de las proteínas que se identificaron como aquellas que no se expresan en presencia de PCF en el medio de cultivo.

La mayoría de las proteínas que no se expresan cuando es adicionado el PCF están relacionadas con el metabolismo energético del hongo. Por ejemplo, la fosfoglicerato quinasa la cual cataliza la segunda etapa en la segunda fase de la glucólisis, la conversión reversible de 1,3-difosfo-glicerato a 3-fosfoglicerato con generación de una molécula de ATP, durante la glucólisis. Esta enzima se encuentra en todos los organismos vivos y su secuencia ha sido altamente conservada durante la evolución (Watson y Littlechild, 1990).

También se dejan de expresar enzimas pertenecientes al ciclo de Krebs, como la fumarasa y la citrato sintasa. Como se sabe el ciclo de Krebs se lleva a cabo en la matriz mitocondrial y es necesario para la producción de energía utilizable en forma de GTP y poder reductor NADH y FADH₂ empleado en la fosforilación oxidativa para la síntesis de ATP. Además, el ciclo de Krebs proporciona precursores para muchas biomoléculas, por ejemplo, los aminoácidos (Lowenstein, 1969; Krebs y Weitzman, 1987).

Se observó que las peptidil-prolil-cis-transisomerasa y rhizopuspepsina dejaron de expresarse en presencia del PCF. La peptidil-prolil-cis-transisomerasa es una enzima de tipo rotamasa, la cual acelera el plegamiento de proteínas al catalizar la isomerización cis-trans de los enlaces peptídicos de prolina en oligopéptidos (Fischer y Schmid, 1990). El factor de elongación 1-alfa se asocia con los ribosomas cíclicamente durante la fase de elongación de la síntesis de proteínas, y cataliza la formación del enlace acilo entre el residuo de aminoácido de entrada y de la cadena peptídica (Leblanc y col., 1988). La rhizopuspepsina, presenta actividad endopeptidasa del tipo aspartil proteasa. Las aspartil proteasas constituyen una familia ampliamente distribuidas de enzimas proteolíticas, se sabe que están presentes en hongos y presentan un pro-péptido, que es una parte de la proteína que se escinde para su maduración o activación (Davies, 1990). Estas enzimas están relacionadas en la síntesis, plegamiento y función catalítica de las proteínas, por lo que se puede decir que la exposición al PCF afecta varios procesos relacionados con la funcionalidad de las proteínas, y por lo tanto con el metabolismo del microorganismo.

La falta de expresión de estas enzimas se relaciona probablemente con el hecho de que el hongo deja de crecer al momento de ser adicionado el PCF al medio de cultivo induciéndose la fase estacionaria. Además, se han reportado los efectos tóxicos del PCF, y la capacidad que tiene para desacoplar el proceso de la fosforilación oxidativa llevado a cabo en la mitocondria (Fernández y col., 2005; Bostrom y Johansson, 1972), inhibiendo de esa manera la síntesis de ATP por ambos procesos y, por lo tanto, el crecimiento del microorganismo.

8. CONCLUSIONES.

- ❖ Se demostró que hay un cambio en la expresión de las proteínas intracelulares del hongo por la presencia del PCF, encontrándose que hay *spots* que se dejan de expresar después de adicionar éste al medio de cultivo, así como proteínas que solo se expresan en presencia del PCF, en ambos tiempos de muestreo.
- ❖ Con base en las proteínas identificadas en cultivos a los que se les adicionó el PCF, se puede concluir que el contaminante altera el metabolismo del hongo, provocando una respuesta ante el estrés oxidativo.
- ❖ Una amplia variedad de proteínas relacionadas con el metabolismo energético de *R. oryzae* se ven afectadas al momento de adicionar el PCF, lo que podría estar relacionado con la detención del crecimiento del hongo.
- ❖ Se encontraron, en presencia del PCF, una oxidorreductasa que probablemente se está expresando como respuesta a la presencia de un tóxico, y enzimas relacionadas con la transferencia de grupos metilo, las cuales pueden estar involucradas en la formación del pentacloroanisol, uno de los metabolitos encontrados como producto de degradación del PCF.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aebersold R, Mann M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422:198-207.
2. Aitken, MD. 1993. Waste treatment applications of enzymes; opportunities and obstacles. *The Chem. Eng. J.* 52:49-58.
3. Amedioha AC. 1993. Production of cellolytic enzymes by *Rhizopus oryzae* in culture and *Rhizopus*-infected tissues of potato tubers. *Mycologia* 85:574–578.
4. Amadioha AC. 1998. Effect of cultural conditions on the growth and amyolytic enzyme production by *Rhizopus oryzae*. *Acta Phyto- pathol Hun* 33:115–121.
5. Anderson NL, Matheson AD, Steiner S. 2000. Proteomics: applications in basic and applied biology. *Curr Opin Biotech* 11:408-412.
6. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DDP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 25(1):25-9.
7. Ashikari T, Nakamura N, Tanaka Y, Kiuchi N, Shibano Y, Tanaka T, Amachi T, Yoshizumi H. 1986. *Rhizopus* raw-starch-degrading glucoamylase: its cloning and expression in yeast. *Agric. Biol. Chem.* 50:957-964.
8. Bai I, Cederbaum AL. 2001. Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biological Signals and Receptors.* 10:189-199.
9. Bakir U, Yavascaoglu S, Guvenc F, Ersayin A. 2001. An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enzyme Microb Tech* 29:328–334.
10. Balakrishnan R, Harris MA, Huntley R, Van Auken K, Cherry JM. 2013. A guide to best practices for Gene Ontology (GO) manual annotation. Database (Oxford).
11. Ban K, Kaieda M, Matsumoto T, Kondo A, Fukuda H. 2001. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Bio- chem Eng J* 8:39–43.

12. Barrell D, Dimmer E, Huntley RP, Binns D, O'Donovan C, Apweiler R. 2009. The GOA database in 2009--an integrated Gene Ontology Annotation resource. *Nucleic Acids Res.* 37:396-403.
13. Bostrom SL, Johansson RG. 1972. Effects of pentachlorophenol on enzymes involved in energy metabolism in liver of eel. *Comp Biochem Physiol.* 41:359-69.
14. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
15. Brandman O, Stewart-Ornstein J, Wong D, Larson A, Williams CC, Li GW, Zhou S, King D, Shen PS, Weibezahn J, Dunn JG, Rouskin S, Inada T, Frost A, Weissman JS. 2012. A ribosome-bound quality control complex tiggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell.* 151(5):1042-1054.
16. Bravo R, Celis JE. (Eds), 1984. *Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins*, Academic Press, Orlando, FL, USA.
17. Bumpus JA. 1993. White-rot fungi and their potential use in soil bioremediation processes. In *soil biochemistry*. Ed. Bollag JM, Marcel Dekker INC. 65-100.
18. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. 2004. Blue Silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25:1327-1333.
19. Carta FS, Soccol CR, Ramos LP, Fontana JD. 1999. Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. *Bioresource Technology* 68(1):23-28.
20. Carvalho MB, Martins I, Medeiros J, Tavares S, Planchon S, Renaut J, Núñez O, Gallart-Ayala H, Galceran MT, Hursthouse A, Pereira CS. 2013. The response of *Mucor plumbeus* to pentachlorophenol: A toxicoproteomics study. *Journal of proteomics.* 78:159-171.
21. Carvalho MB, Tavares S, Medeiros J, Nunez O, Gallart-Ayala H, Leitao MC, Galceran MT, Hursthouse A, Pereira CS. 2011. Degradation pathway of pentachlorophenol by *Mucor plumbeus* involves phase II conjugation and oxidation-reduction reactions, *J. Hazard. Mater.*, 198:133-142.
22. Celis JE, Ostergard M, Jense NA. et al. 1998. Human and mouse Proteomic databases: novel resourses in the protein universe. *Federation of European Biochem. Societies.* 430:24-72.

23. Chen L, Bush SJ, Tovar-Corona JM, Castillo-Morales A, Urrutia AO. 2014. Correcting for differential transcript coverage reveals a strong relationship between alternative splicing and organism complexity. *Mol Biol Evol.* 31(6):1402-1413.
24. Chojnacka K. 2010. Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications, *Environ. Int.*, 36:299-307.
25. Commandeur LCM, Parsons JR. 1991. Degradation of halogenated aromatic compounds. *Biodegradation.* 1:207-220.
26. Compton SJ, Jones CG. 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem.* 151:369-374.
27. Coutinho PM, Reylly PJ. 1997. Glucoamylase structural, functional and evolutionary relationship. *Proteins.* 29:334-347.
28. Crosby DG. 1981. IUPAC Reports on pesticides (14) Environmental chemistry of pentachlorophenol, *Pure Appl. Chem.*, 53:1051-1080.
29. Dai Y, Pochapsky TC, Abeles RH. 2001. Mechanistic Studies of Two Dioxygenases in the Methionine Salvage Pathway of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemistry.* 40:6379-6387.
30. Davies DR. 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Chem.* 19:189-215.
31. Demers PA, Davies HW, Friesen MC, Hertzman C, Ostry A, Hershler R, Teschke K. 2006. Cancer and occupational exposure to pentachlorophenol and tetrachlorophenol (Canada), *Cancer Causes Control*, 17:749-758.
32. Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:143-152.
33. Dyballa N, Metzger S. 2009. Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in polyacrylamide gels. *JoVE.* 30:3791-1431.
34. Domsch KH, Gams W, Anderson TH. 1980. *Compendium of Soil Fungi.* Academic Press, London 1:703
35. Dong YL, Zhou PJ, Jiang SY, Pan XW, Zhao XH. 2009. Induction of oxidative stress and apoptosis by pentachlorophenol in primary cultures of *Carassius carassius* hepatocytes. *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol.* 150:179-85.
36. Echalié A, Trivelli X, Corbier C, Rouhier N, Walker O, Jacqout JP, Aubry

- A, Krimm I, Lancelin JM. 2005. Crystal structure and solution NMR dynamics of a D (type II) peroxiredoxin glutaredoxin and thioredoxin dependent: a new insight into the peroxiredoxin oligomerism. *Biochemistry*. 44(6):1755-1767.
37. Ehrenberg CG. 1820. De Mycetogenesi como Acad. CLCNC praesidem Epístola. *Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldino Carolinae Germanicae Naturae Curiosorum* 10:159-222.
38. Eriksson KI, Blanchette RA, Agner P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Berlin Germany, pp. 225-233.
39. Escher BI, Snozzi M, Schwarzenbach RP. 1996. Uptake, speciation, and uncoupling activity of substituted phenols in energy transducing membranes, *Environ. Sci. Technol.*, 30:3071-3079.
40. Fang Y, Gao X, Zha J, Ning B, Li X, Gao Z. 2010. Identification of differential hepatic proteins in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to pentachlorophenol (PCP) by proteomic analysis. *Toxicol.* 199:69-79.
41. Fazekas de St Groth S, Webster RG, Datyner A. 1963. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim. Biophys.* 71:377-391.
42. Fernández A, Yarto M, Castro J. 2004. Listado adicional al Convenio de Estocolmo. Plaguicidas. Las sustancias tóxicas persistentes. Del Pont, R.M. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT), México, D.F. 97-98.
43. Fernández-Acero FJ, Jorge I, Calvo E, Vallejo I, Carbúl M, Camafeita E, López JA, Cantoral JM, Jorrín J. 2006. Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics*. 6:88-96.
44. Fernández FP, Labrador V, Pérez-Martín JM, Hazen MJ. 2005. Cytotoxic effects in mammalian vero cells exposed to pentachlorophenol. *Toxicology*. 210:37-44.
45. Fhar K, Wetzstein HG, Gry R, Schlosser D. 1999. Degradation of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two Brown rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 175: 127-132.
46. Fischer G, Schmid FX. 1990. The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry*. 29:2205-2212.

47. Futai M, Noumi T, Maeda M. 1989. ATP synthase (H⁺-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Biochem.* 58:111-136.
48. Gariglio P. et al., 2010. Salud de las Mujeres, Cáncer, Biología molecular, Génómica y Proteómica. Instituto de ciencia y tecnología del D.F. UACM.
49. Geyer HJ, Scheunert I, Korte F. 1987. Distribution and bioconcentration of the environmental chemical pentachlorophenol (PCP) in different tissues of humans, *Chemosphere*, 16:887-899.
50. Gil C. 2003. La metodología proteómica: una herramienta para la búsqueda de función. *Actualidad.* 35:12-20.
51. Hang R-cYaYD. 1989. Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology Letters* 11(8):597-600.
52. Harms H, Schlosser D, Wick LY. 2011. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol.* 9:177-92.
53. Hattemer-Frey HA. 1989. Travis C.C, Pentachlorophenol: environmental partitioning and human exposure, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18:482-489.
54. Henrissat BA. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280:309-316.
55. Hesseltine CW. 1983. Microbiology of oriental fermented foods. *Ann. Rev. Microbiol* 37:575-601.
56. Ibrahim AS. 2011. Host cell invasion in mucormycosis: role of iron. *Curr Opin Microbiol* 14:406–411.
57. Jami MS, Barreiros C, García-Estrada C, Martín J. 2010a. Proteome Analysis of the Penicillin Producer *Penicillium chrysogenum*. *Molecular & Cellular Proteomics.* 9: 1182-1198.
58. Jami MS, Barreiros C, García-Estrada C, Barreiro C, Cuadrado A, Salehi-Najafabadi Z, Martín J. 2010b. The *Penicillium Chrysogenum* Extracellular Proteome. Conversion from a Food-rotting Strain to a Versatile Cell Factory for White Biotechnology. *Molecular & Cellular Proteomics.* 9: 2729-2744.
59. Karlson U, Rojo F, van Elsas J, Moore E. 1995. Genetic and serological evidence for the recognition of four pentachlorophenol-degrading

- bacterial strains as a species of the genus *Sphingomonas*. System Appl. Microbiol. 18: 539-548.
60. Karmakar M, Ray RR. 2010. Extra cellular endoglucanase production by *Rhizopus oryzae* in solid and liquid state fermentation of agro wastes. Asian J Biotechnol. 2:27–36.
61. Keller A, Nesvizhskii AL, Kolker E, Aebersold R. 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptid identifications made by MS/MS and database search. Anal Chem. 74(20):5383-5392.
62. Klein JA, Lee DD. 1987. Biological treatment of aqueous wastes from coal conversion processes. Biotechnol. Bioeng. Symp. 8: 379-390.
63. Krebs HA, Weitzman PDJ. 1987. Krebs citric acid cycle: Half a century and still turning. Londres: Biochemical Society. ISBN 0-904498-22-0.
64. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.
65. Lau A, He Q, Chiu J. 2003. Proteomic Technology and its biomedical application. Acta Biochemical et Biophysical. 35:965-975.
66. Lee SG, Ion BD, Park YH, Oh M. 1998. Isolation of a novel pentachlorophenol-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. Bu34. J. Appl. Microbiol. 85:1-8.
67. Leblanc DJ, Lee LN, Titmas BM, Smith CJ, Tenover FC. 1988. Sequence analysis Nucleotide gene of tetracycline resistance *teto* *Streptococcus mutans* DLS. J. Bacteriol. 170:3618-3626.
68. León-Santiesteban, Bernal R, Fernández F, Tomasini A. 2008. Tyrosinase and peroxidase production by *Rhizopus oryzae* strain ENHE obtained from pentachlorophenolcontaminated soil, J. Chem. Technol. Biotechnol., 83:1394-1400.
69. León-Santiesteban, 2008, Contribución al estudio bioquímico del zigomiceto Ñ, Tesis de especialidad, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., 21pp.
70. León-Santiesteban H., 2010, Inmovilización de *Rhizopus oryzae* ENHE, Tesis Doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., 54-70.
71. León-Santiesteban H. 2014. Estudio de los mecanismos de remoción de pentaclorofenol por *Rhizopus oryzae* ENHE, Tesis Doctoral, Universidad

- Autónoma Metropolitana, México D.F., 70-102.
72. Leung KT, Tresse O, Errampalli D, Lee H, Trevors JT. 1997. Mineralization of p-nitrophenol by pentachlorophenol-degrading *Sphingomonas* sp. FEMS Microbiol. Lett. 155:107-114.
73. Linda B, Gaetano P. 2015. Methodologies and Perspectives of Proteomics Applied to Filamentous Fungi: From Sample Preparation to Secretome Analysis. Int. J. Mol. Sci. 16:5803-5829.
74. Lowenstein JM. 1969. Methods in Enzymology, Vol. 13: Citric Acid Cycle. Boston: Academic Press. ISBN 0-12-181870-5.
75. Maas RHW, Bakker RR, Eggink G, Weusthuis RA. 2006. Lactic acid production from xylose by the fungus *Rhizopus oryzae*. Appl Microbiol Biot 72:861–868.
76. Mann M, Jensen ON. 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. Nat Biotechnol 21:255-61.
77. Marcial J, Barrios-González J, Tomasini A. 2006. Effect of medium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid-state culture. Process Biochemistry. 41 496-500.
78. Meissner T, Schweinsberg F. 1996. Pentachlorophenol in the indoor environment: Evidence for a correlation between pentachlorophenol in passively deposited suspended particulate and in urine of exposed persons, Toxicol. Lett., 88:237-242.
79. Miosga T, Schaaff-Gerstenschlager I, Franken E, Zimmermann FK. 1993. Lysine 144 is essential for the catalytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* transaldolase. Yeast. 9(11):1241-9.
80. Montiel AM, Fernández FJ, Marcial J, Soriano J, Barrios-González J, Tomasini A. 2004. A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. Biotechnology Lett. 26:1353-1357.
81. Moreira MT, Feijoo G, Sierra-Alvarez R, Lema J, Field JA. 1997. Biobleaching of oxygen delignified Kraft pulp by several white rot fungal strains. J. Biotechnol. 53:237-251.
82. Murashima K, Nishimura T, Nakamura Y, Koga J, Moriya T, Sumida N, Yaguchi T, Kono T. 2002. Purification and characterization of new endo-1,4- β -D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. Enzyme Microb Tech 30:319–326
83. Nakagawa A, Osawa S, Hirata T, Yamagishi Y, Hosoda J, Horikoshi T. 2006. 2,4-dichlorophenol degradation by the soil fungus *Mortierella* sp., Biosci. Biotechnol. Biochem., 70:525-527.

84. Nesvizhskii AL, Keller A, Kolker E, Aeberold R. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 75(17):4646-4658.
85. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9:255-262.
86. Nicell JA, Al-Kassim L, Bewtra JK, Taylor KE. 1993. Wastewater treatment by enzyme catalized polimeritation and precipitation. *Biorremediation Abstracts.* 7:1-8.
87. Nohynek LJ, Suhonen EL, Nurmiaho-Lassila EL, Salkinoja-Salonen M. 1996. Description of four pentachlorophenol-degrading bacterial strains as *Sphingomonas chlorophenolica* sp. Nov. *System Appl. Microbiol.* 18:527-538.
88. Norouzian D, Akbarzadeh A, Scharer JM, Moo-Young M. 2006. Fungal Glucomylases. *Biotechnol. Adv.* 1:80-85.
89. OFarrell PH. 1975. Two dimensional electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
90. O'Reilly KT, Crawford RL. 1989. Degradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized *Flavobacterium* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2113-2118.
91. Park EY, Anh PN, Okuda N. 2004. Bioconversion of waste office paper to L-(+)-lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technol* 93:77-83.
92. Pfender WF, Maggard SP, Gander LK, Watrud LS. 1997. Comparison of three bioremediation agents for mineralization and transformation of pentachlorophenol in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59:230-237.
93. Poon T, Johnson P. 2001. Proteome analysis and its impact on the discovery of serological tumor markers. *Elsevier Science*; 231-239.
94. Prescott SC, Dunn CG. 1959. *Industrial microbiology*, 3rd edn. McGraw-Hill, New York.
95. Prince RC. 2003. *Bioremediation: An overview of how microbiological process can be applied to the cleanup of organic and inorganic*

- environmental pollutants. Encyclopedia of Environmental Microbiology.
96. Rabilloud T, Lelong C. 2011. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics*. 74:1829-1841.
97. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics*. 73:2064-2077.
98. Rabinovich ML., Boloboba AV, Vasil'chenko LG. 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and Xenobiotics: A review. *Appl. Biochem. and Microbiol.* 40:5-23.
99. Radehaus PM, Schmidt SK. 1992. Characterization of a novel *Pseudomonas* sp. that mineralizes high concentrations of pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2879-2885.
100. Rawlings ND, Barrett AJ. 1994. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.* 244:19-16.
101. Reedy CA. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnol.* 6:320-328.
102. Resnick SM, Chapman PJ. 1994. Physiological properties and substrate specificity of a pentachlorophenol-degrading pseudomonas species. *Biodegradation.* 5:47-54.
103. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. 2000. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev* 13(2):236-301.
104. Riegert U, Heiss G, Fischer P, Stolz A. 1998. Distal clavage of 3-catechol by an extradiol dioxygenase to 3-chloro-2-hydroxamic semialdehyde. *J. Bacteriol.* 180: 2849-2853.
105. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, Sein M, Sein T, Chiou CC, Chu JH, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. 2005. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis* 41:634–653
106. Roy JI. 1997. Pentachlorophenol. *Environmental contaminants encyclopedia.* Compilers/editor.
107. Saito K, Kawamura Y, Oda Y. 2003. Role of the pectinolytic enzyme in the lactic acid fermentation of potato pulp by *Rhizopus oryzae*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30(7):440-444.
108. Sauer J, Sigurskjold BW, Christensen U, Frandsen TP, Mirgorodskaya E, Harrison M, Roepstorff P, Svensson B. 2000.

- Gluamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochim. Biophys.* 1543:275-293.
109. Schipper MAA, Samson RA. 1994. Miscellaneous notes on *Mucolaceae*. *Mycotaxon.*, 50:475-491.
110. Scott RN, Cameron DM, Aust D. 2003. Fungi for Biotechnology. *Encyclopedia of environmental Microbiology*.
111. Seiler JP. 1991. Pentachlorophenol, *Mutat. Res.*, 257:27-47.
112. Sganga MW, Aksamit RR, Cantoni GL, Bauer CE. 1992. Mutational and nucleotide sequence analysis of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Rhodobacter capsulatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 :63286332.
113. Sing BK, Kuhad RC, Singh A, Lal R, Tripathi KK. 1999. Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 19:197-225.
114. Skory CD. 2000. Isolation and expression of lactate dehydrogenase genes from *Rhizopus oryzae*. *Appl Environ Microb* 66:2343– 2348.
115. Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj TA, Soreq H. 2005. Function of alternative splicing. *Gene.* 344:1-20.
116. Szewczyk R, Bernant P, Milczarek K, Dlugonski J. 2003. Application of microscopic fungi isolated from polluted industrial areas for polycyclic aromatic hydrocarbons and pentachlorophenol reduction. *Biodegradation.* 14:1-8.
117. Szewczyk R, Dlugonski J. 2009. Pentachlorophenol and spent engine oil degradation by *Mucor ramosissimus*, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 63:123-129.
118. Takahashi T, Tsuchida Y, Irie M. 1978. Purification and some properties of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* species. *J Biochem* 84(5):1183-1194.
119. Thongchul N, Navankasattusas S, Yang ST. 2010. Production of lactic acid and ~~*Rhizopus*~~ *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. *Bioprocess Biosyst Eng* 33(3):407-416.

120. Tomasini A, Flores V, Cortés D, Barrios-González J. 2001. An isolate of *Rhizopus nigricans* capable of tolerating and removing pentachlorophenol. *World J. Microbiol. and Biotechnol.* 17:201-205.
121. Turco R. 2003. Soil Microorganisms: role in biodegradation. *Encyclopedia of Environmental Microbiology.*
122. Vaidyanathan VG, Villalta PW, Sturla SJ. 2007. Nucleobase-dependent reactivity of a quinone metabolite of pentachlorophenol, *Chem. Res. Toxicol.*, 20:913-919.
123. Vodisch M, Albrecht D, Lebing F, Schmidt AD, Winkler R, Guthke R. 2009. Two-dimensional proteome reference maps for the human pathogenic filamentous *Aspergillus fumigatus*. *Proteomics.* 9:1407-15.
124. Wang JL, Chen C. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future, *Biotechnol. Adv.*, 27:195-226.
125. Washburn MP, Wolters D, Yates JR. 2001. 3rd Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 19:242-247.
126. Watson HC, Littlechild JA. 1990. Isoenzymes of phosphoglycerate kinase: evolutionary conservation of the structure of this glycolytic enzyme. *Biochem. Soc. Trans.* 18:187-190.
127. Wegman RC, Hofstee AW. 1979. Chlorophenol in water of the Netherlands. *Water Research.* 13:651-657.
128. Weinbach EC. 1954. The effect of pentachlorophenol on oxidative phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, 210:545-550.
129. Weinbach EC. 1956. Biochemical basis for the toxicity of pentachlorophenol, *Science*, 124:940-940.
130. Weitzman I, Mcgough DA, Rinaldi MG, Della-Latta P. 1996. *Rhizopus schipperae* sp. nov. A new agent of zygomycosis. *Mycotaxon.*, 59:217-225.
131. White DC, Sutton SD, Ringelberg DB. 1996. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:301-306.
132. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sánchez JC. 1996. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/Technol* 14:61-65.

133. Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA. 2001. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature*. 414:652-656.
134. Yin P, Nishina N, Kosakai Y, Yahiro K, Park Y, Okabe M. 1997. Enhanced production of L-(+)-lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor. *J Ferment Bioeng* 84:249–253
135. Yuan GF, Jong SC. 1984. A new azygosporic species of *Rhizopus*. *Mycotaxon.*, 20:397-400.
136. Zablotowicz RM, Albert T, Hall JC, Veldhuis L, Locke MA, Hoagland RE, Lee H, Trevors JT, Kloth RH, Duke MV. 1998. Bacterial transformation of the dinitroherbicides trifluralin and dinoseb by aromatic nitroreduction. IUPAC 9th International Congress Pestic. Chem. Book. of Abstracts 2. Abs No. 6C.-030.

ANEXOS

1. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS APLICANDO LOS CRITERIOS DE VALIDACIÓN ESTABLECIDOS.

# spot	Proteína	clave de acceso	#Péptidos	#Unico de espectros	#espectros	%Cobertura	# Aminoácidos	P. M.
3	Proteína de control de la división celular	CDC48_YEAST	8	11	18	10	835	92 kDa
	Probable dipeptidil peptidasa-5	DPP5_EMENI	12	14	25	19	722	79.5 KDa
4	Proteína de control de la división celular	CDC48_YEAST	6	7	13	9	835	92 kDa
5	Catalasa B	CATB_EMENI	37	41	78	50	722	79 KDa
6	Adenosil homocisteinasa	SAHH_CANAL	5	8	12	7	450	49 KDa
	ATP sintasa sub-alfa, mitocondrial	ATPA_SCHPO	5	6	10	8	536	58.6 KDa
7	1,3(4)- β -glucanasa	33519210	3	3	5	10	315	34 KDa
	ATP sintasa sub-alfa, mitocondrial	ATPA_SCHPO	11	13	26	17	536	58.6 KDa
10	Glucoamilasa 1	AMYG_RHIOR	11	13	25	19	604	65 KDa
11	Transladolasa	TAL1_SCHPO	1	1	2	2	322	35.2 KDa
14	Glucoamilasa 1	AMYG_RHIOR	43	76	947	54	604	65 KDa
15	Peroxiredoxina	PMP20_EMENI	11	12	19	79	168	18.5 KDa
	1,2-dihidroxi-3-ceto-5-dioxigenasa metiltiopenteno	MTND_EMENI	9	11	20	49	178	21 KDa
	Glucoamilasa 1	AMYG_RHIOR	40	63	239	49	604	65 KDa
16	Proteína de unión a GTP	YPT1_NEUCR	7	8	13	32	203	22.5 KDa
17	Fosfoglicerato quinasa 1	PGK1_RHINI	20	27	75	73	417	44.6 KDa

	Fosfoglicerato quinasa 2	PGK2_RHINI	42	70	299	87	417	44.6 KDa
	Fosfoglicerato quinasa 3	82658794	32	50	235	56	416	44.5 KDa
	Fumarato hidratasa, mitocondrial	FUMH_RHIOR	19	19	35	51	494	53 KDa
	2-metilcitrato sintasa, mitocondrial	PRPC_EMENI	41	62	130	86	460	50.6 KDa
	Citrato sintasa	300078724	29	50	113	65	472	52.3 KDa
18	Peptidil-prolil-cis-transisomerasa D	PPID_RHIO9	14	17	29	45	364	40.4 KDa
	Alcohol deshidrogenasa 1	ADH1_EMENI	11	13	24	37	350	37.1 KDa
	Formiato deshidrogenasa	FDH_EMENI	13	20	38	52	365	40.1 KDa
	Rhizopuspepsina proteína similar	219958077	17	20	44	52	390	41.2 KDa
19	Aldehído deshidrogenasa	ALDH_EMENI	13	13	22	29	497	54 KDa
	Rhizopuspepsina proteína similar	219958077	14	16	35	48	390	41.2 KDa
20	Piruvato carboxilasa	296011192	12	14	26	13	1179	129.6KDa
	Factor de elongación 1-alfa	139004025	5	6	13	17	410	44.8 KDa
	Aldehído deshidrogenasa	ALDH_EMENI	20	26	49	38	497	54 KDa

2. FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON BASE EN LA ONTOLOGÍA DE SUS GENES.

Se utilizaron las siguientes bases de datos para identificar la función de las proteínas, así como la ontología de sus genes: Uniprot, Quick Go, PANTHER, KEGG y Prosite.

Proteína: proteína de control de la división celular
Función: Involucrado en el desmontaje del cabezal, la degradación de las proteínas ubiquitinadas y exportación de proteínas desde el retículo endoplásmico al citoplasma.
GO-función molecular: Unión a ubiquitina.- interacción selectiva y de forma no covalente con ubiquitina, una proteína que cuando se unen covalentemente a otras proteínas celulares los marca para la degradación proteolítica.
GO-proceso biológico: Respuesta a estímulos externos: autofagia.- El proceso en el que las células digieren partes de su propio citoplasma; permite tanto para el reciclado de los componentes macromoleculares en condiciones de estrés celular y remodelación de la estructura intracelular para la diferenciación celular.
GO-componente celular: Microsomas, Retículo endoplásmico y citosol.

Proteína: Dipeptidil peptidasa-5
Función: peptidasa extracelular que elimina dipéptidos N-terminales secuencialmente de polipéptidos que tienen un N-terminal no sustituido.
GO-función molecular: Actividad aminopéptidasa.- Catálisis de la hidrólisis de residuos de aminoácidos N-terminales de una cadena polipeptídica.
GO-proceso biológico: N/A
GO-componente celular: Secretada o parte de componentes de la membrana.

Proteína: Catalasa B
Función: Se produce en los organismos que respiran aeróbicamente casi todos y sirve para proteger las células de los efectos tóxicos de peróxido de hidrógeno.
GO-función molecular: Catálisis de la reacción: $2 \text{ peróxido de hidrógeno} = \text{O}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$.
GO-proceso biológico: desintoxicación oxidante celular. - Proceso llevado a cabo en el nivel celular que reduce o elimina la toxicidad de radicales superóxido o peróxido de hidrógeno.
GO-componente celular: Citosol.

Proteína: adenosilhomocisteinasa
Función: Inhibidor competitivo de reacciones metil transferasa S-adenosil-L-metionina-dependiente; por lo tanto, puede desempeñar un papel clave en el control de metilaciones a través de la regulación de la concentración intracelular de adenosilhomocisteína.
GO-función molecular: Catálisis de la reacción: $\text{S-adenosil-L-homocisteína} + \text{H}_2\text{O} = \text{adenosina} + \text{L-homocisteína}$.
GO-proceso biológico: Las reacciones químicas y las vías que impliquen la transferencia de unidades de un carbono en varios estados de oxidación.
GO-componente celular: Citoplasma.

Proteína: ATP sintasa subunidad alfa, mitocondrial
Función: produce ATP a partir de ADP en presencia de un gradiente de protones a través de la membrana que se genera por los complejos de transporte de electrones de la cadena respiratoria.
GO-función molecular: Catálisis de la transferencia de protones desde un lado

de una membrana a la otra por un mecanismo de rotación.

GO-proceso biológico: Síntesis de ATP acoplada al transporte de protones mitocondrial.

GO-componente celular: Membrana interna mitocondrial, núcleo catalítico de la ATP sintasa.

Proteína: **1,3(4)-beta-glucanasa**

Función: Proceso catabólico de polisacáridos.

GO-función molecular: Catálisis del hidrólisis de cualquier enlace O-glicosídico.

GO-proceso biológico: Metabolismo de carbohidratos

GO-componente celular: N/A

Proteína: **Glucoamilasa 1**

Función: hidrólisis de los enlaces 1-4 del componente alfa-D-glucosa sucesivamente desde extremos de las cadenas no reductoras con la liberación de beta-D-glucosa.

GO-función molecular: hidrólisis de los enlaces 1-4 del componente alfa-D-glucosa sucesivamente desde extremos de las cadenas no reductoras con la liberación de beta-D-glucosa.

GO-proceso biológico: Proceso catabólico de polisacáridos.

GO-componente celular: N/A

Proteína: **transaldolasa**

Función: Esta proteína está implicada en el paso 2 de la sub-ruta que sintetiza

D-gliceraldehído 3-fosfato y beta-D-fructosa 6-fosfato de D-ribosa 5-fosfato y D-xilulosa 5-fosfato de la ruta de las pentosas fosfato.
GO-función molecular: Enzima que transfiere un grupo químico, por ejemplo, un grupo metilo o un grupo glicosilo a partir de un compuesto (donante) a otro compuesto (aceptor).
GO-proceso biológico: Derivación de pentosa-fosfato, rama no oxidativa
GO-componente celular: Citoplasma, citosol y núcleo.

Proteína: Peroxiredoxina pmp20
Función: Involucrada en osmoadaptación.
GO-función molecular: Enzima que cataliza la oxidación de un sustrato mediante la reducción de peróxido de agua (peroxidasa).
GO-proceso biológico: Respuesta celular a estrés osmótico.
GO-componente celular: Extracelular, intracelular y peroxisomas.

Proteína: 1,2-dihidroxi-3-ceto-5-dioxigenasa metiltiopenteno
Función: Cataliza la formación de formiato y 2-ceto-4-metiltiobutirato (KMTB) a partir de 1,2-dihidroxi-3-ceto-5-metiltiopenteno (DHK-MTPeno).
GO-función molecular: Dioxigenasa.- Enzima que reduce el oxígeno molecular mediante la incorporación de ambos átomos en su sustrato (s).
GO-proceso biológico: proceso de biosíntesis de L-metionina a partir de metiltioadenosina
GO-componente celular: Citoplasma y núcleo.

<p>Proteína: Proteína de unión a GTP</p>
<p>Función: Las pequeñas GTPasas Rab son reguladores clave de tráfico intracelular de la membrana, de la formación de vesículas de transporte para su fusión con las membranas. Regula el tráfico de vesículas secretoras desde el retículo endoplásmico (ER) para el aparato de Golgi.</p> <p>Ras GTPasa, sirven como interruptores moleculares para una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares.</p>
<p>GO-función molecular: Actividad GTPasa.- Son enzimas de tipo hidrolasa que pueden unirse e hidrolizar la molécula guanosín trifosfato (GTP).</p>
<p>GO-proceso biológico: El movimiento dirigido de las proteínas en una célula, incluyendo el movimiento de las proteínas entre los compartimentos específicos o estructuras dentro de una célula, tales como orgánulos de una célula eucariota.</p> <p>Mediadoras en la transducción de señales.</p>
<p>GO-componente celular: La membrana que rodea el retículo endoplasmático (ER) y aparato de Golgi.</p>

<p>Proteína: Fosfoglicerato quinasa 2</p>
<p>Función: Esta proteína está implicada en el paso 2 de la sub-ruta que sintetiza piruvato a partir de D-gliceraldehído 3-fosfato, parte de la vía de la glucólisis.</p>
<p>GO-función molecular: Quinasa.- Enzima que cataliza la transferencia de fosfato (fosforilo o transferencia de pirofosforilo) por lo general a partir de ATP a un segundo sustrato.</p>
<p>GO-proceso biológico: Glucólisis.- Proteína implicada en la conversión enzimática anaerobia de la glucosa a lactato o piruvato, resultando en energía almacenada en forma de trifosfato de adenosina (ATP).</p>

GO-componente celular: Citoplasma.

Proteína: **Fumarato hidratasa, mitocondrial**

Función: Esta proteína está implicada en el paso 1 de la sub-ruta que sintetiza malato a partir de fumarato, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

GO-función molecular: actividad fumarato hidratasa.- Catálisis de la reacción:
(S) -malato = fumarato + H₂O.

GO-proceso biológico: ciclo del ácido tricarboxílico.

GO-componente celular: Mitocondria.

Proteína: **2-metilcitrato sintasa, mitocondrial**

Función: Cataliza la síntesis de 2-metilcitrato de propionil-CoA y oxaloacetato, y también a partir de acetil-CoA y oxaloacetato con una mayor eficiencia. También tiene actividad de la citrato sintasa.

GO-función molecular: Catálisis de la reacción: acetil-CoA + H₂O + oxaloacetato = citrato + CoA, donde se añade el grupo acetilo al oxaloacetato.

GO-proceso biológico: ciclo del ácido tricarboxílico.

GO-componente celular: Matriz mitocondrial.

Proteína: **Fosfoglicerato quinasa 1**

Función: catalítica.- ATP + 3-fosfo-D-glicerato = ADP + fosfato de 3-fosfo-D-glicerol.

GO-función molecular: Quinasa.- Enzima que cataliza la transferencia de fosfato (fosforilo o transferencia de pirofosforilo) por lo general a partir de ATP

a un segundo sustrato.
GO-proceso biológico: Glucólisis.- Proteína implicada en la conversión enzimática anaerobia de la glucosa a lactato o piruvato, resultando en energía almacenada en forma de trifosfato de adenosina (ATP).
GO-componente celular: Citoplasma.

Proteína: Citrato sintasa
Función: N/A
GO-función molecular: Catálisis de la reacción: acetil-CoA + H ₂ O + oxaloacetato = citrato + CoA, donde se añade el grupo acetilo al oxaloacetato.
GO-proceso biológico: ciclo del ácido tricarboxílico.
GO-componente celular: N/A

Proteína: Fosfoglicerato quinasa 3
Función: catalítica.- ATP + 3-fosfo-D-glicerato = ADP + fosfato de 3-fosfo-D-glicerol.
GO-función molecular: Las reacciones químicas y las vías que resulta en la ruptura de un hidrato de carbono en piruvato, con la producción concomitante de una pequeña cantidad de ATP y la reducción de NAD (P) H a NAD (P).
GO-proceso biológico: Glucólisis.
GO-componente celular: Citoplasma.

Proteína: Peptidil-prolil-cis-transisomerasa D

Función: PPlases aceleran el plegamiento de las proteínas. Cataliza la isomerización cis-trans de los enlaces peptídicos en oligopéptidos.
GO-función molecular: Rotamasa.- Enzimas que acelera el plegamiento de proteínas al catalizar la isomerización cis-trans de los enlaces peptídicos en oligopéptidos.
GO-proceso biológico: plegamiento de proteínas. - El proceso de ayudar en el covalente y no covalente ensamble de los polipéptidos de cadena o complejos de múltiples subunidades en la estructura terciaria correcta.
GO-componente celular: Citoplasma.

Proteína: Alcohol deshidrogenasa 1
Función: Catálisis de la reacción: un alcohol + NAD + = un aldehído o cetona + NADH + H ⁺ .
GO-función molecular: alcohol deshidrogenasa actividad (NAD).- Catálisis de la reacción: un alcohol + NAD + = un aldehído o cetona + NADH + H ⁺ .
GO-proceso biológico: proceso catabólico de etanol. - Las reacciones químicas y las vías resultantes de la descomposición de etanol, CH ₃ -CH ₂ -OH, un líquido inflamable incoloro, miscible en agua producidos por la fermentación alcohólica.
GO-componente celular: Citoplasma.

Proteína: Formiato deshidrogenasa
Función: Cataliza la NAD ⁺ oxidación dependiente de formiato de dióxido de carbono. La oxidación del formiato es el paso final en el curso de la oxidación de metanol en microorganismos metilotróficos. Tiene un papel en la desintoxicación de formiato en organismos no metilotróficos.
GO-función molecular: Catálisis de una oxidación-reducción de la reacción (redox) en el que un grupo CH-OH actúa como un donante de hidrógeno o de electrones y reduce NAD ⁺ o NADP.

GO-proceso biológico: proceso catabólico formiato.

GO-componente celular: Citoplasma.

Proteína: **Rhizopuspepsina proteína similar**

Función: catalítica.- La hidrólisis de proteínas con amplia especificidad similar a la de la pepsina A.

GO-función molecular: Aspàrtil proteasa. - enzima proteolítica con un residuo de aspartato (Asp) en su sitio activo. Hay muchas familias de las aspartil proteasas. El más conocido es el de la familia de la pepsina, se sabe que existe en los vertebrados, hongos, plantas, retrovirus y algunos virus de plantas.

GO-proceso biológico: N/A

GO-componente celular: N/A

Proteína: **Aldehído deshidrogenasa**

Función: catalítica. Un aldehído + NAD^+ + H_2O = un carboxilato + NADH.
Esta proteína está implicada en el paso 2 de la sub-ruta que sintetiza de etilo a partir de etanol.

GO-función molecular: Catálisis de la reacción: un aldehído + NAD^+ + H_2O = un ácido + NADH + H^+ .

GO-proceso biológico: proceso catabólico acetaldehído. - Las reacciones químicas y las vías resultantes de la descomposición del acetaldehído, un gas incoloro, inflamable líquido intermedio en el metabolismo del alcohol.

GO-componente celular: Citosol.

Proteína: **Piruvato carboxilasa**

Función: Catalítica.- $\text{ATP} + \text{piruvato} + \text{HCO}_3^- = \text{ADP} + \text{fosfato de oxalacetato}^+$.
GO-función molecular: actividad de la piruvato carboxilasa.- Catálisis de la reacción: $\text{ATP} + \text{bicarbonato} + \text{piruvato} = \text{ADP} + 2 \text{H}^+ + \text{oxaloacetato} + \text{fosfato}$.
GO-proceso biológico: Gluconeogénesis. - La formación de glucosa a partir de precursores no carbohidratos, tales como piruvato, aminoácidos y glicerol.
GO-componente celular: N/A

Proteína: Factor de elongación 1-alfa
Función: Esta proteína promueve la unión de GTP-aminoacil-ARNt al sitio-A de los ribosomas durante la biosíntesis de proteínas.
GO-función molecular: La proteína se asocia con los ribosomas cíclicamente durante la fase de elongación de la síntesis de proteínas, y cataliza la formación del enlace acilo entre el residuo de amino-ácido de entrada y de la cadena peptídica.
GO-proceso biológico: Proteína implicada en la biosíntesis de proteínas a partir de moléculas de ARNm. Este proceso, llamado traducción, se lleva a cabo por los ribosomas, donde se añaden aminoácidos activados a la cadena de polipéptido naciente.
GO-componente celular: citoplasma.