

## TESIS DOCTORAL

“ESTUDIO DEL IMPACTO DE  
ALGUNOS METALES/METALOIDES  
EN LOS MICROORGANISMOS DE  
IMPORTANCIA EN ALIMENTACIÓN  
HUMANA CON ENFOQUE EN  
APLICACIONES DE  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS.”

M.C. LUIS FERNANDO MEJIA DIAZ

---

**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**



**CAMPUS GUANAJUATO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**

**POSGRADO INSTITUCIONAL EN QUÍMICA**

**“ESTUDIO DEL IMPACTO DE ALGUNOS METALES/METALOIDES EN LOS MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN ALIMENTACIÓN HUMANA CON ENFOQUE EN APLICACIONES DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**PRESENTA**

**M.C. LUIS FERNANDO MEJÍA DÍAZ**

Director: Dra. Katarzyna Wrobel

Codirector: Dr. Kazimierz Wrobel

Codirectora: Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa

Guanajuato, Gto. enero del 2025

## Responsiva

Por medio de la presente responsabilizo de la autenticidad del presente trabajo de tesis, titulado: **“Estudio del impacto de algunos metales/metaloides en los microorganismos de importancia en alimentación humana con enfoque en aplicaciones de espectrometría de masas”**, que presenta el M.C. Luis Fernando Mejía Díaz, para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas, en las instalaciones del Departamento de Química de la Universidad de Guanajuato.

Alumno

---

M.C. Luis Fernando Mejía Díaz

Director

---

Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Co-director

---

Dr. Kazimierz Wrobel

Co-directora

---

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa

Miembros del Jurado en el examen que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas presenta el M.C. Luis Fernando Mejía Díaz.

### **Sinodales**

---

Dr. Oracio Serrano Torres  
Presidente

---

Dr. Francisco Acevedo Aguilar  
Secretario

---

Dr. Juan Manuel Peralta Hernández  
Vocal

---

Dr. Josaphat Miguel Montero Vargas  
Vocal

---

Dr. Moisés Guerrero Esperanza  
Vocal

---

Dra. Eunice Yañez Barrientos  
Suplente

## Índice

|   |           |
|---|-----------|
| RESPONSIVA.....   | II        |
| SINODALES .....   | III       |
| ÍNDICE .....  | IV        |
| ÍNDICE DE TABLAS .....  | X         |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....  | XII       |
| ABREVIACIONES.....  | XIX       |
| RESUMEN.....  | XX        |
| <b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1 INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.2 BENEFICIOS Y RIESGOS PARA LA SALUD ASOCIADOS CON EL ESTATUS DE SE Y CR(III)<br/>    EN HUMANOS .....</b> | <b>3</b>  |
| 1.2.1 Selenio .....   | 3         |
| 1.2.2 Cromo .....   | 7         |
| <b>1.3 SUPLEMENTOS DIETÉTICOS DE SE Y CR(III) .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>1.4 ESPECTROMETRÍA DE MASAS COMO HERRAMIENTA ANALÍTICA .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>1.5 SISTEMAS DE IONIZACIÓN.....</b>  | <b>22</b> |
| 1.5.1.1 Ionización por impacto de electrones – EI.....  | 24        |
| 1.5.1.2 Ionización química – CI.....  | 24        |
| 1.5.1.3. Ionización por electronebulización – ESI.....  | 24        |
| 1.5.1.4. Ionización por APCI .....  | 25        |
| 1.5.1.5. Sistema MALDI.....   | 26        |
| 1.5.1.6 Ionización por ICP .....  | 27        |
| 1.5.2 Separador/analizador de masas.....  | 27        |
| 1.5.2.1 Cuadrupolo.....   | 28        |
| 1.5.2.2 Tiempo de vuelo .....   | 30        |
| 1.5.2.3 Trampa de iones.....  | 32        |
| 1.5.2.4 Orbitrap .....  | 33        |
| 1.5.3 Espectrómetros de masas en modo tándem .....  | 33        |
| 1.5.4. Espectrómetro de masas híbrido con cuadrupolo ortogonal y tiempo de vuelo (Q-<br>ToF).....               | 36        |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.5.5 Espectrómetro de MC-ICP-MS .....  | 37        |
| 1.5.6 Detectores y procesadores .....   | 39        |
| 1.5.7 Acoplamiento de espectrometría de masas con técnicas de separación .....          | 39        |
| 1.5.7.1 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).....       | 40        |
| 1.5.7.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) .....         | 40        |
| <b>1.6 CIENCIAS OMICAS.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>1.6. PROTEÓMICA .....</b>  | <b>41</b> |
| 1.6.1 Estudios de proteómica.....   | 41        |
| 1.6.1.1 Introducción .....  | 41        |
| 1.6.1.2 Estudios de proteómica bottom up.....   | 42        |
| 1.6.1.3 Extracción de proteínas.....  | 43        |
| 1.6.1.4 Medición de la eficacia de extracción.....                                      | 43        |
| 1.6.1.5 Reducción y alquilación.....  | 44        |
| 1.6.1.6 Proteólisis.....  | 45        |
| 1.6.2. Cuantificación de péptidos (LFQ, SILAC, TMT, iTRAQ, TMT).....                    | 45        |
| 1.6.2.1 LFQ .....   | 45        |
| 1.6.2.2 SILAC .....   | 46        |
| 1.6.2.3 Péptidos marcados con etiquetas isobáricas .....                                | 46        |
| 1.6.2.4. Marcaje metabólico <sup>15</sup> N .....                                       | 46        |
| 1.6.3 Adquisición datos .....   | 48        |
| 1.6.3.1 DDA.....  | 48        |
| 1.6.3.2 DIA .....   | 48        |
| 1.6.4 Análisis de datos.....  | 50        |
| 1.6.5 Bases de datos de secuencias de proteínas .....                                   | 52        |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>   | <b>54</b> |
| <b>2.1 OBJETIVO GENERAL.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>  | <b>54</b> |
| <b>3 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>   | <b>55</b> |
| <b>3.1 EQUIPOS DE LABORATORIO .....</b>   | <b>55</b> |
| 3.1.1 Instrumentación analítica.....  | 55        |
| 3.1.2 Equipos utilizados en el procesamiento de muestras y preparación de reactivos ... | 55        |
| <b>3.2 SOFTWARES PARA ANÁLISIS DE DATOS .....</b>                                       | <b>56</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.3 MATERIAL BIOLÓGICO .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>   | <b>57</b> |
| <b>4.1 CRECIMIENTO DE S. CEREVISIAE DURANTE BIOFORTIFICACIÓN CON SE UTILIZANDO MARCAJE METABÓLICO CON <sup>15</sup>N .....</b>                               | <b>57</b> |
| 4.1.1 Introducción.....  | 57        |
| 4.1.2 Objetivos particulares .....   | 59        |
| 4.1.3 Condiciones experimentales .....   | 59        |
| 4.1.3.1 Reactivos y muestras.....  | 59        |
| 4.1.3.2 Crecimiento de levadura y enriquecimiento con Se .....   | 59        |
| 4.1.4 Resultados y Discusión.....  | 60        |
| 4.1.5 Conclusiones.....  | 62        |
| <b>4.2 ESTUDIO DE FRACCIONAMIENTO ISOTÓPICO DE SE DURANTE BIO-FORTIFICACIÓN DE S. CEREVISIAE E INFLUENCIA DE MARCAJE METABÓLICO CON <sup>15</sup>N .....</b> | <b>62</b> |
| 4.2.1 Introducción.....  | 62        |
| 4.2.2 Objetivos particulares .....   | 63        |
| 4.2.3 Condiciones experimentales .....   | 64        |
| 4.2.3.1 Reactivos y muestras.....  | 64        |
| 4.2.3.2 Instrumentación analítica .....  | 64        |
| 4.2.3.4 Crecimiento de levadura y enriquecimiento con Se .....   | 65        |
| 4.2.3.5 Eliminación de Se elemental de biomasa de levadura .....   | 65        |
| 4.2.3.6 Determinación de selenio total en levadura y de la fracción extracelular del elemento correspondiente a Se <sup>0</sup> por HG-MP-AES .....          | 66        |
| 4.2.3.7 Determinación de Se y de elementos traza en biomasa de levadura por ICP-MS .....   | 67        |
| 4.2.3.8 Determinación de selenometionina(SeMet) por HPLC-ESI-QqQ-MS.....   | 68        |
| 4.2.3.9 Evaluación del fraccionamiento isotópico de Se por HG - MC - ICP-MS .....  | 70        |
| 4.2.3.10 Análisis estadístico.....   | 71        |
| 4.2.4 Resultados y Discusión.....  | 72        |
| 4.2.4.1 Incorporación de Se en levadura crecida <sup>14</sup> N y <sup>15</sup> N .....  | 72        |
| 4.2.4.2 Medición de las relaciones isotópicas de Se (validación de las mediciones) ...   | 76        |
| 4.2.4.3 Fraccionamiento isotópico de selenio en levadura <sup>14</sup> N y <sup>15</sup> N .....   | 78        |
| 4.2.5 Conclusiones.....  | 83        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4.3. ESTUDIO DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA DE LEVADURA SELENIZADA CON MARCAJE METABÓLICO <sup>15</sup>N</b> .....  | <b>84</b>  |
| 4.3.1 Introducción.....  | 84         |
| 4.3.2 Objetivos particulares .....   | 85         |
| 4.3.3 Condiciones experimentales .....   | 86         |
| 4.3.3.1 Reactivos y muestras.....  | 86         |
| 4.3.3.2 Instrumentación analítica .....  | 86         |
| 4.3.3.3 Crecimiento de levadura y enriquecimiento con selenio .....  | 87         |
| 4.3.3.4 Extracción de proteínas.....   | 87         |
| 4.3.3.5 Electroforesis en gel 1D-SDS-PAGE .....  | 87         |
| 4.3.3.6 Digestión de proteínas.....  | 88         |
| 4.3.3.7 Análisis de muestras por capHPLC-ESI-QToF-MS .....   | 89         |
| 4.3.3.8 Análisis de datos adquiridos por capHPLC-ESI-QToF-MS.....  | 90         |
| 4.3.3.9 Determinación de la producción de etanol por GC-FID.....   | 91         |
| 4.3.4 Resultados y Discusión.....  | 93         |
| 4.3.4.1 Crecimiento de levadura .....  | 93         |
| 4.3.4.2 Extracción de proteínas de biomasa de levadura .....   | 93         |
| 4.3.4.3 Identificación de proteínas en levadura de pan y creación de librería DDA ....   | 94         |
| 4.3.4.4 Incorporación de <sup>15</sup> N en proteínas durante el crecimiento de levadura .....   | 95         |
| 4.3.4.5 Identificación y caracterización de proteínas en levadura .....  | 97         |
| 4.3.4.6 Análisis comparativo de perfil de proteínas citosólicas de <i>S. cerevisiae</i> bajo exposición a Se(IV) contra un control no-expuesto utilizando el software Skyline... | 102        |
| 4.3.4.7 Efecto de la exposición a Se(IV) en la producción de etanol por <i>S. cerevisiae</i> .....   | 105        |
| 4.3.5 Conclusiones.....  | 106        |
| <b>4.4. ESTUDIO DEL USO DE NANOPARTÍCULAS DE Se<sup>0</sup> (SENPs) COMO REMOVEDORAS DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO BAJO CONDICIONES FISIOLÓGICAS.</b> .....                           | <b>108</b> |
| 4.4.1 Introducción.....  | 108        |
| 4.4.2. Objetivos particulares .....  | 110        |
| 4.4.3 Condiciones experimentales .....   | 110        |
| 4.4.3.1 Reactivos y muestras.....  | 110        |
| 4.4.3.2 Instrumentación analítica .....  | 111        |
| 4.4.3.2.1 Equipos utilizados en la preparación de muestras .....   | 111        |
| 4.4.3.2.2 Softwares para análisis de datos .....   | 111        |

|  |     |
|--|-----|
| 4.4.3.3 Síntesis de nanopartículas de selenio (SeNPs).....   | 111 |
| 4.4.3.4 Determinación de Se por espectrometría emisión atómica con plasma de microondas previa generación de hidruro de selenio (HG-MP-AES) .....              | 112 |
| 4.4.3.5 Generación de peróxido de hidrógeno en sistema glucosa-glucosa oxidasa en ausencia y en presencia de SeNPs .....                                       | 114 |
| 4.4.3.6 Determinación espectrofotométrica de peróxido de hidrógeno por espectrofotometría UV/Vis .....   | 114 |
| 4.4.4 Resultados y Discusión.....  | 116 |
| 4.4.4.1 Síntesis de las nanopartículas de selenio (SeNPs) .....  | 116 |
| 4.4.4.2 Determinación de la actividad enzimática de glucosa oxidasa.....   | 118 |
| 4.4.4.3 Estudio de reacción en sistemas H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - SeNPs y Glu-GOX - SeNPs .....  | 124 |
| 4.4.5. Conclusión.....   | 128 |
| <b>4.5. ESTUDIO DE DOS CEPAS DE LEVADURA BAJO EXPOSICIÓN A Cr(III) DIRIGIDO A LA PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURA COMO SUPLEMENTO ALIMENTICIO. 129</b> |     |
| 4.5.1 Introducción.....  | 129 |
| 4.5.2. Objetivos particulares .....  | 131 |
| 4.5.3 Condiciones experimentales .....   | 131 |
| 4.5.3.1 Reactivos y muestras.....  | 131 |
| 4.5.3.2 Instrumentación analítica .....  | 132 |
| 4.5.3.3 Crecimiento de dos cepas de levadura en medio YNB y YPG, enriqueciendo con Cr(III).....  | 132 |
| 4.5.3.4 Determinación de cromo total en levadura por MP-AES .....  | 133 |
| 4.5.3.5 Determinación de algunos elementos mayoritarios y minoritarios por MP-AES .....  | 134 |
| 4.5.3.6 Determinación de proteína total en extracto de levadura.....   | 134 |
| 4.5.3.7 Determinación de ácidos nucleicos.....   | 135 |
| 4.5.4 Resultados y Discusión.....  | 136 |
| 4.5.4.1Crecimiento de las levaduras bajo exposición a cromo en medio YNB y YPG .....   | 136 |
| 4.5.4.2 Determinación de cromo total en la biomasa de levadura .....   | 138 |
| 4.5.4.3 Determinación de elementos mayoritarios y minoritarios en biomasa de levadura .....  | 139 |
| 4.5.4.4 Determinación de proteína total en muestras de las levaduras .....   | 141 |

|  |            |
|--|------------|
| 4.5.4.5 Determinación de cromo total en fracción citosólica y pellet después de hidrolisis | 143        |
| 4.5.4.6 Determinación de ácido nucleicos en levadura.....                                  | 144        |
| 4.5.5 Conclusiones .....   | 146        |
| <b>5. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>147</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>149</b> |

## Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Selección de algunas selenoproteínas de relevancia para la salud humana con sus correspondientes funciones y efectos. <sup>1, 39, 41</sup> .....  | 4  |
| <b>Tabla 2.</b> Suplementos dietéticos de selenio con sus especies disponibles y concentración en el mercado mexicano. ....   | 11 |
| <b>Tabla 3.</b> Suplementos dietéticos de cromo disponibles comercialmente en México, indicando forma de Cr(III) y su concentración.....  | 15 |
| <b>Tabla 4.</b> Resumen de los atributos de diferentes métodos de ionización usados en espectrometría de masas .....  | 23 |
| <b>Tabla 5.</b> Analizadores de masas más utilizados en las metodologías analíticas .....   | 28 |
| <b>Tabla 6.</b> Diferentes modos de adquisición en un instrumento de triple cuadrupolo QQQ-MS. ....   | 35 |
| <b>Tabla 7.</b> Composición de medio de cultivo YNB sin aminoácidos para crecimiento de levadura marcada isotópicamente con nitrógeno <sup>15</sup> N; bajo exposición a Se (IV) 5, 10, y 20 mg/L. ....   | 60 |
| <b>Tabla 8.</b> Condiciones de operación instrumental en el sistema HG-MP-AES.....  | 67 |
| <b>Tabla 9.</b> Condiciones de operación instrumental para generación de hidruros MC-ICP-MS   | 71 |
| <b>Tabla 10.</b> Selenio incorporado en biomasa de levadura y en fracción de Se elemental, determinados en dos laboratorios, utilizando dos diferentes técnicas. ....   | 73 |
| <b>Tabla 11.</b> Concentraciones de Se encontrados en biomasa y en sobrenadante (correspondientes a Se <sup>0</sup> ) en cuatro replicas biológicas de cultivos con <sup>14</sup> N y <sup>15</sup> N, respectivamente. En la parte inferior de la tabla, se muestran resultados ANOVA, comparando cultivos obtenidos para dos isotopos estables de N. (Promedios y DE son reportados en base a tres replicas técnicas de cada muestra en microgramos de Se por un gramo de biomasa inicial - antes de eliminar Se <sup>0</sup> ). .... | 74 |
| <b>Tabla 12.</b> Concentraciones de SeMet en muestra de levadura L2, H1 y en SELM-1 determinadas por HPLC-ESI-QqQMS/MS (promedios de tres réplicas con sus desviaciones estándar) y se presentan los porcentajes de Se total en forma de SeMet. ....  | 76 |
| <b>Tabla 13.</b> Resultados obtenidos por ICP-MS para elementos traza y Se en muestras de biomasa libre de Se <sup>0</sup> , incluyendo controles no expuestos (Lc1, Hc1) y levadura expuesta a Se en cuatro replicas biológicas (H1-H4 crecidas con <sup>15</sup> N; L1-L4 conteniendo <sup>14</sup> N). (Las concentraciones se presentan en microgramos del elemento por gramo de biomasa liofilizada).....  | 77 |
| <b>Tabla 14.</b> Valores delta experimentales de fraccionamiento isotópico de Se, confirmando mediciones libres de interferencias en biomasa de levadura. Cada solución introducida al sistema de generación de hidruros MC-ICP-MS contenía Se a 1000 µg/L. ....  | 78 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabla 15.</b> Relaciones isotópicas de selenio obtenidas para biomasa de levadura libre de Se <sup>0</sup> y para las soluciones después de tratamiento con sulfito de sodio (Se reducido extracelular), correspondiente a muestras crecidas en <sup>14</sup> N y <sup>15</sup> N (promedio ± DE, basadas en tres replicas). Cada solución fue medida por HG-MC-ICP-MS con concentración de Se ajustada a 1000 µg/L, diferencias entre valores delta para los dos isotopos de nitrógeno ( <sup>14</sup> N y <sup>15</sup> N) fueron probados por medio de sus datos individuales y una prueba t de dos colas fue realizada. .... | 81  |
| <b>Tabla 16.</b> Condiciones instrumentales de análisis por GC-FID para determinación de etanol en muestras de levadura con marcaje metabólico crecida después de crecimiento por 24 h con y sin exposición a Se 10 mg/L .....  | 92  |
| <b>Tabla 17.</b> Péptidos con Se incorporado en metionina en cultivos expuestos a Se(IV) y sus análogos encontrados en cultivos control no-expuestos: todos identificados en fracción 4 de gel tanto en presencia de <sup>14</sup> N (Lc1, L1) como para <sup>15</sup> N (Hc1, H1). Se anotan también proteínas a los que pertenecen secuencias identificadas. ....   | 97  |
| <b>Tabla 18.</b> Resultados de cuantificación de etanol en levadura enriquecida con 10 mg/L de Se(IV) y de un control no expuesto. ....   | 106 |
| <b>Tabla 19.</b> Condiciones instrumentales empleadas para el análisis de Se por HG-MP-AES. ....  | 113 |
| <b>Tabla 20.</b> Parámetros analíticos de calibración de Se(IV) por HG-MP-AES - λ = 196.026 nm. ....  | 114 |
| <b>Tabla 21.</b> Preparación de curva de calibración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para su análisis por UV-Vis a 350 nm .....  | 115 |
| <b>Tabla 22.</b> Parámetros analíticos de curva de calibración para el análisis de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por UV-VIS. ....   | 115 |
| <b>Tabla 23.</b> Datos obtenidos por espectrofotometría de UV/Vis y evaluación de tamaño de las SeNPs (tres réplicas técnicas analizadas para tres replicas independientes de SeNPs). ....  | 117 |
| <b>Tabla 24.</b> Selenio oxidado determinado en la solución por medio de HG-MP-AES después de exposición a 0.01 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con SeNPs para diferentes intervalos de tiempo (experimentalmente) comparando las concentraciones de Se(VI) con las calculadas a partir del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> determinado por espectrofotometría y considerando la estequiometria de la reacción mostrada en ecuación 21. El consumo de peróxido en la reacción con las SeNPs es también mostrado en la tabla. ....   | 127 |
| <b>Tabla 25.</b> Selenio oxidado encontrado en la solución después de exposición de NPSe a peróxido de hidrógeno generado en sistema glucosa-GOX para diferentes periodos de tiempo. Los valores esperados fueron calculados a partir de concentraciones H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> determinadas espectrofotométricamente y considerando la estequiometria mostrada en la Ecuación 21 ...  | 127 |

**Tabla 26.** Parámetros analíticos del procedimiento por MP-AES evaluados en base al proceso de calibración. Funciones de calibración y coeficientes de linealidad ( $R^2$ ), límite de detección ( $\mu\text{g/L}$ ) y cuantificación ( $\mu\text{g/L}$ ) instrumentales..... 134

## Índice de figuras

**Figura 1.** Estructura hipotética de GTF. La característica crucial de la actividad biológica es la coordinación plana del ácido nicotínico (NA) con el cromo trivalente. Las mitades de aminoácidos, cisteína, ácido glutámico y glicina hacen que la sal sea soluble en agua <sup>51</sup> . .....7

**Figura 2.** Estructura hipotética de cromodulina propuesta por Vincent y col. (izquierda)<sup>55</sup>; mecanismo propuesto para la activación del receptor de insulina por “cromodulina” (LMWCr) en respuesta a insulina. IR: Receptor de insulina; I: Insulina (derecha)<sup>49</sup>. .....8

**Figura 3.** Espectro de masas en modo negativo  $[M-H]^-$  mediante MALDI/TOF PSD de (A) péptido extraído de hígado bovino con  $m/z$  804 correspondiente a péptido parte de LMWCr; (B)  $m/z$  802 de péptido sintético pEEEEGDD; y (C) péptido sintético pEEEGEDD. <sup>52</sup> .....9

**Figura 4.** Estructura de compuestos orgánicos sintéticos utilizados en suplementos dietéticos de Cr(III): (a) picolinato de cromo(III); (b) polinicotinato de Cr(III); (c) malato de Cr(III); (d) glicinato de Cr(III). ..... 17

**Figura 5.** Componentes principales de un instrumento de espectrometría de masas (MS). ... 19

**Figura 6.** Poder de resolución de masa para pico  $m/z$  288.2084, (A) definición de 10 % valle y (B) definición FWHM<sup>79</sup>. (El espectro de masa fue obtenido del software DataAnalysis 4.0). .....20

**Figura 7.** Espectro de masas simulados para ionización positiva de 3-metil éter estradiol ( $[M+H]^+$ ,  $C_{19}H_{27}O_2$ ,  $m/z$  287.2006) y para 2-hidroxiestrone ( $[M+H]^+$ ,  $C_{18}H_{23}O_3$ ,  $m/z$  287.1642); se presentan los picos a poderes de resolución de (A) 5000, (B) 10000, (C) 20000 y (D) 30000<sup>79</sup>. (Los espectros de masas son simulados en el software DataAnalysis 4.0). ....21

**Figura 8.** Esquema de rango de polaridad y de masa molecular cubierto por las técnicas de ionización (Shimadzu corporation). .....23

**Figura 9.** Representación de una fuente de ionización por electrospray (ESI)<sup>85</sup> .....25

**Figura 10.** Proceso de ionización por MALDI. La matriz co-cristalizada es bombardeada con láser que excita la matriz, la cual transfiere energía a los analitos. El resultado es la ionización y desorción de los analitos, principalmente como especies de una sola carga<sup>85</sup> .....26

**Figura 11.** Analizador de masas del tipo cuadrupolo. Está compuesto de cuatro cilindros paralelos con voltaje directo y voltaje alterno. Solo un específico valor de  $m/z$  tiene la

|  |    |
|--|----|
| trayectoria correcta hacia el detector; el resto colisionan con los electrodos y son expulsados <sup>85</sup> .<br>.....   | 29 |
| <b>Figura 12.</b> Representación esquemática de un analizador convencional de tiempo de vuelo ToF (A) y uno del tipo ToF reflector (B). <sup>85</sup> .....  | 31 |
| <b>Figura 13.</b> Analizador de masas del tipo trampa de iones (IT) <sup>87</sup> .....  | 32 |
| <b>Figura 14.</b> Comparación entre espectrometría de masas del tipo MS (arriba) y espectrometría de masas en tándem MS-MS (abajo). En MS, los iones son separados en el analizador de masas antes de llegar al detector. En tándem, iones específicos son seleccionados en el primer analizador (MS <sup>1</sup> ) y son inducidos a colisiones mientras que el segundo analizador (MS <sup>2</sup> ) separa los iones producto antes de que lleguen al detector <sup>87</sup> . .....  | 34 |
| <b>Figura 15.</b> Representación esquemática de un instrumento híbrido Q-ToF con fuente de ionización por electronebulización (ESI) <sup>86</sup> .....  | 36 |
| <b>Figura 16.</b> Representación esquemática de las estrategias “bottom-up” y “top-down”. Los métodos bottom up incluyen hidrolisis proteolítica de una mezcla de proteínas y los péptidos resultantes son separados y analizados por LC-MS/MS. Por otro lado, los métodos top down analiza las proteínas intactas en cual la mezcla de proteínas es primeramente separada y analizada por LC-MS/MS <sup>95</sup> . .....  | 42 |
| <b>Figura 17.</b> Diferentes estrategias cuantitativas comúnmente usadas en proteómica. (a) cuantificación libre de marcaje, proteínas son extraídas de las muestras, péptidos enzimáticamente hidrolizados y analizados por espectrometría de masas. (b) Marcaje metabólico utilizando isotopos estables de aminoácidos en cultivos celulares utiliza con aminoácidos “ligeros” y “pesados”. (c) Marcaje isobárico o químico, las proteínas son separadas y aisladas de las muestras, los péptidos son obtenidos por hidrolisis enzimática, y entonces marcados químicamente con isotopos estables isobáricos.. <sup>95</sup> .....   | 47 |
| <b>Figura 18.</b> Tipos de análisis DIA. (a) SRM/MRM, los péptidos son ionizados por ESI y en el Q1 los iones son filtrados y entonces fragmentados en HCD. Los fragmentos de masas correspondientes a los péptidos son seleccionados en el tercer cuadrupolo (Q3). (b) PRM, de la misma manera que MRM, los péptidos son seleccionados en el primer cuadrupolo, pero el análisis de los fragmentos ocurre en un analizador de masas de alta resolución como una Orbitrap o TOF, ganando selectividad debido a la alta exactitud de masa y resolución para monitorear los fragmentos. (c) uDIA/SWATH, los péptidos son aislados en el primer cuadrupolo, sin embargo, se utiliza una anchura de selección más amplia (ej. 10 - 20 Da). Esto resulta en solapamiento de diferentes péptidos durante su aislamiento por lo que con ayuda de software especiales se puede conocer la identidad y cantidad de los péptidos haciendo uso de |    |

|   |    |
|---|----|
| alta resolución y exactitud de masas obtenidas por el instrumento de espectrometría de masas.<br>.....  | 49 |
| <b>Figura 19.</b> Típico flujo de trabajo para el análisis de datos, empezando por identificación y cuantificación de proteínas, seguido de filtración y análisis estadístico, para finalmente dar una interpretación biológica. ....   | 50 |
| <b>Figura 20.</b> Ecosistema de Alphapept y sus diferentes módulos. Este ecosistema se basa en el conjunto de diversos paquetes probados. Librerías altamente optimizadas como Numba, NumPy, CyPy, scikit-learn, y panda fueron utilizadas para lograr un código efectivo.....  | 51 |
| <b>Figura 21.</b> Efecto de diferentes concentraciones de Se en medio de cultivo (mgSe/L) sobre la cantidad de células de levadura generadas por mL, (a); y sobre biomasa total liofilizada (b); se muestra comparación entre los medios de crecimiento obtenidos en presencia de nitrógeno ligero $^{14}\text{N}$ y pesado $^{15}\text{N}$ . ....  | 61 |
| <b>Figura 22.</b> Imagen donde se muestra efecto de las diferentes concentraciones de Se en medio de cultivo (mgSe/L) sobre el crecimiento celular y producción de biomasa después de 24 h de exposición. ....  | 62 |
| <b>Figura 23.</b> Efecto del marcaje $^{15}\text{N}$ sobre la incorporación de Se durante el crecimiento de levadura (biomasa) y sobre la reducción extracelular de Se(IV) a $\text{Se}^{\circ}$ . Se presentan las concentraciones promedio de Se con su desviación estándar; basadas en cuatro replicas biológicas y tres técnicas. Una prueba-t de dos colas fue utilizada para comparar los resultados obtenidos entre cultivos de $^{14}\text{N}$ y $^{15}\text{N}$ . .... | 74 |
| <b>Figura 24.</b> Cromatogramas típicos MRM de SeMet, adquiridos con solución de estándar de SeMet, biomasa de levadura $^{14}\text{N}$ - L2 y biomasa de levadura $^{15}\text{N}$ - H1. ....   | 75 |
| <b>Figura 25.</b> Típicos registros de abundancia de iones de isotopos de Se y sus respectivas relaciones, obtenidos en modo -TRA mediante HG - MC-ICP-MS, utilizando el método SSB y el modo de adquisición en tiempo real (TRA): (a) muestra L2, (b) muestra H1, (c) muestra SELM-1.....  | 79 |
| <b>Figura 26.</b> Relaciones isotópicas de selenio obtenidas para las muestras y estándares analizados en este trabajo, todos los valores son expresados en unidades por mil, relativas a estándar de Se NIST SRM 3149, y fueron calculados utilizando la Ecuación 12. ....   | 80 |
| <b>Figura 27.</b> Imagen de carriles 3 y 4 del 1D-SDS-PAGE correspondientes a las mezclas Lc1 + Hc1, marcando ocho fracciones recortadas para su análisis por capHPLC-ESI-QToF-MS (aproximadamente 1 cm para cada una de las fracciones).....   | 88 |
| <b>Figura 28.</b> Producción de biomasa y crecimiento celular de <i>S. cerevisiae</i> bajo exposición a Se(IV) con concentración 10 mg-Se/L (24 h); sulfato de amonio (fuente de N): $^{14}\text{N}$ o $^{15}\text{N}$ . ..   | 93 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 29.</b> Número de proteínas encontradas en el análisis proteómico de <i>S. cerevisiae</i> : (azul) muestra expuesta a Se(IV) y (verde claro) muestra control, combinación de ambas (verde). Gráfica generada por el software ProteinScope.....   | 94  |
| <b>Figura 30.</b> Padrón isotópico de péptido identificado K.GVNLPGTDVDLPALSEKDKEDLR. con carga 4+, escogido aleatoriamente para muestra F4; en la izquierda, se observa el péptido con abundancia natural- <sup>14</sup> N, y en la derecha, marcado metabólicamente con <sup>15</sup> N, (a); se observa también la regresión lineal con padrones isotópicos teóricos de 95 %, 97 % y 99 % de <sup>15</sup> N; todas las intensidades fueron normalizadas con base al pico de mayor intensidad, (b). ..... | 96  |
| <b>Figura 31.</b> Determinación del porcentaje de incorporación de <sup>15</sup> N en el péptido aleatorio GVNLPGTDVDLPALSEKDKEDLR por medio del programa “Isotope Enrichment Calculator V 1.2”. Input Peak Mass experimentales del péptido fueron transformadas a una relación m/z con una sola carga, y las intensidades de los picos fueron también computadas. ....  | 96  |
| <b>Figura 32.</b> Espectro de MS (experimental y teórico) y MS/MS para el seleno péptido NATFPGVQM[48]K (2+), espectros obtenidos en el software Data Analysis 4.1 y MS Fragger 3.9, respectivamente.....  | 98  |
| <b>Figura 33.</b> Cromatograma TIC de la fracción 4 de la mezcla L1 + H1, cromatogramas de iones extraídos para el péptido. (NATFPVGQM[48]K) y para su análogo con azufre (NATFPVGQMK), tanto para la secuencia con <sup>14</sup> N como con <sup>15</sup> N. Abajo se presentan padrones isotópicos para cada uno de los casos. El péptido corresponde a la proteína PDC1_YEAST, Pyruvate decarboxylase isozyme. ....   | 99  |
| <b>Figura 34.</b> Cromatograma TIC de la fracción 4 de la mezcla L1+H1, cromatogramas de iones extraídos para el péptido (MSANISSETTAM[48]ITDIATAPAEIDR) y para su análogo con azufre (MSANISSETTAMITDIATAPAEIDR), tanto para secuencia con <sup>14</sup> N como con <sup>15</sup> N. Abajo se presentan padrones isotópicos para cada uno de los casos. El péptido corresponde a la proteína PDC1_YEAST, Pyruvate decarboxylase isozyme 1. ....   | 100 |
| <b>Figura 35.</b> Cromatograma TIC de la fracción 4 de la mezcla L1+H1, cromatogramas de iones extraídos para el péptido (LLQTPIDM[48]SLKPNDAESEKEVIDTILALVK) y para su análogo con azufre (LLQTPIDMSLKPNDAESEKEVIDTILALVK), tanto para secuencia con <sup>14</sup> N como con <sup>15</sup> N. Abajo se presentan padrones isotópicos para cada uno de los casos. El péptido corresponde a la proteína PDC1_YEAST, Pyruvate decarboxylase isozyme 1. ....   | 101 |
| <b>Figura 36.</b> Valores de idotp obtenidos en dos corridas para péptidos NATFPGVQMK y NATFPGVQM[47]K, correspondientes a fracción 4 de muestra control (Lc1) y muestra expuesta a Se(IV) L1 (ambas con nitrógeno ligero). ....   | 103 |

**Figura 37.** (a) tiempos de retención de tres péptidos (1 – IRNATFPGVQMK; 2 – NATFPGVQMK; 3 – NATFPGVQM[48]K) en el análisis de fracción cuatro de la muestra L1+H1, se observa que los péptidos con  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$  presentan el mismo tiempo de retención, mientras que la sustitución de S por Se causa el aumento de tiempo de retención; (b) comparación de las abundancias del seleno péptido en muestra expuesta a Se y la muestra control, para ambas se presentan áreas del pico en EIC correspondientes a cultivo con distribución isotópica natural de N (rojo) y cultivo marcado con  $^{15}\text{N}$  (azul)..... 103

**Figura 38.** Resultados del análisis de PCA, utilizando las proteínas encontradas como variables y comparando resultados obtenidos para fracción cuatro de las muestras control (Lc1+Hc1) contra expuestas a Se(IV) (L1+H1), en color rojo se observan las proteínas donde se encontró selenio. .... 104

**Figura 39.** Cromatograma GC-FID típico obtenido para muestra de levadura expuesta a 10 mg/L de Se(IV) en los medios de cultivo. .... 106

**Figura 40.** Curva de calibración obtenida para la determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en un rango de 0 a 60  $\mu\text{M}$ . Se presentan los espectros de absorción del  $\text{I}_3^-$  generado en el sistema de  $\text{I}^- + \text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de HRP. Las condiciones de reacción fueron:  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0 - 60 \mu\text{M}$ ,  $[\text{KI}] = 40 \text{ mM}$ ,  $[\text{HRP}] = 1 \text{ U/mL}$ , solución en 50 mM de buffer de fosfatos a pH 7,  $T = 26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y lectura después de 2 min..... 115

**Figura 41.** Se presenta un espectro UV/Vis típico medido en una solución de SeNPs (rojo) y de un control conteniendo BSA en buffer de fosfatos (verde), ambas diluidas 10 veces. En color negro se observa el espectro de SeNPs después de sustraer el control no expuesto..... 117

**Figura 42.** Reacción enzimática para producción de peróxido de hidrógeno a partir de oxígeno por acción de la glucosa oxidasa (GOX), convirtiendo glucosa en gluconolactona..... 119

**Figura 43.** Producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalizado por GOX utilizando diferentes concentraciones de glucosa en un rango de 0 a 150 mM, evaluados durante un tiempo de reacción de 10 minutos. .... 119

**Figura 44.** **Arriba:** Velocidad de reacción (V) como función de concentración de sustrato: (a) V es presentadas como un incremento de absorbancia a 350 nm ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por minuto; (b) V es calculada como el incremento en la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto. **Abajo:** Representación gráfica de la ecuación enzimática de Michaelis-Menten en forma linealizada del tipo Lineweaver-Burk. La abscisa (x) representa las concentraciones recíprocas de la glucosa ( $1/[\text{Glu}]$ ) mientras que la ordenada (y) corresponde a la relación inversa de la velocidad ( $1/V$ ); es decir que, (c) y (d) fueron obtenidos de la linealización de los gráficos (a) y (b)..... 120

**Figura 45.** Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y consumo de glucosa en la reacción catalizada por el sistema Glu-GOX (4.0 mM Glu, 0.0125 U/mL GOX). Las líneas punteadas corresponden a los valores teóricos calculados en R a partir de S<sub>0</sub>, Km y Vmax y los puntos individuales representan los valores experimentales determinados (promedio y SD de tres replicas independientes). ..... 123

**Figura 46.** Cambios en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determinados durante intervalos de 5 minutos durante una hora; en presencia de SeNPs, Se(IV) y Se(VI) (cada solución contenía 50 mgSe/L y 0.01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), evaluados respecto a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la solución que no contenía selenio (control). Se presenta el valor promedio de tres replicas, sin embargo, barras de error no son presentadas en el grafico debido a que los valores RSD para los resultados individuales no excedió más de 2 %..... 125

**Figura 47.** Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el sistema Glu-GOX, determinada en intervalos de 5 minutos durante una hora en ausencia de Se y en presencia de SeNPs, Se(IV) y Se(VI). (Cada solución contenía 50 mgSe/L, 4 mM glucosa y 0.0125 U/mL). Se presenta el valor promedio de tres replicas, y su desviación estándar..... 125

**Figura 48** Concentraciones de selenio oxidado determinadas en intervalos de 15 minutos en las soluciones correspondientes a los dos sistemas donde el peróxido de hidrógeno fue expuesto a SeNPs. .... 126

**Figura 49.** Diseño experimental para crecimiento de levadura enriquecida con 250 mg/L y 25 mg/L de Cr(III) en medio YPG y YNB, respectivamente. (Tres replicas biológicas fueron estudiadas simultáneamente para cada condición seleccionada). ..... 133

**Figura 50.** Comparación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii* mediante medición de densidad óptica (DO) a 600 nm. Los resultados se obtuvieron tras 24 h de cultivo en medio YPG enriquecido con 250 mg/L de Cr(III) y en medio YNB enriquecido con 25 mg/L de Cr(III). Los controles sin exposición a cromo fueron incluidos para cada condición evaluada. .... 136

**Figura 51** Efecto del cromo en el crecimiento de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* evaluado por peso seco de biomasa tras 24 h de cultivo. (a) Resultados obtenidos en medio YPG sin Cr (control no expuesto) y enriquecido con 250 mg/L de Cr(III). (b) Resultados obtenidos en medio YNB sin Cr (control no expuesto) y enriquecido con 25 mg/L de Cr(III)..... 137

**Figura 52.** Determinación de cromo total incorporado en biomasa de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* mediante MP-AES tras digestión ácida con HNO<sub>3</sub>. La biomasa fue obtenida después de 24 h de cultivo en medio YPG enriquecido con 250 mg/L Cr(III) y medio YNB enriquecido con 25 mg/L Cr(III), respectivamente. (Controles sin exposición a cromo fueron corridos siempre en paralelo)..... 139

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 53.</b> Perfil de elementos mayoritarios (Ca, K, Na y Mg) obtenidos de la biomasa digerida con HNO <sub>3</sub> y determinadas por MP-AES. Análisis de biomasa crecida en medio YPD y YNB, utilizando <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. boulardii</i> con exposición a 25 mg/L de Cr(III) y comparadas contra un control no expuesto. ....   | 139 |
| <b>Figura 54.</b> Perfil de elementos minoritarios (Cu, Mo, Zn y Fe) obtenidos de la biomasa digerida con HNO <sub>3</sub> y determinadas por MP-AES. Análisis de biomasa crecida en medio YPD y YNB, utilizando <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. boulardii</i> con exposición a 25 mg/L de Cr(III) y comparadas contra un control no expuesto. ....  | 140 |
| <b>Figura 55.</b> Determinación de proteína total en <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. boulardii</i> por método de Bradford. El extracto libre de células se obtuvo por hidrólisis con NH <sub>4</sub> OH de 20 mg de biomasa cultivada durante 24 h en medios YPG y YNB. Los ensayos incluyeron controles sin exposición y muestras con 250 mg/L de Cr(III) para medio YPG y 25 mg/L de Cr(III) para medio YNB. La concentración de proteína se expresa en mg de proteína por cada 100 mg de biomasa... | 142 |
| <b>Figura 56.</b> Determinación de proteína total en <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. boulardii</i> por método de BCA. El extracto libre de células se obtuvo por hidrólisis con NH <sub>4</sub> OH de 20 mg de biomasa cultivada durante 24 h en medios YPG y YNB. Los ensayos incluyeron controles sin exposición y muestras con 250 mg/L de Cr(III) para medio YPG y 25 mg/L de Cr(III) para medio YNB. La concentración de proteína es expresada en mg de proteína por cada 100 mg de biomasa ....  | 143 |
| <b>Figura 57.</b> Determinación de cromo total determinado por MP-AES en pellet y la fracción citosólica de las cepas <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. boulardii</i> , comparando el cromo total adsorbido en la biomasa de las levaduras. La biomasa se obtuvo tras 24 h de cultivo en medio YPG enriquecido con 250 mg/L Cr(III) y en medio YNB enriquecido con 25 mg/L de Cr(III). ....  | 144 |
| <b>Figura 58.</b> Determinación de ácidos nucleicos por UV-Vis a 260 nm para las cepas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. Boulardi</i> . El extracto libre de células se obtuvo por hidrólisis de NH <sub>4</sub> OH de 20 mg de biomasa obtenida después de 24 h de crecimiento en medio YPG enriquecida con 250 mg/L Cr(III) y medio YNB enriquecido con 25 mg/L de Cr(III). ....  | 145 |

## Abreviaciones

| Abreviación              | Descripción   |
|--------------------------|---|
| <b>ADI</b>               | Arginina de iminasa   |
| <b>CrPic<sub>3</sub></b> | Picolinato de cromo   |
| <b>DPPH</b>              | 2,2-diphenyl-1-picryhydazyl   |
| <b>EFSA</b>              | Autoridad Europea de seguridad alimenticia                                    |
| <b>ESI</b>               | Ionización por electro nebulización   |
| <b>FDA</b>               | Administración de alimentos y medicamentos de los E.U.                        |
| <b>FT-ICR</b>            | Analizador de resonancia de ciclotrón iónica por transformada de Fourier      |
| <b>GC</b>                | Cromatografía de gases  |
| <b>GSH</b>               | Glutación   |
| <b>GTF</b>               | Factor de tolerancia a glucosa  |
| <b>HPLC</b>              | Cromatografía de líquidos de alta resolución                                  |
| <b>IT</b>                | Filtro de masas de trampa iónica  |
| <b>LAB</b>               | Bacterias lácticas  |
| <b>LC</b>                | Cromatografía de líquidos   |
| <b>LMWCr</b>             | “Low molecular weight chromium” en inglés                                     |
| <b>LTQX</b>              | Trampa lineal   |
| <b>MCR</b>               | Material de Referencia Certificado  |
| <b>MRM</b>               | Monitoreo de reacciones múltiples   |
| <b>MS</b>                | Espectrometría de masas   |
| <b>MS/MS</b>             | Espectrometría de masas en tándem   |
| <b>PCA</b>               | Análisis de componentes principales   |
| <b>RP</b>                | Fase inversa  |
| <b>SDS-PAGE</b>          | Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico |
| <b>SEC</b>               | Cromatografía por exclusión de tamaño   |
| <b>SeCys</b>             | Seleno Cisteína   |
| <b>SeMet</b>             | Seleno metionina  |
| <b>SeNPs</b>             | Nanopartículas de selenio   |
| <b>SILAC</b>             | Marcaje de isótopos estables por/ con aminoácidos en cultivo celular          |
| <b>SLC</b>               | Enzima dependiente del fosfato de piridoxal                                   |
| <b>SNP</b>               | Polimorfismo de nucleótido único  |
| <b>TIC</b>               | Cromatografía de iones totales  |
| <b>TOF</b>               | Analizador de masas de tiempo de vuelo  |

## Resumen

Los avances en la ciencia y la tecnología en los últimos años han permitido estudiar los sistemas biológicos a un ritmo sin precedentes. La secuenciación del genoma humano y las novedosas técnicas instrumentales de análisis han revolucionado el estudio de sistemas biológicos y enfermedades humanas. En este contexto, la espectrometría de masas (MS) se ha consolidado como una de las herramientas más poderosas para el análisis de sistemas biológicos, permitiendo la identificación y cuantificación de metabolitos y proteínas asociadas a condiciones biológicas específicas. Este trabajo de tesis tiene como objetivo estudiar el impacto de los elementos traza selenio (Se) y cromo (Cr) en la levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*), con especial enfoque en el crecimiento celular, la incorporación de estos elementos, análisis proteómico de seleno levadura y la protección antioxidante frente a especies reactivas de oxígeno (ROS), utilizando técnicas avanzadas de química analítica.

En el Capítulo 1, se presentan los antecedentes más relevantes sobre la biofortificación de levadura con Se (*S. cerevisiae*) y Cr (*S. cerevisiae* y *S. boulardii*), destacando estudios como el SELECT, PRECISE y NPC, que correlacionan la presencia de Se con efectos nutricionales, especialmente en la prevención de enfermedades como el cáncer y el estrés oxidativo. Además, se abordan los principios fundamentales de las técnicas de espectrometría de masas y se revisan estudios previos sobre análisis proteómico de levadura.

El Capítulo 4.1 describe el uso del marcaje metabólico con nitrógeno pesado para estudiar la biofortificación de levadura con Se, especialmente enfocado en la proteómica comparativa. En este capítulo, se evaluó el crecimiento de *S. cerevisiae* en medios enriquecidos con Se(IV) y diferentes isótopos de nitrógeno ( $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ ) para establecer las condiciones óptimas de biofortificación. Se cultivaron células de *S. cerevisiae* en medios con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono, utilizando concentraciones de Se(IV) de 5, 10 y 20 mgSe/L. Los resultados indicaron que el Se inhibe el crecimiento celular de manera dependiente de la concentración, con una reducción de hasta el 50 % en biomasa a concentraciones de 20 mgSe/L. También se observó la formación de Se elemental en la biomasa, un cambio visual correlacionado con la concentración de Se. La concentración óptima seleccionada para estudios posteriores fue 10 mgSe/L, ya que favoreció una biofortificación efectiva sin impactar significativamente el crecimiento celular.

Posteriormente en el capítulo 4.2, se estudia el fraccionamiento isotópico de selenio (Se) durante la biofortificación de Se en levadura y se examina si el marcaje metabólico con sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno afecta la incorporación de Se y su fraccionamiento isotópico en estos microorganismos. Se realizó un análisis del fraccionamiento isotópico tanto en el Se reducido extracelularmente como en el incorporado intracelularmente. Los resultados indican que la reducción de Se(IV), así como su incorporación intracelular, son procesos mediados por la actividad metabólica de la levadura, y en ambos casos existe una preferencia por isótopos ligeros de Se, reflejada en valores delta más negativos. Al sustituir  $^{14}\text{N}$  por  $^{15}\text{N}$ , los valores delta de Se fueron menos negativos en ambas fracciones. Además, la incorporación de Se aumentó un 92 % en presencia de nitrógeno pesado, sin afectar la reducción extracelular de Se(IV) a  $\text{Se}^{\circ}$ . Estos hallazgos destacan el impacto del ambiente isotópico en la asimilación y fraccionamiento del Se en levaduras.

En el capítulo 4.3, se realiza un estudio de proteómica comparativa, iniciado con la confirmación de que el marcaje metabólico con  $^{15}\text{N}$  en *S. cerevisiae* no afecta su crecimiento en presencia de Se(IV) a 10 mgSe/L. Se estimó una incorporación del 98 % de  $^{15}\text{N}$  en proteínas de levadura marcada metabólicamente. Una librería del tipo DDA fue generada identificando cerca de 420 proteínas, incluyendo diez péptidos con selenio incorporado en el residuo de metionina, sin diferencias de abundancia entre muestras con  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ . El análisis de componentes principales (PCA) comparando muestras expuestas a 10 mgSe/L de Se(IV) contra un control no expuesto, mostró que piruvato quinasa (KPYK1), piruvato descarboxilasa (PDC1) y THI3 están directamente asociadas con la exposición a Se(IV), lo que sugiere su papel en el metabolismo de glucosa y la fermentación. Se determinó que la exposición a Se(IV) aumenta significativamente la producción de etanol en levadura ( $6.7 \pm 0.06$  g etanol/g biomasa) en comparación con el control ( $5.1 \pm 0.08$  g etanol/g biomasa) ( $p = 0.023$ ). Estos resultados contribuyen al entendimiento del impacto del Se en *S. cerevisiae* y pueden tener aplicaciones biotecnológicas en la producción de alimentos funcionales.

En el capítulo 4.4, se demuestra la capacidad de las nanopartículas de selenio (SeNPs) para actuar como agentes reductores del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a pH fisiológico y en presencia de albúmina sérica, generando Se(VI) como producto de oxidación. Se confirmó además que las SeNPs pueden eliminar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado en reacciones enzimáticas, utilizando dos sistemas experimentales cuidadosamente diseñados. Para estos estudios, se emplearon SeNPs con un diámetro de  $95 \pm 7$  nm y se mantuvo un pH fisiológico mediante un tampón de

fosfatos 50 mM. La cuantificación de Se y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó mediante generación de hidruros acoplada a espectrometría de emisión atómica (HG-MP-AES) y un procedimiento espectrofotométrico indirecto, respectivamente. Los resultados obtenidos indicaron que existe una conversión de SeNPs a Se(VI) en ambos sistemas. Dentro de una hora, se removió la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un 5.9% cuando se expuso a una concentración inicial fija de peróxido, mientras que cuando el peróxido de hidrogeno fue generado enzimáticamente a partir de Glu-GOX, su concentración fue reducida en un 17.2 %. Estos resultados resaltan el papel antioxidante de las SeNPs en sistemas biológicos, aunque también señalan la producción inevitable de Se(VI), cuya toxicidad podría generar efectos adversos a nivel celular. En conjunto, los resultados obtenidos contribuyen a un mejor entendimiento de la actividad antioxidante de las SeNPs y su impacto en el estrés oxidativo.

Finalmente, en el capítulo 4.5 se estudiaron dos cultivos de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* enriquecidos con Cr(III) en forma de CrCl<sub>3</sub>, utilizando los medios YPG y YNB. Se encontró que YPG favoreció una mayor producción de biomasa en ambas cepas, aunque la presencia de Cr(III) afectó negativamente el crecimiento de *S. boulardii*. En cuanto a la incorporación de cromo, *S. cerevisiae* y *S. boulardii* presentaron concentraciones comparables entre ambos medios, aunque YNB resultó ser el más eficiente al permitir un bio-enriquecimiento efectivo con diez veces menos Cr(III) que YPG. No se observaron diferencias significativas en la concentración de proteínas entre cepas ni medios de cultivo, pero se detectó una mayor acumulación de Cr en la fracción citosólica en YNB y en el pellet de *S. boulardii* en YPG. Además, se encontraron los niveles más bajos de ácidos nucleicos en *S. cerevisiae* cultivada en YNB (5 mg AN/100 mg biomasa), un aspecto clave para su uso como suplemento alimenticio. Finalmente, se concluyó que la mejor estrategia de bio-enriquecimiento fue el cultivo de *S. cerevisiae* en YNB con 25 mg/L de Cr(III), ya que permitió una adecuada incorporación de cromo con niveles reducidos de ácidos nucleicos, ofreciendo una alternativa prometedora para la producción de suplementos alimenticios funcionales y seguros.

## 1. Marco teórico

### 1.1 Introducción

El selenio y el cromo son dos elementos químicos extensivamente estudiados en el contexto de salud humana. Para ambos se conocen efectos benéficos y adversos, dependiendo de su concentración total, estado de oxidación e identidad de especies químicas que entran al organismo<sup>1,2</sup>. Mientras que el selenio juega un papel vital en la defensa antioxidante y algunos de sus compuestos tienen propiedades quimiopreventivas<sup>1</sup>, el cromo trivalente - Cr(III) mejora la eficacia de la insulina en regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos<sup>3</sup>. La EFSA (European Food Safety Authority) establece las dosis adecuadas de Se y Cr(III) en intervalos de 15 - 85 µg/día<sup>4</sup> y 25 - 35 µg/día<sup>5</sup>, respectivamente, dependiendo de la edad, sexo y condición clínica. Es también relevante que para ambos elementos se ha informado ingesta diaria deficiente en algunas regiones del mundo o debido a condiciones específicas de salud<sup>6,7</sup>. Varios estudios han demostrado una asociación entre los niveles sub fisiológicos de Se con estrés oxidativo, trastornos cardiovasculares e incidencia de diferentes tipos de cáncer<sup>8</sup>. Por su parte, en personas obesas -en los que se presentan alteraciones en el metabolismo de glucosa y lípidos-, en síndrome metabólico y en pacientes diabéticos, se han reportado bajas concentraciones de Cr en sangre y suero, mientras que se encontraron elevadas concentraciones en orina, comparado con sujetos sanos<sup>9</sup>. Así mismo, existe el consenso que la suplementación con adecuadas formas de ambos elementos y en dosis adecuadas, permiten contrarrestar efectos adversos provocados por sus deficiencias. Los suplementos dietéticos de Cr y de Se son ampliamente utilizados, con una variedad de productos disponibles en el mercado<sup>10-12</sup>.

En cuanto a las propiedades de los suplementos dietéticos de micronutrientes, éstos deben contener concentraciones conocidas y adecuadas de las formas biodisponibles, bioactivas y estables de los elementos de interés. Adicionalmente, dichos suplementos pueden proveer antioxidantes, vitaminas, aminoácidos y proteínas que en su conjunto potencializan efectos benéficos a la salud, de acuerdo con el concepto de productos funcionales<sup>13, 14</sup>. En el caso de Se, el suplemento más común es la levadura del pan (*Saccharomyces cerevisiae*) enriquecida *in vivo*, donde la forma mayoritaria y bioactiva de Se es Se-metionina<sup>15</sup>. Se han estudiado también otros tipos de organismos que pueden transformar Se inorgánico en formas orgánicas con actividad biológica; entre ellos cabe mencionar diferentes tipos de plantas, principalmente de géneros *Brassica* y *Allium*<sup>16</sup>, y las bacterias probióticas del género *Lactobacillus*<sup>13, 17</sup>. En el caso de Cr(III), el primero en utilizar y hasta ahora el suplemento más efectivo es la levadura de pan; aunque la identidad química de la especie de Cr(III) en este producto no ha sido

elucidada de manera contundente, se ha adoptado el término “factor de tolerancia a glucosa” (GTF, por sus siglas en inglés), en el que Cr(III) es coordinado con glicina, cisteína, ácido glutámico y ácido nicotínico<sup>18</sup>.

Durante varias décadas se realizaron estudios muy intensos enfocados en la obtención de productos adecuados para suplementación en humanos con Cr(III) y con Se. El interés principal en estos estudios ha sido caracterizar las formas/especies del elemento y sus concentraciones, así como evaluar su actividad biológica y establecer las mejores condiciones de su producción (enriquecimiento *in vivo*)<sup>7, 11, 12, 19</sup>. Mientras que menor esfuerzo se ha puesto en estudiar el impacto de Se y Cr en los microorganismos utilizados con el fin de transformar formas inorgánicas de estos elementos en las especies orgánicas con mayor actividad biológica. En el contexto de este proyecto de tesis, cabe citar algunos trabajos sobre efectos de Se en microorganismos de relevancia en alimentación humana; en la mayoría de ellos se evaluó el crecimiento celular y se utilizaron simples ensayos espectrofotométricos y/o kits comerciales para observar cambios a nivel de defensa antioxidante<sup>20-24</sup> y/o metabolismo primario<sup>25, 26</sup>. Por su parte, no se han encontrado estudios sobre el impacto de Cr(III) en levadura de pan ni en bacterias probióticas. Para avanzar en el conocimiento sobre los efectos de Se y de Cr(III) en microorganismos de relevancia en alimentación/suplementación en humanos, es necesario acudir a las herramientas de las ciencias “ómicas”. Los resultados de estos estudios serán de importancia en la producción de suplementos dietéticos con un valor nutricional mejorado, evitando los efectos adversos causados por excesivas concentraciones de Se y de Cr(III) utilizadas en los medios de crecimiento.

El grupo de ciencias “ómicas” abarca diferentes áreas de biología, donde el objetivo es hallar y caracterizar una totalidad de especies químicas que en su conjunto tienen importancia en la estructura, función y dinámica de uno o varios organismos vivos. Pertenecen a las “ómicas” áreas tales como genómica, transcriptómica, proteómica, lipidómica, metabolómica, glicómica, metalómica, entre otras<sup>27</sup>. Una de las principales herramientas en ciencias “ómicas” es la espectrometría de masas con fuente de ionización suave, gracias a su capacidad de caracterizar estructuralmente e identificar diferentes compuestos con base en la masa exacta del ion mono-isotópico, el patrón isotópico y espectros de fragmentación. Aunado a ello, el uso de adecuadas plataformas de análisis de datos y análisis estadístico, permiten evaluar comparativamente los datos registrados para el mismo sistema biológico, pero obtenido en diferentes condiciones -por ejemplo, bajo estrés abiótico o algún proceso patológico-<sup>28-32</sup>. De esta manera, K. Bayoumy y col. realizaron un análisis proteómico, evaluando el efecto de Se(IV) en *S. cerevisiae*; las proteínas de muestras expuestas y de controles no-expuestos fueron

separados y después de tripsinólisis, los péptidos fueron analizados en el sistema de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas de alta resolución (LC-MS), obteniendo datos MS y MS/MS<sup>33</sup>. Como resultado, se encontraron 37 proteínas expresadas diferencialmente en levadura selenizada respecto al control<sup>33</sup>. En otro trabajo reciente, Gómez-Gómez y col. reportaron el análisis proteómico de bacterias lácticas cultivadas en ausencia de Se, en presencia de Se(IV) y de nanopartículas de Se<sup>0</sup><sup>34</sup>. Para fines de proteómica cuantitativa, se utilizó un marcaje metabólico con isótopos estables (SILAC- por sus siglas en inglés), agregando aminoácidos <sup>13</sup>C-arginina (R) o <sup>13</sup>C-lisina (K) a los medios de cultivo. Una vez obtenidos extractos mixtos de proteínas de dos diferentes cultivos de los cuales uno ha sido marcado con isótopo pesado, estos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las fracciones separadas se recortaron y después de tripsinólisis, fueron analizadas por LC-MS y MS/MS. Se encontraron 57 y 47 proteínas con menor abundancia en bacterias expuestas a Se(IV) y a Se<sup>0</sup> respectivamente, en comparación con controles no expuestos<sup>35</sup>.

Con base en la revisión bibliográfica resumida brevemente en los párrafos anteriores, en el trabajo de tesis se propone estudiar el impacto de Se(IV) y de Cr(III) sobre algunos microorganismos utilizados en la producción de suplementos dietéticos, utilizando espectrometría de masas con un enfoque de proteómica cuantitativa.

## 1.2 Beneficios y riesgos para la salud asociados con el estatus de Se y Cr(III) en humanos

### 1.2.1 Selenio

El selenio se puede encontrar en diversas formas orgánicas en el organismo humano, principalmente como componente de selenoaminoácidos y selenoproteínas, donde este elemento ejerce importantes funciones fisiológicas<sup>1, 8, 24, 36</sup>. El selenio tiene una importante participación en la defensa antioxidante, además de prevenir enfermedades cardiovasculares y ayudar en el tratamiento de cáncer y de algunas enfermedades crónico-degenerativas. Debido a que el metabolismo de Se en mamíferos comienza por la conversión de todas sus formas ingeridas en seleniuro (H<sub>2</sub>Se) o metilseleniuro (CH<sub>3</sub>SeH), es preferible la administración de las formas orgánicas que son rápidamente asimiladas<sup>37</sup>. Por su parte, cuando se utilizan oxoaniones de Se, el selenio inorgánico (Se(IV), Se(VI)) tiene que ser primeramente reducido, lo que compromete al sistema antioxidante; por ello, el Se inorgánico es tóxico en el ambiente celular.

En cuanto a las especies orgánicas de selenio en el organismo humano, es necesario destacar la selenocisteína (SeCys) como el aminoácido proteico número 21. Dicho aminoácido fue descubierto en el año 1986 por Stadtman<sup>38</sup> y se encuentra en el centro activo de al menos 25

selenoproteínas<sup>1, 39</sup>. En la Tabla 1 se muestra una selección de selenoproteínas conocidas y caracterizadas con sus respectivas funciones. Muchas de estas enzimas son requeridas para los procesos fisiológicos en el cuerpo humano; y se ha relacionado el déficit de selenio con la falta de actividad de estas enzimas, además de daño por estrés oxidativo debido a la insuficiencia de protección antioxidante de éstas mismas<sup>1, 20, 37, 39</sup>. Cabe también señalar la presencia de selenometionina (SeMet) tanto en forma libre como integrada en proteínas; sin embargo, éste no es un aminoácido proteico y se forma por la sustitución de azufre por selenio. Además de estos dos aminoácidos, existen otras especies de Se de baja masa molecular que se introducen con alimentos y/o suplementos; y que juegan un rol importante en la salud. Tal es el caso de las formas mono-metiladas de selenio: Se-metilcisteína (SeMeCys) y  $\gamma$ -glutamil-Se-metilcisteína, ambos precursores de metilselenol (CH<sub>3</sub>SeH), el cual exhibe fuerte actividad anti carcinogénica<sup>20, 40</sup>. Finalmente, se debe mencionar que, a pesar de los múltiples efectos benéficos reportados para especies de Se, es también conocido que su exceso ocasiona efectos adversos a la salud, además de que algunas de selenoproteínas son susceptibles a polimorfismo (SNPs) lo que afecta el estatus de selenio, incrementando el riesgo a ciertas enfermedades<sup>1</sup>.

**Tabla 1.** Selección de algunas selenoproteínas de relevancia para la salud humana con sus correspondientes funciones y efectos.<sup>1, 39, 41</sup>.

| Selenoproteína              | Función  | Efecto a la salud   | Efecto asociado a polimorfismo en selenoproteínas  |
|-----------------------------|--|---|--|
| Glutación peroxidasa (GPxs) | Antioxidante<br><br>Efectos antivirales<br><br>Protección del sistema cardiovascular | Remueven el peróxido de hidrogeno, hidroperóxidos lipídicos, hidroperóxidos en colesterol y fosfolípidos.                       | -  |
| GPx1 (citósólico)           |  | Reduce carga viral mediante prevención de mutaciones virales; su deficiencia causa cardiomiopatía.                              | Síndrome metabólico, presión arterial alta, hemorragia intracerebral; cáncer de pulmón, próstata, hígado y vejiga; enfermedad de Keshan y de Kashin-Bock; autismo. |
| GPx2 (gastrointestinal)     |  | Función anti apoptótica en criptas de colon; ayuda a mantener la integridad de la mucosa intestinal.                            | -  |
| GPx3 (extracelular)         |  | Antioxidante en fluidos extracelulares; protección tiroidea contra peróxido de hidrogeno en tirocitos y en folículos del lumen. | Cáncer diferenciado de tiroides; derrame cerebral isquémico.   |
| GPx4 (fosfolipídica)        |  | Asociada a membranas; juegan un rol esencial en movilidad y viabilidad de espermatozoides. Así como en inmunidad en células T.  | Pólipos adenomatosos, adenocarcinomas colorrectales; cáncer de colon; cáncer de mama.  |

|  |   |  |   |
|--|---|--|---|
| Yodotironina desyodasas                                    |   | Producción de hormonas tiroideas T <sub>3</sub> , y reversa (rT <sub>3</sub> ).  | -   |
| Dio1 (tiroides, hígado, riñón, etc.)                       | Tiroidea                                | Producción de T <sub>3</sub> en tiroides y tejidos periféricos.  | Concentraciones libres de IGF-1, fuerza muscular, masa corporal sin grasa   |
| Dio2 (cerebro, pituitaria, músculo, oreja, corazón etc.)   | Hormonal                                | Producción de T <sub>3</sub> en tejidos periféricos.   | Diabetes tipo 2 y resistencia a insulina; osteoartritis, densidad mineral ósea; deficiencia mental.   |
| Dio3 (córtex, piel, cerebral, placenta, útero en embarazo) |   | Producción de rT <sub>3</sub> ; previene la sobre exposición del feto a T <sub>3</sub> .   | Osteoartritis.  |
| 15 KDa Selenoproteína (SEPP15)                             | Desdoblamiento de proteínas             | Localizada en RE; puede afectar el plegamiento de glicoproteínas .   | Cáncer de próstata; cáncer de pulmón; cáncer de colon.  |
| Selenoproteínas P (SEPP1)                                  | Transporte<br>Antioxidante              | Transporte de selenio desde hígado a tejidos a través de plasma, incluyendo el cerebro, testículos y la placenta; presenta algunas funciones antioxidantes; necesario para el cerebro y para fertilidad masculina; correlacionada con glucosa en plasma sanguíneo. | Cáncer próstata; afecta estatus de selenio -selenio y SEPP en plasma- y expresión de otras seleno proteínas; adenoma de colon; cáncer de colon. |
| Selenoproteína N (SeIN)                                    | Homeóstasis de calcio                   | Localizada en RE; puede regular movilidad de calcio requerido para pronto desarrollo muscular  | -   |
| Tiorredoxina reductasa (TrxR)                              |   | Actividad redox con amplio rango de sustratos, principalmente tiorredoxina, requerida para síntesis de ADN   | -   |
| TrxR1 (citoplasmática /nuclear)                            | Regulación de factores de transcripción | Controla actividad en factores de transcripción, proliferación celular, apoptosis; reducción de expresión conduce a menor crecimiento de tumoral.  | Adenoma de colon avanzado; esclerosis lateral amiotrófica familiar.   |
| TrxR2 (mitocondrial)                                       | Detoxificación                          | Indispensable para la viabilidad de cardiomiocitos; homeostasis redox; preserva integridad mitocondrial.   | Cáncer gástrico: la SNP en TrxR2 interactúa con GPx1 para afectar el riesgo.  |
| TrxR3 (específico en testículos)                           | Antioxidante                            | -  | -   |

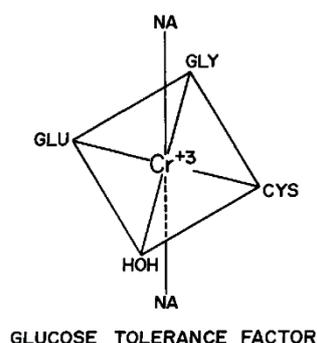
La particularidad de Se en el contexto de la salud humana consiste en un estrecho intervalo de concentraciones en el que se observan efectos favorables. Ya se mencionó antes que la ingesta recomendada corresponde a 55 - 75 µg Se/día, mientras que el límite superior seguro es de 400 µg Se/día y los efectos tóxicos se observan con dosis superiores de 800 µg Se/día. Otro aspecto que distingue Se de la mayoría de los micronutrientes es que su ingesta en alimentos y bebidas varía inmensamente a nivel mundial, fluctuando desde cantidades deficientes a muy excesivas.

En el caso de ingesta de cantidades tóxicas, lo que ocurre en las regiones con suelos seleníferos (por ejemplo, la provincia Enshi de China), en la población se observan síntomas tales como halitosis, pérdida de cabello y uñas, desordenes en sistema nervioso, pobre salud dental y en ocasiones parálisis<sup>42</sup>. Las ingestas típicas y adecuadas en América del Norte varían entre 80 y 140  $\mu\text{g Se/día}$ , con promedio de 93  $\mu\text{g Se/día}$  (mujeres) y 134  $\mu\text{g Se/día}$  (hombres); entre tanto en otras partes del mundo los niveles de selenio son considerablemente más bajos. Específicamente, en Europa y en Nueva Zelanda los intervalos van desde  $<30$  a  $60 \mu\text{g/día}$  y en algunas regiones de China, se han reportado ingestas menores a  $10 \mu\text{g/día}$ <sup>1</sup>. Claramente, existen poblaciones grandes alrededor del mundo que no cumplen con los requerimientos mínimos de selenio establecidos, lo que se atribuye al bajo contenido de selenio en suelo y agua. Aunado a las fluctuaciones de concentraciones totales de Se, su biodisponibilidad en la cadena alimenticia depende de las formas fisicoquímicas presentes en un sitio dado, del pH y del contenido de materia orgánica en el suelo, y finalmente la presencia de otros minerales que pueden formar compuestos con selenio disminuyendo su disponibilidad<sup>43</sup>.

Así pues, el estatus de selenio en los seres humanos, varía en diferentes partes del mundo de acuerdo con su correspondiente ingesta en la dieta. Dicho estatus se evalúa con base a las concentraciones de Se en suero o plasma y, de manera general, niveles normales de Se corresponden al intervalo  $60 - 120 \mu\text{g/L}$ . En el caso de concentraciones inferiores, se recomienda suplementación con selenio. Se ha demostrado tanto a nivel de investigación como en la práctica que los suplementos de Se ayudan a restaurar el estatus de Se, disminuyendo riesgo de enfermedades e incluso eliminando sus síntomas. Por otro lado, también se han reportado efectos adversos en casos de prolongada administración de ciertos suplementos, asociados con excesiva acumulación de Se en el organismo. Específicamente, se han asociado altas concentraciones de Se en torrente sanguíneo con un incremento en prevalencia de diabetes y alto riesgo de adquirir cáncer<sup>1, 7, 44, 45</sup>. A pesar de muchas evidencias acumuladas, no existe consenso en cuanto a las recomendaciones acerca de estrategias, dosis y tiempos de suplementación. Por ejemplo, para la población de los E.U., no se recomienda tomar suplementos al tener concentración de Se en suero mayor de  $122 \mu\text{g/L}$ <sup>1, 46</sup>; sin embargo, un incremento de selenio hasta  $130-150 \mu\text{g/L}$  ha sido asociado con la mínima mortalidad<sup>45, 46</sup>. Finalmente, es necesario también mencionar que se debería de evitar tratamientos de suplementación con selenio por periodos prolongados, para prevenir excesiva acumulación de Se y evitar así sus efectos adversos en el organismo.

### 1.2.2 Cromo

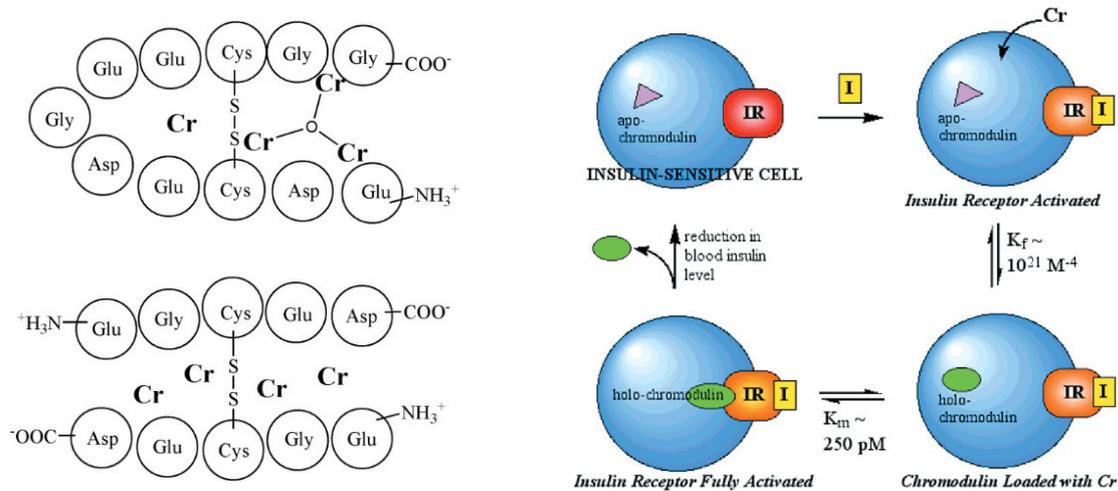
La biodisponibilidad de Cr(III) en forma de compuestos inorgánicos es baja (aprox. 2%), pero la reactividad de ion libre dentro de un ambiente celular puede causar efectos adversos. Específicamente, Cr(III) puede sustituir a Fe(III) en su unión con transferrina, además de formar aductos con otras biomoléculas, afectando su estructura y funcionalidad<sup>47, 48</sup>. En la década de los años 50 del siglo pasado, se reportó un efecto benéfico de Cr(III) contenido en levadura sobre el metabolismo de glucosa y lípidos<sup>18</sup>. Para resolver la aparente controversia se ha propuesto que en levadura se forma un complejo denominado GTF (factor tolerante a glucosa) como forma biológicamente activa del Cr(III). GTF ha sido descrito como complejo de Cr(III) con ciertos aminoácidos (glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína) y en conjunto con el ácido nicotínico (Figura. 1), aunque la estructura no ha sido completamente elucidada<sup>18, 49, 50</sup>.



**Figura 1.** Estructura hipotética de GTF. La característica crucial de la actividad biológica es la coordinación plana del ácido nicotínico (NA) con el cromo trivalente. Las mitades de aminoácidos, cisteína, ácido glutámico y glicina hacen que la sal sea soluble en agua<sup>51</sup>.

Para explicar el mecanismo subyacente del efecto de Cr(III) en metabolización de glucosa y lípidos en humanos, se ha propuesto la formación de cromodulina - un compuesto de baja masa molecular que, al unirse con Cr(III) se convierte en una forma biológicamente activa (LMWCr low molecular weight chromium)<sup>48, 52, 53</sup>. Se ha reportado también que cromodulina ayuda a eliminar exceso de Cr en orina, lo que apunta a su adicional rol “destoxicante” en el organismo<sup>50</sup>. La cromodulina ha sido descrita como un oligopéptido sintetizado en hígado, compuesto de glicina, cisteína, aspartato y glutamato, con abundantes grupos carboxílicos que

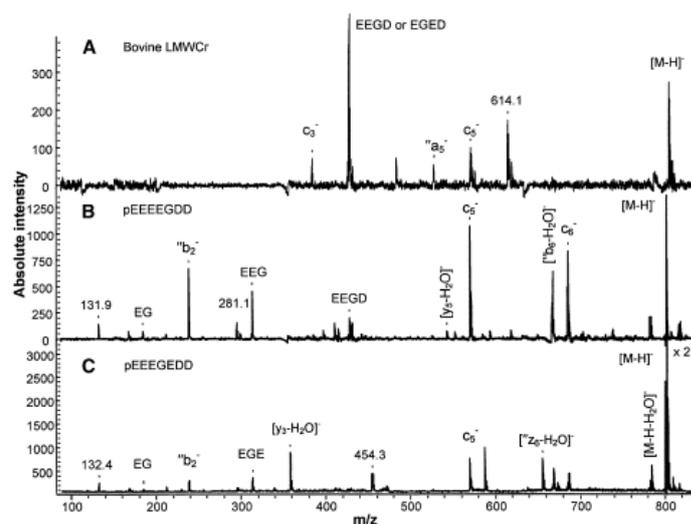
aseguran unión de cuatro equivalentes de Cr(III) por una molécula, con la constante de formación  $K_f = 1 \times 10^{21} \text{ M}^{-4}$ .



**Figura 2.** Estructura hipotética de cromodulina propuesta por Vincent y col. (izquierda)<sup>55</sup>; mecanismo propuesto para la activación del receptor de insulina por “cromodulina” (LMWCr) en respuesta a insulina. IR: Receptor de insulina; I: Insulina (derecha)<sup>49</sup>.

La estructura hipotética de LMWCr, propuesta en base a búsqueda de secuencias genómicas se presenta en la Figura 2<sup>55</sup>. Se ha propuesto que LMWCr puede funcionar como parte de un sistema único de auto amplificación para señalización de insulina<sup>49</sup> (Figura 2). Cabe recordar que, cuando la concentración de insulina en sangre incrementa (después de la ingesta de alimentos), se une a su receptor provocando cambio conformacional que resulta en la auto fosforilación de un residuo de tirosina en el receptor. El resultado es una activa tirosina quinasa que permite transmitir señales de insulina a las células. El papel de Cr(III) ha sido planteado de manera que, en respuesta al incremento de la insulina, el cromo es transportado desde sangre a las células sensibles a insulina para unirse con apo-cromodulina presente en estas células. Finalmente, el holoLMWCr se une al receptor amplificando su actividad quinasa. Cuando la señalización se acaba, una caída en los niveles de insulina en sangre facilita la relajación de la conformación del receptor, y el holoLMWCr es excretado de la célula. Por último, LMWCr se elimina en la orina<sup>49</sup>. Es sumamente importante mencionar que el aislamiento y la caracterización estructural de cromodulina han sido desafiantes, por lo tanto, la formación de unión cromodulina-Cr(III) y su papel en mejorar la sensibilidad a insulina no han sido elucidados por completo, aunque ambos aspectos han sido estudiados en modelos de resistencia a insulina y diabetes<sup>56-58</sup>. Cabe también resaltar que el enfoque principal de estudios realizados hasta la fecha ha sido en la identificación de especies biológicamente activas de Cr(III) en

líneas celulares y/o tejidos tanto de manera *in vitro* como *in vivo*<sup>6, 47, 50, 52, 59, 60</sup>. En este contexto, la espectrometría de masas es una herramienta de gran utilidad para la caracterización de compuestos involucrados en la acción benéfica de Cr(III) en el organismo. Específicamente, Vincent y col. analizaron un extracto de hígado bovino mediante MALDI-TOF MS y ESI-QIT MS en modo negativo; e identificaron al péptido pGluGluGluGluGlyAspAsp, asignándolo como parte de LMWCr<sup>52</sup>. En la Figura 3. se observa el espectro de masas PSD (Post Source Decay) obtenido del ion  $m/z$  804 proveniente de LMWCr de hígado bovino, comparada con 2 secuencias de péptidos sintéticos *B* y *C*, coincidiendo las señales de masas de los iones  $m/z$  384, 428, 482 y 570, presentes tanto en el péptido aislado como en los estándares<sup>52</sup>.



**Figura 3.** Espectro de masas en modo negativo  $[M-H]^-$  mediante MALDI/TOF PSD de (A) péptido extraído de hígado bovino con  $m/z$  804 correspondiente a péptido parte de LMWCr; (B)  $m/z$  802 de péptido sintético pEEEEGDD; y (C) péptido sintético pEEEGEDD.<sup>52</sup>

Sin duda, este trabajo fue un gran avance hacia el entendimiento del rol fisiológico de Cr(III) y una aportación a nivel molecular en los estudios de suplementación con cromo. Queda sin embargo abierta la problemática del uso de Cr(III) en el tratamiento de síntomas de diabetes mellitus tipo-2 y de otras enfermedades relacionadas con deficiente metabolismo de carbohidratos y lípidos.

En resumen, se sabe que suplementación con Cr(III) tiene efectos benéficos en la salud humana, principalmente relacionados con mejoramiento de la función de insulina y decremento de los niveles de triglicéridos; con ello se logra una menor incidencia de síndrome metabólico, el apoyo en el control de diabetes y mejor control de masa y composición corporal<sup>2, 3, 11, 50</sup>. Sin

embargo, también se sabe de algunos casos aislados donde tratamientos prolongados o en dosis altas generan efectos adversos a la salud en los que se incluye estrés oxidativo, genotoxicidad y daño renal<sup>61</sup>. A diferencia de Se, la elucidación estructural de las especies de Cr(III) presentes en alimentos/suplementos, de aquellas formados en el organismo humano y el entendimiento de los mecanismos responsables de su acción benéfica, siguen siendo un reto después de casi 60 años de haber estudiado el papel de Cr(III) en el metabolismo de carbohidratos. En paralelo con investigación de bases moleculares subyacentes del papel de Cr(III) en el organismo, se están buscando las mejores estrategias de suplementación<sup>11, 60, 62</sup>. Como uno de los temas actuales, hay que mencionar la búsqueda de la forma de Cr(III) más adecuada en suplementos para asegurar su buena biodisponibilidad y utilización en el control de metabolismo de carbohidratos y lípidos, evitando al mismo tiempo excesiva acumulación de Cr y relacionado con ello, efectos adversos<sup>60, 62</sup>.

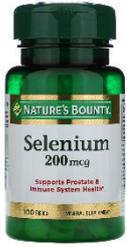
### 1.3 Suplementos dietéticos de Se y Cr(III)

Los suplementos dietéticos se definen como productos naturales, intencionalmente enriquecidos o sintéticos, que contienen vitaminas, minerales, aminoácidos y/o extractos de ciertos organismos, mismos que se administran para incrementar la ingesta dietética total, complementarla o suplir alguno de sus componentes, y así reducir el riesgo de desarrollar enfermedades<sup>63</sup>. El “Center for Food Safety and Applied Nutrition” (CFSAN), parte de la FDA, es la responsable de supervisar estos productos en Estados Unidos de Norte América; mientras tanto en México, la Secretaría de Salud es la responsable a través de la COFEPRIS. Los suplementos dietéticos no necesitan contar con algún registro sanitario, el fabricante es responsable de someter un “aviso de funcionamiento” de estos productos, y deberá de cumplir con el contenido, etiquetado e inocuidad de su producto. Dentro de los suplementos dietéticos más usados, se encuentran los vitamínicos/ multi-minerales (MVMs), normalmente conteniendo algunas de las siguientes especies o combinación de ellas: vitaminas A, C, D, E y K, conjunto de vitaminas B; así mismo especies de Ca, Fe, Zn, Co, Se, Cr, etc. Éstos deben contener conocidas y adecuadas concentraciones de las formas biodisponible, bioactivas y estables de los elementos de interés.

En el caso de suplementos obtenidos mediante procesos biotecnológicos (a partir de plantas y microorganismos), estos suelen contener de manera adicional antioxidantes, vitaminas, aminoácidos y proteínas que en su conjunto potencializan los efectos benéficos para la salud.

En cuanto al selenio, en la sección 1.2.1 quedó demostrada la necesidad de su suplementación. Aunque los alimentos y agua potable pueden contener de manera natural diferentes especies de Se, desde oxo-aniones inorgánicos hasta seleno aminoácidos libres o incorporados en la estructura de proteínas, en muchas regiones su ingesta diaria es deficiente. Las rutas de asimilación de Se en mamíferos han sido extensivamente estudiadas y, como ya se ha mencionado, independientemente de la especie ingerida, el Se es llevado a un pool de seleniuro ( $H_2Se$ )<sup>64</sup>. En el caso de Se(IV) o Se(VI), ocurre la reducción con participación de glutatión como donador de electrones. En el caso de especies orgánicas, las enzimas del grupo liasas son responsables por la ruptura de enlaces de Se liberando directamente  $H_2Se$  o primero  $CH_3SeH$  y después, por acción de desmetilasas en  $H_2Se$ <sup>65</sup>. A partir de seleniuro, el Se puede ser utilizado para la síntesis de aminoácidos y proteínas o puede ser metilado para su eliminación en orina o como compuestos volátiles<sup>65</sup>. Debido a que prácticamente todas las especies de Se pueden ser asimiladas y utilizadas por el organismo humano, la selección de la especie para suplementación no parece ser importante; aunque es reportado que se prefieren las formas orgánicas por dos razones: (i) asimilación de Se inorgánico consume GSH y provoca estrés oxidativo, y (ii) muchas de las formas orgánicas tienen demostrada actividad biológica en prevención de cáncer. En la Tabla 2 se muestra un resumen de los diferentes suplementos dietéticos de Se disponibles en el mercado mexicano, mostrando la identidad de la especie de Se presente.

**Tabla 2.** Suplementos dietéticos de selenio con sus especies disponibles y concentración en el mercado mexicano.

| Suplemento comercial  | Contenido de Se en etiqueta ( $\mu g$ ) | Forma de selenio                                     | Vitaminas, proteínas, antioxidantes, aminoácidos  | Costo MXN |
|---|---|--|---|-----------|
| Nature's Bounty Selenium<br> | 200                                     | <i>S. cerevisiae</i> enriquecida con selenio (SeMet) | Levadura de cerveza, celulosa vegetal, ácido esteárico, sílice, estearato de magnesio vegetal | \$ 135    |

|  |            |   |  |              |
|--|------------|---|--|--------------|
| <p>Solgar Selenium</p>                  | <p>200</p> | <p><i>S. cerevisiae</i><br/>enriquecida con selenio<br/>(SeMet)</p> | <p>Levadura de cerveza, sulfitos,<br/>trigo, ácido esteárico vegetal</p>   | <p>\$410</p> |
| <p>GNC Sel</p>                          | <p>100</p> | <p><i>S. cerevisiae</i><br/>enriquecida con selenio<br/>(SeMet)</p> | <p>Fosfato di cálcico<br/>celulosa<br/>dióxido de silicio<br/>ácido esteárico<br/>estearato de magnesio</p>  | <p>\$230</p> |
| <p>Amazing Formulas<br/>Selenium</p>  | <p>200</p> | <p><i>S. cerevisiae</i><br/>enriquecida con selenio</p>             | <p>Levadura de cerveza, fosfato di<br/>cálcico, celulosa, dióxido de<br/>silicio, estearato de magnesio,<br/>ácido esteárico, croscarmelosa<br/>de sodio</p> | <p>\$800</p> |
| <p>BIOVEA Selenium</p>                | <p>100</p> | <p>L-SeMet</p>  | <p>Harina de arroz, hidroxipropil,<br/>metilcelulosa, estearato de<br/>magnesio vegetal</p>  | <p>\$235</p> |

|  |     |   |  |       |
|--|-----|---|--|-------|
| <p>NOW Selenium</p>                             | 200 | L-SeMet   | Harina de arroz, hipromelosa, ácido esteárico vegetal  | \$250 |
| <p>Salud&amp;Vida Selenio</p>                   | 100 | L-SeMet   | Harina de arroz, vitamina C, β-caroteno, sorbitol, hidroxipropil, metilcelulosa, dióxido de silicio      | \$190 |
| <p>Country Life Selenium</p>                  | 100 | L-SeMet   | Celulosa, metilcelulosa, dióxido de silicio, estearato de magnesio, ácido esteárico                      | \$250 |
| <p>Life Extension Super Selenium Complex</p>  | 200 | Me-SeCys, SeMet, Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> | Vitamina E (20 mg), celulosa micro cristalizada, ácido esteárico, dióxido de silicio, fosfato di cálcico | \$220 |

Se puede observar en la Tabla 2 que, la mayoría de los suplementos comerciales son producidos a partir de levadura (*S. cerevisiae*) enriquecida *in vivo* con Se. Para ello, durante el crecimiento de la levadura se agrega Se(IV) al cultivo; los microorganismos lo retienen y

transforman principalmente en SeMet - la cual se incorpora de manera no específica a las proteínas. Estos suplementos son muy bien caracterizados, tanto a nivel de las condiciones empleadas durante su producción, como en términos de especiación de Se<sup>13, 66-68</sup>. Se considera que la levadura selenizada es de buena calidad si Se en forma de SeMet corresponde a 60-90 % de selenio total y el residuo de Se(IV) a menos de 1 % de Se total<sup>69</sup>. Entre las ventajas de levadura como fuente de selenio hay que mencionar: (i) SeMet como forma orgánica, mayoritaria y estable de Se; (ii) alto contenido de Se orgánico (más de 1000 mg Se/kg); (iii) es un proceso de producción rápido y controlado. Como se observa en la Tabla 2, algunos suplementos contienen SeMet en forma libre y no incorporada a las proteínas. A pesar de la clara preferencia por SeMet (principalmente por su relativamente fácil obtención y buena estabilidad), hay evidencias de su acumulación y de efectos adversos cuando la ingesta es a largo plazo<sup>70</sup>. Otras formas orgánicas de Se, especialmente SeMeCys y  $\gamma$ -glutamil-Se-metilcisteína, son sintetizadas en las plantas y presentan una mayor actividad biológica; sin embargo, estas especies son menos estables y su obtención en relativamente altas concentraciones es más difícil en comparación con SeMet; por ello, suplementos con estos compuestos son relativamente escasos. Se pueden también mencionar suplementos que contienen Se(IV) en forma de selenito de sodio, aunque la asimilación de Se de esta forma requiere etapa de reducción, lo que expone a los consumidores a un aumento de estrés oxidativo.

A pesar de extensos estudios dedicados a la producción de suplementos, caracterización estructural y cuantificación de especies de Se, relativamente poco se sabe sobre el impacto que este elemento tiene en los organismos utilizados para producir suplementos dietéticos, específicamente a nivel proteómico y metabolómico. Estos datos serían de importancia en el contexto de valor nutritivo de suplementos basados en microorganismos enriquecidos *in vivo* con Se. El proyecto de tesis se enfoca en la evaluación de impacto de Se(IV) en levadura de pan a nivel de proteoma, en el fraccionamiento isotópico de Se durante el proceso de bio - fortalecimiento de levadura y en la evaluación de la actividad antioxidante de nanopartículas de selenio elemental formadas como resultados de la actividad metabólica de levadura.

Como ya se mencionó anteriormente, el Cr(III) como catión inorgánico no está biodisponible y, de hecho, solamente 2% de la cantidad ingerida se absorbe en el tracto digestivo. También se sabe que, además de su papel benéfico en el metabolismo de carbohidratos, Cr(III) ejerce efectos tóxicos en el ambiente celular mediante formación de aductos con biomoléculas. El ion Cr(III) en el tracto sanguíneo se une a transferrina y es transportado a diferentes órganos y

tejidos<sup>50</sup>; el Cr(III) utiliza sitios de unión de Fe(III) de manera similar como ocurre para Al(III) o Bi(III)<sup>48</sup>. Por otra parte, el Cr(III) al unirse con apo-cromodulina, presenta actividad biológica mediante unión al receptor de insulina. Como ya fue mencionado en la sección 1.2.2, la cromodulina es un oligopéptido y se aisló a partir de hígados de algunos animales; y solo una parte de su estructura fue elucidada por espectrometría de masas<sup>48, 52</sup>; aunque todavía faltan evidencias contundentes de su formación y su papel biológico en humanos.

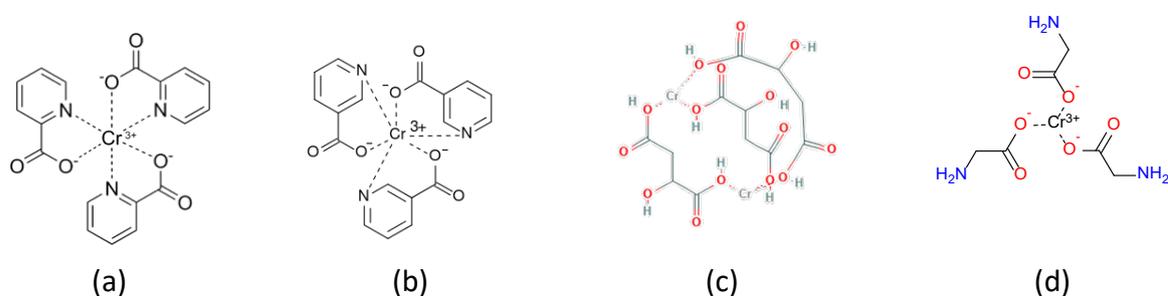
Además de la función en transporte de Cr(III), algunos autores proponen que la unión Cr(III)-Tf ayuda en prevenir efectos tóxicos de Cr(III) a nivel celular<sup>71</sup>. Cabe también mencionar que Cr(III), al unirse con Tf, provoca cambios conformacionales de proteína y, dependiendo de las condiciones -principalmente del pH y de la cinética de liberación de Cr(III)-, puede ser lenta o rápida<sup>59</sup>. En este sentido, en un estudio reciente Vincent y col. argumentan que dicha liberación es suficientemente rápida para ser fisiológicamente relevante<sup>47</sup>. En otras palabras, se propone que transferrina no solamente transporta el Cr(III) en el torrente sanguíneo, pero también lo entrega a los sitios de acción específicos en diferentes tejidos del cuerpo. Los hallazgos que se acaban de describir son de relevancia para la suplementación con Cr(III), donde principalmente se utilizan las formas orgánicas para asegurar efectiva absorción del Cr(III) en el tracto digestivo, pero muy poco se sabe de su transporte y de los posibles complejos de cromo formados *in vivo*. Específicamente, en el contexto de trabajo de tesis, parece interesante estudiar la interacción de diferentes formas de Cr(III) que son utilizadas en suplementos comerciales, y con proteínas de suero humano. Los resultados podrían contribuir en un mejor entendimiento de papel biológico de Cr(III), así como establecer la mejor forma para su suplementación.

**Tabla 3.** Suplementos dietéticos de cromo disponibles comercialmente en México, indicando forma de Cr(III) y su concentración.

| Suplemento comercial   | Contenido de Cr(III) (µg) | Forma de cromo (III) | Vitaminas, proteínas, antioxidantes, aminoácidos | Costo  |
|--|---------------------------|----------------------|--|--------|
| Pure encapsulations<br> | 200                       | Picolinato de cromo  | -  | \$ 250 |

|   |                    |  |  |              |
|---|--------------------|--|--|--------------|
| <p>Solgar</p>              | <p>200<br/>500</p> | <p>Picolinato de cromo</p>                                 | <p>Celulosa microcristalina, celulosa vegetal, estearato de magnesio vegetal</p>   | <p>\$410</p> |
| <p>GNC Chromium</p>        | <p>200</p>         | <p>Picolinato de cromo</p>                                 | <p>Fosfato di cálcico, celulosa, dióxido de silicio, ácido esteárico, estearato de magnesio vegetal</p>  | <p>\$300</p> |
| <p>INNATE</p>            | <p>100</p>         | <p>GTF<br/>(levadura <i>S. cerevisiae</i>)</p>             | <p>Extracto de arroz orgánico, <i>S. cerevisiae</i>, brócoli orgánico, zanahoria orgánica, hojas de perejil orgánico</p>                             | <p>\$610</p> |
| <p>(ChromoPrecise®)</p>  | <p>100</p>         | <p>Levadura <i>S. cerevisiae</i> enriquecida con cromo</p> | <p>Levadura, maltodextrina, celulosa micro cristalizada, talco mineral, hidroxipropil, metil celulosa, dióxido de silicio, estearato de magnesio</p> | <p>\$600</p> |
| <p>Jarrow FORMULAS</p>   | <p>200</p>         | <p>GTF (Levadura <i>S. cerevisiae</i> enriquecida)</p>     | <p>Levadura, celulosa, estearato de magnesio vegetal, capsulas en base a gretina</p>   | <p>-</p>     |

En la Tabla 3, se presentan los suplementos de Cr(III) disponibles en el mercado mexicano. De manera similar a Se, varios de los suplementos contienen levadura *S. cerevisiae* enriquecida *in vivo* adicionando al medio de cultivo el cloruro de cromo (III)<sup>18</sup>. En estos productos aparece la etiqueta GTF como forma activa de Cr(III). Cabe señalar que, en estudios clínicos, levadura enriquecida con Cr(III) demostró múltiples beneficios sin presentar adversos efectos secundarios. En el caso de pacientes diabéticos, se utilizaron dosis desde 20 µg/día a 1000 µg/día por periodos de 2 meses a 7.8 años, logrando un buen control de niveles de glucosa<sup>60</sup>. Es importante recordar sin embargo que, la identidad de GTF no ha sido elucidada y tampoco se conocen mecanismos responsables por su absorción en el tracto digestivo y su metabolismo en el organismo humano. Por otro lado, GTF y otras formas orgánicas de Cr(III) son preferidas en suplementación debido a que especies inorgánicas, como cloruro de cromo (III) y sulfato de cromo(III) administradas por periodos prolongados, provocan efectos tóxicos<sup>60</sup>. Fuera de cualquier duda, los suplementos más utilizados a nivel mundial son los que contienen picolinato de Cr(III) (CrPic<sub>3</sub>) y también estos suplementos son populares en México, tal como se muestra en la Tabla 3. Se puede observar que, en CrPic<sub>3</sub>, el ion Cr(III) está coordinado por tres moléculas del ácido picolínico y se ha demostrado que el Cr(III) es más biodisponible en esta forma respecto a compuestos inorgánicos de Cr(III)<sup>60</sup>; sin embargo, es importante mencionar cierta controversia que ha crecido con relación a CrPic<sub>3</sub>. Por un lado, en varios estudios se reportó su efectividad en el control de peso<sup>72</sup> y también en el manejo de niveles de glucosa y de lípidos, especialmente en pacientes diabéticos<sup>60, 73</sup>. Y por otro lado, se han obtenido numerosas evidencias de la falta de efectos benéficos e incluso de su carácter tóxico<sup>74, 75</sup>; aunado a ello no hay certeza en cuanto a los mecanismos responsables por su absorción y transformación en el organismo humano.



**Figura 4.** Estructura de compuestos orgánicos sintéticos utilizados en suplementos dietéticos de Cr(III): (a) picolinato de cromo(III); (b) polinicotinato de Cr(III); (c) malato de Cr(III); (d) glicinato de Cr(III).

Es de notar el continuo esfuerzo en mejorar la efectividad de los suplementos de Cr(III) en forma de compuestos orgánicos sintéticos, Figura 4; tal es el caso de polinicotinato de Cr(III) (*5b*)<sup>76</sup>, malato de Cr(III) (*5c*)<sup>77</sup>, glicinato (*5d*)<sup>78</sup>, entre otros.

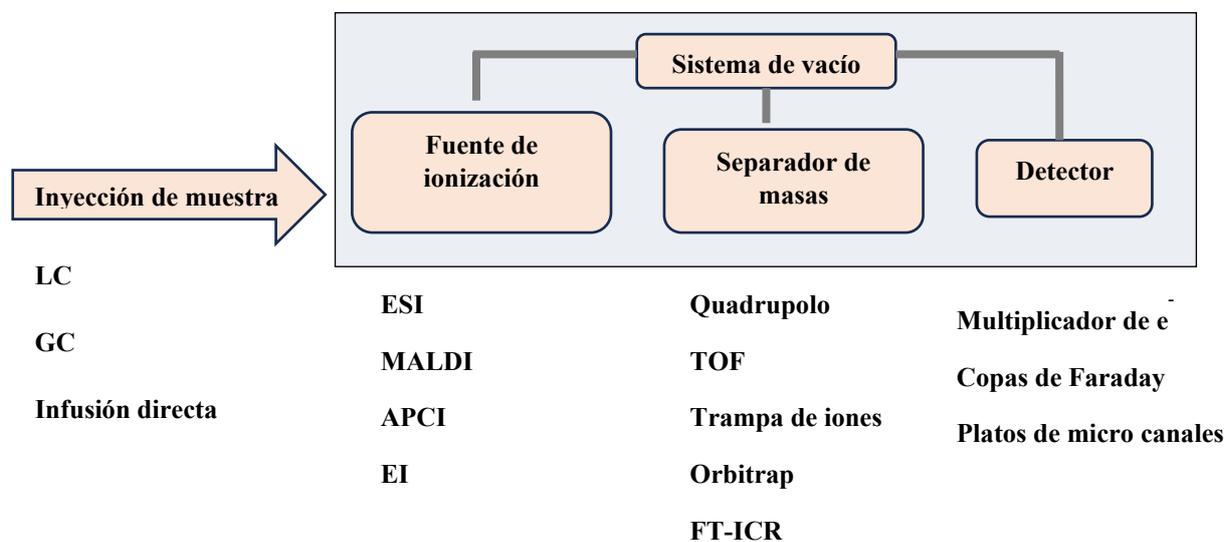
En resumen, en cuanto a suplementos dietéticos de Cr(III) se pueden distinguir tres líneas principales de investigación: (i) establecer el protocolo de un eficaz enriquecimiento de levadura con Cr(III); (ii) profundizar en el conocimiento sobre mecanismos responsables de los efectos benéficos de levadura enriquecida y (iii) establecer cuáles compuestos orgánicos sintéticos son más efectivos en la suplementación y entender los mecanismos responsables de su actividad biológica. En el proyecto de tesis, se propone estudiar el primer aspecto, evaluando diferentes medios de cultivo y estrategias de exposición a diferentes formas de Cr(III); como criterio de selección se evaluará la producción de biomasa y la concentración de Cr en dicha biomasa.

La realización de estudios planteados hasta ahora requiere el uso de las herramientas de química analítica moderna, incluyendo espectrometría de masas. Por ello, en las siguientes secciones se hace una breve reseña de herramientas utilizadas en el trabajo.

#### 1.4 Espectrometría de masas como herramienta analítica

La espectrometría de masas es una familia de técnicas analíticas que pueden ser utilizadas para el análisis cualitativo y/o cuantitativo de una gran variedad de analitos en función de la relación  $m/z$  de los iones generados en fase gas. Moléculas pequeñas, péptidos, y proteínas se encuentran entre especies analizadas rutinariamente por espectrometría de masas (MS). Sin embargo, el análisis por MS no es trivial y se requiere de diferentes configuraciones instrumentales; donde se definen cinco principales componentes: (i) sistema de introducción de muestra, (ii) dispositivo de ionización, (iii) separador de masas, (iv) detector, y (v) procesador, siendo además una parte esencial el sistema de alto vacío. De manera general, el análisis por espectrometría de masa inicia con la introducción de muestra al dispositivo de ionización, donde se generan iones en fase gaseosa. La separación de estos iones requiere que no haya colisiones con otras moléculas mientras estos viajan por el espectrómetro, lo cual ocurre en condiciones de alto vacío ( $10^{-3} - 10^{-9}$  torr). Posteriormente los iones son separados con base a sus relaciones  $m/z$  antes de llegar al detector, el cual tiene la función de censar los iones, convertir el conteo en la corriente eléctrica y amplificar la señal normalmente en varias órdenes de magnitud. En el último paso, un procesador de señales convierte la información en

un conjunto de picos denominados como espectro de masas; en el que se grafica la abundancia de los iones respecto a su relación  $m/z$ . El proceso completo se esquematiza en la Figura 5.



**Figura 5.** Componentes principales de un instrumento de espectrometría de masas (MS).

La *resolución de masa* y el *poder de resolución de masa* son dos términos atribuidos a la capacidad de un espectrómetro de masas para poder adquirir de manera individual dos señales de  $m/z$  muy próximas entre sí.

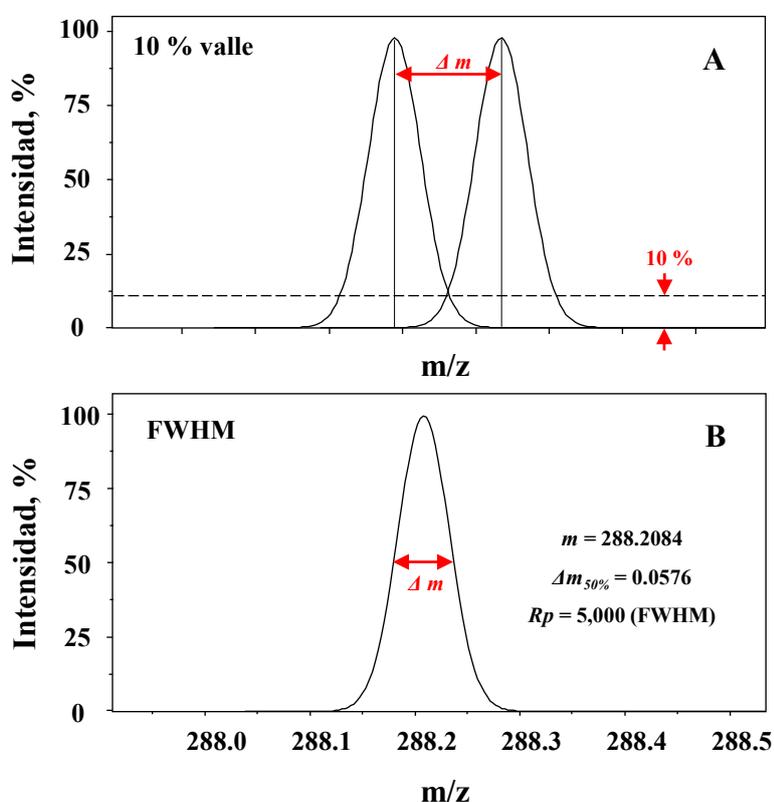
La IUPAC define el *poder de resolución de masa* como la capacidad de un espectrómetro de masas para distinguir entre dos iones con una mínima diferencia de  $m/z$  entre ellos, calculándose como:

$$R_p = \frac{m/z}{\Delta (m/z)} \quad \text{Ec. 1}$$

En donde  $m/z$ , es el valor del pico al cual la resolución fue calculada; mientras tanto que el valor de  $\Delta (m/z)$  puede ser determinado por dos métodos diferentes: (i) definición de 10 % valle y (ii) definición de anchura de pico.

En el primer caso; el  $\Delta (m/z)$  se define como la diferencia entre dos picos,  $(m/z)_1$  y  $(m/z)_2$ , los cuales tienen parecida intensidad y deberían ser resueltos entre ellos por la existencia de un valle en un punto mínimo correspondiente al 10 % de la altura de uno de los dos picos; donde el ion dos se define a partir del primero mediante la ecuación:  $(m/z)_2 = (m/z)_1 + (\Delta m/z)$ . Esta definición se aplica comúnmente a espectrómetros del tipo sector magnético.

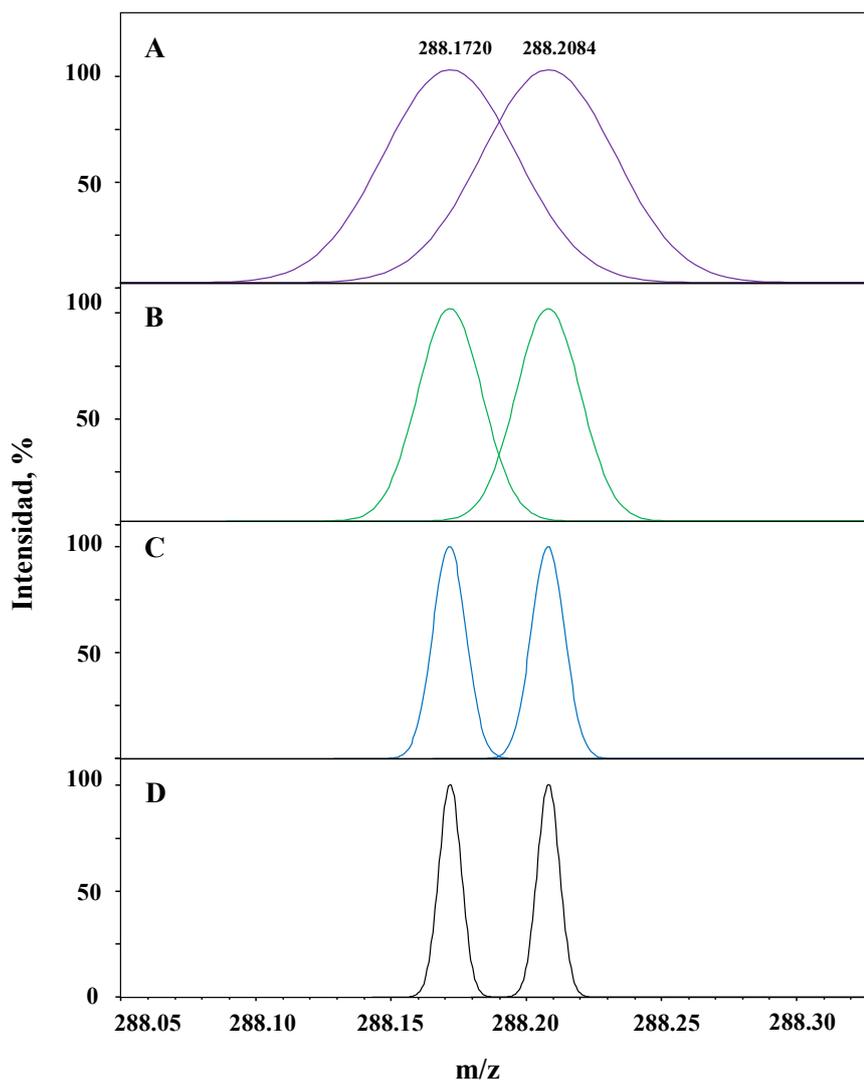
Por otro lado, en la definición de anchura de pico, la medición es realizada en un solo pico de masa y el valor  $\Delta(m/z)$  es determinado a cierta altura del pico, comúnmente a la mitad del pico y es conocida como anchura completa máxima en la altura media del pico (FWHM). Esta metodología es comúnmente utilizada en cuadrupolos de filtro de masa, trampa iónica, tiempo de vuelo, movilidad iónica e instrumentos de transformada de Fourier como el Orbitrap e ICR. En Figura 6, se presenta el poder de resolución de masa para un instrumento bajo las dos metodologías de cálculo de  $\Delta m$ , por definición de valle 10 % y por definición de anchura de pico (FWHM). Instrumentos de poder de resolución alta son normalmente atribuidos a valores de resolución mayores de 10,000; donde se excluye a los filtros de masas del tipo cuadrupolo y a los analizadores de trampa iónica<sup>79, 80</sup>.



**Figura 6.** Poder de resolución de masa para pico  $m/z$  288.2084, (A) definición de 10 % valle y (B) definición FWHM<sup>79</sup>. (El espectro de masa fue obtenido del software DataAnalysis 4.0).

La *resolución de masa* se define como la separación entre dos picos cercanos en el espectro de masas. Mientras que la IUPAC, menciona la resolución de masa como la pequeña diferencia de los valores  $m/z$  de dos picos adyacentes; pueden ser resueltos solo si la diferencia entre ellos es mayor al valor  $\Delta m/z$ , anteriormente descrito. Para tener buena exactitud en las mediciones

de  $m/z$ , la resolución en la línea base en ambos picos debería ser lograda. Esto involucra un poder de resolución ( $R_p$ ) mayor a tres veces la relación:  $(m/z)_2 / (\Delta m/z)$ . En la Figura 7, se observa claramente que la anchura de pico y la exactitud de masa son afectadas por el poder de resolución ( $R_p$ ) en el instrumento. Es evidente que al incrementar el poder de resolución se decreta la anchura de pico, logrando completa resolución de ambos picos a partir de valores  $R_p$  mayores de 20,000<sup>79</sup>.



**Figura 7.** Espectro de masas simulados para ionización positiva de 3-metil éter estradiol ( $[M+H]^+$ ,  $C_{19}H_{27}O_2$ ,  $m/z$  287.2006) y para 2-hidroxiestrone ( $[M+H]^+$ ,  $C_{18}H_{23}O_3$ ,  $m/z$  287.1642); se presentan los picos a poderes de resolución de (A) 5000, (B) 10000, (C) 20000 y (D) 30000<sup>79</sup>. (Los espectros de masas son simulados en el software DataAnalysis 4.0).

La exactitud es otro factor importante cuando se interpretan espectros de masas, la cual se refiere a que tan cerca está el valor de masa medido con respecto al valor de masa esperado

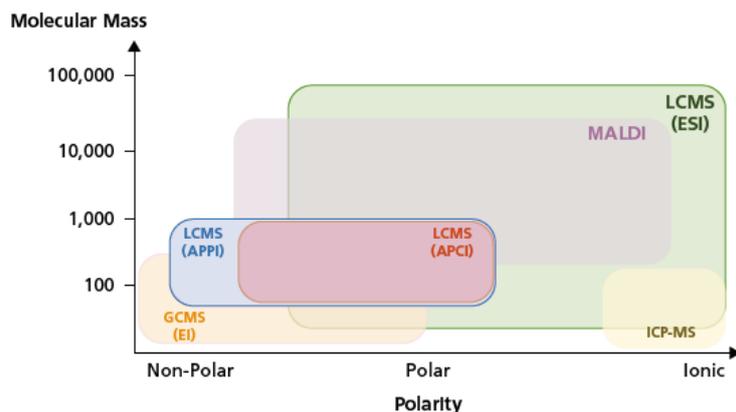
(verdadero). La exactitud de masa, calculada como la diferencia entre la masa experimental y teórica esperada dividida entre la masa teórica, varían enormemente entre diferentes sistemas de espectrometría de masas. Generalmente se expresa en base al error en partes por millón (ppm)<sup>81</sup>.

$$Error = \frac{m/z_{teórico} - m/z_{experimental}}{m/z_{teórico}} (10^6) [ppm] \quad Ec. 2$$

### 1.5 Sistemas de ionización

Independientemente de la metodología utilizada para introducción de muestra a un sistema de espectrometría de masas, se requiere generar iones de los analitos en fase gas. Existen diferentes técnicas de ionización y su uso depende del tipo de muestra a analizar y por tanto de sus propiedades físicas y químicas; por ejemplo, cuando moléculas en fase gas son introducidas a una fuente de ionización después de un sistema de cromatografía de gases (GC), la ionización por impacto de electrones (EI) y/o ionización química (CI) son técnicas altamente recomendadas. Por otro lado, cuando una separación se lleva a cabo a través de cromatografía de líquidos (LC), los analitos en fase líquida son ionizados en condiciones atmosféricas o muy cercanas a ella, utilizando métodos como: ionización por electronebulización (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), o fotoionización a presión atmosféricas (APPI). Destacan también otras técnicas de ionización comunes tal como plasma acoplado inductivamente (ICP), la desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI), desorción/ionización por electronebulización (DESI), ionización de evaporación rápida (REI) y desorción termal (TD).

En la Figura 8, se muestra un esquema donde se relaciona la técnica de ionización más adecuada para ciertos tipos de analitos en base a su polaridad y masa molecular. Destacando que para moléculas de baja masa molecular y de naturaleza no polar, ionización por impacto de electrones, APPI o ionización química son las más adecuadas. Mientras que, para el estudio de moléculas de gran tamaño molecular con naturaleza polar, la ionización por electronebulización (ESI) y MALDI son las más recomendada; por ejemplo, el análisis de proteínas y péptidos.



**Figura 8.** Esquema de rango de polaridad y de masa molecular cubierto por las técnicas de ionización (Shimadzu corporation).

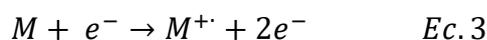
Las últimas dos técnicas de ionización mencionadas han revolucionado el uso de espectrómetros de masas en los últimos años. La importancia del desarrollo de MALDI y ESI fue globalmente reconocido cuando a los inventores, Koichi Tanaka de Shimadzu Corp y John Fenn de Virginia Commonwealth University, se les otorgó el premio Nobel en Química en 2002 por sus contribuciones en este campo. Sin embargo, mucho del crédito también debe ser reconocido a Michael Karas y Franz Hillenkamp, quienes desarrollaron inicialmente la idea de las técnicas de desorción láser<sup>82-84</sup>. En la Tabla 4, se presenta un breve resumen donde se compara diferentes métodos de ionización comúnmente utilizados en espectrometría de masas.

**Tabla 4.** Resumen de los atributos de diferentes métodos de ionización usados en espectrometría de masas

| Técnica de ionización                                  | Naturaleza de los analitos                      | Introducción de muestra                      | Rango de masa            | Descripción breve                              |
|--|---|--|--------------------------|--|
| Impacto de electrones (EI)                             | Volátiles; estables térmicamente                | Cromatografía de gases                       | < 1000 Da                | Método duro, formación de fragmentos           |
| Ionización química (CI)                                | Volátiles; estables térmicamente                | Cromatografía de gases                       | < 1000 Da                | Método suave; ion molecular                    |
| Bombardeo rápido de átomos (FAB)                       | Compuestos organometálicos                      | Cromatografía de líquidos                    | < 5000 Da                | Método suave; requiere matriz                  |
| Desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI) | Biomoléculas (proteínas, ADN, gluco-conjugados) | La muestra es co-cristalizada con una matriz | Por debajo de 500,000 Da | Método suave; formación de iones mono-cargados |
| Ionización por electrospray (ESI)                      | Compuestos inorgánicos y orgánicos              | Muestra en solución                          | De muy bajas a muy altas | Método suave; iones multiple cargados          |

### 1.5.1.1 Ionización por impacto de electrones – EI

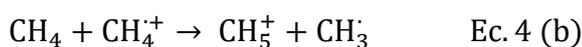
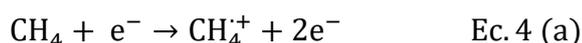
El impacto de electrones es la forma más común de ionización en aplicaciones de cromatografía de gases (GC). Ocurre en la reacción en fase gas descrita a continuación:



Donde M es la molécula neutra que se ioniza, y  $M^{+\cdot}$  es el catión radical originado en el proceso. Inicialmente, moléculas sin carga en fase gas son bombardeadas con un haz de electrones de alta energía de 70 eV. Una diferencia de potencial energiza la fuente de electrones, donde la colisión con moléculas neutras resulta en la eyección de dos electrones y la formación de un radical catiónico. Este proceso de alta energía considerado como “ionización dura” causa gran rompimiento de las moléculas, originando fragmentos diversos con valiosa información estructural para creación de librerías a partir de los patrones de fragmentación, permitiendo identificación de analitos en muestras desconocidas.

### 1.5.1.2 Ionización química – CI

La ionización química es una técnica de ionización suave comúnmente usada en GC-MS, caracterizada primordialmente por la formación de iones moleculares donde un protón es transferido o abstraído de un gas, habitualmente metano, amonio o isobutano. El resultado de la ionización química es la formación de iones protonados con carga positiva ( $MH^{+}$ ); tal como se observa en el ejemplo de la Ecuación 4, donde se presenta la reacción de ionización química entre una molécula neutra y gas metano:

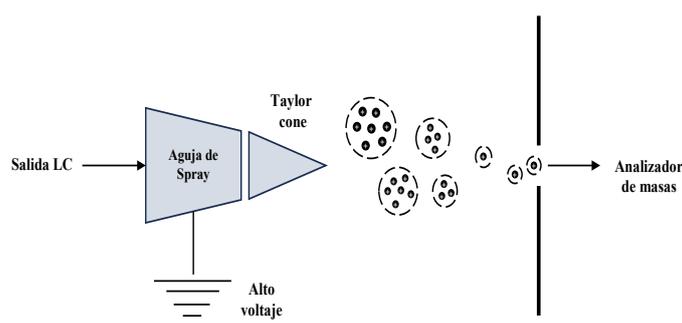


Evidentemente también existe ionización química en modo negativo, en el que iones son producidos por extracción de protones usando gases de carácter básico; esta técnica es típica en la industria farmacéutica para cuantificación de benzodiazepinas y otras drogas.

### 1.5.1.3. Ionización por electronebulización – ESI

La ionización por electronebulización es la ionización suave más robusta que existe, permite la formación de iones en fase gas a partir de especies presentes en la solución, incluyendo iones de grandes moléculas no volátiles, por ejemplo, péptidos y proteínas. Dicha solución está preparada en un solvente volátil y preferiblemente de naturaleza polar y se introduce a un

capilar cargado con un voltaje de 1 – 5 kV, formando un aerosol con pequeñas gotas (10 ~ μm) de diámetro. Para facilitar la nebulización y evaporar el solvente de las gotas formadas se utiliza gas de secado (N<sub>2</sub>). Bajo estas condiciones, las gotas se van rompiendo en su camino hacia la fuente disminuyendo su tamaño, haciendo que las partículas se aproximen entre sí, repelándose unas con otras debido a su naturaleza con misma carga; causando formación de gotas aún más pequeñas en un proceso conocido como explosión de Coulomb (Figura 9).



**Figura 9.** Representación de una fuente de ionización por electrospray (ESI)<sup>85</sup>

Iones con múltiple carga [ $M + nH^{n+}$ ] son frecuentemente formados en ESI, lo cual es ventajoso para el análisis de grandes macromoléculas como péptidos y proteínas. La multiple carga de los analitos provoca una reducción en sus respectivos valores de  $m/z$  y por consecuencia entran en el rango aceptable de análisis de espectrómetros de masa. A pesar de resolver los problemas relacionados con el estudio de grandes moléculas mediante espectrometría de masas y mejorar su capacidad de análisis acoplándolo con cromatografía de líquidos. En un principio, Fenn y col. inyectaron muestras con flujos de 2 - 20 μL/min, lo cual generó problemas cuando se trabajaba con ciertas muestras biológicas. Tiempo después, el desarrollo de tecnologías de nano-espray, las cuales operan a muy bajas velocidades de flujo - del orden de nano litros por minuto (nL/min)- permitió minimizar la velocidad de flujo y mejorar del mecanismo de formación de iones.

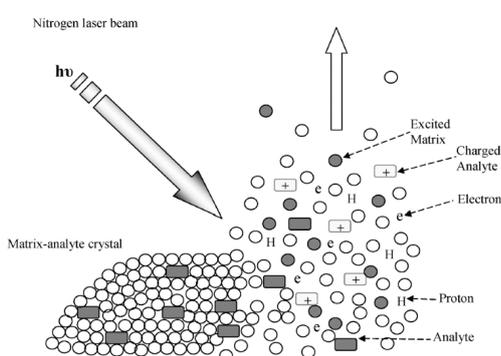
#### 1.5.1.4. Ionización por APCI

La ionización por ionización química a presión atmosférica (APCI) ocurre a presión atmosférica y requiere de nebulización, desolvatación e incorporación de una interfaz similar a ESI; sin embargo, en APCI la formación de iones ocurre de manera diferente comparando con ESI. La técnica parte de la evaporación del solvente por medio de calor, y el vapor generado es entonces ionizado por electrones de baja energía que al mismo tiempo ionizan un gas (O<sub>2</sub>,

N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, etc.), desencadenando una serie de reacciones ion/molécula que produce iones positivos y negativos del analito. Por otro lado, el alto calor (400 °C) utilizado en APCI puede generar pérdida de algunas modificaciones metabólicas hechas a los analitos de interés, por lo que es dirigida principalmente para analitos pequeños y moléculas térmicamente estables.

#### 1.5.1.5. Sistema MALDI

La desorción/ionización laser asistida por matriz química (MALDI) es una técnica de ionización suave que permite análisis de moléculas en muy amplios intervalos de valores  $m/z$  y sin requerimiento de su volatilidad o polaridad, incluyendo proteínas, péptidos, carbohidratos, polímeros y oligonucleótidos. Típicamente las muestras se preparan en fase sólida liberando iones de los analitos en fase gaseosa. En la técnica convencional, la muestra es co-cristalizada con una matriz química que absorbe fuertemente la energía de laser. Para dicha co-cristalización, la muestra diluida en un disolvente relativamente volátil ( $\leq 1 \mu\text{L}$ ) se mezcla con exceso de una matriz apropiada (relación de volúmenes aprox. 1:1) y es cargada en la superficie de una placa porta muestras MALDI. Una vez secado el depósito, se obtiene la co-cristalización deseada. Los componentes de la mezcla son llevados a la fase gaseosa por un pulso láser, que usualmente suele ser láser de nitrógeno con longitud de onda de 337 nm, el cual incide en el pocillo con la muestra co-cristalizada (Figura 10). La energía es absorbida por la matriz y es desprendida de la superficie ionizando la muestra en el proceso, dando lugar a especies mono-cargadas que son aceleradas por un potencial de 10-30 kV. TOF es el analizador de masas típicamente utilizado con MALDI debido a que cada pulso de laser genera grupo de iones que son transportados al analizador de masas en paquetes discretos, los cuales llegan al detector en tiempos de vuelo que van de los 10  $\mu\text{s}$  a los 100  $\mu\text{s}$ .



**Figura 10.** Proceso de ionización por MALDI. La matriz co-cristalizada es bombardeada con láser que excita la matriz, la cual transfiere energía a los analitos. El resultado es la ionización y desorción de los analitos, principalmente como especies de una sola carga<sup>85</sup>.

Contrario a ESI, donde la ionización produce especies de múltiple carga para biomoléculas, la ionización en MALDI tiende a generar especies de una sola carga que permiten identificar el ion molecular para analitos como proteínas, carbohidratos y lípidos<sup>86</sup>.

Existen diferentes tipos de matrices disponibles para su uso en MALDI, la mayoría son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que absorben energía de radiación UV y transfieren dicha energía a la muestra, previniendo su descomposición y promoviendo la ionización de ésta. La mayoría de las matrices son mezcladas con la muestra en relación molar de 1000 : 1 a 10000 : 1; en relación - matriz : muestra.

#### 1.5.1.6 Ionización por ICP

A diferencia de otras fuentes de ionización a presión atmosférica, tal como ESI y APCI, la técnica de ICP se clasifica como una ionización dura, la cual permite generación de cationes atómicos monocargados con muy alta eficacia. ICP consta de un sistema de introducción de muestra al instrumento (nebulizador y cámara de nebulización), una antorcha y un serpentín de radio frecuencia (RF) para generación y estabilización del plasma de argón, además de una interfaz que conecta la fuente de ionización con el espectrómetro de masas. La técnica de ICP es utilizada principalmente para análisis ultra-trazas de elementos, y posee la ventaja de tener un amplio rango dinámico de análisis y la capacidad de cuantificar algunos elementos a niveles de partes por trillón (ppt). Lo que distingue la técnica ICP-MS de otras técnicas de espectrometría atómica, además de muy alto poder de detección, es su capacidad isotópica.

#### 1.5.2 Separador/analizador de masas

Los separadores de masas son la parte principal de los espectrómetros de masas, están basados en la dinámica de partículas cargadas en un campo eléctrico y expuestas a un campo magnético en alto vacío; su función es separar los iones en función de su relación  $m/z$ . Pueden ser clasificados en dos grupos: (i) del tipo filtro, donde el analizador funciona como un filtro de masas (ejemplo. cuadrupolo y trampa iónica) y (ii) del tipo analizador de masas, en los que se encuentran tiempo de vuelo, sector de campo electrostático y/o magnético.

Por supuesto que los separadores de masas varían en términos de resolución, rango de masas, diseño y por tanto del precio. Es importante mencionar que es habitual combinar dos separadores de masas con el fin de mejorar el desempeño para ciertas aplicaciones, como es el caso de la configuración del QTOF, donde se logra alta resolución de masas en modo MS y MS/MS; y en QQQ, para realizar análisis cuantitativo por MRM.

En la Tabla 5, se describen algunos de los analizadores másicos más utilizados en la actualidad vendidos en los instrumentos comerciales.

**Tabla 5.** Analizadores de masas más utilizados en las metodologías analíticas

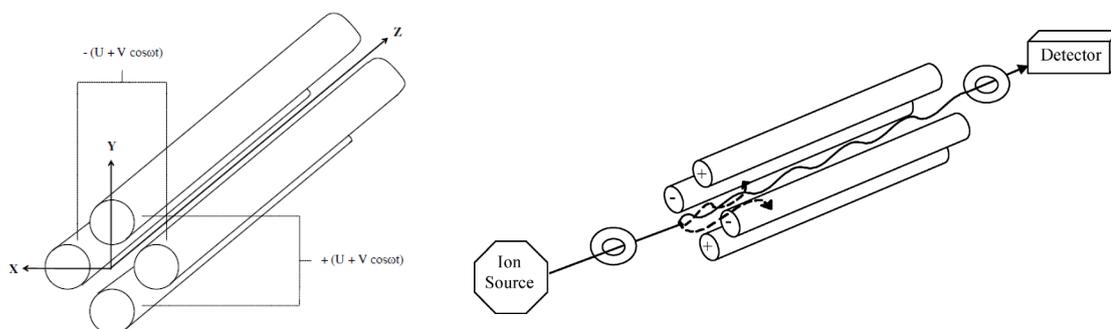
| Separador de masas   | Acrónimo | Principio de funcionamiento  |
|--|----------|--|
| Tiempo de vuelo  | TOF      | Dispersión temporal de un haz de iones a los que se confirió la misma energía cinética, bajo mismas condiciones de alto vacío, existe separación de los iones por su tiempo de vuelo en un tubo.               |
| Sector magnético   | B        | Deflexión de un haz continuo de iones; separación por momento en un campo magnético debido a la fuerza de Lorentz.   |
| Cuadrupolo lineal  | Q        | Haz de iones continuo en un campo cuadrupolar de radiofrecuencia lineal; separación debido a la inestabilidad de las trayectorias de los iones.  |
| Trampa de iones  | IT       | Los iones son atrapados y almacenados en un espacio delimitado por tres electrodos, y mediante ajustes de voltajes permite expulsar los iones en función de su $m/z$ .   |
| Resonancia de ciclotrón iónica por transformada de Fourier | FT-ICR   | Los iones son atrapados en un campo magnético (fuerza de Lorentz); separación por frecuencia de su oscilación en ciclotrón, detección de corriente de imagen y transformación de Fourier de señal transitoria. |
| Orbitrap   | Orbitrap | Oscilación axial en un campo eléctrico no homogéneo; detección de frecuencia después de la transformación de Fourier de la señal transitoria.  |

### 1.5.2.1 Cuadrupolo

Los analizadores de masas del tipo cuadrupolo son filtros de iones, que usan ajustes de dos tipos de campo electromagnético para permitir el paso de iones con particular relación  $m/z$ . A pesar de tener menor sensibilidad, resolución, y rango de masas que un sector magnético, el cuadrupolo es preferido en espectrómetros de masas enfocados a investigación y análisis clínicos; esto debido a su relativamente menor costo, poseer tamaño compacto, robustez

analítica y su facilidad para ser acoplado con sistemas de separación cromatográficas tal como GC o LC. Sin embargo, los cuadrupolos poseen capacidad muy limitada para separar altos valores de  $m/z$  (usualmente funciona para  $< 4000$  Da), tienen baja resolución y no permiten hacer análisis MS/MS. Por lo que es muy usual ver combinación de cuadrupolos -por ejemplo, QQQ; donde también el uso de hexapolos y octapolos pueden mejorar el enfoque de los iones guiándolos hacia otros componentes (otros analizadores de masas).

El cuadrupolo consiste en un grupo de cuatro electrodos cilíndricos o hiperbólicos colocados paralelamente (Figura 11) en una configuración cuadrada, donde un voltaje de corriente directa (Vdc) es aplicado a dos de estos electrodos, y a los dos restantes un voltaje alterno (Vac) con una radiofrecuencia fija ( $\omega$ ). Los iones generados en la fuente de ionización deben atravesar longitudinalmente el espacio limitado por las barras hasta llegar al detector. Campos eléctricos oscilantes son utilizados cuando los iones pasan por el campo generado, estabilizando o desestabilizando los iones selectivamente; de forma que para una combinación de potenciales solo los iones en un estrecho rango de valores de  $m/z$  oscilaran la trayectoria hasta llegar al detector. Partículas neutras y iones con otros valores de  $m/z$  tendrán trayectorias irregulares y por consecuencia colisionarán con los electrodos, y serían expedidos radialmente del analizador.



**Figura 11.** Analizador de masas del tipo cuadrupolo. Está compuesto de cuatro cilindros paralelos con voltaje directo y voltaje alterno. Solo un específico valor de  $m/z$  tiene la trayectoria correcta hacia el detector; el resto colisionan con los electrodos y son expulsados<sup>85</sup>.

La resolución ( $R$ ) de un cuadrupolo es proporcional al número de ciclos de RF ( $n$ ) a los cuales un ion es sometido. Por tanto, un incremento en la frecuencia de la RF significaría que la resolución del cuadrupolo es optimizada. La resolución es definida con la siguiente ecuación.

$$R = n^2 = \frac{mf^2L^2}{qV} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde  $m$  es la masa,  $f$  es la frecuencia de voltaje alterno  $RF$ ,  $L$  es la longitud de las barras cilíndricas (electrodos) y  $qV$  es la energía cinética de los iones.

### 1.5.2.2 Tiempo de vuelo

El analizador de tiempo de vuelo (ToF) se basa en la aceleración de iones mediante la aplicación de un campo eléctrico antes de su entrada a un tubo libre del campo y donde se mantiene un alto vacío. Los iones viajan a velocidades inversamente proporcional a la raíz cuadrada de su relación  $m/z$ , por lo que su recorrido hacia el otro extremo del tubo dependerá exclusivamente de su  $m/z$ ; considerando que la carga y la energía cinética de los iones formados en la fuente es constante, la medida del tiempo de vuelo permite determinar de forma muy precisa la masa de cada uno de estos iones. Es decir que los iones con relación  $m/z$  pequeña llegan al detector más rápidamente que aquellos con una relación  $m/z$  más grande.

ToF se basa entonces en el vuelo libre de las moléculas ionizadas en un tubo de 1 m a 2 m de longitud, antes de llegar al detector. Los iones se distribuyen a una velocidad inversamente proporcional a la raíz cuadrada de su relación masa-carga ( $m/z$ ) por lo que su llegada al detector será distribuido de acuerdo con la raíz cuadrada de su relación  $m/z$ . Es decir, los iones con una relación  $m/z$  más chica llegaran al detector más rápido que aquellos con una relación  $m/z$  más grande.

Recordando que la energía potencial de una partícula dentro de un campo eléctrico está dada por la carga de la partícula y la fuerza del campo eléctrico mediante la ecuación  $E_p = qU$ ; donde  $q$  es la carga de la partícula y  $U$  es el voltaje aplicado. Asimismo, cuando las partículas son aceleradas en el tubo de tiempo de vuelo por un voltaje  $U$ , su energía potencial ( $E_p$ ) es entonces convertida en energía cinética ( $E_k$ ). Tal como se describe en la ecuación 6.

$$E_p = qU = E_k = \frac{1}{2}mv^2 \quad Ec. 6$$

Por otro lado, la velocidad de la partícula en el tubo de vuelo puede ser calculada a partir de la distancia ( $d$ ) y el tiempo ( $t$ ) que dura la partícula en alcanzar el detector.

$$v = \frac{d}{t} \quad Ec. 7$$

Cuando se combina Ec. 6 y Ec. 7, y después de ordenar los términos, se obtiene la Ecuación:

$$qU = \frac{1}{2}m \left(\frac{d}{t}\right)^2 \quad Ec. 8$$

Finalmente, despejando el tiempo de Ec 8, se obtiene una ecuación que asocia la relación  $m/z$  con respecto al tiempo.

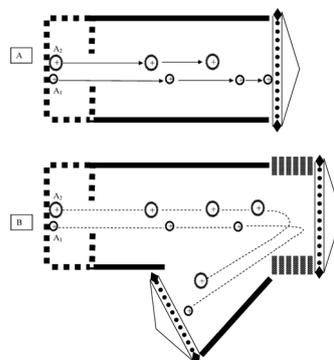
$$t_f = \frac{d}{\sqrt{2U}} \sqrt{\frac{m}{q}} \quad \text{Ec. 9}$$

Podemos observar en la ecuación anterior que los valores de  $d$  y  $U$  son constantes, si se asignan a una nueva constante  $K$ , se simplifica la ecuación a la forma:

$$m/q = K t_f^2 \quad \text{Ec. 10}$$

En este caso, el valor  $K$  es el factor de calibración. Esta ecuación demuestra la relación directa entre los valores ( $m/z$ ) y el tiempo de vuelo ( $t_f$ ). Como se observa en la Figura 12, si dos iones ( $A_1$  y  $A_2$ ) son formados al mismo tiempo y con la misma carga, pero se cumple que la masa  $A_1 < A_2$ , entonces significa que  $A_1$  llegará primero al detector. La principal ventaja de los analizadores ToF es que eventualmente todos los iones formados llegarán al detector (a diferencia de los cuadrupolos o los instrumentos de sector magnético).

En un inicio los primeros analizadores del tipo tiempo de vuelo (ToF) tenían la desventaja de ser de baja resolución, ya que la energía cinética aplicada no era la misma para idénticas especies. Mejoras como el desarrollo de la extracción retardada y el reflector (espejo electrostático), el cual modifica el camino de los iones dentro del instrumento, incrementaron el poder de resolución de los analizadores TOF. El aumento de resolución del reflector es debido a que los iones con mayor energía cinética penetran a una profundidad mayor en el espejo de iones y, por tanto, los iones serán repelidos de manera gradual hasta igualar el tiempo en llegar al detector, aumentando la resolución de la metodología.



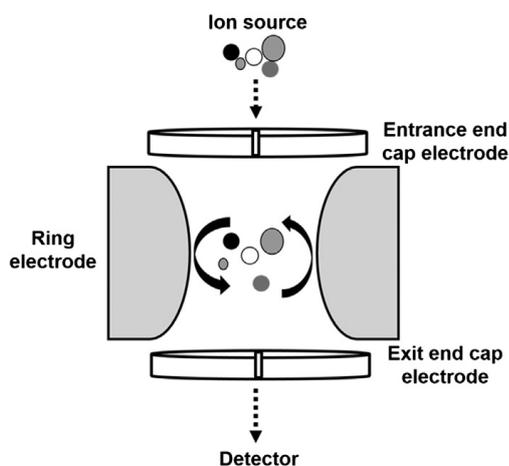
**Figura 12.** Representación esquemática de un analizador convencional de tiempo de vuelo ToF (A) y uno del tipo ToF reflector (B).<sup>85</sup>

Es normal asociar el analizador TOF a la fuente de ionización MALDI, sin embargo, acoplamiento con otros sistemas de confinamiento como cuadrupolo resulta adecuado para realizar experimentos de espectrometría de masa en tándem. La combinación de una fuente de iones como ESI o MALDI, con analizadores de masas ToF y/o QToF permiten el análisis de un gran rango de moléculas, proporcionando información estructural para identificación y confirmación de analitos.

### 1.5.2.3 Trampa de iones

El cuadrupolo de trampa de iones es un dispositivo capaz de actuar como un filtro de masas, los iones con específicos valores  $m/z$  son almacenados en un compartimiento (trampa) por un periodo de tiempo, seguido por su expulsión hacia el detector. La trampa de iones consiste en tres electrodos hiperbólicos: el primer electrodo en forma de anillo, un segundo electrodo en la entrada “endcape”, y un último electrodo “endcape” a la salida. La distribución de los electrodos forma un hueco en la cual es posible atrapar y analizar los iones. Los iones atraviesan los electrodos “endcape” a través de un agujero en sus centros, mientras que el electrodo en forma de anillo es localizado transversalmente entre los dos electrodos endcape (Figura 13).

Una vez que los iones entran a la trampa, campos eléctricos oscilantes (AC) y no oscilantes (DC) son aplicados a los electrodos, y mediante variación en ambos voltajes se logra atrapar y expulsar los iones en base a su relación  $m/z$ . Dentro de la trampa iónica se fragmentan los iones almacenados permitiendo obtener espectros de  $MS^n$  y por tanto identificación de compuestos; además de lograr su cuantificación mediante monitoreo de reacciones múltiples (MRM), haciéndolos instrumentos muy versátiles.



**Figura 13.** Analizador de masas del tipo trampa de iones (IT)<sup>87</sup>.

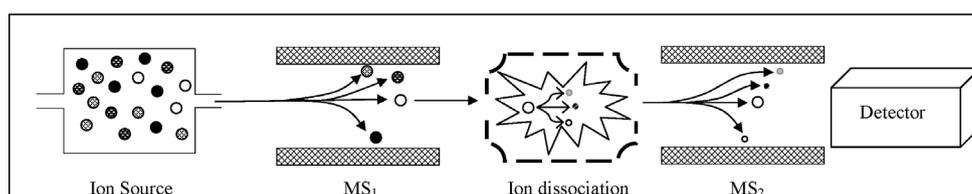
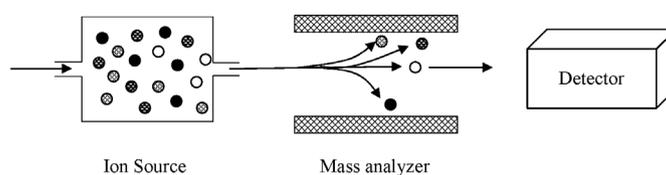
#### 1.5.2.4 Orbitrap

El analizador de masas tipo Orbitrap fue comercializado en 2006, a diferencia de la resonancia de ciclotrón iónico (ICR), el Orbitrap no utiliza un campo magnético para atrapar a los iones. Este analizador de masas alcanza resoluciones mayores a 100,000 y exactitudes menores a una parte por millón (ppm); aunado a su capacidad de tener un rango dinámico de hasta cuatro magnitudes.

El principio de operación del Orbitrap es mediante el atrapamiento de iones por medio de campos electrostáticos, el analizador consta de un electrodo central en forma de un huso de hilar y rodeado por otro electrodo exterior en forma de barril. El electrodo central confina los iones de tal forma que se encuentran oscilando en el eje axial del electrodo. Esta oscilación genera una corriente de imagen y frecuencia característica para cada valor de  $m/z$  de los iones individuales. Los espectros de masas son obtenidos de manera similar a los analizadores FTICR<sup>87</sup>. Su alta resolución y exactitud de masas, ambas benéficas para caracterizar e identificar analitos, permiten que el Orbitrap sea ampliamente utilizado en estudios de proteómica dentro de laboratorios de investigación y en aplicaciones de toxicología clínica.

#### 1.5.3 Espectrómetros de masas en modo tándem

A pesar de que todos los analizadores de masas tienen únicas características que los hace ideales para analitos específicos, una configuración secuencial de dos o más analizadores de masas con una celda de colisión entre ellos permite análisis del tipo MS y MS/MS. El análisis por tándem MS/MS tiene la ventaja de hacer identificación de compuestos, caracterización de estructuras complejas, y análisis cuantitativo<sup>87</sup>. Los analizadores de masa del tipo haz y configurados de forma secuencial, el análisis de MS/MS se realiza en modo “tándem en el espacio”; mientras que para los analizadores de masa del tipo filtro o trampa, el MS/MS es llevado a cabo en “tándem en el tiempo”<sup>86, 88</sup>.



**Figura 14.** Comparación entre espectrometría de masas del tipo MS (arriba) y espectrometría de masas en tándem MS-MS (abajo). En MS, los iones son separados en el analizador de masas antes de llegar al detector. En tándem, iones específicos son seleccionados en el primer analizador ( $MS^1$ ) y son inducidos a colisiones mientras que el segundo analizador ( $MS^2$ ) separa los iones producto antes de que lleguen al detector<sup>87</sup>.

En la mayoría de las metodologías MS/MS en analizadores de masas del tipo trampa, el primer analizador es usado para seleccionar un ion precursor de específica relación  $m/z$  (ion no fragmentado), posteriormente este ion se pasa a la celda de colisión donde choca con moléculas de un gas inerte -normalmente Ar, He, o  $N_2$ - para inducir la fragmentación, produciendo pequeños fragmentos denominados iones productos. El análisis de estos nuevos iones formados es realizado en el segundo analizador de masa (ver Figura 14)<sup>87</sup>.

El método de fragmentación en fase gas más popular en MS es la disociación por colisión inducida (CID), sin embargo, existen otras metodologías de fragmentación como la disociación por transferencia de electrones (ETD), la disociación por captura de electrones (ECD), y disociación de alta energía de colisión (HCD). Todas las metodologías mencionadas anteriormente comparten la similitud de obtener similares perfiles en los espectros de masas bajo las mismas condiciones de análisis en diferentes instrumentos, lo cual permite obtener librerías espectrales muy fiables para la identificación de analitos para cada tipo de fragmentación<sup>86, 87</sup>.

En CID, un ion madre y un gas neutral colisionan fragmentándose en varios iones producto, generando información estructural de los analitos. La fragmentación por HCD es una variación de CID, muchas veces utilizado en Orbitrap, donde un mayor voltaje de RF es aplicado para retener los iones en la trampa tipo C. Una vez los iones son fragmentados, se aceleran y permanecen dentro de la trampa para ser inyectados y separados dentro del Orbitrap con base a sus frecuencias rotacionales<sup>87</sup>.

ETD es principalmente para secuenciar péptidos y proteínas, incluyendo identificación de modificaciones postraduccionales lábiles. Este método requiere de cationes en fase gas con  $z > 2$ , y por consiguiente es limitado a ser utilizado exclusivamente con fuente de ionización de ESI. El mecanismo de fragmentación consiste en producir radicales catiónicos de los péptidos a partir de reacciones de transferencia de electrones por medio de radicales aniónicos como el fluoranteno<sup>86</sup>. Los radicales formados son inestables y se forman durante la ruptura del enlace

entre la amina y el  $\alpha$ -carbono de la cadena peptídica (N -  $\alpha$ C), estos fragmentos obtenidos son conocidos como iones tipo c- y z-, respectivamente<sup>87</sup>.

Existen diferentes configuraciones en espectrometría de masas para análisis tándem - MS/MS; algunas de ellas correspondientes al instrumento de triple cuadrupolo son resumidas en la Tabla 6. El escaneo de un ion producto comienza por la selección de un ion precursor de especifica relación  $m/z$  en un primer analizador de masa (denominado como MS1 o Q1), seguido de un full scan del espectro de los fragmentos - los iones objetivo.

La metodología más común para cuantificación en aplicaciones de MS/MS son el monitoreo de reacciones múltiples (MRM), muy comúnmente usado en instrumentos de tipo IT, QQQ y Q-ToF. En adquisición por MRM, se selecciona un ion precursor de un analito en la primera etapa de separación y este ion es fragmentado en la celda de colisión para producir un amplio rango de iones productos. Uno, o más de estos iones son utilizados para análisis cuantitativo<sup>86</sup>,<sup>87</sup>. Los métodos basados en MRM proporcionan muy bajos límites de cuantificación y una selectividad excepcional.

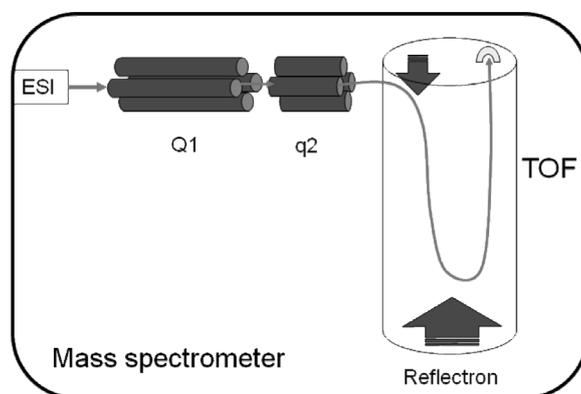
**Tabla 6.** Diferentes modos de adquisición en un instrumento de triple cuadrupolo QQQ-MS.

| Modo de escaneo          | Descripción  |
|--------------------------|--|
| Escaneo de ion producto  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Q1 se configura solo para la transmisión de un valor <math>m/z</math> (ion precursor)</li> <li>• El ion precursor colisiona con gas inerte para formar iones producto (Q2)</li> <li>• Los iones producto son separados en el Q3</li> </ul>                    |
| Escaneo de ion precursor | <ul style="list-style-type: none"> <li>• El analizador Q1 escanea</li> <li>• El ion precursor colisiona con gas inerte para formar iones productos</li> <li>• Q3 se configura para permitir solo el paso de un valor de <math>m/z</math></li> </ul>  |
| Perdida neutral          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Q1 y Q3 escanean</li> <li>• Iones precursores colisionan con gas inerte formando iones producto</li> <li>• Q3 se configura para ver una pérdida de masa de interés</li> <li>• Solo iones que producen la pérdida de masa de interés son detectados</li> </ul> |
| MRM                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Q1 se configura para transmitir solo los iones precursores de interés</li> <li>• La fragmentación en la celda de colisión genera iones producto</li> <li>• Q3 se configura para transmitir los iones producto de interés</li> </ul>                           |

#### 1.5.4. Espectrómetro de masas híbrido con cuadrupolo ortogonal y tiempo de vuelo (Q-ToF)

El espectrómetro de masas del tipo Q-ToF fue descrito por primera vez en 1996 en un esfuerzo por combinar las capacidades de escaneo de un cuadrupolo con el poder de resolución de un analizador de tiempo de vuelo ToF<sup>89</sup>.

En la Figura 15 se presenta un diagrama representativo de un analizador del tipo Q-ToF. El espectrómetro de masas está compuesto por dos cuadrupolos acoplados a un analizador de tiempo de vuelo, posicionado geoméricamente alineado en una configuración ortogonal respecto a los cuadrupolos. Los instrumentos con esta configuración usualmente incluyen un cuadrupolo adicional previo al Q1 que funciona como una guía de iones que mejoran la calidad del haz de iones, referido como q0, funciona solamente con radiofrecuencia de manera similar a la celda de colisiones (q2). El cuadrupolo Q1, por otra parte, funciona como un filtro de iones cuando se trabaja en MS/MS. Debido a los roles cruciales de los cuadrupolos Q1 y q2 durante análisis MS/MS, estos instrumentos son usualmente referidos como espectrómetros QqToF, donde el primer Q representa el cuadrupolo de masas y la segunda q hace referencia a la celda de colisión (cuadrupolo o hexápodo de solo RF)<sup>86, 89</sup>.



**Figura 15.** Representación esquemática de un instrumento híbrido Q-ToF con fuente de ionización por electrospray (ESI)<sup>86</sup>.

Dentro de las ventajas del analizador de masas QToF destacan: (i) habilidad para ser acoplado con ESI o MALDI con apenas poca manipulación de la configuración, (ii) alta resolución lograda, (iii) adquisición en modo MS y MS/MS; (iv) amplio rango dinámico de masas.

### 1.5.5 Espectrómetro de MC-ICP-MS

La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente de multicolector (MC-ICP-MS) fue desarrollado debido a la necesidad de mejorar las mediciones de relaciones isotópicas para muestras nucleares, geológicas, medio ambientales, biológicas y de la industria médica<sup>90</sup>. La espectrometría de masas por ionización térmica, la cual había dominado el análisis isotópico por décadas, ha sido laboriosa con procedimientos químicos que requieren mucho tiempo además de presentar dificultades analíticas para medición de elementos con altas energías de primera ionización.

La introducción del plasma acoplado inductivamente (ICP) en los años 70's fue una contribución significativa en el campo de análisis de trazas multi elemental, debido a su poder de alta detección y rápido análisis de muestras. Las muestras líquidas, introducidas al plasma en forma de aerosol, son desolvatadas, vaporizadas y atomizadas; los átomos son ionizados eficazmente en el plasma antes de su introducción al espectrómetro de masas.

El ICP-MS ofrece límites de detección del orden de menores a las partes por billón para la mayoría de los elementos, incluso para elementos con primer potencial de ionización alto (> 9.0 eV), por ejemplo, As, Se, P, Cl; además de ofrecer alta selectividad y capacidad isotópica. Sin embargo, fluctuaciones de las condiciones del plasma, características del aerosol y efectos por matriz de la muestra, limitan la precisión durante la medición de relaciones isotópicas usando típicos instrumentos de un solo colector. Por otro lado, instrumentos capaces de realizar la medición isotópica de manera simultánea fueron desarrollados, mejorando significativamente la precisión de las mediciones de relación isotópica. El primer sistema de MC-ICP-MS fue introducido en el año de 1992, y actualmente existen modelos de cuatro marcas comerciales, y un total de 190 instrumentos MC-ICP-MS instalados en todo el mundo<sup>90</sup>.

En instrumentos del tipo sector magnético, partículas cargadas son separadas cuando un campo magnético constante es aplicado sobre una fuente de iones, permitiendo la colección de iones de diferente valor  $m/z$  (incluyendo isótopos del mismo elemento) en el plano focal del espectrómetro de masas. Mediciones secuenciales de las relaciones isotópicas usando instrumentos con un solo colector son realizadas variando la fuerza del campo magnético aplicado a la fuente de iones, por tanto, midiendo secuencialmente cada isótopo de interés en un solo detector con una posición definida para cada elemento. Por otro lado, un instrumento con sector magnético multicolector, los isótopos son medidos de manera simultánea, utilizando de dos a doce detectores de tipo de caja Faraday (estáticos y/o móviles). La

adquisición de diferentes isotopos de manera simultánea permite emplear largos tiempos de integración mejorando de manera sustancial la precisión necesaria para observar sutiles cambios en las relaciones isotópicas.

Los iones que entran al espectrómetro de masas son propensos a efectos de discriminación -sesgos de masa “bias mass”. Estos efectos de discriminación pueden ser originados en MC-ICP-MS durante la salida de los iones del plasma, dentro del plasma, en la región de la interfaz o bien durante el transporte a través del espectrómetro de masas. Aunado a los efectos de repulsión que existen en el haz de iones y en las colisiones con moléculas de gas residual y átomos de Ar, repercute en la pérdida de iones durante la transmisión. Por tanto, los isotopos ligeros son perdidos de manera más rápida del haz de iones central, resultando en desviación positiva en la medición de las relaciones isotópicas  $x_m/y_m$ , asumiendo  $x > y$  (ejemplo  $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ ). Típicamente, un sesgo de masa de  $> 10\%$ ,  $< 2\%$  y  $< 1\%$  es observada para Li, Fe, y U, respectivamente. La magnitud del mass bias es frecuentemente diez veces mayor que el fraccionamiento isotópico para elementos con isotopos estables en la naturaleza, y por consecuente es de suma importancia tener correcciones en la exactitud para lograr alta calidad de los análisis de relaciones isotópicas.

Existen dos métodos principales para corrección de estos efectos: (i) normalización interna y (ii) normalización externa. La normalización interna puede ser usada para elementos con tres o más isotopos de los cuales al menos dos son no radiogénicos. El procedimiento consiste en corregir la relación de interés, incluyendo el radionúclido, con otro isotopo estable el mismo elemento, ej. sistemas de Sr y Nd. Sin embargo, este análisis no se puede aplicar cuando el objetivo es estudiar abundancias de todos los isotopos, ej. Pb donde tres de sus cuatro isotopos son producidos por decaimiento radiactivo. En lugar de esto, se ha propuesto el uso de otro elemento con masa similar, y por tanto características químicas y físicas muy similares; permitiendo su uso para corrección isotópica. Ej. Uso de Tl para correcciones de relaciones isotópicas de Pb.

Por otro lado, Baxter y col. (2006) desarrollaron un modelo para normalización externa utilizando estándar interno, basados en el trabajo de Woodhead. En este estudio, las soluciones medidas (estándares y/o muestras) son adicionadas con conocida cantidad de un estándar interno con misma concentración del elemento de interés. El propósito de adicionar un estándar interno a las muestras es para corregir variaciones instrumentales e inducidas por la matriz en el “mass bias”. Usando este protocolo, es mandatorio que los isótopos del estándar interno son

libres de interferencias isobáricas y que el elemento utilizado para hacer la corrección no esté presente en la muestra. La exactitud del resultado, corregido, en las relaciones isotópicas es establecida por la metodología de estándar – bracketing, donde el estándar consiste en un material de referencia con conocida composición isotópica.

#### 1.5.6 Detectores y procesadores

En la espectrometría de masas, los detectores son ultimadamente los ojos del instrumento. Nuevos detectores y tecnologías se han desarrollado para corregir, mejorar y extender la detección de los iones. Sin embargo, todos los esfuerzos se han dirigido principalmente a mejorar los métodos de ionización y separación de los iones mientras que muy poco se ha hecho con respecto a desarrollar nuevas tecnologías de detección de iones<sup>87</sup>.

Detectores analógicos tradicionales (copas Faraday) y multiplicadores de electrones se han usado por décadas. Muy pocos métodos novedosos de detección han sido desarrollados, y generalmente no son mencionados en textos o reviews de espectrometría de masas. El multiplicador de electrones es usado para convertir flujo de los iones que salen del analizador de masas en corriente eléctrica, aumentando el número de electrones en los dinodos sucesivos correspondientes a cada uno de los iones que impactaron al primer dinodo. El principio físico del proceso se basa en la emisión secundaria de los electrones que tiene lugar cuando un ion o electrón impacta en la superficie del cátodo. El número de electrones secundarios expulsados depende del tipo de la primera partícula incidente, su energía y las características de la superficie incidente. Dentro de los detectores multiplicadores de electrones, se identifican tres tipos principalmente: (i) dinodos discretos, (ii) dinodos continuos y (iii) plato multicanal.<sup>87, 91, 92</sup>.

#### 1.5.7 Acoplamiento de espectrometría de masas con técnicas de separación

El análisis de metabolitos y estudios de proteómica han tomado mucha importancia en recientes años, y dentro de las metodologías más utilizada actualmente se encuentra el acoplamiento de técnicas de separación (GC y LC) con espectrometría de masas (MS).

Hay que tener en cuenta que la infusión directa de la muestra a un espectrómetro de masas permite adquirir un espectro de masas que registra todos iones formados y separados en el instrumento, lo que en muchos casos es suficiente para obtener información deseada. Sin embargo, para muestras con matriz químicamente compleja la infusión directa no es recomendable debido a supresión de eficacia de ionización y debido a interferencias

espectrales; para evitar estos problemas, se utilizan sistemas de separación previos al análisis por espectrometría de masas.

#### 1.5.7.1 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

La cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS), es de las metodologías más utilizadas en el campo de las ciencias omicas, incluyendo proteómica y metalproteómica. La cromatografía de líquidos ofrece la versatilidad de contar con diferentes mecanismos de separación, columnas de diferentes propiedades, y fases móviles que permiten separar compuestos de diferente polaridad y/o carga. Además de que se cuenta con diferentes marcas comerciales de instrumentos LC-MS, con software disponibles de alta calidad y con de bases de datos públicos y de pago.

#### 1.5.7.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas representa una poderosa sinergia para los estudios enfocados principalmente en metabolitos, específicamente para compuestos volátiles, semi-volátiles y termoestables. Dentro de las ventajas se encuentra la separación de componentes de una matriz compleja permitiendo el análisis con propósitos cualitativos y cuantitativos. Sin embargo, las técnicas de ionización deben tener la capacidad de formar iones directamente en fase gaseosa (EI, APCI, CI, etc.). Utilizar GC-MS específicamente con EI, provee un patrón característico de fragmentación que puede ser utilizado para la identificación del analito.

### 1.6 Ciencias Omicas

Cuando hablamos de ciencias biológicas, se usa la terminación -omicas para referirse al estudio de la totalidad o del conjunto de algo. Ciencias “omicas” abarcan la genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, metalómica, entre varias más, cada una de ellas enfocada en otro conjunto de especies o datos<sup>93, 94</sup>. La genómica es la ciencia que estudia la estructura, función, evolución y el mapeo de los genes con el objetivo de caracterizar y cuantificar los genes que participan en la síntesis de proteínas con asistencia de enzimas y moléculas mensajeras. La transcriptómica por su parte abarca el estudio de todas las moléculas mensajeras de ARN en una célula, tejido, u organismo. Por otro lado, la proteómica es el estudio de todas las proteínas presentes en una célula, tejido, u organismo; se enfoca en la relación de las proteínas con sus propiedades biológicas y su función, además de cuantificarlas, identificar modificaciones postraduccionales o cambios en su estructura durante el crecimiento o cuando son expuestas a estímulos externos<sup>94</sup>. En este mismo contexto de funcionamiento de cada organismo vivo, la

metabolómica tiene como objetivo la identificación de los metabolitos en una muestra biológica, que representan los productos finales del proceso celular. Esta es tal vez la más complicada de las tareas y por ello se definen diferentes enfoques en estudios metabolómicos, tanto de carácter dirigido como no dirigido. De manera general, el objetivo principal de las ciencias ómicas en conjunto se basa en identificar, caracterizar, y cuantificar todas las biomoléculas involucradas en la estructura, función y dinámica de una célula, tejido u organismo.

## 1.6. Proteómica

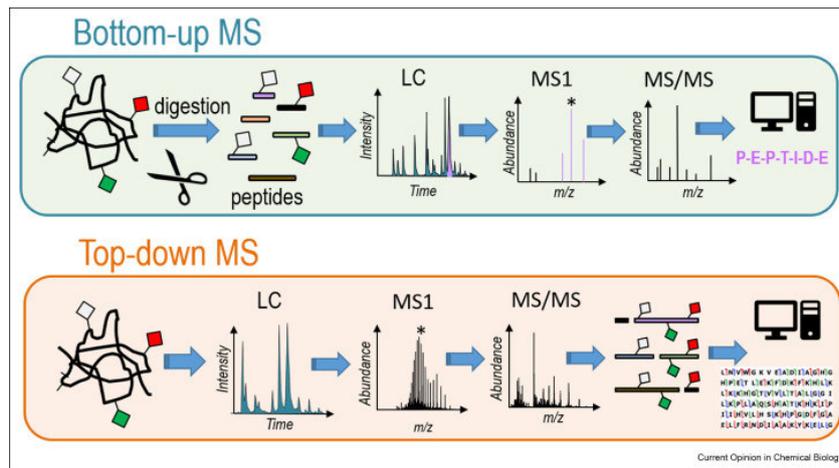
### 1.6.1 Estudios de proteómica

#### 1.6.1.1 Introducción

El término “proteómica”, introducido por primera vez por Marc R. Wilkins, es el análisis más completo y detallado para estudiar la estructura y función de las proteínas. Las proteínas son traducidas a partir del transcripto del ARN (ARNm) que fue transcripto a partir del ADN complementario del genoma. A pesar de que el genoma guarda e indica las funciones celulares y estados, el estudio de las proteínas y todas sus formas es necesario para entender completamente la biología.

A pesar de que existen diferentes herramientas para realizar estudios de proteómica, la espectrometría de masas ha tomado suma importancia en la pasada década como herramienta principal para el análisis comprensivo del proteoma, esto debido a su capacidad para detectar cambios químicos para identificación de péptidos, así como encontrar modificaciones en diversas investigaciones biológicas. Entre otros métodos podemos encontrar los basados en interacciones de afinidad con anticuerpos o aptámeros de ADN, inmovilización paralela de péptidos con microscopia de reflexión interna total, seguida de una degradación secuencial con el método de Edman. Sin embargo, actualmente el método por excelencia para análisis de proteómica es la espectrometría de masas acoplado con cromatografía de líquidos(LC-MS).

En cuanto a los estudios de proteómica, existen dos diferentes tipos de enfoques utilizando espectrometría de masas y pueden ser: (i) análisis de la proteína total (top-down) o (ii) estudio después de hidrólisis de proteínas a péptidos usando proteasas (bottom up). Es importante mencionar que, estrategias del tipo bottom up no detectan proteínas, sino que se infieren de los péptidos encontrados, las cuales representan pequeñas fracciones de la secuencia total de la proteína (ver Figura 16)<sup>95, 96</sup>.



**Figura 16.** Representación esquemática de las estrategias “bottom-up” y “top-down”. Los métodos bottom up incluyen hidrólisis proteolítica de una mezcla de proteínas y los péptidos resultantes son separados y analizados por LC-MS/MS. Por otro lado, los métodos top down analiza las proteínas intactas en cual la mezcla de proteínas es primeramente separada y analizada por LC-MS/MS<sup>95</sup>.

#### 1.6.1.2 Estudios de proteómica bottom up

Los estudios de “bottom up” por lo regular siguen un flujo de trabajo estructurado, empezando por la extracción de las proteínas, donde se utiliza una lisis mecánica de las células o tejidos mientras que se desnaturaliza y solubiliza solo las proteínas para minimizar interferencias de matriz en el análisis posterior. Después, las proteínas son hidrolizadas para fragmentarlas en péptidos por medio de enzimas de corte, por ejemplo, tripsina, la cual genera péptidos en C-terminal de los aminoácidos arginina (R) y lisina (K). Normalmente los péptidos obtenidos son purificados por cartuchos de cromatografía de líquidos en fase reversa o por puntas zip tip C18 para remover posibles interferencias de buffer y sal. Los péptidos recuperados son separados por cromatografía de líquidos en fase reversa antes de ser ionizados e introducidos a espectrometría de masas. Durante el análisis de masas se colecta los iones precursores y los iones productos correspondientes a los péptidos, por lo que los péptidos son identificados a partir de los espectros de MS/MS; las proteínas son asignadas de acuerdo con las bases de datos de proteomas reportados y en algunos estudios se reporta también los valores cuantitativos<sup>95</sup>. Los cambios en la abundancia de las proteínas bajo diferentes condiciones son determinadas por medio de análisis estadístico, y los resultados deben de ser interpretados bajo un enfoque o función biológica. La interpretación de datos en estudios de proteómica es un gran desafío debido a su complejidad y requiere el uso de programas especializados.<sup>95</sup>

Hay que recordar que existen estudios proteómicos cualitativos y cuantitativos; dirigidos principales a encontrar: (i) cambios en la abundancia de proteínas en distintos grupos (LFQ o utilizando marcaje isobárico), (ii) modificaciones postraduccionales (PTMs), incluyendo la fosfoproteómica y la glicoproteómica, (iii) técnicas dirigidas a composición estructural de las proteínas en la que se incluye cross-linking mass spectrometry (XL-MS), intercambio de deuterio – hidrógeno (HDR-MS), (iv) estudios de estabilidad proteica y unión a pequeñas moléculas tal como ensayos de desplazamiento celular térmico (CETSA) y finalmente (v) enfoque dirigido a estudiar interacciones proteína-proteína.

#### 1.6.1.3 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas depende del enfoque del estudio, ya que por ejemplo la matriz de una muestra de un tejido vegetal puede variar inmensamente respecto a una muestra de un tejido de una línea celular. En el caso de estrategias del tipo “bottom up” el objetivo más importante es hacer una extracción eficiente de todas las proteínas de interés. Existen pues un número diverso de protocolos de extracción que se han desarrollado, y la selección dependerá del tipo de muestra o ensayo a realizarse (extracción de proteínas nativas o no nativas). Las extracciones pueden ser ayudadas con adición de detergentes o agentes caotrópicos, sin embargo, se debe de tener mucho cuidado ya que este tipo de aditivos pueden quedarse en el sistema de espectrometría de masas.<sup>95</sup>

A manera de ejemplo un método comúnmente utilizado para extracción de proteínas podría ser utilizar una solución 8 M urea en 100 mM Tris, pH 8.5 (actividad de la tripsina). Seguido de remoción de sales con ayuda de StageTips o Waters’ SepPaks, los cuales permiten limpiar los péptidos. Se debe de evitar a toda costa detergentes como SDS, tritón X-100 y NP-40.

#### 1.6.1.4 Medición de la eficacia de extracción

Después de hacer la extracción de proteínas. La cuantificación de las proteínas en el sobrenadante recuperado es requerida para conocer la eficacia de la extracción y la cantidad de proteína recuperada para proseguir con el protocolo de trabajo a seguir durante los pasos del estudio. Existen diferentes métodos para cuantificar proteínas basados en ensayos colorimétricos o fluorimétricos. Dentro de los métodos colorimétricos se encuentran principalmente el ensayo de Bradford, el ensayo de Folin-Lowry, el ácido bicinconínico (BCA) y el ensayo de Biuret. En el caso del ensayo por BCA, los enlaces peptídicos de las proteínas reducen los iones cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a iones cuprosos ( $\text{Cu}^+$ ) en relación proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. El reactivo de BCA se une a los iones cuprosos, formando

un complejo que presenta banda de absorción con el máximo en 562 nm, permitiendo una correlación directa entre concentración de proteína y absorbancia medida a esta longitud de onda. El ensayo de Bradford es otro método espectrofotométrico comúnmente utilizado para la cuantificación de proteínas, el cual se basa en la interacción entre el colorante azul brillante Coomassie y las proteínas por medio de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. La unión proteína-colorante desplaza el máximo de la banda de absorción de colorante de 450 nm a 595 nm, permitiendo su cuantificación en esta nueva longitud de onda. Finalmente, el método de Folin-Lowry es un ensayo colorimétrico consistente de dos pasos. En el paso uno la reacción de Biuret forma complejos entre el cobre con nitrógeno de la proteína, en el segundo paso los aminoácidos acomplejados tirosina y treonina reaccionan con un reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu formando un intenso color azul verdoso que absorbe a 650-750 nm.<sup>95</sup>

Por otro lado, los métodos fluorimétricos exhiben mayor sensibilidad que los métodos colorimétricos, que son relativamente más caros. Las proteínas totales en una muestra específica pueden ser cuantificadas en base a la fluorescencia intrínseca del triptófano, el cual corresponde aproximadamente 1.0 % del contenido total de aminoácidos en el proteoma. Existen también kits comerciales para determinación de proteínas por fluorimetría, tal como el NanoOrange, el cual contiene una solución del colorante merocianina que incrementa la eficacia cuántica cuando interacciona con complejos detergentes-proteínas. La señal de fluorescencia es medida usando una longitud de excitación de 485 nm y longitud de emisión de 590 nm.

#### 1.6.1.5 Reducción y alquilación

Para proteómica del tipo “bottom up”, los enlaces disulfuro de las proteínas son reducidos y alquilados previo a la proteólisis. Mediante estas dos reacciones se tiene mayor acceso a todos los residuos durante la digestión enzimática y además se eliminan entrecruzamientos en la estructura de las proteínas por puentes de disulfuro (S-S). Los reactivos típicos para reducción de enlaces disulfuro son el hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP-HCl), ditioneitol (DTT) o el 2-β-mercaptoetanol (2BME), las concentraciones requeridas van en un rango de 5-15 mM. Aunado al proceso de reducción, es necesario hacer una alquilación utilizando agentes de alquilación a una concentración de 10 mM hasta 20 mM, destacando como agentes más comunes a la cloroacetamida/iodoacetamida o el n-etil maleimida, los cuales bloquean los grupos tioles libres resultantes después de la reducción. Es importante adicionar que las reacciones de alquilación son realizadas a temperatura ambiente y en la oscuridad, evitando la alquilación en exceso de otros aminoácidos<sup>95</sup>.

#### 1.6.1.6 Proteólisis

La proteólisis es el paso fundamental que distingue a las estrategias “bottom up” de las estrategias de proteómica “top-down”. Hacer buena hidrólisis de las proteínas es una etapa de suma importancia, ya que los péptidos de longitud entre 10 y 40 aminoácidos son considerados más útiles para análisis de espectrometría de masas. Péptidos de longitud muy corta son difíciles de asignar debido a que podrían coincidir con la secuencia de muchas proteínas, mientras que péptidos conteniendo muy largas secuencias de aminoácidos no pueden ser identificados fácilmente y podrían ser perdidos durante la separación cromatográfica debido a su carácter apolar y por ello una fuerte retención en las columnas de fase inversa.<sup>95</sup>

La tripsina es la proteasa utilizada más común para hidrólisis de proteínas debido a que es específica, eficiente, disponible y de bajo costo. La tripsina corta enlaces del C-terminal de los aminoácidos de carácter básico; arginina (R) y la lisina (L). Una gran ventaja de la tripsina es que genera péptidos en apropiada longitud e hidrofobicidad para separación cromatográfica, fragmentación de péptidos en MS y MS/MS, permitiendo la identificación por medio de búsqueda en bases de datos. Sin embargo, una de las grandes limitaciones de utilizar tripsina es la generación de demasiados fragmentos, la gran mayoría con longitud menor de seis aminoácidos, esto limita significativamente el número de identificaciones confiables de las isoformas de la misma proteína y modificaciones post traduccionales. Aunque es cierto que se pueden usar otras estrategias para incrementar la cobertura del proteoma por medio del uso de múltiples proteasas, incrementando también la identificación N-terminal y así encontrar señales de péptidos de proteínas pequeñas. En general utilizando un sistema multi-proteasas genera datos e información que incrementa el número de proteínas identificadas, modificaciones post traduccionales y disminuye la ambigüedad de falsos positivos en la identificación de proteínas. Es importante mencionar que utilizar un sistema con múltiples proteasas también tiene retos significativos, ya que los péptidos no son unidos después de que los residuos son cargados positivamente como en la R/K (cuando se utiliza tripsina), por lo que podrían tener precursores con una sola carga y ser ineffectivamente fragmentados<sup>97</sup>.

#### 1.6.2. Cuantificación de péptidos (LFQ, SILAC, TMT, iTRAQ, TMT).

##### 1.6.2.1 LFQ

La cuantificación libre de marcaje (LFQ) sigue el protocolo típico de bottom up, las muestras son analizadas directamente después de hidrólisis en el espectrómetro de masas y son inyectadas una a la vez obteniendo para cada muestra un experimento de LC-MS/MS y un archivo raw. En este tipo de estrategia las abundancias de los experimentos LC-MS son

calculados a partir del área bajo el cromatograma del ion extraído, que es específico para cada péptido en su respectivo tiempo de retención. En LFQ se puede realizar la cuantificación usando el ion MS1 de las señales obtenidas por la metodología DDA (data-dependent acquisition, por sus siglas en ingles), o utilizando múltiples fragmentos de los iones obtenidos en el caso de DIA (data-independent acquisition, por sus siglas en ingles). Es importante notar que, debido a las diferencias en la eficacia de ionización, LFQ solo provee cuantificación relativa, pero no absoluta.<sup>98</sup>

#### 1.6.2.2 SILAC

El método de marcaje con isótopos estables produce péptidos que son químicamente idénticos para cada muestra y que difieren solo en la masa. Entre los métodos se incluye marcaje con isótopos estables por aminoácidos en medios de cultivo (SILAC) y marcaje químico tal como etiquetas para modificar grupos amino para cuantificación relativa y absoluta (mTRAQ) o marcaje con dimetil. Los métodos en donde se utiliza este tipo de marcaje isotópico generan un desplazamiento de 4 Da o 8 Da, los cuales pueden ser identificados dentro del full scan MS1. Es importante mencionar que este tipo de estrategias son típicas para DDA. Sin embargo, las nuevas tecnologías implementadas en más recientes instrumentos permiten utilizar marcaje químico con 3-plex mTRAQ o marcaje con dos metilos en estrategias DIA.<sup>99</sup>

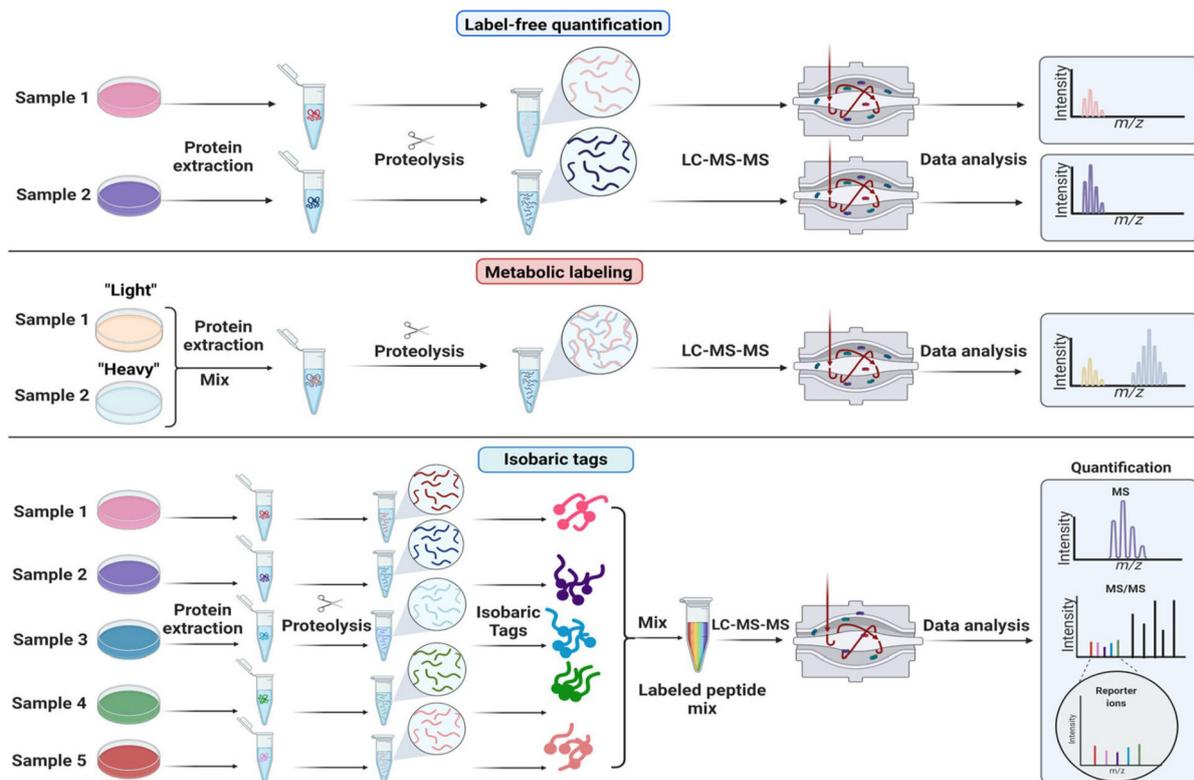
#### 1.6.2.3 Péptidos marcados con etiquetas isobáricas

Otros estudios se hacen con multiplexación utilizando etiquetas isobáricas, una estrategia que permite análisis en paralelo de adquisición de datos después de combinar las muestras antes de la corrida analítica. Las etiquetas comerciales isobáricas incluyen etiquetas de masas tándem (TMT) y etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) entre otras, y demasiadas opciones no comerciales se han desarrollado simultáneamente<sup>99</sup>.

#### 1.6.2.4. Marcaje metabólico <sup>15</sup>N

La proteómica cuantitativa permite comparar dos o más proteomas para la identificación de alteraciones en los niveles de expresión proteica bajo dos condiciones distintas de estudio. Una de las metodologías de proteómica cuantitativa incluye el uso de isótopos estables no radiactivos como estándares internos marcados isotópicamente. El uso de marcaje metabólico con <sup>15</sup>N, consiste en marcar isotópicamente proteínas de un organismo al sustituir el nitrógeno con abundancia isotópica normal, <sup>14</sup>N, por su contraparte, <sup>15</sup>N. Durante el análisis proteómico muestras con diferentes condiciones son marcadas y mezcladas en una proporción conocida, normalmente 1:1, la diferencia en masa entre péptidos isotopólogos permite identificar y

cuantificar con alta precisión por medio de espectrometría de masas. Este enfoque minimiza los sesgos experimentales asociados principalmente a la preparación y análisis de muestras, garantizando resultados más fiables.<sup>97, 100-102</sup>



**Figura 17.** Diferentes estrategias cuantitativas comúnmente usadas en proteómica. (a) cuantificación libre de marcaje, proteínas son extraídas de las muestras, péptidos enzimáticamente hidrolizados y analizados por espectrometría de masas. (b) Marcaje metabólico utilizando isotopos estables de aminoácidos en cultivos celulares utiliza con aminoácidos “ligeros” y “pesados”. (c) Marcaje isobárico o químico, las proteínas son separadas y aisladas de las muestras, los péptidos son obtenidos por hidrolisis enzimática, y entonces marcados químicamente con isotopos estables isobáricos. Las etiquetas isobáricas producen reportes de especifica relación masa-carga ( $m/z$ ) que son formados durante el proceso de fragmentación MS/MS. Los iones de los fragmentos de los péptidos son utilizados para identificar los péptidos, y las señales de los iones reporteros son usados para la cuantificación; por lo que alineación de los cromatogramas y su tiempo de retención son ajustados.<sup>95</sup>

### 1.6.3 Adquisición datos

La innovación en reciente años de los instrumentos de espectrometría de masas ha permitido coleccionar los datos en diferentes formas. Las diferentes estrategias de adquisición de datos difieren en la secuencia en la que los scans precursores y fragmentos son analizados y por tanto cómo los analitos son escogidos para hacer MS/MS. Estas estrategias se pueden clasificar en dos grandes grupos: (i) Adquisición dependiente de datos (DDA), en la cual la secuencia exacta de escaneo en cada análisis depende de los datos que observa el espectrómetro de masas. (ii) Adquisición independiente de datos (DIA), en la cual la secuencia exacta de escaneo es independiente de los datos; los datos son colectados independientemente si se inyectan péptidos de levadura, péptidos de humano o blanco. Ambas estrategias pueden ser subdivididas posteriormente en métodos dirigidos o no dirigidos.<sup>95</sup>

#### 1.6.3.1 DDA

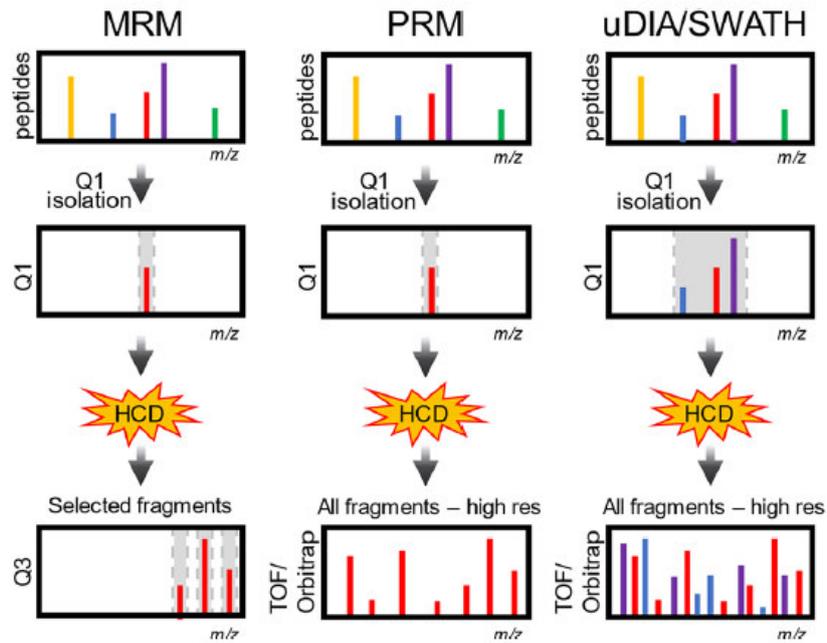
La estrategia de DDA fue inventada a inicios de los 1990's, donde permitía la colección de espectros de MS/MS para péptidos detectados al eluirse de la columna cromatográfica. La estrategia de DDA no dirigida es un método comúnmente usado en proteómica moderna, donde el espectrómetro de masas colecta los iones precursores (MS1) después de hacer un escaneo buscando precursores de masas que cumplan con ciertos criterios de detección específicos tales como carga del ion y una intensidad mínima requerida. Una de la gran desventaja de la DDA es que los iones son seleccionados al mismo tiempo que son detectados, por lo que análisis DDA de la misma muestra posiblemente producirá diferentes sets de identificaciones.

La estrategia dirigida DDA no es comúnmente utilizada, además de que los péptidos deben cumplir con específica carga y un mínimo valor de intensidad, el espectrómetro busca valores de masas específicos. En estos estudios, la muestra es primeramente analizada por LC-MS para detectar los iones precursores con ayuda de un software, y entonces análisis posteriores dirigidos a aquellas masas para fragmentación con una lista de inclusión hasta que todas las señales sean fragmentadas. Esto incrementó la cobertura del proteoma significativamente.

#### 1.6.3.2 DIA

El método más simple para operar un espectrómetro de masas es tener predefinido los escaneos que serán colectados para cada muestra durante el análisis. En este tipo de metodologías la secuencia de análisis no depende de los datos que el instrumento observa. Por tanto, el análisis es repetitivo, y con bucles para ciertos escaneos predeterminados, más frecuentemente se hace una selección en un rango de  $m/z$  en el primer cuadrupolo seguido por fragmentación en un

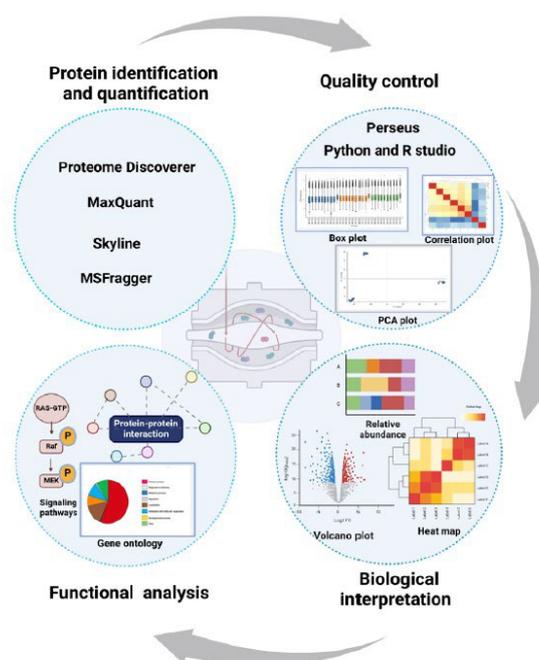
segundo cuadrupolo y la detección de los iones fragmentados en la parte final del espectrómetro de masas. De la misma manera DIA puede ser utilizada como dirigida o no dirigida. Cuando se habla de DIA dirigida se tienen los métodos SRM/MRM o PRM (Parallel reaction monitoring), mientras que análisis no dirigido (uDIA) es simplemente denominado como DIA o SWATH (Sequential Window Acquisition of All Theoretical Mass Spectra). Ver Figura 18.



**Figura 18.** Tipos de análisis DIA. (a) SRM/MRM, los péptidos son ionizados por ESI y en el Q1 los iones son filtrados y entonces fragmentados en HCD. Los fragmentos de masas correspondientes a los péptidos son seleccionados en el tercer cuadrupolo (Q3). (b) PRM, de la misma manera que MRM, los péptidos son seleccionados en el primer cuadrupolo, pero el análisis de los fragmentos ocurre en un analizador de masas de alta resolución como una Orbitrap o TOF, ganando selectividad debido a la alta exactitud de masa y resolución para monitorear los fragmentos. (c) uDIA/SWATH, los péptidos son aislados en el primer cuadrupolo, sin embargo, se utiliza una anchura de selección más amplia (ej. 10 - 20 Da). Esto resulta en solapamiento de diferentes péptidos durante su aislamiento por lo que con ayuda de software especiales se puede conocer la identidad y cantidad de los péptidos haciendo uso de alta resolución y exactitud de masas obtenidas por el instrumento de espectrometría de masas.

#### 1.6.4 Análisis de datos

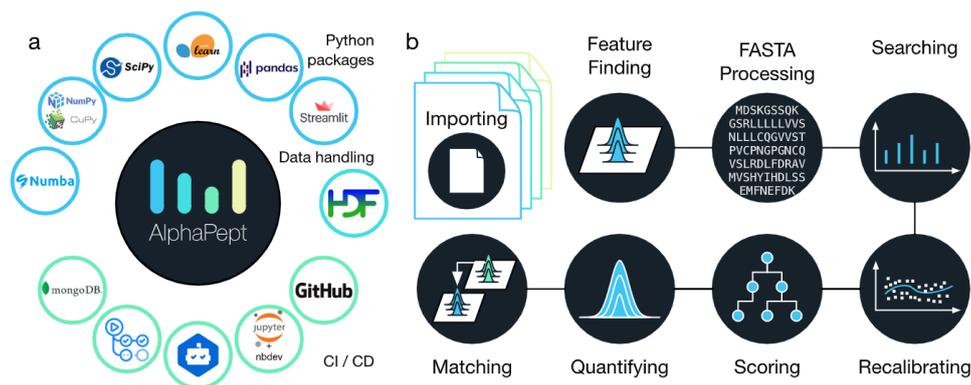
El objetivo en general de la proteómica es obtener una lista de proteínas y su abundancia a partir de los datos crudos espectrales obtenidos durante el análisis LC-MS, este proceso involucra muchas etapas en las que se incluye aseguramiento de la calidad de los datos, la asignación de los espectros a los péptidos correspondientes, interferencias proteicas, cuantificación y análisis estadístico. Debido a que se pueden obtener datos muy distintos entre las estrategias DDA y DIA, existen diferentes softwares que facilitan las etapas mencionadas anteriormente. Además de que existe actualmente una gran cantidad de software libres y con licencia disponibles en el mercado. En Figura 19 se presenta un diagrama de flujo para análisis de datos utilizando diferentes softwares de proteómica, iniciando en la identificación y cuantificación de proteínas, seguido de un filtrado y validación de estos usando modelos estadísticos para finalmente darle una explicación biológica<sup>97</sup>.



**Figura 19.** Típico flujo de trabajo para el análisis de datos, empezando por identificación y cuantificación de proteínas, seguido de filtración y análisis estadístico, para finalmente dar una interpretación biológica.

En el caso de DDA, el análisis de datos se puede hacer directamente con los programas proporcionados por el proveedor del software tal como las máquinas de búsqueda Mascot, SEQUEST, Protein Pilot o usando software de licencia libre como MS-Fragger, MaxQuant, Comet, ¡X!Tandem, Morpheus y OMSSA. Cuando se usa softwares libres los datos crudos

deben ser convertidos a formatos estándar como el XML, mzML o mzXML utilizando interfaces para conversión de datos como el MSConvertGUI de ProteoWizard. Aunque el avance en la bioinformática ha permitido hacer el procesamiento de datos más rápido y eficiente, también deben destacarse los esfuerzos por parte de diversos grupos de proteómica para crear ecosistemas colaborativos de código abierto tal como AlphaPept. En el caso de AlphaPept, el repositorio completo se encuentra almacenado en GitHub y el código está documentado en Jupyter Notebooks usando la librería nbdev. Este tipo de herramientas nos permiten, por ejemplo, importar datos crudos de diferentes compañías (.d, .raw, mzML, etc.) en forma de un contenedor del tipo HDF para acceder de manera rápida y de manera independiente a los datos. Esto permite el almacenamiento de espectros de MS de manera eficiente, lo que se traduce por ejemplo en cargar datos a la memoria de la computadora en 1 s para un análisis completo de proteómica adquirido de una muestra de HeLa durante 2h en un espectrómetro Thermo Orbitrap.



**Figura 20.** Ecosistema de Alphapept y sus diferentes módulos. Este ecosistema se basa en el conjunto de diversos paquetes probados. Librerías altamente optimizadas como Numba, NumPy, CyPy, scikit-learn, y panda fueron utilizadas para lograr un código efectivo.

Para la búsqueda de proteínas se utiliza un archivo FASTA que contiene todas las proteínas predichas a partir del genoma del organismo escogido como base de datos de referencia para la búsqueda de los espectros experimentales. Antes de comenzar con la búsqueda, una selección de parámetros como los errores de péptido (tolerancia de MS1) y de los fragmentos (tolerancia MS2), tipo de enzima, número de cortes fallidos, modificaciones químicas y modificaciones biológicas potenciales (variables/dinámicas) son seleccionadas en el algoritmo de búsqueda. Cuando el algoritmo encuentra al mejor candidato que empareja un espectro experimental contra un posible péptido y a este se le asigna un alto score, se le conoce como “peptide

spectrum match (PSM)”. El valor de score refleja un buen ajuste entre el espectro experimental y el teórico, pero no necesariamente representa la veracidad del péptido asignado.

Cuando se habla de análisis DIA, la principal diferencia es que en lugar de tener un espectro único de MS/MS para cada péptido, en DIA se observa la elución de fragmentos de diferentes péptidos al mismo tiempo cromatográfico. Existen dos tipos de estrategias para la identificación de péptidos utilizando datos obtenidos por DIA: (i) centrada en los péptidos y (ii) centrada en los espectros. La primera se centra en identificar péptidos específicos utilizando librerías con datos de MS/MS; estas librerías pueden también ser creadas a partir de algoritmos de predicción (ej, Prosit) o utilizar librerías públicas con datos obtenidos previamente. Entre los softwares más comunes para este tipo de estrategia se encuentra OpenSWATH, Spectronaut, csDIAq y DIA-NN. Por otro lado, las estrategias centradas en espectros se enfocan en identificar si hay evidencia para cada péptido basado en el análisis de los espectros observados. Entre los softwares más comunes están DIA-Umpire y PECAN. Este tipo de estrategia tiene la ventaja de producir espectros pseudo MS/MS de la coelución de los fragmentos que pueden ser usados con búsqueda de librerías DDA.

#### 1.6.5 Bases de datos de secuencias de proteínas

La gran mayoría de los algoritmos de búsqueda empleados en proteómica basada en espectrometría de masas requieren de una base de datos teórica para identificar la secuencia de los péptidos a partir de la masa del precursor y los patrones de fragmentación del péptido. Estas bases de datos se usan para búsqueda con algoritmos DDA, pero también recientemente con nuevos modos de predicción de espectros MS/MS para generar librerías espectrales teóricas para análisis de datos con DIA. El espacio de búsqueda es calculado de las posibles proteínas en una muestra (proteoma del organismo en particular) y también se incluye los contaminantes esperados. La base de datos del proteoma se almacena en un archivo FASTA (FAST All) donde está la colección de secuencias de las proteínas.

Los archivos FASTA (secuencias de proteínas) pueden ser descargados de diferentes organismos centrales: UniProt, RefSeq y Ensembl. Es importante mencionar que las secuencias de las proteínas proporcionadas por las tres organizaciones algunas veces no contienen la misma información, por lo que es necesario adicionar las diferentes bases de datos en la búsqueda.

La base de datos “The Universal Protein Resource – UniProt”, tiene tres diferentes productos: (i) UniProt Knowledgebase (UniProtKB), (ii) UniProt Reference Clusters (UniRef) y el

UniProt Archive (UniParc). El UniProt Knowledgebase (UniProtKB) es la colección central para la información total de las proteínas, con anotaciones precisas y consistentes. Además de adicionar datos para cada entrada en la colección tal como secuencia de aminoácidos, nombre de proteína o descripción, taxonomía, fuente para citar, además de todas las anotaciones posibles que se puede adicionar para tener más información.

La colección de UniProtKB consta además de dos secciones: una sección que contiene registros de anotaciones asignadas manualmente con información extraída de la literatura y análisis computacional evaluado por un algoritmo curador (UniProtKB/Swiss-Prot), por otro lado, existe también con registros analizados computacionalmente que esperan una anotación manual completa (UniProtKB/TrEMBL). Las secuencias de proteínas en UniProt son derivadas a partir de secuencias codificantes de ADN enviadas a EMBL-Bank, GenBank y DDBJ. Las secuencias de proteínas traducidas se importan primeramente a la base de datos de TrEMBL, por esta razón también se le denomina base de datos “no revisada”. Los datos se pueden incrementar con adición de secuencias directamente de “Protein Data Bank -PDB”, secuenciación directa de proteínas de trabajos reportados en literatura, y también a partir de predicción de gen codificante (fuente de Ensembl). Una vez cargada la información con las secuencias, estas pueden ser entonces revisadas manualmente y agregadas a la base de datos Swiss-Prot, y por tanto se le denomina también a la base de datos “revisada”. Durante el proceso de curación se puede eliminar un conjunto de entradas de TrEMBL y ser reemplazada por una sola entrada revisada de Swiss-Prot. Por ejemplo, si buscamos *S. cerevisiae* (Baker’s yeast) en la base de datos UniProtKB con (taxonomy\_id:4932), obtendremos 7,913 entradas revisadas (Swiss-Prot) y 40,121 entradas sin revisar (TrEMBL); indicando que en la actualidad existen más proteínas no revisadas que las que si lo están, aunque durante una búsqueda se puede combinar las dos opciones para tener mayor número de entradas y cobertura de proteínas. Con el aumento de secuenciación de genomas de alta calidad y el desarrollo de nuevos algoritmos para realizar anotaciones automáticas, las entradas de TrEMBL serán de mayor calidad que las que existían hace 5 años, por ejemplo.

El segundo tipo de colección de secuencias de proteínas disponibles en UniProtKB se designa como proteomas, con subclases de “proteoma”, “proteoma de referencia” o “pan-proteoma”. De acuerdo con el concepto manejado en esta colección, un proteoma es el conjunto de proteínas derivados de la anotación de un gen completamente secuenciado (un proteoma por un gen). Esto significa que un proteoma incluirá tanto entradas de Swiss-Prot como de

TrEMBL presentes en una única anotación genómica, y que todas las entradas en el proteoma pueden rastrearse a hasta un solo ensamble genómico completo.

Cuando se recuperan colecciones de secuencias de proteínas como Swiss-Prot/TrEMBL o de proteomas designados, existe la opción de descargar el archivo como formato “FASTA (canónica)” o “FASTA (canónica e isoformas)”. La segunda opción incluye también isoformas adicionales, anotadas manualmente para las secuencias de Swiss-Prot. Cada entrada de Swiss-Prot tiene una secuencia canónica seleccionada por el curador manual. El número de isoformas adicionales en un proteoma varía considerablemente dependiendo del tipo de especie. Una vez que una colección de secuencias de proteínas ha sido seleccionada y recuperada, el archivo descargado deberá de seguir una cierta nomenclatura sugerida por UniProtKB para que las búsquedas entre diferentes usuarios sean reproducibles. Los archivos de UniProtKB FASTA sugieren utilizar el siguiente formato: [nombre común o científico]-[id taxonómico]-uniprot[Swiss-Prot/TrEMBL/proteoma]-[UP#proteoma]-[canonical/canonicalmás isoformas]-[liberación]; por ejemplo, el archivo FASTA descargado para *Homo sapiens* (human) de UniProtKB: Human-9606-uniprot-proteome-UP000005640-canonical-2023\_04.fasta.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Avanzar en el conocimiento sobre el impacto de Se y de Cr en microorganismos de relevancia en la alimentación humana, mediante aplicación de diversas herramientas analíticas y de análisis de datos, con enfoque en el uso de espectrometría de masas.

### 2.2 Objetivos específicos

- I. Establecer las condiciones de crecimiento y enriquecimiento de *S. cerevisiae* bajo exposición a Se(IV) utilizando marcaje metabólico *in vivo* con isotopo pesado de nitrógeno ( $^{15}\text{N}$ ).
- II. Estudiar el impacto del marcaje metabólico con  $^{15}\text{N}$  sobre la captación y biotransformación de Se(IV) en levadura, y determinar si existe fraccionamiento isotópico de Se durante su incorporación en la levadura.
- III. Estudiar el efecto del Se(IV) en levadura mediante un estudio de proteómica semicuantitativa utilizando marcaje metabólico con  $^{15}\text{N}$  haciendo uso de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS).
- IV. Evaluar la capacidad de nanopartículas de Se (NPSe<sup>o</sup>) como removedoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones fisiológicas.

- V. Estudiar diferentes formas de exposición de Cr con levadura., enfocándose en una incorporación efectiva de Cr(III) y en un buen crecimiento celular de la levadura.

### 3 Parte experimental

#### 3.1 Equipos de laboratorio

##### 3.1.1 Instrumentación analítica

- Espectrómetro de masas de alta resolución maXis Impact: Ionización ESI y cuadrupolo-tiempo de vuelo ESI-QToF-MS (Bruker Daltonics, California, USA).
- Espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) modelo Nexion 300D (Perkin Elmer, Boston, USA), con celda de colisión/reacción tipo octapolo.
- Espectrómetro de emisión atómica con plasma de microondas (MP-AES) modelo MP-4100 de Agilent Technologies con generador de nitrógeno Agilent 4107 y con módulo de control de gas externo (EGCM) (Agilent Technologies, California, USA.).
- Espectrómetro de masas modelo “Plasma II” multicolector de alta resolución equipado con 16 copas de Faraday (MC-ICP-MS) (Nu Instruments, Wrexham, U.K.).
- Espectrómetro de masas con ionización ESI y triple cuadrupolo (ESI-QqQ-MS) Agilent 6460 (Agilent Technologies, Múnich, Alemania).
- Espectrómetro de masas con desorción/ionización laser asistida con matriz y con analizador de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS) (Bruker Daltonics), equipado con un láser Smartbeam<sup>TM</sup>-II Nd:YAG (335 nm, 532 nm, 1064 nm).
- Cromatógrafo de líquidos UHPLC Ultimate 3000 (Dionex Thermo Scientific, California, USA) equipado con bomba binaria, desgasificador, termostato y auto muestreador.
- Cromatógrafo de líquidos HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, Múnich, Alemania).
- Cromatógrafo de gases Clarus 500 con detector de ionización de flama (GC-FID) (Perkin Elmer, USA).
- Espectrofotómetro UV/Vis modelo Multiskan GO (Thermo Scientific).

##### 3.1.2 Equipos utilizados en el procesamiento de muestras y preparación de reactivos

- Sistema de extracción en reflujo, modelo Carousel 12 Plus Reaction Station (Radleys Chemistry Equipment, Saffron Walden, U.K.).
- Sistema de digestión asistida por microondas “High-Performance Microwave Digestion System ETHOS<sup>TM</sup> UP” (Milestone Srl).

- Sistema Comercial de generación de Hidruros/Vapor frio modelo HGX-200 (Teledyne CETAC Technologies).
- Cámara de electroforesis SDS-PAGE Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, México).
- Purificador de agua Mili-Q WaterPro Ps (Labconco).
- Centrifuga HERMLE Labortechnik Z 326.
- Centrifuga Legend Mrico 17 (Thermo Scientific).
- Speed Vac Vacufuge plus (Eppendorf AG).
- pH metro 3200P (Agilent Technologies).
- Liofilizador FreeZone 2.5 Plus y Frasco Fast-Freeze 600 mL (Labconco).
- Campana de flujo laminar con lampara UV.
- Micropipetas BioPette™ A de 2 µL, 10 µL, 20 µL, 200 µL, y 1000 µL (Labnet, NJ, USA).

### 3.2 Softwares para análisis de datos

- Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics).
- ProteinScape (Bruker Daltonics).
- BioTools (Bruker Daltonics).
- MASCOT (Matrix Science).
- MassHunter Workstation Software Version B.07.00 (Agilent Technologies).
- ProfileAnalysis Version 2.1 (Bruker Daltonics)
- Excel Office 365
- ChemStation (Agilent Technologies)
- Agilent Expert MP (actualizado de MP-AES 4200)
- Skyline
- MS Fragger
- Isotopic Pattern Calculator
- ProteoWizard – MSconvert
- ID Pick
- R
- Isotope enrichment calculator v.1.2

### 3.3 Material biológico

- Levadura panadera (*S. cerevisiae*)
- Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Crecimiento de *S. cerevisiae* durante biofortificación con Se utilizando marcaje metabólico con <sup>15</sup>N

#### 4.1.1 Introducción

La levadura biofortificada con selenio ha sido un foco de investigación desde hace más de 5 décadas. El primer estudio nutricional a gran escala se relacionó con la prevención de cáncer, comprobando un decremento en la incidencia de diferentes tipos de cáncer en la población que recibió 200 µg de Se-levadura diariamente por 4 años; el estudio fue llevado a cabo en los años 90 por Clark y colaboradores<sup>103</sup>. Posteriormente, numerosos ensayos clínicos han sido realizados utilizando no solamente levadura selenizada como el suplemento, sino también L-Se-metionina (SeMet), oxi-aniones de selenio y diversas formas orgánicas de selenio obtenidas sintéticamente. A través de los años, un consenso se ha establecido entre los diferentes estudios de que los efectos benéficos son evidentes solamente cuando los participantes muestran bajos niveles de Se. Además, se ha demostrado que los resultados de la suplementación con Se también dependen de la dosis de Se y la duración del tratamiento. Como una conclusión importante, la levadura selenizada fue aceptada como la forma más efectiva del elemento<sup>104-106</sup>. Es necesario resaltar que SeMet administrada por sí sola o con vitamina E en el estudio SELECT, falló en la prevención de cáncer de próstata en la población de hombre relativamente sanos<sup>106</sup>. La SeMet es la forma principal de selenio en levadura, equivalente a cerca del 60 % del selenio total, y por ello es necesario entender completamente el metabolismo de selenio y los cambios asociados al Se en estos organismos para poder entender la significancia de la actividad quimiopreventiva de levadura biofortificada con Se. Como ejemplo, un estudio realizado en ratones reveló diferentes efectos en la expresión a nivel genético cuando se utilizaba selenito de sodio, SeMet y Se-levadura<sup>107</sup>. Además, usando electroforesis en gel de dos dimensiones seguida de cromatografía de líquidos y ionización por electrospray con espectrometría de masas en tándem, se observó diferencias en la expresión de las proteínas asociadas con el proceso carcinogénico debido a la biofortificación de levadura con selenio<sup>108</sup>.

En un estudio reciente, ocho fracciones de una electroforesis en gel fueron analizadas por MALDI-TOF-MS, encontrando cambios en la expresión de proteínas en presencia de Se<sup>109</sup>. Sin embargo, ninguno de los estudios citados fue conclusivo, por lo contrario, los autores resaltaron la necesidad de realizar más investigación futura.

Por otro lado, el marcaje metabólico con nitrógeno pesado durante el crecimiento de ciertos organismos se ha convertido en una estrategia ampliamente aceptada en proteómica comparativa<sup>99, 110</sup>, y podría ser útil cuando es enfocada en estudio de Se-levadura. En tales estudios, una sal conteniendo nitrógeno es agregada al medio de crecimiento como única forma de nitrógeno, utilizando sal <sup>15</sup>N para la levadura expuesta a Se y una sal con composición isotópica natural de nitrógeno (99.63% de <sup>14</sup>N) para controles no expuestos (o inversamente). Cabe resaltar que el marcaje con isótopos estables permite análisis LC-MS de la mezcla de dos muestras en una sola corrida cromatográfica, asegurando idénticas condiciones de separación y detección en ambos sistemas estudiados. Gracias a la capacidad isotópica de la espectrometría de masas, el mismo compuesto (péptido) proveniente de dos muestras diferentes, aunque se eluye de la columna cromatográfica prácticamente con el mismo tiempo de retención, puede ser fácilmente asignado a cada una de las muestras y su abundancia puede ser comparada entre las muestras aplicando la diferencia esperada de *m/z* debida a la sustitución del isótopo ligero por el isótopo pesado en una de ellas.

No obstante, introduciendo isótopos pesados de nitrógeno, un elemento químico presente en la mayoría de las biomoléculas importantes dentro de cualquier organismo puede alterar varios procesos vitales causando cambios en la transcripción del ADN, expresión de proteínas, y en el perfil de metabolitos. Por consiguiente, un marcaje metabólico inverso es usualmente realizado, preparando dos sets de muestras biológicas; en un set, <sup>14</sup>N es aplicado al cultivo control, y en el otro, <sup>15</sup>N es introducido en el organismo expuesto. De esta manera, la interpretación de los datos de análisis de espectrometría de masas se vuelve menos propensa a errores, y los efectos causados por el tratamiento aplicado puede ser separado de aquellos provocados por <sup>15</sup>N<sup>102, 111</sup>. Específicamente, en *Escherichia coli*, se ha reportado que el <sup>15</sup>N afecta los perfiles de proteína y metabolitos en varias rutas biosintéticas y metabólicas, incluyendo en el ciclo del ácido cítrico y glicolisis<sup>112</sup>.

Dentro de los objetivos generales del proyecto doctoral, se propone hacer un estudio proteómico comparando levadura crecida en presencia de selenio inorgánico, Se (IV), contra un control no-expuesto. Como aportación original, se pretende hacer marcaje metabólico con nitrógeno pesado (<sup>15</sup>N). Y para ello, primeramente, se establecieron las condiciones de exposición de levadura a Se(IV) teniendo como objetivos una eficiente incorporación de selenio sin sacrificar la producción de biomasa. Para poder realizar el marcaje metabólico, se utilizó medio YNB (Millipore Y1251), el cual no contiene ni aminoácidos ni sales de amonio<sup>113</sup>. Por tanto, el sulfato de amonio es agregado como única fuente de nitrógeno;

utilizando en uno de los cultivos la sal con distribución natural de isotopos de nitrógeno ( $^{14}\text{N}$ ) y en otro cultivo una sal que contiene nitrógeno pesado ( $^{15}\text{N}$ ). De esta manera se hace posible comparación de cultivo expuesto a Se(IV) contra el control no expuesto en una sola corrida LC-MS.

#### 4.1.2 Objetivos particulares

- Aislar una cepa de *S. cerevisiae* a partir de levadura panadera comercial.
- Establecer condiciones de crecimiento de la levadura en medio definido YNB (sin aminoácidos y sin sulfato de amonio), bajo exposición a Se (IV): 0, 5, 10 y 20 mg/L.
- Evaluar el crecimiento de la levadura en base a la biomasa liofilizada obtenida en peso seco y sobre número de células formadas.
- Comparar el crecimiento de levadura cuando se utiliza marcaje metabólico con  $^{15}\text{N}$ , tanto en los medios con Se(IV) como en los controles no expuestos.

#### 4.1.3 Condiciones experimentales

##### 4.1.3.1 Reactivos y muestras

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y reactivos de la marca Sigma Aldrich fueron ampliamente utilizados. Las muestras y estándares fueron diluidos con agua desionizada (18 M $\Omega$  cm Labconco).

Selenito de sodio, sulfato de amonio con composición isotópica natural ( $^{14}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), sulfato de amonio marcado con nitrógeno pesado ( $^{15}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), > 98 % de átomos  $^{15}\text{N}$  y dextrosa fueron reactivos obtenidos de Sigma Aldrich.

El medio mínimo YNB (base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio) fue obtenida de Sigma Aldrich y medio PDA (Agar papa dextrosa) de BD Bioxon.

##### 4.1.3.2 Crecimiento de levadura y enriquecimiento con Se

Un cultivo de levadura de pan (*S. cerevisiae*) fue obtenido a partir de sembrar el microorganismo en medio sólido agar papa dextrosa (PDA) e incubando toda la noche a 28 °C; las colonias fueron recuperadas con una aza estéril y fueron inoculadas en dos matraces Erlenmeyer, cada uno con 200 mL de medio líquido. En ambos matraces, el medio consistió en 1.7 g/L YNB, 4.0 % de dextrosa y 5 g/L de sulfato de amonio (Tabla 7); sin embargo, la sal de amonio con composición natural de  $^{14}\text{N}$  fue adicionada en un matraz, mientras que , en el segundo matraz, la sal con  $^{15}\text{N}$  fue utilizada. La levadura fue crecida a 28 °C por 24 h, con

agitación. Las células se recuperaron por centrifugación a 4,000 g por 5 min y la pastilla fue re-suspendida en 10 mL de medio fresco. Alícuotas de estas soluciones fueron inoculadas en el siguiente ciclo de crecimiento donde ocho matraces Erlenmeyer se utilizaron para cultivos con  $^{14}\text{N}$  y otros ocho para  $^{15}\text{N}$ . En cada caso, dos matraces fueron usados para crecer un control no expuesto y los otros seis matraces se destinaron para la exposición a Se(IV) con concentraciones de 5, 10 y 20 mgSe/L, respectivamente (dos replicas para cada condición). La concentración inicial de levadura en cada matraz fue de  $6.0 \times 10^6$  células/mL. Todos los experimentos fueron realizados de manera simultánea manteniendo las mismas condiciones de crecimiento, incubándolos por 24 h a 28 °C con agitación constante. Las células se recuperaron por centrifugación (5,000 g por 5 min) y fueron lavadas tres veces con agua desionizada. Finalmente, las muestras fueron congeladas, liofilizadas, y la producción de biomasa fue evaluada con respecto a peso seco obtenido. Las repeticiones biológicas de los medios crecidos bajo las mismas condiciones fueron analizadas en tres replicas técnicas.

**Tabla 7.** Composición de medio de cultivo YNB sin aminoácidos para crecimiento de levadura marcada isotópicamente con nitrógeno  $^{15}\text{N}$ ; bajo exposición a Se (IV) 5, 10, y 20 mg/L.

| Reactivo                               | Levadura - $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ |
|--|--|
| Medio YNB                              | 1.7 g/L                                  |
| Dextrosa                               | 4.0 % m/v                                |
| * $(^{14/15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 37.9 mM $\approx$ 5 g/L                  |
| Se (IV)                                | 5, 10, 20 mgSe/L                         |

\* se utilizaron dos sales de amonio, una con composición isotópica natural de  $^{14}\text{N}$  y otra con  $^{15}\text{N}$  ( $^{15}\text{N} > 98\%$ ).

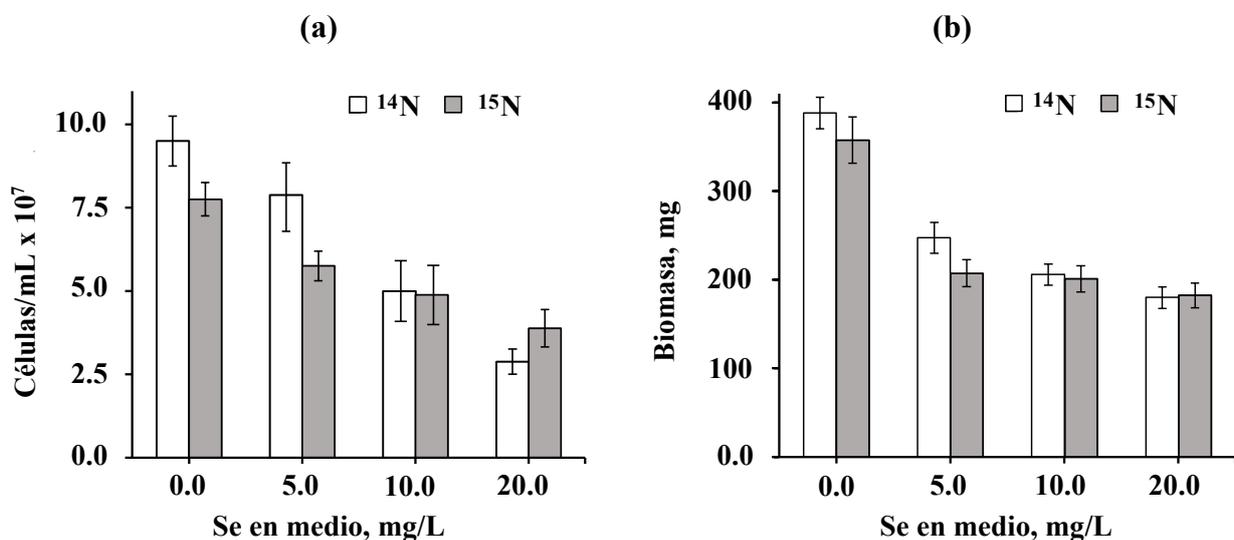
#### 4.1.4 Resultados y Discusión

Como punto de partida, el crecimiento celular de la levadura en presencia de nitrógeno ligero y pesado fue evaluada, estableciendo las mejores condiciones para su crecimiento. Inicialmente, un medio YNB sin aminoácidos fue preparado de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor, adicionando sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, es decir, sal con distribución isotópica natural  $^{14}\text{N}$  para un medio ligero, mientras que, una sal enriquecida isotópicamente con  $^{15}\text{N}$  para el medio pesado.

Se utilizó una concentración de sal de amonio de 20 mmol/L y 2.0 % m/v de glucosa, tal como ha sido reportado anteriormente<sup>114</sup>. Sin embargo, se observó deficiente crecimiento bajo estas condiciones, varios experimentos se realizaron variando la concentración de

nitrógeno y de glucosa como fuente de carbón (resultados no mostrados)<sup>15</sup>. Como resultado de estas pruebas, se decidió usar doble del sulfato de amonio inicialmente probado y 4 % m/v de glucosa, los cuales produjeron buen e igual crecimiento de levadura en presencia de ambas formas isotópicas de nitrógeno. Por otro lado, para el enriquecimiento con Se, se adicionó selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) para tener concentraciones finales de Se en los medios equivalentes a 5, 10 y 20 mgSe/L. Como se observa en la Figura 21a el Se inhibe el crecimiento de levadura en forma directamente proporcional a la cantidad adicionada. Es de particular interés que un color rojizo apareció en todos los cultivos con exposición a Se, indicando la formación de Se elemental. Se observó además que la intensidad del color fue de manera proporcional a la cantidad de selenio adicionada a los medios.

Es importante mencionar que, bajo estas condiciones idénticas de crecimiento seleccionadas, prácticamente el mismo número de células y cantidad de biomasa fueron obtenidos después de crecimiento de la levadura por 24 h, tanto en los medios en presencia de nitrógeno  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$  (Figura 21a y Figura 21b). Es claro también que, la exposición de la levadura a 20 mgSe/L inhibe el crecimiento celular en aproximadamente 50 % con respecto a un control no expuesto.



**Figura 21.** Efecto de diferentes concentraciones de Se en medio de cultivo (mgSe/L) sobre la cantidad de células de levadura generadas por mL, (a); y sobre biomasa total liofilizada (b); se muestra comparación entre los medios de crecimiento obtenidos en presencia de nitrógeno ligero  $^{14}\text{N}$  y pesado  $^{15}\text{N}$ .

A manera de demostración, en Figura 21 se presentan resultados obtenidos en estos experimentos; las cantidades de células por mL y los valores de biomasa obtenidos después de 24 h de crecimiento en ausencia de Se(IV) y cuando los medios fueron expuestos 5, 10 y 20 mgSe/L, respectivamente. Adicionalmente, en la Figura 22 se puede observar el cambio de color de biomasa conforme aumentaba la concentración de Se en el medio. En base a los resultados obtenidos, se seleccionó la concentración de 10 mgSe/L para las siguientes etapas del estudio.



**Figura 22.** Imagen donde se muestra efecto de las diferentes concentraciones de Se en medio de cultivo (mgSe/L) sobre el crecimiento celular y producción de biomasa después de 24 h de exposición.

#### 4.1.5 Conclusiones

Se establecieron las condiciones de crecimiento de *S. cerevisiae* adecuados para llevar a cabo el marcaje metabólico con  $^{15}\text{N}$  utilizando sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Se ha logrado igual crecimiento y producción de biomasa de levadura en presencia de ambas formas isotópicas de nitrógeno. Así mismo, se seleccionó la concentración de Se(IV) en medio correspondiente a 10 mgSe/L

### 4.2 Estudio de fraccionamiento isotópico de Se durante bio-fortificación de *S. cerevisiae* e influencia de marcaje metabólico con $^{15}\text{N}$

#### 4.2.1 Introducción

En el capítulo 4.1, se describe el crecimiento de la levadura utilizando marcaje metabólico con nitrógeno pesado como una estrategia útil enfocada en estudio de Se-levadura, específicamente pensando en hacer proteómica comparativa<sup>99, 110</sup>. No obstante, introduciendo isótopos pesados de nitrógeno, un elemento químico presente en la mayoría de las biomoléculas importantes dentro de cualquier organismo puede alterar varios procesos vitales causando cambios en expresión de proteínas, y en el perfil de metabolitos. Específicamente, en *Escherichia coli*,  $^{15}\text{N}$  ha sido reportado que afecta los perfiles de proteína y metabolitos en

varias de sus rutas biosintéticas y metabólicas, incluyendo en el ciclo del ácido cítrico y glicolisis. En este sentido, se han reportado también diferencias en la composición isotópica de carbono (un elemento estructural similar al nitrógeno) entre plantas con diferentes vías de fotosíntesis, afectando el fraccionamiento isotópico durante la síntesis de clorofila<sup>115</sup>.

Por otro lado, es reportado que el fraccionamiento de masa para ciertos metales, tal como Cu, Zn, o Fe, ocurre durante procesos biológicos<sup>116</sup>. Alteraciones en la composición isotópica en nutrientes minerales se han observado en varias condiciones clínicas y patologías, incluyendo cáncer<sup>113, 117, 118</sup>. También existen reportes informando valores delta negativos para selenio presente en levadura, lo que sugiere que durante el proceso de captación y asimilación de este elemento existe una preferencia a los isotopos “ligeros” de; sin embargo, la única muestra analizada hasta el momento fue SELM-1- un material de referencia certificado producido en el Centro Nacional de Investigación Council Canadá (NRCC)<sup>119, 120</sup>.

La información colectada y resumida anteriormente fue la motivación para investigar el fraccionamiento isotópico de Se durante bio-fortificación de *S. cerevisiae* y evaluación de los posibles efectos causados por nitrógeno pesado, usado en el marcaje metabólico. En este capítulo se reportan los resultados de la evaluación del efecto del marcaje metabólico con <sup>15</sup>N sobre la incorporación y sobre el posible fraccionamiento isotópico de Se durante la captación/biotransformación de Se(IV). Para determinar la incorporación de Se(IV) a levadura, se utilizaron dos sistemas instrumentales: espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas- previa generación de hidruros (HG-MP-AES) y espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Así mismo, la conversión de Se(IV) en SeMet fue confirmada después de la digestión de muestra con ácido metanosulfónico y el análisis por cromatografía de líquidos con detector masico de triple cuadrupolo. Finalmente, las relaciones isotópicas de Se fueron determinadas utilizando un espectrómetro de masas de alta resolución con ionización en plasma acoplado inductivamente equipado con detector de tipo multicolector (HG-MC-ICP-MS).

#### 4.2.2 Objetivos particulares

- Corroborar la selección de la concentración de Se(IV) en medio de cultivo mediante evaluación de la captación de Se y su transformación en SeMet en *S. cerevisiae* - Determinar el fraccionamiento isotópico de Se durante bio-fortificación de *S. cerevisiae*
- Comparar la incorporación de Se y su fraccionamiento isotópico entre levadura marcada con <sup>15</sup>N y levadura con distribución isotópica natural de <sup>14</sup>N.

### 4.2.3 Condiciones experimentales

Para asegurar alta fiabilidad de los resultados, cuatro replicas biológicas de cultivo de levadura marcada y sin marcaje fueron preparadas y analizadas; el selenio reducido extracelularmente y Se incorporado en células fue determinado de manera independiente en muestras de nitrógeno  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ , usando dos técnicas analíticas diferentes: HG-MP-AES y ICP-MS.

El fraccionamiento isotópico para selenio fue determinado a partir de las relaciones isotópicas de Se determinadas por medio de generación de hidruros acoplado a espectrometría de masas de multicolector con plasma acoplado inductivamente (HG MC ICP-MS), esto después de estudiar algunas posibles interferencias.

#### 4.2.3.1 Reactivos y muestras

Todos los reactivos fueron de grado analítico, en su mayoría fueron productos Sigma Aldrich. Las muestras y estándares fueron diluidos con agua desionizada (18 M $\Omega$  cm Labconco).

Selenito de sodio, selenometionina (SeMet), sulfato de amonio con composición isotópica natural ( $(^{14}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), sulfato de amonio marcado con  $^{15}\text{N}$  ( $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), > 98 % de átomos  $^{15}\text{N}$ ), sulfito de sodio, ácido nítrico ultrapuro, ácido clorhídrico fumante, ácido metanosulfónico, ácido fórmico, formiato de amonio, hidróxido de sodio, peróxido de hidrogeno, y dextrosa fueron reactivos de Sigma Aldrich.

Una solución de estándar multi elemental MERCK ICP VI que contiene: Li, Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Rb, Sr, Mo, Ag, Cd, Ba, Tl, Pb, Bi, U a 9.8 mg/L, y Be, Fe, As, Se, Zn a 100 mg/L; estándares individuales de Zn y Cu fueron adquiridos de Merck.

Para determinar la precisión y exactitud de los resultados, se utilizó el material certificado de referencia para levadura selenizada SELM-1 (National Research Council, Ottawa, ON, Canada), una solución estándar de selenio SRM NIST 3149 (Merck, Darmstadt, Germany), y estándares de referencia de agua superficiales, SPS-SW2 y SPS-SW1 (Spectrapure Standards, Oslo, Norway).

#### 4.2.3.2 Instrumentación analítica

- ✓ Espectrómetro de emisión atómica con plasma de microondas (MP-AES) modelo MP-4100 de Agilent Technologies con generador de nitrógeno Agilent 4107 y con módulo de control de gas externo (EGCM) (Agilent Technologies, California, USA.). Para la introducción de las muestras se utilizó un sistema de introducción de muestras

- multimodo (MSIS), controlado por el software Agilent MP Expert. El sistema que integra generacion de hidruros con MP-AES se abrevia a continuación HG - MP-AES
- ✓ Espectrómetro ICP-MS modelo Nexion 300D (Perkin Elmer, Boston, USA), con celda de colisión/reacción tipo octapolo. En el texto se abrevia este sistema como ICP-MS.
  - ✓ Cromatógrafo de líquidos 1290 Infinity HPLC (Agilent, USA) acoplado con espectrómetro de masas Agilent 6064 ionización por electro nebulización y con separador de masas de triple cuadrupolo (HPLC-ESI-QqQ-MS). La columna cromatográfica utilizada fue una del tipo Poroshell 120 EC-C18 (50 mm x 3 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ )
  - ✓ Espectrómetro de masas modelo “Plasma II” multicollector de alta resolución equipado con 16 copas de Faraday (MC-ICP-MS) (Nu Instruments, Wrexham, U.K.). Este sistema fue acoplado a un generador de hidruros y se abrevia a continuación como HG-MC - ICP-MS

#### 4.2.3.4 Crecimiento de levadura y enriquecimiento con Se

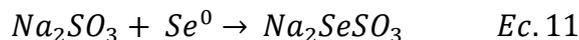
Las muestras de levadura fueron obtenidas tal como se describen en la sección 4.1.2 del capítulo anterior: Sin embargo, para facilitar la interpretación de datos en los siguientes capítulos, las muestras se identificarán de la siguiente manera: **Lc1-Lc4** – levadura crecida en presencia de  $^{14}\text{N}$  y sin exposición de Se; **L1-L4** – levadura crecida en presencia de  $^{14}\text{N}$  y bajo exposición a Se(IV); **Hc1-Hc4** – levadura crecida en presencia de  $^{15}\text{N}$  y sin Se; **H1-H4** – levadura crecida en presencia de  $^{15}\text{N}$  y Se(IV)”.

En cada experimento, dos muestras biológicas fueron obtenidas de cada tratamiento y se realizaron cuatro repeticiones en meses consecutivos (marzo – junio 2022). Las repeticiones biológicas de los medios crecidos bajo las mismas condiciones fueron homogenizados y analizados en tres replicas técnicas.

#### 4.2.3.5 Eliminación de Se elemental de biomasa de levadura

En todos los experimentos con exposición a Se(IV) se observó la formación de nanopartículas de selenio elemental (SeNPs) por reducción de selenio inorgánico a selenio elemental. Su presencia es visible por una coloración rojiza acumulada en la superficie celular. Para la eliminación de estas nanopartículas de Se adsorbidas sobre las células de la levadura, se realizó un tratamiento con sulfito de sodio, siguiendo el procedimiento reportado anteriormente<sup>121</sup>. En concreto, a una alícuota de 150 mg de levadura liofilizada se adicionaron 2.5 mL de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$

200 mM y la mezcla se calentó a 60 °C durante 6 h en reflujo, logrando la siguiente oxidación de Se<sup>0</sup> a selenosulfito de sodio, soluble en agua.



Después de solubilizar las nanopartículas, las soluciones se centrifugaron a 6,000 g por 10 min. La pastilla obtenida, la cual correspondía a células sin Se<sup>0</sup> fue secada a temperatura ambiente (pastilla 1). Por otro lado, se recuperó el sobrenadante que contenía el selenosulfito proveniente de la oxidación de NPSe y posiblemente algunas proteínas disueltas. Las proteínas extraídas por el tratamiento fueron posteriormente recuperadas con adición de tres volúmenes de acetona fría, y manteniendo la mezcla a – 20 °C toda la noche. Una vez precipitadas las proteínas, se recuperaron en la pastilla después de centrifugación a 13,000 g por 10 min (pastilla 2). Finalmente, las pastillas 1 y 2 fueron combinadas y usadas para la determinación de: (i) contenido Se total captado por levadura, (ii) determinación de elementos traza y (iii) medición de las relaciones isotópicas de Se en levadura. En cada muestra, el sobrenadante recuperado fue evaporado a temperatura ambiente, y concentrado a 1 mL previo a digestión ácida para determinación de selenio que correspondía a la fracción que formó NPSe afuera de las células.

#### 4.2.3.6 Determinación de selenio total en levadura y de la fracción extracelular del elemento correspondiente a Se<sup>0</sup> por HG-MP-AES

Después de remover Se<sup>0</sup>, 50 mg de levadura liofilizada y el sobrenadante recuperado para cada muestra fueron depositados independientemente en 15 mL de tubos de digestión de cristal de borosilicato, previamente lavados en 10 % HNO<sub>3</sub> por 24 h, y enjuagados con suficiente agua. Para la digestión, 1 mL de ácido nítrico concentrado fue agregado a cada muestra, y todas fueron calentadas a 80 °C durante 20 min, seguido de un incremento de temperatura a 120 °C y mantenida por 3 h (Accublock Digital Dry Bath D1200, Labnet International, NJ, USA). Una vez que los digestos se enfriaron a temperatura ambiente, 500 µL de peróxido de hidrógeno se adicionó, y las muestras se calentaron por otros 30 min. El volumen se ajustó a 2 mL en tubos eppendorf y, después de haber centrifugado a 13,000 g por 5 min, 400 µL fueron tomados y diluidos a 4 mL con agua desionizada previo a análisis por HG-MP-AES.

El procedimiento de HG-MP-AES fue adoptado de estudios previos<sup>15</sup>. La generación de seleniuro (HG) se realizó utilizando un sistema MSIS; donde las muestras/estándares fueron bombeadas a través del canal inferior, el agente reductor suministrado a través del canal superior y el gas de nebulización fue introducido de manera perpendicular. Para la acidificación, 1 mol/L HCl fue proporcionado junto a la muestra mediante una conexión en

forma de T. La solución reductora fue preparada diariamente disolviendo 4.5 g de NaBH<sub>4</sub> (1.5 % m/v, 0.32 M) en 300 mL de 1.0 % m/v, 0.26 M NaOH.

Los parámetros para la generación de hidruro de selenio y las condiciones de operación del instrumento son presentados en Tabla 8. La cuantificación de selenio se realizó utilizando una curva de calibración externa con siete puntos de calibración (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0 y 5.0 mgSe/L) utilizando el estándar de Se(IV). La función de regresión lineal de la calibración fue de  $R^2 > 0.999$  y el límite de cuantificación instrumental para Se fue de 0.14 mg/L. El procedimiento fue validado utilizando el material de referencia certificado SELM-1, el cual fue utilizado en todo momento.

**Tabla 8.** Condiciones de operación instrumental en el sistema HG-MP-AES

| <b>Generación de hidruros</b> |   |
|-------------------------------|---|
| Acidificación                 | HCl 1 mol/mL; 1 mL/min  |
| Agente reductor               | NaBH <sub>4</sub> 1.5 % (m/v) + NaOH 1.0 % (m/v); 1 mL/min      |
| <b>Detección por MP-AES</b>   |   |
| Presión de nitrógeno          | 140 psi   |
| EGCM                          | Media   |
| Nebulizador/cámara de niebla  | Sistema de introducción de muestra multimodo/MiraMist Teflon    |
| Presión de nebulizador        | 220 KPa   |
| Posición de visualización     | - 20  |
| Posición de adquisición       | Continua  |
| Tiempo de integración         | 5 s   |
| Longitud de onda de detección | $\lambda = 196.026 \text{ nm}$ , $\lambda = 203.985 \text{ nm}$ |
| Número de pixeles             | 3   |

#### 4.2.3.7 Determinación de Se y de elementos traza en biomasa de levadura por ICP-MS

150 mg de biomasa liofilizada fue tratada con sulfito de sodio como anteriormente se describió, la pastilla recuperada y el sobrenadante (concentrado a 1 mL) se colocaron de manera independiente en tubos de digestión de teflón. Para la digestión, 4.5 mL de ácido nítrico ultrapuro concentrado y 0.5 mL de peróxido de hidrógeno fueron adicionados, y las muestras se calentaron en un sistema de microondas (High-Performance Microwave Digestion System ETHOS™ UP, Milestone, Italy). El programa de digestión consistió en 50 min con una

potencia máxima de 1800 W; la temperatura fue incrementada de manera lineal hasta 210 °C durante 20 min, y mantenida a 210 °C por 15 min. Finalmente, los digestos fueron enfriados a temperatura ambiente por 20 min y el volumen se llevó a 50 mL con agua desionizada para el análisis de Se y de elementos trazas. Se utilizó un ICP-MS Nexion 300D (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) con nebulizador Meinhard y cámara de nebulización ciclónica de Quarzo. Los parámetros de operación del instrumento fueron optimizados diariamente para obtener la máxima sensibilidad. Las condiciones de operación fueron las siguientes: poder de RF de 1300 W, el flujo de gas de plasma (Ar) fue de 15 L/min, velocidad del flujo de gas auxiliar 1.2 L/min, y flujo del gas de nebulizador (Ar) fue de 0.8 L/min, tiempo de integración de 100 ms. Específicamente para la determinación de Se en biomasa y en sobrenadante, los isótopos  $^{78}\text{Se}$  y  $^{82}\text{Se}$  fueron elegidos debido a la conocida interferencia poliatómica del dímero de Ar con el isótopo más abundante,  $^{80}\text{Se}$ . Se monitorearon los siguientes elementos en biomasa con base a los siguientes isótopos:  $^{51}\text{V}$ ,  $^{53}\text{Cr}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{86}\text{Sr}$ ,  $^{137}\text{Ba}$ . Se realizó calibración externa con diluciones sucesivas de una solución de estándares multi elemental para ICP-MS, la cual consistía en: Li, Al, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Rb, Sr, Mo, Ag, Cd, Ba, Tl, Pb, Bi, U con concentraciones de 9.8 mg/L y Be, Fe, As, Se, Zn con concentración de 100 mg/L. Los rangos de calibración fueron de: 0.98 – 98  $\mu\text{g/L}$  para el primer grupo de elementos, y de 10 – 1000  $\mu\text{g/L}$  para el segundo grupo. Las muestras fueron diluidas apropiadamente para tener los elementos analizados dentro del rango de calibración.

La exactitud de los resultados fue validada mediante el análisis de los materiales de referencia certificados SPS-SW 1 y SPS-SW2; obteniendo desviaciones relativas del valor certificado para los diez elementos monitoreados de 1.15 % - 3.38 %, excepto 6.44 % para Sr en SPS-SW1. En el caso de Se, los porcentajes de desviación fueron 0.14 % en SPS-SW2 (valor certificado  $2.0 \pm 0.02$  ng/mL) y 0.12 % en SPS-SW2 (valor certificado  $10.0 \pm 0.05$  ng/mL).

#### 4.2.3.8 Determinación de selenometionina(SeMet) por HPLC-ESI-QqQ-MS

Alícuotas de muestra de 50 mg de biomasa liofilizada libre de  $\text{Se}^{\circ}$  fueron digeridos con ácido metanosulfónico de acuerdo con Wrobel y col.<sup>122</sup>, con ligeras modificaciones. En resumen, 5 mL de ácido metanosulfónico (MA) 4 mol/L y 50  $\mu\text{L}$  de mercaptoetanol se adicionaron a cada una de las muestras y todas fueron calentadas en reflujo por 18 h en el sistema de digestión Carousel 12 Plus Reaction Station (Radley Tech, Germany). El volumen de los digestos se aforó a 10 mL, y se tomaron alícuotas de 30  $\mu\text{L}$ , las cuales fueron diluidas 50 veces con agua desionizada y filtradas por filtro de jeringa (PVDF Acrodisc LC de diámetro 13 mm, y tamaño de poro 0.2  $\mu\text{m}$ ) antes de inyectar al sistema de separación LC.

La determinación de Se-metionina (Se-Met) se realizó utilizando el sistema HPLC-ESI-QqQ-MS, siguiendo procedimiento reportado previamente <sup>123</sup>. La columna de fase inversa se mantuvo a 40 °C. Las fases móviles fueron, A: formiato de amonio 10 mM y ácido fórmico 0.4 % en agua y B: formiato de amonio 10 mM y ácido fórmico 0.4 % en metanol. Se utilizó el siguiente gradiente de elución: 0 – 2.0 min, 0 % B; 2.0 – 4.0 min, 0 % - 90 % B; 4.0 – 6.0 min, 90 % B; 6.01 – 8.0 min, 0 % B. Se inyectó un volumen de 3 µL para cada muestra y se mantuvo un flujo de 0.34 mL/min.

Los parámetros de operación del espectrómetro de masas fueron los siguientes: fuente de ESI en modo positivo, voltaje del capilar 3.5 KV, nitrógeno como gas de nebulización (35 psi) y gas de secado (8 L/min); con temperatura de secado 300 °C. Se utilizó también nitrógeno como gas de colisión para fragmentación de los iones seleccionados. La adquisición de datos se realizó en el intervalo de  $m/z$  50 - 250. El tiempo de retención de la Se-metionina fue de 1.6 min, y se cuantificó por monitoreo de reacciones múltiples (MRM), utilizando transiciones de los iones  $198 > 56$  y  $199 > 57$ , para levadura crecida en medio de cultivo de  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ , respectivamente. Los iones fueron fragmentados con un voltaje de colisión de 25 V y monitoreados en ventana de adquisición de 0.35 a 3.0 min; por otro lado, las transiciones de los iones calificadores fueron  $198 > 181$  y  $199 > 181$ , respectivamente, (voltaje de colisión de 9 V). El voltaje de fragmentación fue fijado a 60 V y tiempo de integración de 200 ms. La calibración externa fue realizada en un rango de 60 – 300 µg Se /L, con regresión lineal  $r^2 > 0.996$  y límite de detección instrumental de 18 µg Se/L.

Además de determinar SeMet, era necesario descartar posible formación de óxido de SeMet (SeMetO) durante hidrólisis de proteínas (aunque la hidrólisis se llevó a cabo en presencia de 2-mercaptoetanol) .. Para este análisis, el estándar de SeMetO se obtuvo adicionando 1 mL de peróxido de hidrogeno 30 % a 10 mL de solución de estándar de SeMet 1 mgSe/L preparado en 0.1 mol/L HCl y la solución fue dejada a temperatura ambiente toda la noche. El producto de reacción fue introduciendo al mismo sistema HPLC-ESI-QqQ-MS, observando su elución en un tiempo de 0.8 min; para la cuantificación por MRM se utilizó la transición  $196 > 95$  bajo los mismos parámetros aplicados a SeMet. El límite de detección instrumental para SeMetO fue de 25 µg Se/L. En aplicación al análisis de muestras reales, no se observó la formación de SeMetO ni en SELM-1 ni en las muestras de levadura obtenidas y analizadas durante este trabajo.

#### 4.2.3.9 Evaluación del fraccionamiento isotópico de Se por HG - MC - ICP-MS

Se realizaron mediciones de las relaciones isotópicas de Se en biomasa de levadura libre de Se<sup>o</sup> y en sobrenadante que contenía la fracción de Se reducido por actividad metabólica de levadura y oxidado/solubilizado a selenosulfito; se utilizó el mismo protocolo de digestión con ácido nítrico que se empleó para análisis por ICP-MS. Para todas las muestras, la concentración final de Se en la solución se ajustó a 1000 µg/L y todas fueron preparadas en solución HCl 1mol/L. Para asegurar introducción de Se al plasma libre de posibles interferentes y para lograr mayor eficacia de transporte, se llevó a cabo la generación previa de seleniuro, utilizando un sistema de generación de hidruros modelo HGX-200 (CETAC Technologies, Omaha, NE, USA), con parámetros seleccionados en base a lo reportado en literatura<sup>124</sup>. Las condiciones de generación de seleniuro se presentan en la Tabla 9. En la misma Tabla 9 se enlistan condiciones de operación del espectrómetro de masas “Plasma II” multicolector de alta resolución equipado con 16 copas de Faraday (Nu Instruments, Wrexham, U.K.). El ajuste de las condiciones instrumentales (tuning) se realizó previo a cada sesión de análisis; la posición óptima de las copas y la calibración de los amplificadores Faraday fue realizada diariamente utilizando una señal de referencia interna de 40 V. El plasma fue operado con un poder de RF de 1300 W, un flujo de gas refrigerante de 13.6 L/min y una velocidad de flujo de gas auxiliar de 1.17 L/min; y conos de interfaz de níquel fueron utilizados como detectores. Cuatro colectores (L-4, H-2, H-8) se emplearon para las mediciones de isótopos de Se 76, 77, 78 y 82, respectivamente, con tiempos de integración para cada isótopo de 0.5 s.

Las relaciones isotópicas de selenio:  $^{82}\text{Se}/^{78}\text{Se}$  y  $^{82}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ , fueron medidas usando el método de adquisición estándar-muestra-estándar (SSB standard-sample-bracketing por las siglas en inglés), el cual consiste en que cada muestra se introduce al sistema entre dos porciones de la solución de estándar Se NIST 3149 con conocida relación de isótopos de Se. También se hizo corrección de blanco real utilizando la señal medida justo antes de la introducción del primer estándar, y se sustrajo tanto para los estándares de Se como para las muestras de levadura analizadas. Por último, posibles interferencias debidas a presencia de ciertos metales de transición fueron descartadas (descripción de experimentos en el apartado de resultados y discusiones) demostrando que las mediciones de las relaciones isotópicas de Se fueron confiables sin acudir a la separación previa de cationes por cromatografía de intercambio iónico.

**Tabla 9.** Condiciones de operación instrumental para generación de hidruros y MC-ICP-MS

| <b>Generación de hidruros</b>                    |  |
|--|--|
| Acidificación                                    | HCl 1 mol L <sup>-1</sup>  |
| Agente reductor                                  | NaBH <sub>4</sub> 1.2 % (m/v) + NaOH 0.05 % (m/v)                                      |
| Velocidad de flujo de reactivos y muestra        | 0.83 mL/min  |
| Posición de rotámetro de introducción de muestra | 13 mm  |
| Velocidad de flujo de gas de adición             | 0.7 mL/min   |
| <b>Parámetros de MC-ICP-MS</b>                   |  |
| Potencia de RF                                   | 1300 W   |
| Flujo de gas de enfriamiento (Ar)                | 13 L/min   |
| Flujo de gas auxiliar (Ar)                       | 1.15 L/min   |
| Flujo de gas nebulizador (Ar)                    | 0.69 L/min   |
| Interfaz de los conos                            | Nickel   |
| <b>Parámetros de medición</b>                    |  |
| Modo de resolución                               | ~300   |
| Configuración de las copas                       | L2: <sup>77</sup> Se; Ax: <sup>78</sup> Se; H8: <sup>82</sup> Se; H4: <sup>80</sup> Se |
| Tiempo de integración                            | 3.0 s  |
| Modo de medición                                 | Análisis de tiempo resuelto (TRA)  |
| Réplicas   | ≥60  |

El fraccionamiento isotópico del Se en las muestras analizadas fue calculado de acuerdo con la Ecuación 12, en la cual <sup>x</sup>Se corresponde a la señal de <sup>78</sup>Se y <sup>77</sup>Se, respectivamente:

$$\delta^{82/x}Se(\text{‰}) = \left( \frac{\left( \frac{{}^{82}Se}{{}^xSe} \right)_{muestra}}{\left( \frac{\left( \frac{{}^{82}Se}{{}^xSe} \right)_{NIST\ 3149(1)} + \left( \frac{{}^{82}Se}{{}^{78}Se} \right)_{NIST\ 3149(2)}}{2} \right)} - 1 \right) \times 1000 \quad Ec. 12$$

En donde el estándar Se NIST 3149 (1) es la medición pre-muestra y Se NIST 3149 (2) es la medición post-muestra.

#### 4.2.3.10 Análisis estadístico

Cuatro réplicas biológicas para cada condición de crecimiento fueron obtenidas para cada muestra (Lc1-Lc4, L1-L4, Hc1-Hc4, H1-H4), y los análisis por HG - MP-AES, ICP-MS, y HG - MC-ICP-MS fueron llevados a cabo en tres réplicas técnicas. Después de obtener valores promedio y sus respectivas desviaciones estándar, un análisis estadístico fue realizado comparando los resultados entre dos técnicas analíticas (HG - MP-AES contra ICP-MS). Por

otro lado, se realizó la comparación de los valores delta de fraccionamiento isotópico de Se entre muestras de levadura obtenidas en presencia de nitrógeno ligero y pesado (prueba t-test, dos colas). El software donde se realizó fue en Microsoft Excel 2020 (Microsoft, Múnich, Alemania) y un nivel  $p < 0.05$  de significancia estadística se estableció para la prueba t-test.

#### 4.2.4 Resultados y Discusión

En primera instancia, se evaluó la incorporación de Se a levadura para diferentes concentraciones de Se(IV) en medio y utilizando la levadura con nitrógeno ligero y pesado con el fin de complementar los datos presentados en capítulo 4.1. . El selenio elemental extracelular fue separado del Se incorporado intracelularmente usando sulfito de sodio, posteriormente la determinación de selenio total en ambas fracciones se llevó a cabo por HG-MP-AES y por ICP-MS. Para confirmar la biotransformación de Se a SeMet, la levadura fue digerida con ácido metanosulfónico, y el análisis se hizo por HPLC-ESI-QqQ-MS. Adicionalmente, fue necesario examinar si algún elemento traza u otro componente de la levadura digerida podría interferir las mediciones de relaciones isotópicas de Se. Finalmente, se llevó a cabo la determinación de las relaciones isotópicas de Se en las muestras obtenidas fueron determinadas por HG-MC - ICP-MS.

##### 4.2.4.1 Incorporación de Se en levadura crecida $^{14}\text{N}$ y $^{15}\text{N}$

Previo al tratamiento con sulfito de sodio, las células de levadura fueron lavadas tres veces con agua desionizada para eliminar residuos de Se(IV). Después del tratamiento, el selenio en la solución correspondió a fracción de selenio elemental -producto de reducción de Se(IV) mediante actividad metabólica de levadura, mientras que Se absorbido por las células pudo ser determinado en biomasa . Utilizando el método de Bradford se observó presencia de proteínas en la solución debido al rompimiento celular parcial por el tratamiento con sulfito. Puesto que estas proteínas podrían tener Se incorporado, se realizó su precipitación con acetona fría y la pastilla se combinó con la biomasa de levadura para la determinación de Se absorbido por los microorganismos. Para cuatro muestras seleccionadas (L1, L2, H1, H2), la determinación de selenio total en la solución y en biomasa libre de Se extracelular se realizó en dos laboratorios diferentes, utilizando dos diferentes procedimientos de digestión y dos técnicas analíticas diferentes (HG MP-AES y ICP-MS).

Los resultados obtenidos se presentan en Tabla 10; donde se observa que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos para las mismas muestras en dos laboratorios (*t-test*,  $p < 0.05$ ). Utilizando el procedimiento de HG - MP-AES, los porcentajes de recuperación

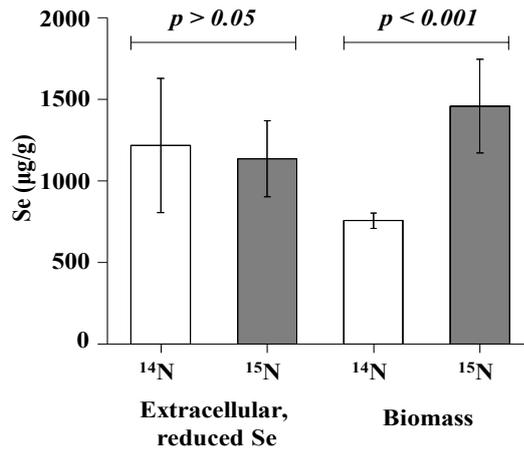
de Se total, calculado como la suma de Se en solución y biomasa con respecto al Se total cuantificado antes del tratamiento con sulfito de sodio, fueron en un rango de 99.3 % y 105 %.

**Tabla 10.** Selenio incorporado en biomasa de levadura y en fracción de Se elemental, determinados en dos laboratorios, utilizando dos diferentes técnicas.

| Muestra | Fracción     | Se, promedio $\pm$ DE, $\mu\text{g/g}^*$ | Suma de fracciones, $\mu\text{g/g}^{**}$ | tSe, promedio $\pm$ DE, $\mu\text{g/g}^{**}$ | R, %<br>*** | Procedimiento |
|---------|--------------|--|--|--|-------------|---------------|
| H1      | biomasa      | 1699 $\pm$ 11                            | 3042                                     | 3026   | 99.5        | HG-MP-AES     |
|         | sobrenadante | 1342 $\pm$ 6                             |  |  |             |               |
|         | biomasa      | 1685 $\pm$ 5                             | 3068                                     | -  | -           | ICP-MS        |
|         | sobrenadante | 1383 $\pm$ 6                             |  |  |             |               |
| H2      | biomasa      | 1746 $\pm$ 49                            | 2502                                     | 2485   | 99.3        | HG-MP-AES     |
|         | sobrenadante | 755.2 $\pm$ 15                           |  |  |             |               |
|         | biomasa      | 1793 $\pm$ 10                            | 2355                                     | -  | -           | ICP-MS        |
|         | sobrenadante | 561 $\pm$ 2                              |  |  |             |               |
| L1      | biomasa      | 568 $\pm$ 21                             | 2020                                     | 3026   | 100         | HG-MP-AES     |
|         | sobrenadante | 1452 $\pm$ 145                           |  |  |             |               |
|         | biomasa      | 520 $\pm$ 21                             | -  | -  | -           | ICP-MS        |
|         | sobrenadante | -  |  |  |             |               |
| L2      | biomasa      | 619 $\pm$ 36                             | 2367                                     | 2254   | 105         | HG-MP-AES     |
|         | sobrenadante | 1748 $\pm$ 160                           |  |  |             |               |
|         | biomasa      | 614 $\pm$ 24                             | -  | -  | -           | ICP-MS        |
|         | sobrenadante | -  |  |  |             |               |
| SELM-1  | biomasa      | 1816 $\pm$ 76                            | 2046                                     | 2006   | 102         | ICP-MS        |
|         | sobrenadante | 230 $\pm$ 34                             | -  | -  |             |               |

no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de la misma muestra obtenidos por las dos técnicas (*t*-test,  $p < 0.05$ ); \*\*.- Se total determinado en digestión ácida de levadura sin tratamiento con sulfito de sodio; \*\*\* porcentaje de recobro calculado como la suma de Se en las dos fracciones con respecto al tSe determinado.

En la Tabla 11 y en la Figura 23, se presentan los resultados obtenidos para levadura con nitrógeno ligero y pesado. A primera vista se observa que la incorporación de selenio fue mejor en los microorganismos que contenían nitrógeno pesado ( $1460 \pm 286 \mu\text{g/g}$ ) con respecto a nitrógeno ligero ( $746 \pm 47 \mu\text{g/g}$ ), confirmando diferencias estadísticamente significativas en *prueba-t*. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre concentraciones de Se en soluciones analizadas, correspondientes a selenio elemental.

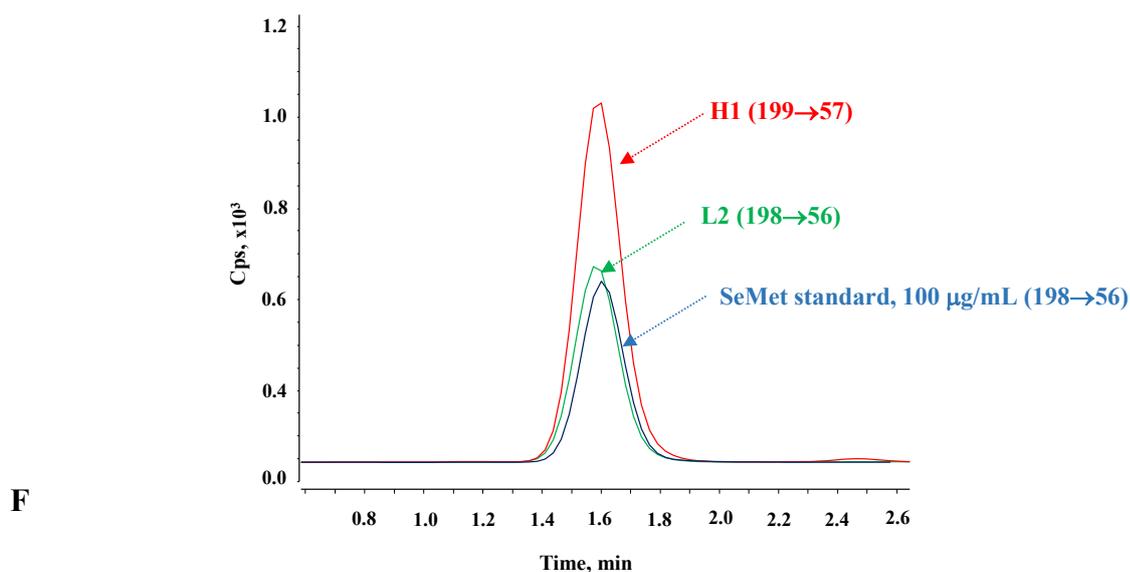


**Figura 23.** Efecto del marcaje <sup>15</sup>N sobre la incorporación de Se durante el crecimiento de levadura (biomasa) y sobre la reducción extracelular de Se(IV) a Se<sup>0</sup>. Se presentan las concentraciones promedio de Se con su desviación estándar; basadas en cuatro replicas biológicas y tres técnicas. Una *prueba-t* de dos colas fue utilizada para comparar los resultados obtenidos entre cultivos de <sup>14</sup>N y <sup>15</sup>N.

**Tabla 11.** Concentraciones de Se encontrados en biomasa y en sobrenadante (correspondientes a Se<sup>0</sup>) en cuatro replicas biológicas de cultivos con <sup>14</sup>N y <sup>15</sup>N, respectivamente. En la parte inferior de la tabla, se muestran resultados ANOVA, comparando cultivos obtenidos para dos isotopos estables de N. (Promedios y DE son reportados en base a tres replicas técnicas de cada muestra en microgramos de Se por un gramo de biomasa inicial - antes de eliminar Se<sup>0</sup>).

| Replica biológica | Se en biomasa, promedio ± DE, µg/g biomasa                       |                 | Se en sobrenadante, promedio ± DE, µg/g biomasa      |                 |
|-------------------|--|-----------------|--|-----------------|
|                   | <sup>14</sup> N  | <sup>15</sup> N | <sup>14</sup> N                                      | <sup>15</sup> N |
| 1                 | 568 ± 32   | 1699 ± 11       | 1452 ± 145   | 1342 ± 6        |
| 2                 | 619 ± 36   | 1746 ± 49       | 1748 ± 160   | 755 ± 15        |
| 3                 | 847 ± 53   | 1146 ± 203      | 815 ± 18   | 1135 ± 20       |
| 4                 | 991 ± 126  | 1247 ± 14       | 854 ± 25   | 1306 ± 10       |
| ANOVA             | $F_{exp} = 71.7$<br>$F_{crit} = 4.2$<br>$p = 3.3 \times 10^{-9}$ |                 | $F_{exp} = 0.57$<br>$F_{crit} = 4.2$<br>$p = 0.4581$ |                 |

La biotransformación del selenio inorgánico a SeMet, como la especie principal en levadura, fue confirmado por análisis de HPLC-ESI-QqQ-MS. En la Figura 24, se muestran típicos cromatogramas MRM que se adquirieron para las muestras de SELM-1, L2, y H1; mientras que los resultados cuantitativos obtenidos para determinación de SeMet se muestran en la Tabla 12. Es de notar que los porcentajes de Se total en forma de SeMet en muestras L2 y H1 fueron similares, con porcentajes de 59.7 % y 56.4 %, respectivamente. En el caso de SELM-1, se encontró experimentalmente un 60.3 % de Se total en forma de SeMet, lo cual coincide con el valor esperado de 63 % de acuerdo con los valores certificados de este material de referencia. Finalmente, es de suma importancia mencionar que la concentración de SeMet en levadura depende del procedimiento de crecimiento aplicado, en este trabajo, la levadura fue crecida en medio mínimo con sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Una vez que la incorporación de Se y la eficiencia de biotransformación a SeMet fue demostrado, el siguiente paso fue determinar el fraccionamiento isotópico de Se.



**igura 24.** Cromatogramas típicos MRM de SeMet, adquiridos con solución de estándar de SeMet, biomasa de levadura <sup>14</sup>N - L2 y biomasa de levadura <sup>15</sup>N - H1.

**Tabla 12.** Concentraciones de SeMet en muestra de levadura L2, H1 y en SELM-1 determinadas por HPLC-ESI-QqQMS/MS (promedios de tres réplicas con sus desviaciones estándar) y se presentan los porcentajes de Se total en forma de SeMet.

| Muestra | Se total, $\mu\text{g/g}^*$ | SeMet, $\mu\text{g/g}$ | Se en forma de SeMet, $\mu\text{g/g}$ | % de Se total en forma de SeMet |
|---------|-----------------------------|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| L2      | $619 \pm 36$                | $918 \pm 116$          | 370                                   | 59.7                            |
| H1      | $1699 \pm 11$               | $2378 \pm 51$          | 957                                   | 56.4                            |
| SELM-1  | $2006 \pm 76$               | $3002 \pm 88$          |                                       | 60.3                            |
|         | $2031 \pm 70^{**}$          | $3190 \pm 260^{**}$    | 1209                                  | 63 <sup>**</sup>                |

\* - resultados obtenidos por HG-MP-AES; \*\* - valores certificados

#### 4.2.4.2 Medición de las relaciones isotópicas de Se (validación de las mediciones)

Los isótopos  $^{82}\text{Se}$ ,  $^{78}\text{Se}$  y  $^{77}\text{Se}$  fueron seleccionados para análisis isotópico debido a que presentan suficiente abundancia isotópica de 8.82 %, 23.7 % y 7.60 %, respectivamente; además de no presentar interferencias originadas en el plasma. Las relaciones isotópicas  $^{82}\text{Se}/^{77}\text{Se}$  y  $^{82}\text{Se}/^{78}\text{Se}$  fueron adquiridas por HG – MC - ICP-MS. Las muestras fueron introducidas al plasma por medio de generación de hidruros, evitando potenciales interferencias por efecto matriz que podrían ocurrir utilizando típica introducción de muestra.

Por otro lado, existe el riesgo de que la presencia de iones metálicos divalentes afecte la eficiencia de generación de hidruros, además de la posibilidad de formar boruros; ambos casos causarían errores en el análisis. Para el caso específico de Se, interferencias por Ni, Co, Cu, y Zn han sido reportadas anteriormente<sup>125</sup>. Por tal motivo, diez elementos fueron determinados en muestras de biomasa de levadura (Lc1,Hc1, L1-L4, H1-H4) y los resultados obtenidos se presentan en Tabla 13. Para V, Cr, Co, Ni, Sr y Ba, se encontraron concentraciones inferiores a 3  $\mu\text{g/g}$  en biomasa liofilizada, descartando cualquier efecto. El manganeso y hierro fueron encontrados en mayor concentración (aproximadamente 2.2 – 9.3  $\mu\text{g/g}$  y 20.8 – 60.6  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente), sin embargo, no se han encontrado reportes sobre interferencias causadas por estos elementos<sup>124</sup>. Para dos elementos considerados como interferencias potenciales – el Cu y Zn, sus concentraciones en biomasa fueron entre 9.0 – 18.6  $\mu\text{g/g}$  y 7.8 y 14.0  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente. Para estos elementos fue necesario comprobar el impacto que pudieran causar durante la medición de las relaciones isotópicas de Se.

**Tabla 13.** Resultados obtenidos por ICP-MS para elementos traza y Se en muestras de biomasa libre de Se<sup>o</sup>, incluyendo controles no expuestos (Lc1, Hc1) y levadura expuesta a Se en cuatro replicas biológicas (H1-H4 crecidas con <sup>15</sup>N; L1-L4 conteniendo <sup>14</sup>N). (Las concentraciones se presentan en microgramos del elemento por gramo de biomasa liofilizada).

| Muestra | <sup>78</sup> Se | <sup>66</sup> Zn | <sup>63</sup> Cu | <sup>60</sup> Ni | <sup>59</sup> Co | <sup>57</sup> Fe | <sup>55</sup> Mn | <sup>52</sup> Cr | <sup>51</sup> V | <sup>137</sup> Ba | <sup>86</sup> Sr |
|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| Lc1     | 0.35             | 9.04             | 13.0             | 1.21             | 0.20             | 33.4             | 7.34             | 1.18             | 0.04            | 0.12              | 0.13             |
| Hc1     | 0.23             | 8.74             | 14.1             | 0.91             | 0.31             | 42.9             | 9.32             | 1.27             | 0.04            | 0.11              | 0.14             |
| L1      | 520              | 11.4             | 18.6             | 0.55             | 0.07             | 20.8             | 2.21             | 1.51             | 0.07            | 3.00              | 2.70             |
| L2      | 551              | 9.82             | 13.1             | 0.72             | 0.18             | 33.4             | 7.92             | 1.74             | 0.09            | 0.25              | 0.21             |
| L3      | 916              | 11.9             | 17.8             | 0.64             | 0.23             | 42.9             | 9.01             | 1.82             | 0.11            | 0.33              | 0.25             |
| L4      | 395              | 7.82             | 8.99             | 0.66             | 0.11             | 24.2             | 5.19             | 1.23             | 0.05            | 0.17              | 0.15             |
| H1      | 1684             | 10.8             | 16.4             | 0.39             | 0.17             | 53.8             | 7.92             | 1.70             | 0.08            | 0.21              | 0.15             |
| H2      | 1793             | 11.6             | 18.1             | 0.37             | 0.19             | 60.6             | 8.79             | 1.45             | 0.08            | 0.20              | 0.17             |
| H3      | 1381             | 14.0             | 10.3             | 0.39             | 0.11             | 36.2             | 7.20             | 1.43             | 0.07            | 0.18              | 0.15             |
| H4      | 1356             | 14.2             | 11.1             | 0.39             | 0.09             | 41.4             | 3.88             | 1.67             | 0.08            | 0.11              | 0.07             |

Para estudiar posible efecto de Cu y Zn en la medición de relaciones isotópicas de Se, se prepararon soluciones del estándar NIST 3149 a concentración 1000 µg/L Se, con adición de Cu 40 µg/L y Zn 20 µg/L; estas concentraciones fueron elegidas por ser las máximas observadas en las muestras de levadura. En la Tabla 14, se observa claramente que los valores de fraccionamiento de Se no fueron afectados por la presencia de Cu y/o Zn a estas concentraciones. Así mismo, efectos por matriz fueron estudiados utilizando la muestra control (Lc1) con adición del estándar NIST 3149 y comparando con una solución de estándar puro, sin que se encontrara diferencia alguna en el fraccionamiento isotópico de Se. Adicionalmente, se comprobó que no hay variaciones en el fraccionamiento isotópico para selenito de sodio (la sal utilizada en el crecimiento de levadura) cuando se analizó directamente o después de digestión ácida, demostrando que la digestión no introduce variaciones en la composición isotópica de selenio en las muestras. El procedimiento y los resultados fueron finalmente validados realizando el análisis del material de referencia SELM-1. Los valores delta obtenidos

en este análisis fueron congruentes con valores reportados anteriormente para este material de referencia, utilizando generación de hidruros <sup>119</sup> y bajo condiciones de plasma húmedo<sup>126</sup>; los valores reportados anteriormente son incluidos en Tabla 14. Los experimentos realizados dan evidencia sólida de que el análisis de relaciones isotópicas de Se por HG – MP – ICP-MS no fue afectado por interferencias químicas ni espectrales.

**Tabla 14.** Valores delta experimentales de fraccionamiento isotópico de Se, confirmando mediciones libres de interferencias en biomasa de levadura. Cada solución introducida al sistema de generación de hidruros MC-ICP-MS contenía Se a 1000 µg/L.

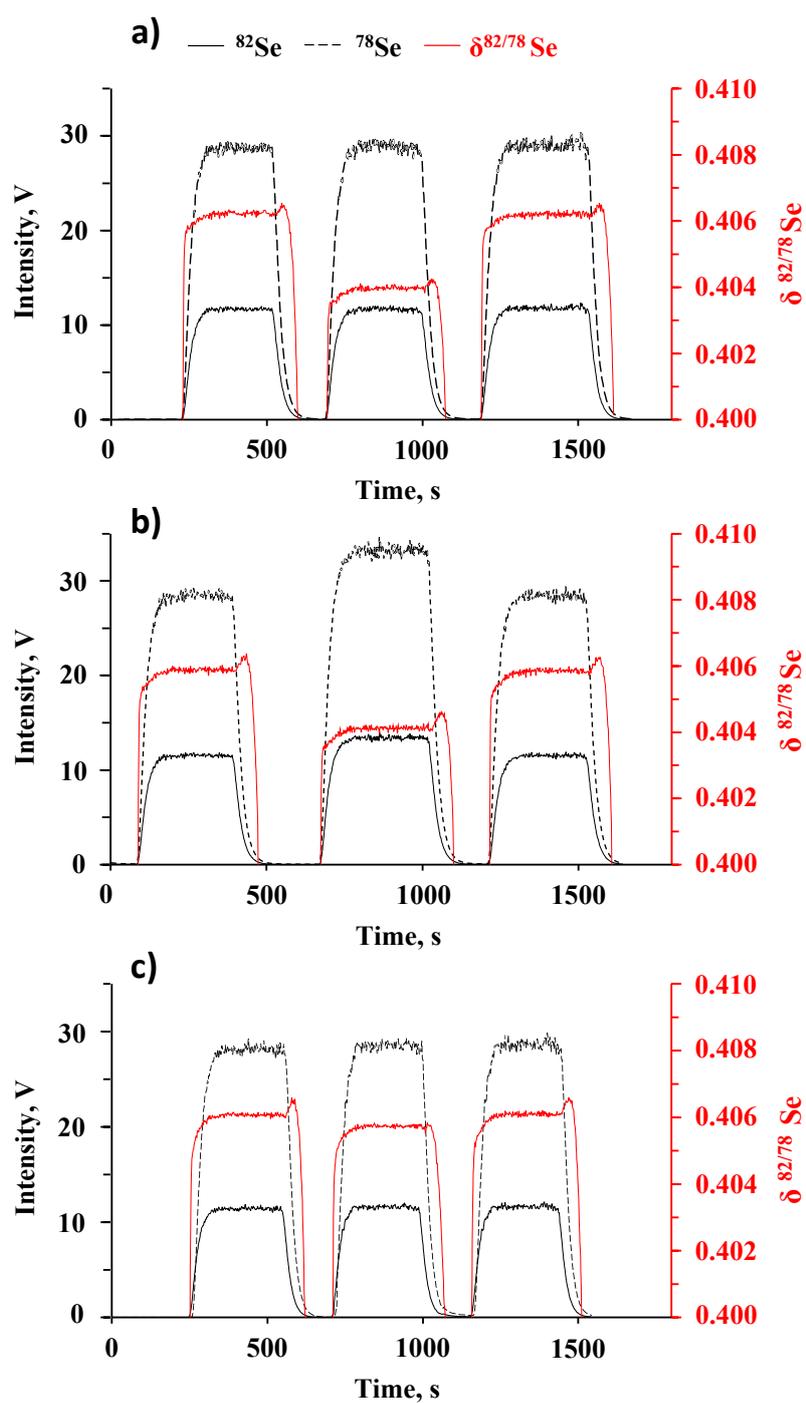
| Muestra  | $\delta^{82/78}\text{Se}$ |      | $\delta^{82/77}\text{Se}$ |      |
|--|---------------------------|------|---------------------------|------|
|  | Promedio, ‰               | 2 SD | Promedio, ‰               | 2 SD |
| NIST 3149  | -0.03                     | 0.03 | 0.00                      | 0.02 |
| Lc1 con adición de NIST 3149                                   | -0.10                     | 0.04 | 0.00                      | 0.04 |
| NIST 3149 con adición de Cu y Zn                               | -0.04                     | 0.01 | 0.00                      | 0.01 |
| Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> solución directa original     | -0.32                     | 0.10 | -0.48                     | 0.06 |
| Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> solución después de digestión | -0.32                     | 0.02 | -0.51                     | 0.03 |
| SELM-1*  | -0.68                     | 0.01 | -0.96                     | 0.05 |

\*Valores reportados:  $\delta^{82/78}\text{Se} = -0.66$  (2SD 0.29),  $\delta^{82/77}\text{Se} = -0.79$  (2SD 0.39)<sup>127</sup>;  $\delta^{82/78}\text{Se} = -0.68$  (2SD 0.02)<sup>120</sup>

#### 4.2.4.3 Fraccionamiento isotópico de selenio en levadura <sup>14</sup>N y <sup>15</sup>N

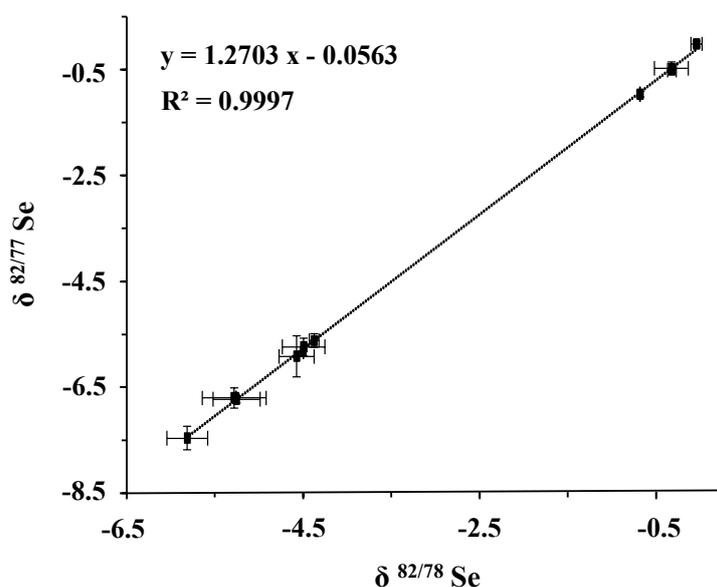
Las señales de los isótopos de Se y sus relaciones fueron adquiridas en modo de análisis en tiempo real (TRA time resolved analysis por sus siglas en inglés), tanto para muestras de levadura libre de Se<sup>o</sup> como para las soluciones recuperadas después de tratamiento con sulfito de sodio, además de los estándares de selenio. En Figura 25, se presentan los registros de adquisición de datos para los isótopos <sup>82</sup>Se y <sup>78</sup>Se en modo SSB (estándar-muestra-estándar), para muestras L2, H1, y SELM-1, respectivamente. En el eje Y primario (a la izquierda), se representa la intensidad de los isótopos <sup>82</sup>Se y <sup>78</sup>Se, mientras que, en el eje Y secundario (a la derecha) marca los valores delta ( $\delta^{82/78}\text{Se}$ ,  $\delta^{82/77}\text{Se}$ , ambos en partes por mil) calculados utilizando la Ecuación 12.

Como se muestra en la Tabla 14, los valores delta obtenidos para selenito de sodio, el cual fue adicionado a los medios de cultivo, fue ligeramente diferente comparado con el estándar de NIST 3149. Debido a que todos los medios de cultivo fueron crecidos a partir de la misma sal de selenio, no se hizo ninguna corrección al respecto, y el fraccionamiento isotópico de Se durante su incorporación fue evaluado con base a los valores delta respecto al estándar NIST 3149.



**Figura 25.** Típicos registros de abundancia de iones de isotopos de Se y sus respectivas relaciones, obtenidos en modo -TRA mediante HG - MC-ICP-MS, utilizando el método SSB y el modo de adquisición en tiempo real (TRA): (a) muestra L2, (b) muestra H1, (c) muestra SELM-1.

Como una adicional forma de confirmar la confiabilidad de los resultados obtenidos en la medición de relaciones isotópicas, utilizando los datos obtenidos para todas las muestras y estándares, se obtuvo la gráfica de fraccionamiento isotópico con tres isotopos de selenio,  $^{77}\text{Se}$ ,  $^{78}\text{Se}$  y  $^{82}\text{Se}$ , la cual es presentada en la Figura 26. Como se puede observar, los datos se ajustan a una función de regresión lineal, presentando una  $R^2 = 0.9979$  y pendiente de 1.268. El valor obtenido de pendiente coincide con el valor teórico determinado de 1.269, lo cual indica que el fraccionamiento isotópico medido fue consistente con la ley de fraccionamiento dependiente de masa (MDF)<sup>128-130</sup>.



**Figura 26.** Relaciones isotópicas de selenio obtenidas para las muestras y estándares analizados en este trabajo, todos los valores son expresados en unidades por mil, relativas a estándar de Se NIST SRM 3149, y fueron calculados utilizando la Ecuación 12.

Los resultados obtenidos de las soluciones digeridas que contienen Se (fracción extracelular de  $\text{Se}^0$ ), son presentadas en la Tabla 15; todos los valores delta fueron negativos y fueron asociados al proceso de reducción de  $\text{Se(IV)}$  a  $\text{Se}^0$  por actividad metabólica de levadura. Este efecto confirma estudios anteriores sobre la preferencia por isótopos ligeros durante la reducción de oxoaniones de Se, tanto en procesos abióticos como bióticos<sup>128, 130, 131</sup>. Específicamente, los isótopos pesados tienden a permanecer en estados de oxidación más altos mientras que los isótopos ligeros son reducidos a estados de oxidación inferiores, provocando un enriquecimiento de isótopos ligeros en formas/especies reducidas. Es interesante que cuando la levadura fue crecida en presencia de  $^{15}\text{N}$ , se obtuvieron valores delta menos negativos para ambos pares de isotopos cuando se compararon con  $^{14}\text{N}$ .

De acuerdo con los valores individuales de las soluciones obtenidas para  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$  en todas las muestras analizadas, se puede comparar los promedios de las muestras L1-L4, donde los resultados de fraccionamiento para  $\delta^{82/78}\text{Se}$  y  $\delta^{82/77}\text{Se}$  correspondieron a -5.20 ‰ (DE 0.21) y -6.65 ‰ (DE 0.31); mientras que para las soluciones H1-H4, los valores fueron -4.08 ‰ (DE 0.21) y -5.23 ‰ (DE 0.31). Estos resultados demuestran que la presencia de nitrógeno ligero o pesado en el microorganismo afecta el fraccionamiento isotópico durante la reducción extracelular de Se(IV) a  $\text{Se}^{\circ}$ , lo cual confirmó que la reducción es debida a la actividad metabólica de la levadura, y dicha actividad es afectada en presencia de  $^{15}\text{N}$ .

**Tabla 15.** Relaciones isotópicas de selenio obtenidas para biomasa de levadura libre de  $\text{Se}^{\circ}$  y para las soluciones después de tratamiento con sulfito de sodio (Se reducido extracelular), correspondiente a muestras crecidas en  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$  (promedio  $\pm$  DE, basadas en tres replicas). Cada solución fue medida por HG-MC-ICP-MS con concentración de Se ajustada a 1000  $\mu\text{g/L}$ , diferencias entre valores delta para los dos isotopos de nitrógeno ( $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ ) fueron probados por medio de sus datos individuales y una prueba  $t$  de dos colas fue realizada.

| Muestra   | $\delta^{82/78}\text{Se}$ |      |                         |      | $\delta^{82/77}\text{Se}$ |      |                         |      |
|---|---------------------------|------|-------------------------|------|---------------------------|------|-------------------------|------|
|   | $^{14}\text{N}$ (L1-L4)   |      | $^{15}\text{N}$ (H1-H4) |      | $^{14}\text{N}$ (L1-L4)   |      | $^{15}\text{N}$ (H1-H4) |      |
|   | Prom., ‰                  | 2 SD | Prom., ‰                | 2 SD | Prom., ‰                  | 2 SD | Prom., ‰                | 2 SD |
| <i>Solución después de tratamiento con sulfito (Se elemental)</i> |                           |      |                         |      |                           |      |                         |      |
| 1   | -5.28                     | 0.05 | -4.03                   | 0.11 | -6.58                     | 0.09 | -5.06                   | 0.15 |
| 2   | -5.45                     | 0.03 | -4.02                   | 0.02 | -6.93                     | 0.05 | -5.34                   | 0.03 |
| 3   | -5.01                     | 0.11 | -4.01                   | 0.01 | -6.29                     | 0.08 | -5.13                   | 0.02 |
| 4   | -5.07                     | 0.21 | -4.28                   | 0.14 | -6.81                     | 0.34 | -5.38                   | 0.03 |
| <i>t</i> -test  | $p = 9.9 \times 10^{-13}$ |      |                         |      | $p = 2.9 \times 10^{-12}$ |      |                         |      |
| <i>Biomasa de levadura (Se incorporado)</i>                       |                           |      |                         |      |                           |      |                         |      |
| 1   | -5.81                     | 0.19 | -4.42                   | 0.14 | -7.46                     | 0.18 | -5.73                   | 0.18 |
| 2   | -5.28                     | 0.29 | -4.52                   | 0.04 | -6.72                     | 0.06 | -5.80                   | 0.07 |
| 3   | -5.26                     | 0.01 | -4.63                   | 0.11 | -6.70                     | 0.02 | -5.97                   | 0.32 |
| 4   | -5.08                     | 0.30 | -4.37                   | 0.04 | -6.55                     | 0.06 | -5.61                   | 0.11 |
| <i>t</i> -test  | $p = 2.0 \times 10^{-6}$  |      |                         |      | $p = 7.9 \times 10^{-6}$  |      |                         |      |

En Tabla 15, se pueden observar los valores obtenidos para biomasa libre de  $\text{Se}^{\circ}$  tanto para  $^{14}\text{N}$  como  $^{15}\text{N}$ ; es claro que los valores delta son incluso más negativos comparando con sus respectivas soluciones.

La captación y metabolización de selenio inorgánico por levadura comienza cuando el oxo-anión de Se(IV) entra a las células por la vía de sulfatos, involucrando reducción enzimática a seleniuro<sup>132</sup>, por lo que el proceso de reducción enzimática intracelular hace que exista un fraccionamiento isotópico por preferencia hacia isótopos ligeros de Se. Los valores delta en biomasa de todas las muestras analizadas en este trabajo fueron menos negativos que los reportados anteriormente para SELM-1; estos efectos se atribuyen a las diferentes condiciones de crecimiento y enriquecimiento entre las muestras obtenidas durante desarrollo de este proyecto y aquellas utilizadas en la producción del material de referencia. Diferente distribución isotópica de Se en la sal utilizada en nuestro estudio y en la producción de SELM-1 podría ser otro factor responsable por diferencias entre nuestros resultados y los reportados anteriormente. Cabe mencionar que existe un reporte previo donde también se observó una fluctuación de los valores delta encontrados en levadura enriquecida con Se para diferentes marcas comerciales<sup>119</sup>. Más importante es mencionar que se encontraron diferencias significativas entre valores delta de muestras de biomasa correspondientes a levadura ligera comparándola con levadura pesada (prueba-*t*). Específicamente, valores promedio de todas las muestras de  $\delta^{82/78}\text{Se}$  y  $\delta^{82/77}\text{Se}$  fueron -4.48 ‰ (DE 0.28) y -5.76 ‰ (DE 0.31) para nitrógeno pesado, respectivamente; en el caso de nitrógeno ligero los resultados fueron: -5.35 ‰ (DE 0.10) y -6.85 ‰ (DE 0.35). La diferencia de una unidad de partes por miles indica que la presencia de <sup>15</sup>N en levadura causó un decremento de preferencia por isótopos ligeros durante la incorporación de Se en levadura.

La evidencia experimental obtenida en este trabajo demostró que el fraccionamiento isotópico de Se ocurrió tanto al exterior de las células como durante la captación y metabolización de Se por *S. cerevisiae*. En el caso de la reducción extracelular de Se(IV) a Se<sup>0</sup>, valores delta negativos fueron obtenidos para todas las muestras (<sup>14</sup>N y <sup>15</sup>N), indicando preferencia hacia los isótopos ligeros durante este proceso. Por tanto, el Se que entra a las células podría de inicio tener una composición isotópica diferente a la composición de la sal de selenio inicialmente adicionada al medio, es decir, con mayor abundancia de isótopos pesados. Es incluso más interesante que los deltas de Se incorporado fueron más negativos comparados con el Se reducido extracelular, lo cual muestra que isótopos ligeros son preferidos durante la toma y asimilación de Se dentro de las células. Por otro lado, en la levadura crecida con <sup>15</sup>N, los valores delta obtenidos para Se reducido extracelularmente e incorporado en biomasa fueron significativamente menos negativos comparados con sus respectivos análogos de <sup>14</sup>N. Se propone que la incorporación de <sup>15</sup>N en las enzimas participantes en la reducción e

incorporación, y durante la metabolización de Se, podría afectar su conformación estructural cuaternaria y/o terciaria facilitando la toma del elemento y acceso a los isotopos pesados. Adicionalmente, alteración en los perfiles de expresión de proteínas en presencia de  $^{15}\text{N}$  podría ocurrir tal como se reportó para *E. coli*<sup>133</sup>.

Los resultados también evidencian que el fraccionamiento isotópico de Se en varios procesos es afectado cuando se remplazan los isotopos ligeros de nitrógeno por isotopos pesados, tal como se observa en la diferencia de los valores delta para Se reducido extracelularmente y para el incorporado intracelularmente. En las muestras pesadas H1-H4 se obtuvieron diferencias en los valores de fraccionamiento entre Se intracelular y extracelular de (0.40 para  $\delta^{82/78}\text{Se}$ , 0.53 para  $\delta^{82/77}\text{Se}$ ,  $p < 0.001$ ) comparados contra las muestras L1-L4 donde se obtuvieron diferencias de (0.15 para  $\delta^{82/78}\text{Se}$ , 0.20 para  $\delta^{82/77}\text{Se}$ ,  $p > 0.05$ ), respectivamente.

Respecto a la suplementación de Se, los resultados de este trabajo y los reportados anteriormente<sup>119, 126</sup> demostraron que la composición isotópica de Se en levadura es más ligera comparada con su distribución natural. A pesar de que los valores de los deltas de Se en levadura no son altos (aproximadamente menores a 7 ‰), la composición isotópica ligera podría ser uno de los factores que contribuyen a la eficiencia de levadura selenizada en prevención de cáncer comparada con otras fuentes de suplementación con este elemento.

#### 4.2.5 Conclusiones

El objetivo de este capítulo fue estudiar el fraccionamiento isotópico de Se durante biofortificación de Se en levadura y examinar si el marcaje metabólico con sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno, afecta la incorporación de Se y su fraccionamiento isotópico en estos microorganismos. Análisis de fraccionamiento isotópico fue realizado en Se reducido extracelularmente e incorporado de manera intracelular. Los principales resultados encontrados fueron: (i) Valores delta negativos se obtuvieron para dos fracciones de Se, pero existió mayor preferencia por isótopos ligeros en el interior de las células. (ii) Cuando  $^{14}\text{N}$  fue remplazado por  $^{15}\text{N}$ , valores delta de Se menos negativos fueron encontrados tanto en medio extracelular como en incorporado a células. (iii) En presencia de nitrógeno pesado, la incorporación de Se fue incrementada en un 92 % respecto a levadura crecida bajo condiciones de nitrógeno de natural composición isotópica,  $^{14}\text{N}$ ; mientras que no existió diferencia alguna en el Se(IV) convertido a  $\text{Se}^{\circ}$  de manera extracelular.

Los resultados obtenidos en este capítulo de tesis indican en resumen que, la reducción de Se(IV) a Se<sup>0</sup>, así como la incorporación de Se(IV) son llevadas a cabo por la actividad metabólica de la levadura; y en ambos procesos se tiene preferencia por isótopos ligeros de Se. Considerando que existe evidencia reportada donde isotopos pesados de ciertos elementos son encontrados en células tumorosas, surge la hipótesis de que la mayor presencia de isótopos ligeros en la composición de Se en levadura podría contribuir a su eficacia en su actividad quimiopreventiva de cáncer.

El efecto del marcaje metabólico, por la incorporación de <sup>15</sup>N en las enzimas de la levadura que participan en los procesos de reducción, metabolización e incorporación de Se(IV), podría afectar la conformación estructural cuaternaria y/o terciaria de las proteínas facilitando la incorporación de isótopos más pesados de Se. Los efectos observados podrían también ser debidos a la alteración en los perfiles de proteínas causados por el efecto de nitrógeno pesado. Los resultados de este trabajo pueden ayudar cuando se diseñan protocolos de proteómica comparativa de levadura bajo exposición a Se(IV) contra un control de levadura no expuesto. Específicamente, una estrategia de marcaje metabólico de modo inverso es altamente recomendado.

### 4.3. Estudio de proteómica cuantitativa de levadura selenizada con marcaje metabólico <sup>15</sup>N

#### 4.3.1 Introducción

En los capítulos anteriores se describió el crecimiento de levadura de pan (*S. cerevisiae*) en medio YNB sin aminoácidos, donde se obtuvo comparable cantidad de células y cantidad de biomasa en presencia de dos isotopos estables de nitrógeno (<sup>14</sup>N y <sup>15</sup>N). Así mismo, se probaron diferentes concentraciones de exposición a Se(IV) en los medios de cultivo, observándose una clara disminución en la producción de biomasa con aumento de la concentración de Se(IV). En base a los resultados obtenidos en los capítulos 4.1, se seleccionó Se(IV) 10 mgSe/L como la concentración de exposición a utilizar para el estudio proteómico. Es muy importante mencionar que, para realizar proteómica comparativa, se estudió también que la sustitución de <sup>14</sup>N por <sup>15</sup>N durante el crecimiento del microorganismo no tuviera un impacto sobre la metabolización de Se(IV) en el perfil de proteínas. Por lo que se evaluó la incorporación y el fraccionamiento isotópico de Se durante captación/biotransformación de Se(IV) por HG-MC-ICP-MS, respectivamente. Específicamente, la conversión de Se(IV) en SeMet fue confirmada después de la digestión de muestra con ácido metanosulfónico y el análisis por cromatografía de líquidos con detector másico de triple cuadrupolo en el modo MRM (HPLC-ESI-QqQ-MS/MS)<sup>134</sup>. Para completar el estudio, es necesario tener evidencia de la formación de los

seleno péptidos, comparando abundancias de péptidos ligeros  $^{14}\text{N}$  respecto a sus análogos marcados isotópicamente con  $^{15}\text{N}$ .

Aunque el conocimiento del impacto de Se en *S. Cerevisiae* a nivel proteoma podría contribuir en un mejor entendimiento del papel nutricional benéfico de levadura selenizada, el estado de arte actual en este tema es limitado<sup>135, 136</sup>. Es por ello por lo que se propuso llevar a cabo un estudio proteómico y, para asegurar mayor confiabilidad de los resultados obtenidos utilizando sistema capLC-ESI-MS y MS/MS al comparar cultivos expuestos a Se(IV) respecto controles no-expuestos, se realizó el marcaje metabólico con  $^{15}\text{N}$ .

En concreto, se llevó a cabo un estudio de proteómica cuantitativa con marcaje metabólico  $^{15}\text{N}$  para estudiar el efecto del selenio a nivel proteoma en levadura de pan enriquecida con selenio (10 mg/L en los medios de cultivo). Las proteínas fueron extraídas y combinadas tomando iguales cantidades de proteínas provenientes de cultivos con  $^{14}\text{N}$  y con  $^{15}\text{N}$  y la mezcla obtenida se sometió a una separación por electroforesis en gel 1D-SDS-PAGE. Una vez teniendo el gel de proteínas, se recortaron las bandas individuales, mismas que fueron posteriormente combinadas para su tratamiento y análisis de péptidos por capHPLC-ESI(+)-QToF-MS. En el estudio se abordaron inicialmente los siguientes aspectos: (i) evaluar el porcentaje de incorporación de nitrógeno pesado en las proteínas marcadas metabólicamente con  $^{15}\text{N}$ ; (ii) identificación de seleno proteínas en presencia de Se(IV), aprovechando el marcaje metabólico con nitrógeno pesado (iii) hacer un estudio semicuantitativo comparando perfil y abundancia de proteínas en presencia de Se(IV) contra un control no-expuesto, basándose en principio de dos canales ( $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ ). La hipótesis lógica era que la exposición a Se(IV) causaría alteraciones en el perfil y abundancia de proteínas en *S. cerevisiae* que podrían ser de importancia desde el punto de vista nutricional o biotecnológico. 6

#### 4.3.2 Objetivos particulares

- Obtener cultivos de levadura crecida en presencia de Se(IV) 10 mg/L y de un control no-expuesto, haciendo marcaje metabólico inverso con nitrógeno  $^{15}\text{N}$ .
- Crear librería de datos local incluyendo péptidos ligeros y/o pesados con base a sus espectros de MS, MS/MS, y de su tiempo de retención.
- Evaluar el porcentaje de incorporación de  $^{15}\text{N}$  en las proteínas en cultivos donde se utilizó el isotopo pesado de nitrógeno como única fuente de nitrógeno.

- Realizar el análisis por capHPLC-ESI-QToF-MS, utilizando multiplexado de dos canales para el digesto proteico de un pool de bandas individuales recortadas de gel 1D-SDS-PAGE.

- Hacer un estudio comparativo de perfiles de proteínas en levadura expuesta a Se(IV) contra levadura control no-expuesta, utilizando datos LC-MS y MS/MS y diferentes herramientas de análisis de datos

### 4.3.3 Condiciones experimentales

#### 4.3.3.1 Reactivos y muestras

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco, Kansas City, MO, USA), metanol grado HPLC, etanol, acetonitrilo, y acetona de Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA) fueron utilizados

Selenito de sodio, selenometionina (SeMet), sulfato de amonio con composición isotópica natural ( $(^{14}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), sulfato de amonio marcado con  $^{15}\text{N}$  ( $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), > 98 % de átomos  $^{15}\text{N}$ , ácido fórmico, formiato de amonio, bicarbonato de amonio, clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano, ácido clorhídrico, ácido trifluoroacético (TFA), dodecilsulfato de sodio (SDS), acrilamida, N,N'-metilenebis(acrilamida), tetrametiletilendiamina (TEMED), persulfato de amonio (APS), L-glicina, mercaptoetanol, ditioneitol (DTT), yodoacetamida (IAM), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), albumina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina, tripsina de grado proteómica y dextrosa fueron todos adquiridos de Sigma.

El medio mínimo YNB (base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio) fue obtenida de Sigma Aldrich y medio PDA (Agar papa dextrosa) de BD Bioxon.

Estándares de proteína Precise Plus (15-250 KDa) fue un producto de Bio-Rad.

#### 4.3.3.2 Instrumentación analítica

- ✓ Espectrómetro de masas maXis impact ESI-QToF-MS equipado en Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics) fue usado en acoplamiento con un cromatógrafo de líquidos modelo Ultimate 3000 RLSCnano operado mediante software Hystar 3 (Thermo Scientific Dionex). Se empleó una trampa capilar Dionex ( $\mu$ -Precolumna, 5 x 0.3 mm, C18 PepMap 100, 5  $\mu\text{m}$ ) y una columna capilar de fase inversa HALO C18 (150 x 0.3 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ) Este sistema se abrevia a continuación capHPLC-ESI-QToF-MS
- ✓ El cromatógrafo de gases con detector de ionización en flama fue modelo Clarus 500 de Perkin-Elmer y la columna capilar fue ZB-WAX (30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ). En el texto, este sistema se abrevia como GC-FID.

#### 4.3.3.3 Crecimiento de levadura y enriquecimiento con selenio

La obtención y clasificación de las muestras se describe en capítulo 4.1.3.1

#### 4.3.3.4 Extracción de proteínas

50 mg de biomasa liofilizada de cada muestra (Lc1, L1, Hc1, H1) fue macerada con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana con tres ciclos de rompimiento. Las proteínas se extrajeron en 1 mL de buffer TRIS-HCl 50 mM (pH 7.5), agregando 10  $\mu$ L de PMSF 0.1 M, como inhibidor de proteasas. Después de centrifugar a 12000 g por 5 min y a 4 °C, el sobrenadante se precipitó con tres volúmenes de acetona fría, y la mezcla se mantuvo a -20 °C toda la noche. Las proteínas precipitadas fueron recuperadas por centrifugación a 12000 x g por 5 min, y su concentración final fue determinada por UV-Vis utilizando el método de Bradford. La calibración fue realizada con estándares de albumina de suero bovino y ovoalbúmina en un rango de 0 a 1.0 mg/mL; y las funciones de regresión lineal fueron obtenidas diariamente ( $r^2 > 0.999$ ) realizando lecturas de absorbancia a 450 nm y 595 nm. Finalmente, las proteínas purificadas fueron resuspendidas en un buffer 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , completando el volumen final a 200  $\mu$ L. La concentración final de proteína fue de 2.0 mg/mL.

#### 4.3.3.5 Electroforesis en gel 1D-SDS-PAGE

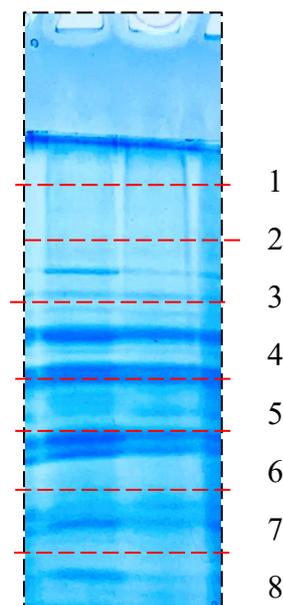
Una electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida (**1D-SDS-PAGE**) fue realizada por el método de Laemmli en 10 % gel de poliacrilamida (Mini-PROTEAN® Tetra System, Bio-Rad). Un gel concentrador 4 % y un gel separador de 10 % de acrilamida se prepararon a partir de un stock de 30 % de acrilamida - 0.8 % de *N,N'*-bis-metilen bis acrilamida. Las concentraciones finales en el gel de separación fueron 0.39 M Tris-HCl (pH 8.8) y 0.1 % SDS; y fue polimerizado químicamente con 0.1 % APS y 0.1 % TEMED. El gel concentrador consistió en 4 % acrilamida con longitud vertical de 1 cm, el cual contenía 0.13 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.1 % SDS y polimerizado de la misma manera que el gel separador (0.1 % APS y 0.1 % TEMED). Se utilizaron cinco carriles para separar las proteínas correspondientes a muestras expuestas a Se(IV) y control no-expuesto; tanto marcadas metabólicamente con  $^{15}\text{N}$  como muestras con distribución isotópica natural  $^{14}\text{N}$ . En el carril # 1 y # 2, las muestras Lc1 y L1 fueron cargadas respectivamente; estas muestras fueron dirigidas principalmente para la generación de las librerías por DDA. Por otro lado, para el estudio con marcaje metabólico con  $^{15}\text{N}$ , una mezcla equivalente de la muestra Lc1 y Hc1 fue cargada en el carril #3, mientras que en el carril #4 una mezcla equivalente de muestra L1 y H1 fue cargada. (Un primer carril, denominado como 0, fue destinado para el marcador).

En cuanto a la cantidad de proteína cargada en cada carril, un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de proteína (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) fue mezclado con 5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 5X y 1  $\mu\text{L}$  de 10 % mercaptoetanol para carril #1 y #2, en el caso de los carriles #3 y #4, 10  $\mu\text{L}$  de proteína (2  $\text{mg}/\text{mL}$ ) para cada muestra (2x). Se calentó a 95  $^{\circ}\text{C}$  por 10 min y se centrifugó a 12000 g por 10 min. Finalmente, el volumen se cargó en cada carril y se separó en un buffer de corrida compuesto por 25 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.192 M de L-glicina y 0.1 % de SDS. La electroforesis se corrió por 90 min a 220 V. Los geles obtenidos fueron lavados con agua desionizada, teñidos con una solución de azul de Coomassie G-250 y posteriormente desteñidos toda la noche con agua desionizada. Un carril fue cargado con el marcador Precise Plus Protein Standards (15-250 KDa), obtenidos de Bio-Rad.

#### 4.3.3.6 Digestión de proteínas

Después de separar las proteínas por 1D-SDS-PAGE, los carriles fueron cortados y colocados en un vidrio de reloj - cubiertas con suficiente agua desionizada para prevenir su deshidratación. Los cortes se realizaron con un cúter lavado previamente en abundante etanol. De cada carril se cortan ocho fracciones de aproximadamente 1 cm x 1 cm. Cada fracción de gel obtenida fue cortada en cubos de aproximadamente 1  $\text{mm}^3$  y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL.

Los geles cortados correspondientes a las bandas de los carriles #3 (Lc1 y Hc1) y #4 (L1 y H1), fueron divididas en ocho fracciones, denominadas como C1-C8 y F1-F8, respectivamente, como se muestra en la Figura 27.



**Figura 27.** Imagen de carriles 3 y 4 del 1D-SDS-PAGE correspondientes a las mezclas Lc1 + Hc1, marcando ocho fracciones recortadas para su análisis por capHPLC-ESI-QToF-MS (aproximadamente 1 cm para cada una de las fracciones).

Todas las fracciones obtenidas fueron desteñidas con 200  $\mu\text{L}$  de 50 % ACN en 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e incubados por 10 min a temperatura ambiente con vortex ocasional; la solución se removió y desechó con ayuda de una micropipeta (tres lavados fueron necesarios). Posteriormente, a los geles se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo (100%) y se incubó por 5 min realizando agitación con vórtex ocasionalmente. La solución de lavado se desechó hasta que las piezas del gel lucían blancas y opacas. Para reducir las proteínas, 100  $\mu\text{L}$  de 10 mM DTT en 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  se adicionó a los geles incubando por 1 h a 55 °C. La solución reductora fue removida y desechada. La alquilación de proteínas se realizó con 100  $\mu\text{L}$  de 20 mM IAM en 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  y la mezcla se incubó en la oscuridad por 45 min a temperatura ambiente, la solución fue desechada nuevamente. Las piezas de gel fueron finalmente lavadas en tres etapas: (i) 200  $\mu\text{L}$  de 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , (ii) 200  $\mu\text{L}$  25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  en 50 % ACN y (iii) 200  $\mu\text{L}$  de ACN por 10 min hasta que los geles fueron deshidratados; la solución de lavado entre cada etapa se fue desechando. Finalmente, la digestión de las proteínas fue realizada con la adición de 20  $\mu\text{L}$  de una solución 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tripsina en 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (tripsina grado proteómico de Sigma Aldrich) e incubada a 37 °C toda la noche – cuando fue necesario, se adicionó algunos microlitros de solución 10 % ACN en 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  suficiente para cubrir los geles. Antes de la separación cromatográfica, se adicionó ácido fórmico para detener la digestión enzimática (4 % AF) y las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente en 16000 g durante 5 minutos; la concentración final de proteína se ajustó para tener 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en 4 % AF y 2 % ACN.

#### 4.3.3.7 Análisis de muestras por capHPLC-ESI-QToF-MS

El auto muestreador se mantuvo a 4 °C y 10  $\mu\text{L}$  de proteína digerida (aprox. 2  $\mu\text{g}$  de proteína) se inyectaron a la trampa capilar C18 por medio de la bomba de carga con flujo de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  y 1.0 % de fase B (0.1 % ácido fórmico en ACN). Después de 2 minutos, el flujo fue cambiado a la columna capilar (mantenida a 40 °C) realizando la separación cromatográfica con flujo de 4  $\mu\text{L}/\text{min}$  utilizando dos fases móviles: Fase A - 0.1 % ácido fórmico en agua; Fase B - 0.1 % ácido fórmico en ACN. La separación se llevó a cabo bajo los gradientes lineales: 1.0 % - 38 % B durante 100 min; 38 % - 98 % B por 10 min; 98 % B mantenida por 5 min; 98 % - 1.0 % B por 2 min; 1.0 % B durante 3 min; y finalmente la columna fue reequilibrada con 1 % B por 5 min. La corrida cromatográfica total fue completada en 120 min. La salida de la columna capilar fue conectada a una fuente ESI a través de un capilar de 50 cm (id 50  $\mu\text{m}$ ), se utilizó un estándar de masa como fijador de masa (lock-mass) de  $m/z$  1221.9907 en la fuente de iones. ESI fue operado de manera positivo con voltaje de 4500 V; voltaje offset de 500 V; nitrógeno

como gas de secado con flujo 4 L/min; temperatura de secado de 180 °C y presión de gas de nebulización de 0.4 bar. Los cromatogramas se obtuvieron con espectros de MS a una velocidad de adquisición de 2 Hz y en un rango de  $m/z$  200 a 1800. En modo auto MS/MS, la velocidad de adquisición fue definida como 2 Hz y 10 Hz, para señales de baja intensidad (< 15,000 cps) y alta intensidad (> 100,000 cps), respectivamente. Calibración externa del instrumento fue realizada con el Tuning Mix ESI-TOF-pos con lista de masas de referencia  $m/z$ : 118.0863, 322.0481, 622.0290, 922.0098, 1321.9841, 1521.9715, calibrando en modo cuadrático se obtuvo score 100.0 % y StdDev de 0.02 ppm. Se analizaron dos replicas biológicas y dos técnicas para cada muestra.

#### 4.3.3.8 Análisis de datos adquiridos por capHPLC-ESI-QToF-MS

Los datos crudos (archivos Bruker en formato .d) se recalibraron utilizando el software Data Analysis 4.1, y se obtuvieron las señales correspondientes a los péptidos en base a sus espectros de MS y auto MS/MS, a ambos espectros se les hizo una desconvolución aceptando cargas desde 1+ a 5+. La lista de datos MS y MS/MS generadas por Data Analysis fue exportada como un archivo .mgf (mascot generic file) e importadas en el software ProteinScape 3.1.3 (Bruker Daltonics), para su futura búsqueda en el algoritmo de MASCOT (versión 2.4.0). Una búsqueda inicial para proteínas que contenían  $^{14}\text{N}$  fue realizada utilizando el archivo FASTA de *Saccharomyces cerevisiae* UP000002311 y contaminantes, recuperados de la base de datos de UniProtKB. Seguido de una re-búsqueda para encontrar proteínas con marcaje metabólico  $^{15}\text{N}$  e incluirlas en los resultados de búsqueda. La tolerancia de masa del precursor inicial fue asignada como 10 ppm y una tolerancia MS/MS de 0.1 Da. Para la digestión enzimática, se seleccionó tripsina con tres cortes no reconocidos permitidos; mientras que carbamido-metilación de cisteínas se seleccionó como modificación fija ( $\Delta m = 57.0214$  Da), y las modificaciones variables incluyeron oxidación de metionina ( $\Delta m = 15.9949$  Da), acetilación en N-terminal ( $\Delta m = 42.0106$  Da), sustitución de selenio-azufre en metionina y cisteína ( $\Delta m = 47.9444$  Da). La carga mínima y máxima de los péptidos fue seleccionada como +2 y +5, respectivamente; siete aminoácidos fue la mínima longitud de péptidos para la búsqueda. Para cuantificación, marcaje metabólico con  $^{15}\text{N}$  fue seleccionado. La casilla decoy fue activada, ajustando una máxima razón de descubrimiento falso (FDR) para péptidos y proteínas del 1 %, los hits estadísticamente significantes encontrados en MASCOT fueron aceptados solo si,  $p < 0.05$ .

La lista de péptidos fue exportada como formato de datos de MASCOT (.dat) hacia el software Skyline (<https://skyline.ms/project/home/software/Skyline/begin.view>), generando una librería

espectral DDA, donde los datos MS y MS/MS fueron asociados a sus tiempos de retención. Péptidos con átomos de  $^{14}\text{N}$  o  $^{15}\text{N}$ , fueron asignados con base a su tiempo de retención, a la simetría del pico cromatográfico, y con un  $\text{idotp} > 0.95$ . Este último parámetro (isotope dot product) determina la consistencia entre la distribución observada y experimental de las áreas de los iones isotópicos precursores (tanto para péptidos con y sin marcaje metabólico).

Análisis estadístico de componentes principales se realizó tomando la abundancia de todas las proteínas encontradas en cada condición de exposición asignándolos como “casos”, y atribuyendo las muestras expuestas a Se y control no-expuesto (dos réplicas de cada una) como “variables”. El análisis estadístico de PCA se realizó también de forma inversa, cambiando inversamente los atributos entre las variables y los casos. Todas las abundancias fueron normalizadas con base a la relación entre proteína  $^{14}\text{N}$  y su correspondiente con nitrógeno  $^{15}\text{N}$ ; y el modelo PCA fue obtenido usando el software “The Unscrambler X”, encontrando diferencias entre muestras control y expuestas a Se(IV).

#### 4.3.3.9 Determinación de la producción de etanol por GC-FID

Un cultivo de levadura (*S. Cerevisiae*) fue sembrado en medio sólido PDA e incubado por 48 h a 28 °C; se tomaron colonias con un asa estéril y fueron inoculadas en dos matraces Erlenmeyer, cada uno con 50.0 mL de medio mínimo. En ambos matraces, el medio consiste en: YNB 1.7 g/L, dextrosa 40 g/L y sulfato de amonio- $^{14}\text{N}$  5 g/L y la levadura fue crecida a 28 °C por 24 h, con agitación. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 3,000 g por 5 minutos y la pastilla fue resuspendida en 10 mL de medio fresco ( $5.8 \times 10^8$  cel/L). Alícuotas (1 mL) de esta solución fueron inoculadas para la siguiente ciclo de crecimiento utilizando dos matraces para: (i) levadura control y (ii) levadura bajo exposición a Se(IV) (10 mgSe/L), con tres replicas biológicas para cada una (conc. celular inicial fue  $1.1 \times 10^6$  cel./mL). Todos los medios fueron crecidos a 28 °C por 24 h con agitación. Alícuotas de 2 mL del medio de cultivos control y el expuesto a Se(IV) fueron tomados, y congeladas a -20 °C para su análisis por GC-FID. Por otro lado, las células fueron recuperadas por centrifugación (5000 g, 5 min, 4°C) y lavadas tres veces con agua desionizada, liofilizadas y pesadas para determinar producción de biomasa.

Para la determinación de etanol por GC-FID se utilizaron las condiciones que se resumen en Tabla 16. Los flujos de gases en el detector fueron: 450 mL/min de aire y 45 mL/min de hidrógeno. El volumen de inyección fue de 0.5  $\mu\text{L}$  y se utilizó un split 10:1; el programa de temperatura en la columna inició en 35 °C y se mantuvo por 2 min y después, se aplicó aumento

de temperatura de 15 °C/min hasta llegar a una temperatura de 100 °C, seguido de un incremento de 25 °C/min hasta llegar a una temperatura final de 200 °C, la cual se mantuvo por 1 min para concluir la cromatografía en un tiempo total de 11.3 min. La temperatura del inyector fue de 220 °C y la del detector de 220 °C.

Para la calibración, se utilizaron soluciones de estándar de etanol: 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 y 15.0 g/L, adicionando a cada una de las soluciones acetonitrilo como estándar interno con concentración final de 5.0 g/L. Las funciones de regresión lineal fueron obtenidas en cada análisis ( $r^2 > 0.999$ ), y el límite de cuantificación de etanol determinado fue de 0.2 g/L. Las muestras reales fueron centrifugadas a 12,000 g por 5 min y 500 µL de la solución de muestra control o expuesta a 10 mgSe/mL (tres replicas biológicas) fueron diluidas con 250 µL de 2 % ACN y 250 µL de agua desionizada (concentración final de ACN como EI 5 g/L - igual que en las soluciones de calibración) y 0.5 µL fue inyectado al sistema GC-FID.

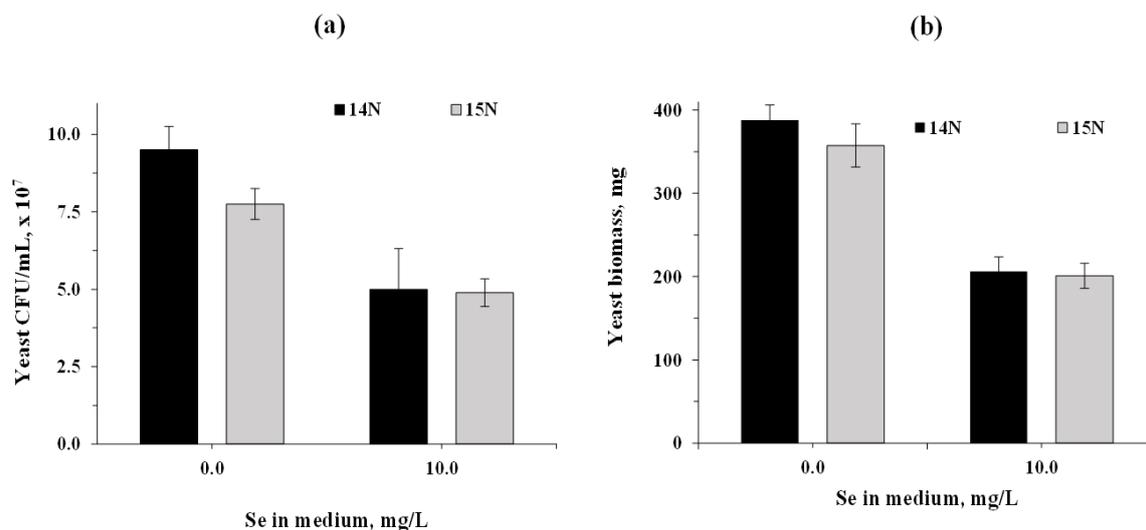
**Tabla 16.** Condiciones instrumentales de análisis por GC-FID para determinación de etanol en muestras de levadura con marcaje metabólico crecida después de crecimiento por 24 h con y sin exposición a Se 10 mg/L

| Parámetro               | Condiciones seleccionadas        |          |            |             |
|-------------------------|----------------------------------|----------|------------|-------------|
| Inyector                | 0.5 µL                           |          |            |             |
| Temperatura de inyector | 220 °C                           |          |            |             |
| Split                   | -0.50 min                        | 50:1     | 0.75 min   | 10:1        |
| Flujo de gas acarreador | Hidrógeno 0.8 mL/min             |          |            |             |
| Columna                 | ZB-WAX (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm) |          |            |             |
|                         | °C/min                           | Temp. °C | Hold (min) | Total (min) |
|                         | -                                | 35       | 2.0        | 2.0         |
|                         | 15                               | 100      | 0.0        | 6.3         |
|                         | 25                               | 200      | 1.0        | 11.3        |
| Detector                | FID                              |          |            |             |
| Temperatura de detector | 220 °C                           |          |            |             |

#### 4.3.4 Resultados y Discusión

##### 4.3.4.1 Crecimiento de levadura

Aunque el crecimiento de levadura se estudió previamente para diferentes concentraciones de Se(IV) (sección 4.1, Fig. 21), en esta parte del trabajo se confirmó que para 0 y 10 mgSe/L en el medio, el crecimiento no fue afectado por la sustitución de la fuente de nitrógeno con natural distribución isotópica ( $^{14}\text{N}$ ) por la sal conteniendo  $^{15}\text{N}$  (Figura 28).



**Figura 28.** Producción de biomasa y crecimiento celular de *S. cerevisiae* bajo exposición a Se(IV) con concentración 10 mg-Se/L (24 h); sulfato de amonio (fuente de N):  $^{14}\text{N}$  o  $^{15}\text{N}$ .

##### 4.3.4.2 Extracción de proteínas de biomasa de levadura

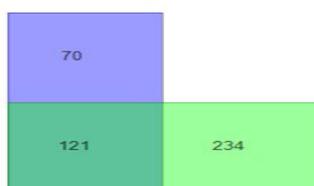
Un factor de suma importancia en estudios de proteómica es el uso de un procedimiento adecuado para extracción de proteínas de interés. En este trabajo, la biomasa se trituró con nitrógeno líquido y se agregó tampón Tris/HCl obteniendo en la solución proteínas citosólicas, mismas que fueron recuperadas para su análisis mediante precipitación con acetona a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Otro aspecto importante en estudios de proteómica es controlar la cantidad de proteínas en cada una de las etapas – para ello, se utilizó en método de Bradford tal como se describió en la parte experimental. Cabe mencionar que inicialmente se procedió con la digestión de proteínas directamente en el extracto obtenido, pero la composición de la muestra era demasiado compleja y no se pudo realizar el análisis de datos confiable. Como una etapa adicional de limpieza de muestra, se realizó la separación por 1D-SDS-PAGE, recortando bandas de las proteínas para la digestión enzimática. Finalmente, las muestras analizadas por capHPLC-ESI-QToF-MS fueron las siguientes:

- Pool de las fracciones 1-8 para Lc1 y pool de las fracciones 1-8 para L1 – estas muestras fueron procesadas y analizadas por separado para construcción de la librería DDA (cuatro corridas capHPLC-ESI-QToF-MS).
- Fracciones 2-8 individuales de la mezcla Lc1 con Hc1 y fracciones individuales 2-8 de la mezcla L1 con H1 para proteómica comparativa (28 corridas capHPLC-ESI-QToF-MS). La fracción 1 fue eliminada para cada muestra debido a muy baja cantidad de proteína.

Es necesario aclarar que los Se-péptidos fueron encontrados solamente en la fracción 4 y por ello, el análisis de datos se realizó para cuatro conjuntos de datos (fracción 4 de la mezcla Lc1+Hc1 y fracción 4 de la mezcla L1+H1, ambas en dos replicas técnicas)

#### 4.3.4.3 Identificación de proteínas en levadura de pan y creación de librería DDA

En base a los datos crudos obtenidos para muestras Lc y L1 (cuatro conjuntos de datos correspondientes a dos pools separados de las fracciones 1D-SDS-PAGE de muestra control y expuesta a Se(IV), respectivamente – dos replicas técnicas de cada una) y siguiendo los pasos descritos en la parte de condiciones experimentales, se realizó la búsqueda de péptidos en cada una de las muestras y por consiguiente de sus respectivas proteínas. En particular, mediante los datos de MS, MS/MS, y tiempo de retención, se creó una librería DDA de los péptidos encontrados. En la Figura 29, se presenta el número total de proteínas encontradas en este análisis, distinguiendo aquellas halladas en levadura expuesta a Se (L1) y las encontradas en levadura control (Lc1). Se observa claramente que 121 de las proteínas fueron comunes para ambas muestras, pero la exposición a Se causó una serie de modificaciones con 70 proteínas encontrados solamente muestra selenizada y 234 proteínas existentes solamente en muestra control. Una vez creada la librería de base de datos de manera local, se hicieron nuevas búsquedas de péptidos, variando los parámetros de tolerancia MS/MS y score de aceptación de proteínas; como resultado, se encontraron algunos péptidos con modificación de SeMet y SeCys, los cuales fueron adicionados a la librería.



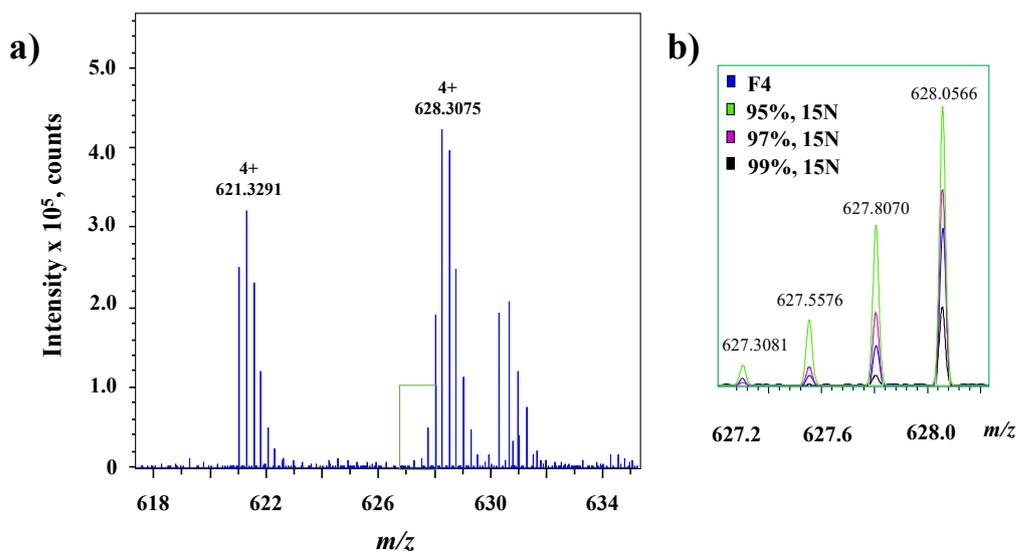
**Figura 29.** Número de proteínas encontradas en el análisis proteómico de *S. cerevisiae*: (azul) muestra expuesta a Se(IV) y (verde claro) muestra control, combinación de ambas (verde). Gráfica generada por el software ProteinScope, utilizado para realizar la búsqueda de proteínas.

#### 4.3.4.4 Incorporación de $^{15}\text{N}$ en proteínas durante el crecimiento de levadura

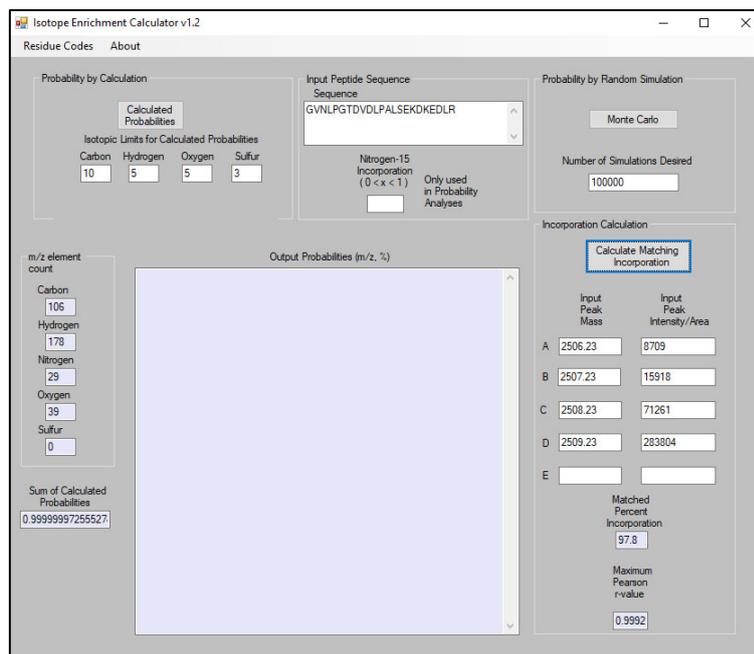
Para fines de proteómica cuantitativa basado en marcaje metabólico con  $^{15}\text{N}$ , es necesario conocer el grado de incorporación del isótopo pesado. La medida de la incorporación de  $^{15}\text{N}$  debe ser objetiva, repetible y basada en análisis empírico. Para asignar el porcentaje de incorporación de  $^{15}\text{N}$  en un péptido, se compara el espectro de masas del perfil isotópico experimental contra una serie de perfiles isotópicos teóricos, variando las relaciones de enriquecimiento. Mediante una regresión lineal de los espectros teóricos, se encuentra el mejor “match” entre el perfil experimental y teórico; donde el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) sirve como parámetro evaluador de la linealidad.

La determinación de la incorporación de  $^{15}\text{N}$  fue realizada en dos formas: (i) simulación teórica del padrón isotópico del péptido aplicando diferentes porcentajes de incorporación de  $^{15}\text{N}$ ; y (ii) utilizando el código en R: “Isotope Enrichment Calculator V 1.2” - creada en Visual Basic (Visual Studio 2010); obteniéndose similares resultados en ambos casos.

El péptido con la secuencia: GVNLPGTDVDLPALSEKDKEDLR [178, 200] correspondiente a la proteína *Piruvato quinasa* sp|P00549|KPYK1\_YEAST, encontrado en la fracción F4 del carril #3 del gel de electroforesis (L1/H1), fue seleccionado al azar para evaluar la incorporación de nitrógeno pesado. Primeramente, el padrón isotópico del péptido es simulado en Data Analysis 4.1 con valores de incorporación teóricos de  $^{15}\text{N}$  de: 99 %, 97 %, 96 % y 95 %, y mediante regresión lineal se determinó que existe un 98 % de incorporación de  $^{15}\text{N}$ ,  $R^2 > 0.999$  (ver Figura 30). Por otro lado, la misma secuencia de péptido fue computada en “Isotope enrichment calculator V 1.2”, adicionando los valores experimentales de  $m/z$  (previamente ajustados a una sola carga) y sus correspondientes intensidades (Figura 31). El software arroja valores de 97.8 % de incorporación  $^{15}\text{N}$  y  $R^2$  de 0.9992. Se obtuvieron similares valores de incorporación para muestra F4 por ambos métodos.



**Figura 30.** Padrón isotópico de péptido identificado K.GVNLPGTDVDLPALSEKDKEDLR. con carga 4+, escogido aleatoriamente para muestra F4; en la izquierda, se observa el péptido con abundancia natural- $^{14}\text{N}$ , y en la derecha, marcado metabólicamente con  $^{15}\text{N}$ , (a); se observa también la regresión lineal con padrones isotópicos teóricos de 95 %, 97 % y 99 % de  $^{15}\text{N}$ ; todas las intensidades fueron normalizadas con base al pico de mayor intensidad, (b).



**Figura 31.** Determinación del porcentaje de incorporación de  $^{15}\text{N}$  en el péptido aleatorio GVNLPGTDVDLPALSEKDKEDLR por medio del programa “Isotope Enrichment Calculator V 1.2”. Input Peak Mass experimentales del péptido fueron transformadas a una relación  $m/z$  con una sola carga, y las intensidades de los picos fueron también computadas.

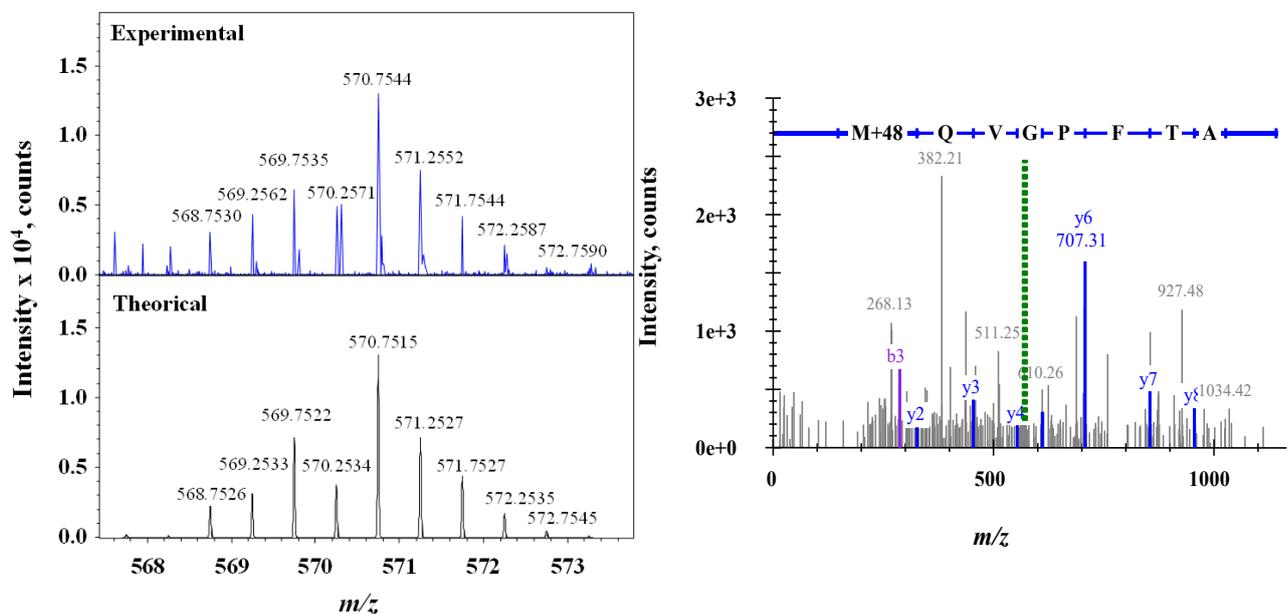
#### 4.3.4.5 Identificación y caracterización de proteínas en levadura

Una vez creada la librería de base de datos local, se hicieron nuevas búsquedas de péptidos, variando los parámetros de tolerancia MS/MS y score de aceptación de proteínas; como resultado, se encontraron algunos péptidos con modificación de SeMet y SeCys, los cuales fueron adicionados a la librería. Específicamente, en la fracción F4 del gel de electroforesis se encontró prácticamente todos los seleno péptidos identificados. Las proteínas identificadas con selenio fueron: piruvato descarboxilasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y piruvato quinasa (Tabla 17); estas dos últimas ya han sido reportadas en literatura como proteínas de levadura que contienen Se<sup>136, 137</sup>.

**Tabla 17.** Péptidos con Se incorporado en metionina en cultivos expuestos a Se(IV) y sus análogos encontrados en cultivos control no-expuestos: todos identificados en fracción 4 de gel tanto en presencia de <sup>14</sup>N (Lc1, L1) como para <sup>15</sup>N (Hc1, H1). Se anotan también proteínas a los que pertenecen secuencias identificadas.

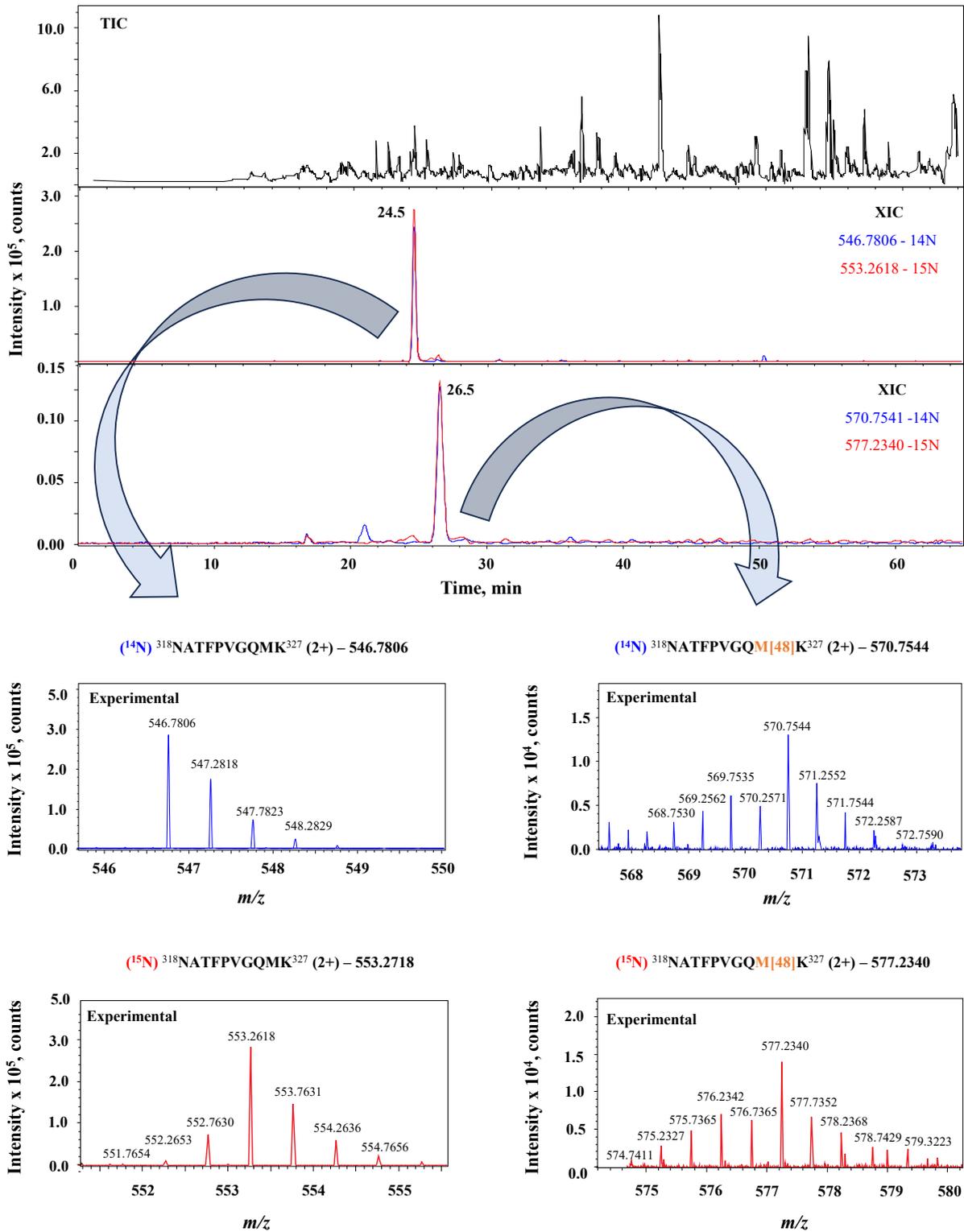
| MW <sup>a</sup><br>(theo.) | MW <sup>a</sup><br>(exp.) | Error<br>(ppm) | Secuencia de péptido                   | Z       | Proteína<br>identificada                               |
|----------------------------|---------------------------|----------------|--|---------|--|
| 1091.5433                  | 1091.5466                 | 3.0            | NATFPGVQMK                             | 2       |  |
| 1139.4878                  | 1139.4926                 | 4.2            | NATFPGVQM[48]K                         | 2       |  |
| 2521.2040                  | 2522.2082                 | 0.51           | MSANISSETTAMITDIATAPAEIDR              | 2, 3    |  |
| 2569.1510                  | 2569.1532                 | 0.86           | M[48]SANISSETTAMITDIATAPAEIDR          | 2, 3    | <b>Piruvato<br/>descarboxilasa</b>                     |
| 2285.1799                  | 2286.1836                 | 0.35           | MIEIMLPVFDAPQNLVEQAK                   | 2, 3    |  |
| 2333.1268                  | 2333.1272                 | 0.17           | M[48]IEIMLPVFDAPQNLVEQAK               | 2, 3    |  |
| 3323.7975                  | 3323.7985                 | 0.30           | LLQTPIDMSL KPNDASESEKE VIDTILALVK      | 2, 3, 4 |  |
| 3371.7439                  | 3371.7533                 | 2.7            | LLQTPIDM[48]SL KPNDASESEKE VIDTILALVK  | 2, 3, 4 |  |
| 2575.3028                  | 2575.3077                 | 1.9            | VINDAFGIEEGLMTTVHSLTATQK               | 2, 3    |  |
| 2623.2485                  | 2623.2541                 | 2.1            | VINDAFGIEEGLM[48]TTVHSLTATQK           | 2, 3    | <b>Gliceraldehído<br/>3-fosfato<br/>deshidrogenasa</b> |
| 2601.2862                  | 2601.2854                 | 0.31           | KDIEVVAVNDPFISNDYAAVMVK                | 2, 3, 4 |  |
| 2648.2277                  | 2648.2254                 | 0.87           | KDIEVVAVNDPFISNDYAAVM[48]VK            | 3       |  |
| 3042.5482                  | 3042.5453                 | 0.95           | KVVITAPSSTAPMFVGMVNEEKYTSDLK           | 3, 4    |  |
| 3090.4944                  | 3090.4898                 | 1.5            | KVVITAPSSTAPMFVM[48]GVNEEKYTSDLK       | 4       |  |
| 2579.1919                  | 2579.2024                 | 4.0            | AEVSDVGNAILDGADC(57)VMLSGETAK(42)      | 3       | <b>Piruvato<br/>quinasa</b>                            |
| 2627.1376                  | 2627.1429                 | 2.0            | AEVSDVGNAILDGADC(104)VMLSGETAK(42)     | 3       |  |
| 2674.0820                  | 2674.1203                 | 14             | AEVSDVGNAILDGADC(104)VM(48)LSGETAK(42) | 3       |  |

Para confirmar igual marcaje metabólico en los seleno péptidos comparando con péptidos sin selenio, se hizo el cálculo para el péptido NATFPGVM[48]QK (2+), proteína Piruvato descarboxilasa sp[P06169 PDC1\_YEAST], en la muestra L1+H1 (Fracción 4), obteniéndose el porcentaje de incorporación de  $^{15}\text{N}$  de 98 % con base al ion 575.7362, con parámetros de regresión lineal :  $Y = -933X + 97472$  y  $R^2 = 0.9999$  (Figura 32). Este resultado es consistente con los obtenidos previamente para un péptido sin Se incorporado (K.GVNLPGTDVDLPALSEKDKEDLR. con carga 4+).

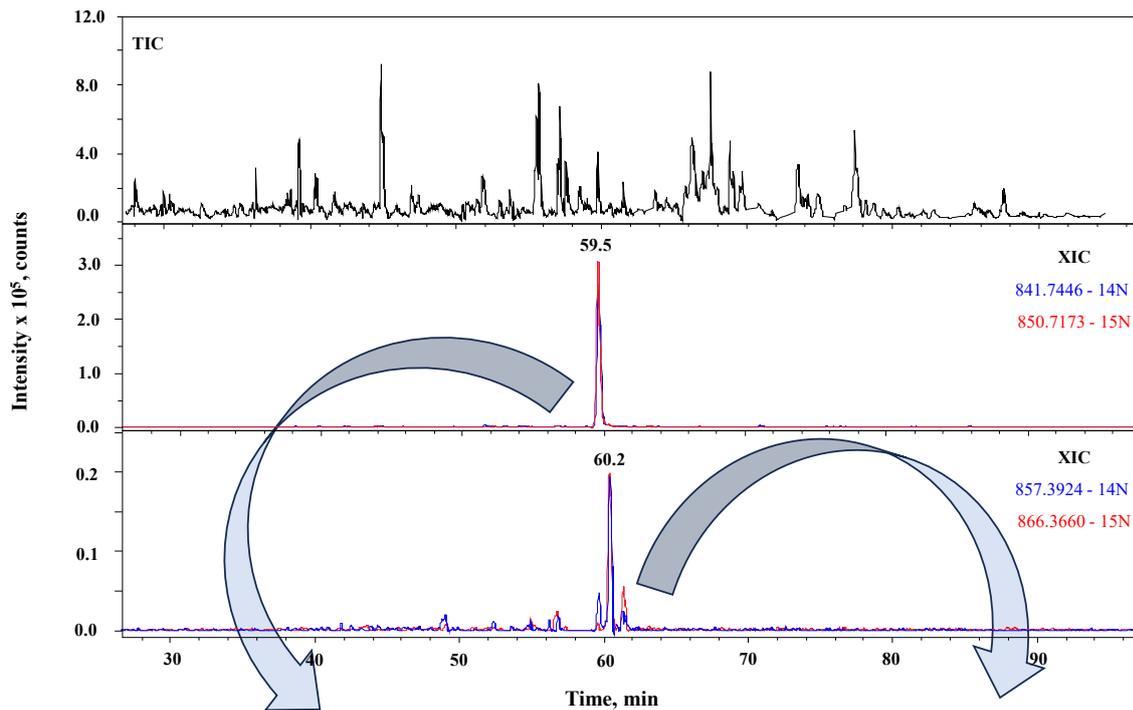


**Figura 32.** Espectro de MS (experimental y teórico) y MS/MS para el seleno péptido NATFPGVM[48]QK (2+), espectros obtenidos en el software Data Analysis 4.1 y MS Fragger 3.9, respectivamente.

La detección e identificación de Se-péptidos se realizó en base a diferencia de masa para modificación variable Met – SeMet, el padrón isotópico conferido por la presencia de Se y el espectro MS/MS. De manera de ejemplo, en la Figura 33 se muestra un cromatograma TIC registrado para fracción 4 de la mezcla L1+H1, los cromatogramas de iones extraídos para  $m/z$  correspondientes a péptido NATFPGVMK ligero y pesado sin selenio (546.78, 553.26) y para el mismo péptido pesado y ligero con Se incorporado NATFPGVM[48]K (570.75 y 577.23). En la misma figura, se muestran padrones isotópicos del dicho péptido para cada uno de los casos, observándose el característico padrón de Se para el péptido NATFPGVM[48]K.

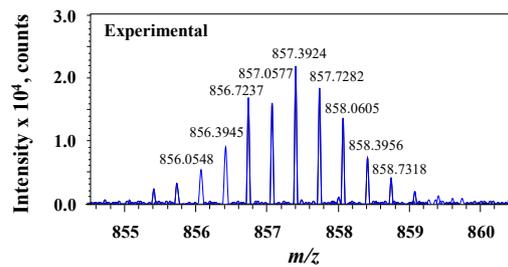
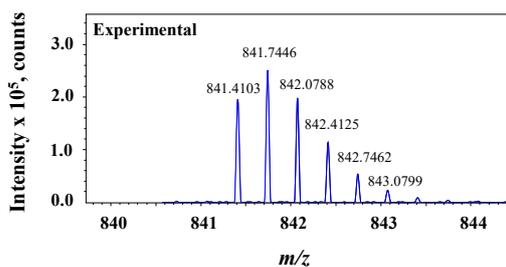


**Figura 33.** Cromatograma TIC de la fracción 4 de la mezcla L1 + H1, cromatogramas de iones extraídos para el péptido. (NATFPVGQM[48]K) y para su análogo con azufre (NATFPVGQMK), tanto para la secuencia con <sup>14</sup>N como con <sup>15</sup>N. Abajo se presentan padrones isotópicos para cada uno de los casos. El péptido corresponde a la proteína PDC1\_YEAST, Pyruvate decarboxylase isozyme.



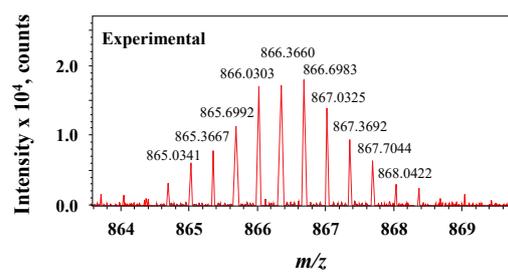
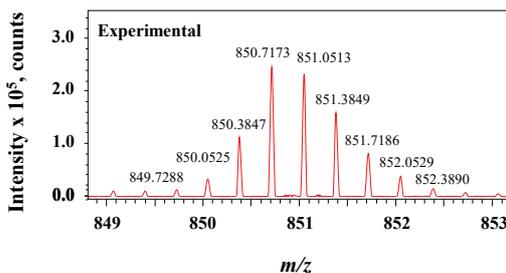
$(^{14}\text{N})$   $^{128}\text{MSANISSETTAMITDIATAPAEIDR}^{151}$  (3+) – 841.7446

$(^{14}\text{N})$   $^{128}\text{MSANISSETTAM[48]ITDIATAPAEIDR}^{151}$  (3+) – 857.3924

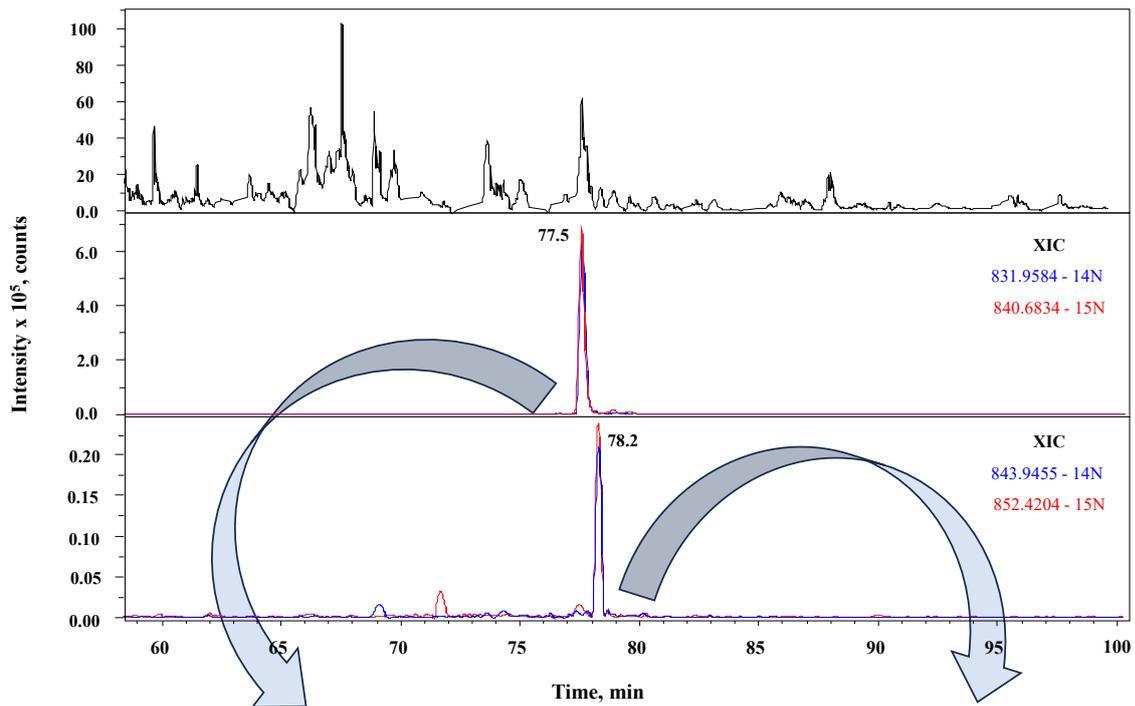


$(^{15}\text{N})$   $^{128}\text{MSANISSETTAMITDIATAPAEIDR}^{151}$  (3+) – 850.7173

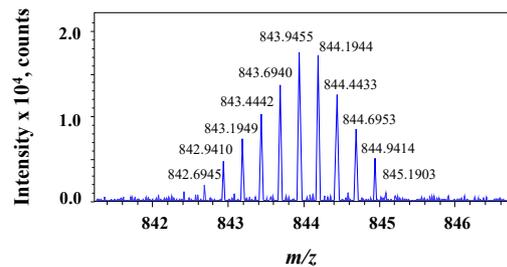
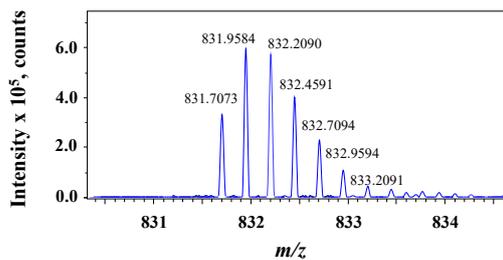
$(^{15}\text{N})$   $^{128}\text{MSANISSETTAM[48]ITDIATAPAEIDR}^{151}$  (3+) – 866.3660



**Figura 34.** Cromatograma TIC de la fracción 4 de la mezcla L1+H1, cromatogramas de iones extraídos para el péptido (MSANISSETTAM[48]ITDIATAPAEIDR) y para su análogo con azufre (MSANISSETTAMITDIATAPAEIDR), tanto para secuencia con  $^{14}\text{N}$  como con  $^{15}\text{N}$ . Abajo se presentan padrones isotópicos para cada uno de los casos. El péptido corresponde a la proteína PDC1\_YEAST, Pyruvate decarboxylase isozyme 1.

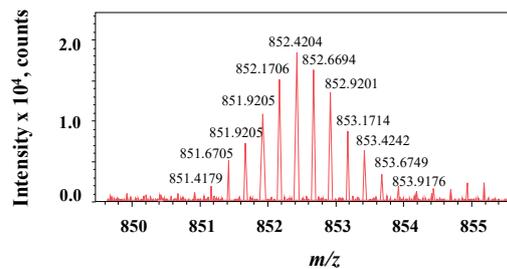
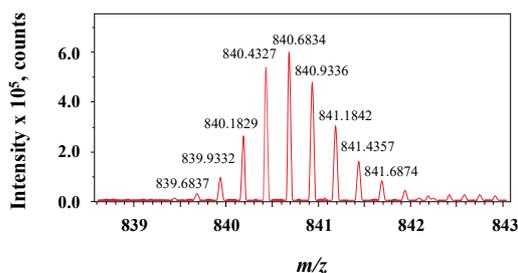


<sup>(14)</sup>N <sup>180</sup>LLQTPIDMSLKPNDASEKEVIDTILALVK<sup>209</sup> (4+) – 831.9584    <sup>(14)</sup>N <sup>180</sup>LLQTPIDM[48]SLKPNDASEKEVIDTILALVK<sup>209</sup> (4+) – 843.9455



<sup>(15)</sup>N <sup>180</sup>LLQTPIDMSLKPNDASEKEVIDTILALVK<sup>209</sup> (4+) – 840.6834

<sup>(15)</sup>N <sup>180</sup>LLQTPIDM[48]SLKPNDASEKEVIDTILALVK<sup>209</sup> (4+) – 852.4204



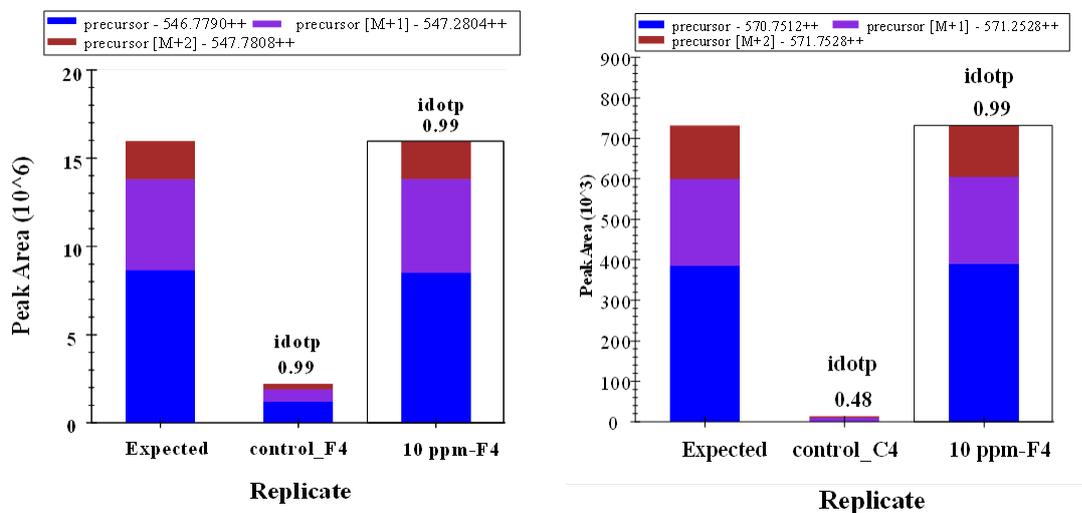
**Figura 35.** Cromatograma TIC de la fracción 4 de la mezcla L1+H1, cromatogramas de iones extraídos para el péptido (LLQTPIDM[48]SLKPNDASEKEVIDTILALVK) y para su análogo con azufre (LLQTPIDMSLKPNDASEKEVIDTILALVK), tanto para secuencia con <sup>14</sup>N como con <sup>15</sup>N. Abajo se presentan padrones isotópicos para cada uno de los casos. El péptido corresponde a la proteína PDC1\_YEAST, Pyruvate decarboxylase isozyme 1.

De manera similar, en las Figuras 34 y 35 se presentan datos para otros dos péptidos pertenecientes a la misma proteína PDC1\_YEAST, Pyruvate decarboxylase isozyme 1. La Figura 34 muestra cromatogramas y padrones isotópicos del péptido MSANISSETTAMITDIATAPAEIDR sin selenio y su análogo con Se incorporado MSANISSETTAM[48]ITDIATAPAEIDR, mientras que la Figura 35 corresponde al péptido LLQTPIDMSLKPNDASESEKEVIDTILALVK y su análogo con Se LLQTPIDM[48]SLKPNDASESEKEVIDTILALVK.

Los resultados presentados en Figuras 33-35 evidencian la detección e identificación de péptidos donde la exposición del cultivo de levadura a Se(IV) causó la sustitución de azufre en metionina por selenio tanto en cultivo ligero como en pesado.

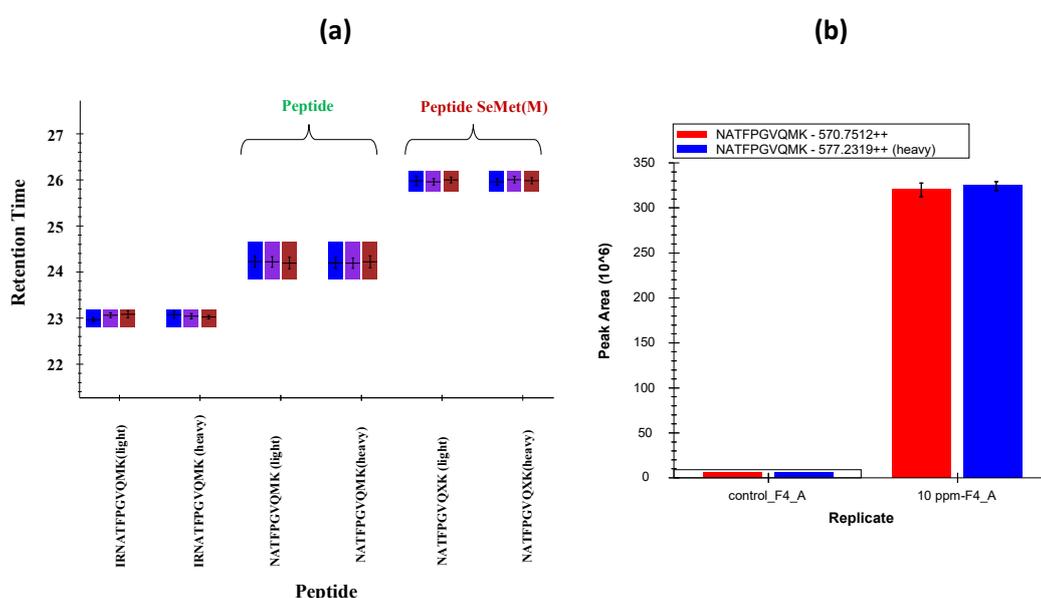
#### 4.3.4.6 Análisis comparativo de perfil de proteínas citosólicas de *S. cerevisiae* bajo exposición a Se(IV) contra un control no-expuesto utilizando el software Skyline

Los seleno péptidos fueron identificados y visualizados en el software Skyline obteniendo valores de idotp > 0.98 para ambos cultivos, es decir <sup>14</sup>N y <sup>15</sup>N. Cabe aclarar que el parámetro idotp determina el grado de consistencia entre la distribución esperada (calculada) y experimental de las áreas de los picos EIC para iones isotópicos precursores del péptido, donde el score más alto es 1.0. En Figura 36 se presenta a manera de ejemplo, los valores de idotp para el péptido NATFPGVQMK-<sup>14</sup>N sin modificación, y con incorporación de Se en metionina ( $\Delta m = 47.9444$  Da), visualizados en el software Skyline. En esta Figura, a la izquierda se presenta la distribución esperada de áreas para iones precursores de este péptido y a la derecha, la distribución experimental encontrada en la fracción 4 del cultivo control (Lc1+Hc1) y del cultivo expuesto a Se(IV) (L1+H1) observándose los valores idotp muy cercanos a 1.



**Figura 36.** Valores de idotp obtenidos en dos corridas para péptidos NATFPGVQMK y NATFPGVQM[47]K, correspondientes a fracción 4 de muestra control (Lc1) y muestra expuesta a Se(IV) L1 (ambas con nitrógeno ligero).

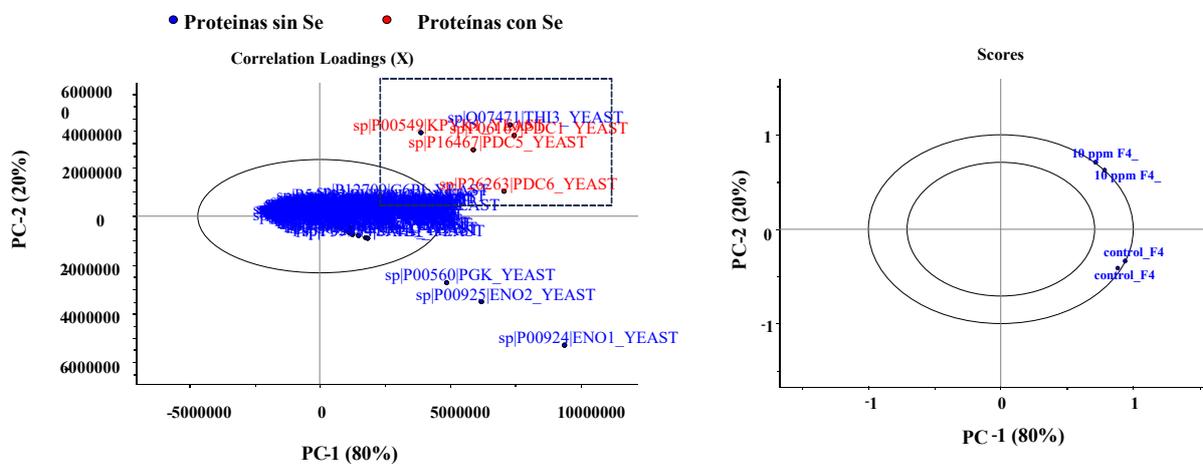
En Figura 37a, se presentan tiempos de retención de tres iones precursores de los péptidos IRNATFPGVQMK, NATFPGVQMK sin Se y NATFPGVQM[48]K con Se incorporado, observando los mismos tiempos para péptidos del cultivo con nitrógeno ligero y pesado en cada uno de los casos. También se observa que la sustitución de S en metionina por Se aumentó ligeramente retención del péptido NATFPGVQMK. en la columna.



**Figura 37.** (a) tiempos de retención de tres péptidos (1 – IRNATFPGVQMK; 2 – NATFPGVQMK; 3 – NATFPGVQM[48]K) en el análisis de fracción cuatro de la muestra L1+H1, se observa que los péptidos con <sup>14</sup>N y <sup>15</sup>N presentan el mismo tiempo de retención, mientras que la sustitución de S por Se causa el aumento de tiempo de retención; (b) comparación de las abundancias del seleno péptido en muestra expuesta a Se y la muestra control, para ambas se presentan áreas del pico en EIC correspondientes a cultivo con distribución isotópica natural de N (rojo) y cultivo marcado con <sup>15</sup>N (azul).

Por su parte, en la Figura 37b se comparan intensidades de las señales (área de pico en EIC) del péptido NATFPGVQMK en cultivo control y el expuesto a Se(IV), incluyendo datos de cultivo ligero y pesado. Estos datos corresponden al análisis de la fracción 4 de Lc1+Hc1 y L1+H1, respectivamente. Claramente se observa que los Se-péptidos se forman cuando la levadura crece en presencia de Se(IV) y que la incorporación de Se ocurre en la misma proporción en cultivo ligero y pesado.

Como ya se ha presentado antes, se encontraron tres proteínas con Se incorporado en residuos de metionina en cultivos expuestos a Se(IV). Para obtener más evidencias sobre impacto de Se al perfil de proteínas citosólicas en levadura, se llevó una comparación de cultivo expuesto a Se(IV) contra un control no expuesto, realizando el análisis de componentes principales (PCA – principal component analysis, por las siglas en inglés). En esta etapa, se consideraron datos correspondientes al análisis de la fracción 4 de muestras Lc1+Hc1 y L1+H1, pero solamente tomando en cuenta proteínas con nitrógeno pesado. La lista de proteínas y sus intensidades integradas en el programa Skyline fueron introducidos al programa The Unscramble X (Camo, Norway) y el modelo PCA obtenidos se presenta en la Figura 38.



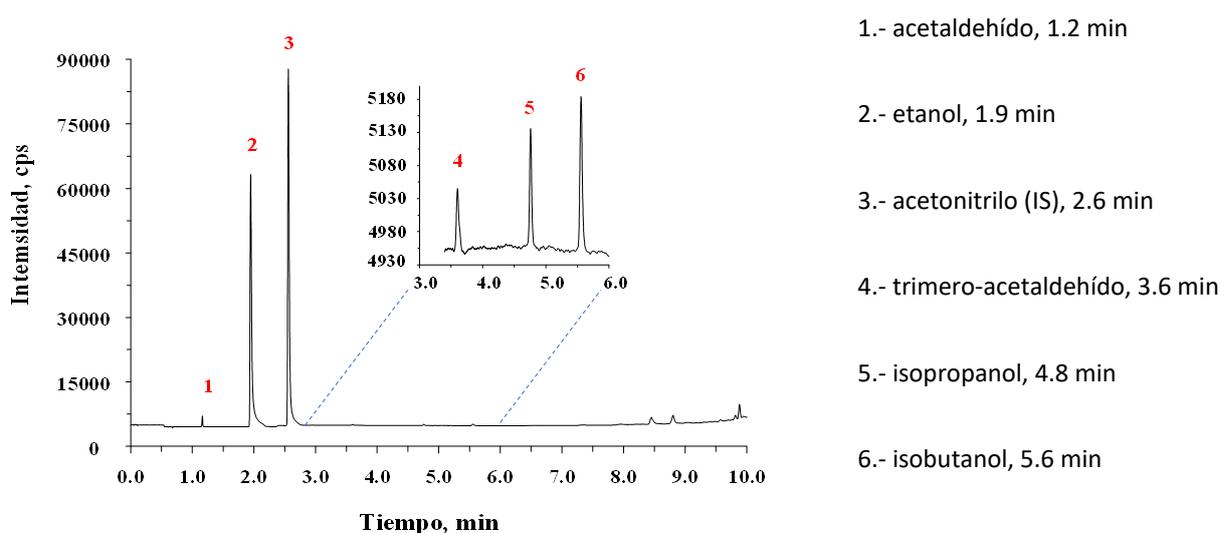
**Figura 38.** Resultados del análisis de PCA, utilizando las proteínas encontradas como variables y comparando resultados obtenidos para fracción cuatro de las muestras control (Lc1+Hc1) contra expuestas a Se(IV) (L1+H1), en color rojo se observan las proteínas donde se encontró selenio.

Este modelo permite evaluar de manera general el efecto de Se sobre el perfil de proteínas citosólicas de la fracción 4 del gel 1D-SDS-PAGE. Cabe mencionar que dos primeros componentes principales describen la totalidad de la varianza de los datos, indicando la significancia estadística. En la Figura 38, la gráfica “scores” presenta la distribución de muestras (dos replicas técnicas de fracción 4 de Lc1+Hc1 y dos replicas técnicas la misma fracción para L1+H1) en las coordenadas PC1 y PC2, mientras que la gráfica de X-loadings corresponde a la distribución de proteínas encontradas en estas muestras en las mismas coordenadas PC1, PC2. Se observa claramente la asociación de las proteínas marcadas en rojo en el rectángulo gris con muestras expuestas a Se. Específicamente, se confirma que la

exposición a Se(IV) se relaciona con una mayor expresión de las proteínas piruvato descarboxilasa, piruvato quinasa y proteína reguladora del metabolismo de tiamina THI3. Las funciones moleculares y biológicas de estas proteínas están estrechamente relacionadas con el proceso de glicolisis fermentativa de *S. cerevisiae*, específicamente en la conversión a etanol. En literatura se encontró una interesante evidencia de que la levadura enriquecida con selenio produce mayor cantidad de bioetanol, comparando dicha producción contra un control sin Se<sup>138</sup>,  
139.

#### 4.3.4.7 Efecto de la exposición a Se(IV) en la producción de etanol por *S. cerevisiae*

Para confirmar el efecto de Se en la expresión de proteínas participantes en la conversión de glucosa a etanol y esperada mayor producción de etanol, se llevó a cabo su análisis por cromatografía de gases con detector de ionización en flama (GC-FID). Se obtuvieron cultivos de 24 h de levadura en presencia de Se(IV) y un control y para el análisis de etanol se tomaron alícuotas de respectivos medios de cultivo (detalles se presentan en la parte de condiciones experimentales). En la Figura 39, se muestra un típico cromatograma GC-FID obtenido analizando el medio de cultivo después de crecimiento de levadura en exposición a Se(IV), 10 mgSe/L. Además de etanol, se detectaron otros compuestos, mientras que la señal de acetonitrilo es debida al uso de este compuesto como estándar interno. En la Tabla 18, se presentan resultados de determinación de etanol obtenidos en tres repeticiones de análisis de muestra expuesta al Se(IV) y de respectiva muestra control. Cabe mencionar que la concentración de etanol determinada en el medio de cultivo no permite evaluar la producción de etanol por la levadura de manera confiable, porque la exposición a Se(IV) provoca un decremento de producción de biomasa, como se ha descrito en la sección 4.1.3.2, Por ello, para comparar dicha producción, se normalizó la concentración de etanol por el valor de biomasa producida en dos tipos de cultivo. Los resultados presentados en la Tabla 18, confirman una mayor producción de etanol por levadura expuesta a Se(IV) respecto al control no-expuesto. En concreto, se calculó el porcentaje de etanol producido respecto a biomasa seca, obteniendo valores de  $6.7 \pm 0.6$  g<sub>etanol</sub>/g<sub>biomasa</sub> y  $5.1 \pm 0.8$  g<sub>etanol</sub>/g<sub>biomasa</sub>, respectivamente. Este hallazgo podría ser de interés en aplicaciones biotecnológicas de *S. cerevisiae*.



**Figura 39.** Cromatograma GC-FID típico obtenido para muestra de levadura expuesta a 10 mg/L de Se(IV) en los medios de cultivo.

**Tabla 18.** Resultados de cuantificación de etanol en levadura enriquecida con 10 mg/L de Se(IV) y de un control no expuesto.

| Muestra   | Biomasa en 50 mL de medio (g) | Etanol en 50 mL de medio (g) | Etanol respecto a biomasa (g etanol/g biomasa) |
|-----------|-------------------------------|------------------------------|--|
| Control A | 0.15                          | 0.73                         | 5.03   |
| Control B | 0.14                          | 0.70                         | 5.15   |
| Control C | 0.13                          | 0.64                         | 4.98   |
| Selenio A | 0.07                          | 0.52                         | 7.36   |
| Selenio B | 0.08                          | 0.48                         | 6.19   |
| Selenio C | 0.09                          | 0.59                         | 6.56   |

#### 4.3.5 Conclusiones

Se confirmó que el marcaje metabólico de *S. cerevisiae* con  $^{15}\text{N}$  en medio mínimo YNB, no influye en el crecimiento de los microorganismos bajo exposición a Se(IV), 10 mgSe/L. Se evaluó el porcentaje de incorporación de  $^{15}\text{N}$  en proteínas de levadura durante su crecimiento obteniendo el valor de 98 %.

El estudio proteómico se enfocó en las proteínas citosólicas. En primer lugar, se generó una librería local, analizando digeridos trípticos obtenidos para levadura control no-expuesta a Se y del cultivo expuesto a Se(IV), 10 mgSe/L. En la etapa de extracción/purificación de proteínas, se incluyó la separación electroforética (1D-SDS-PAGE), combinando para la digestión enzimática ocho bandas del gel. En esta primera etapa solamente se analizaron cultivos con distribución natural de N. Para el estudio comparativo, antes de la digestión enzimática, se mezclaron las proteínas provenientes de cultivos  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$  (proporción 1:1). Para estas muestras, se analizaron ocho fracciones por capLC-ESI(+)-QTOF-MS de manera individual, encontrando seleno péptidos en la fracción 4. Con el uso de las herramientas de análisis de datos, se encontraron en total de 420 proteínas (Anexo 2), identificando un total de 8 péptidos con Se incorporado en metionina; dichos péptidos correspondieron a tres proteínas diferentes (y sus isoformas), evidenciando además que no existió variación de abundancia de seleno péptidos entre muestra con abundancia isotópica natural  $^{14}\text{N}$  y la marcada isotópicamente con  $^{15}\text{N}$ .

La lista de proteínas y sus intensidades arrojadas por la herramienta Skyline, en base a los datos obtenidos de la fracción electroforética 4 de cultivo expuesto a Se(IV) y cultivo control (ambos con  $^{14}\text{N}$  y con  $^{15}\text{N}$ ), fueron sometidos a un análisis de componentes principales. El modelo PCA obtenido mostró la asociación directa de piruvato quinasa, piruvato descarboxilasa y THI3, con las muestras expuestas a Se(IV). Las tres proteínas forman parte de la actividad del metabolismo de glucosa en levadura y producción de etanol durante la fermentación.

Se determinó la producción de etanol para levadura expuesta a 10 mgSe/L y para un control no expuesto, ambos cultivos crecidos por 24 h. Comparando la producción de etanol respecto a cantidad de biomasa seca, se obtuvieron valores de  $5.1 \pm 0.08$  g<sub>etanol</sub>/g<sub>biomasa</sub> y  $6.7 \pm 0.06$  g<sub>etanol</sub>/g<sub>biomasa</sub>, para control no expuesto y expuesto a Se, respectivamente. En aplicación de prueba estadística *t*, se encontró la diferencia estadísticamente significativa entre estos resultados ( $p = 0.023$  y  $T_{exp} = -4.4$ ,  $T_{crit} = 2.91$ ), lo que confirma que Se estimula la producción de etanol en levadura, mediante sobreexpresión de las tres proteínas mencionadas anteriormente. Los resultados obtenidos contribuyen en un mejor entendimiento del impacto de Se(IV) en *S. cerevisiae* y también son de interés para las aplicaciones biotecnológicas de estos microorganismos.

#### 4.4. Estudio del uso de nanopartículas de Se<sup>0</sup> (SeNPs) como removedoras de peróxido de hidrógeno bajo condiciones fisiológicas.

##### 4.4.1 Introducción

Como ya se ha mencionado en este documento varias veces, diversas formas químicas de selenio presentan actividades antioxidante, antiinflamatoria o quimiopreventiva y algunas de ellas han sido utilizadas para combatir la toxicidad de elementos pesados<sup>1, 140, 141</sup>. En la actualidad se sabe que Se puede ejercer efectos benéficos en todos los organismos vivos o caso contrario provocar efectos adversos, todo depende de la especie y del intervalo de concentraciones al cual se encuentra. La suplementación con Se provee protección contra el estrés oxidativo iniciado por el exceso de especies reactivas de oxígeno. En este sentido, las nanopartículas de selenio (SeNPs) parecen una alternativa interesante, debido a buena estabilidad química de SeNPs, su buena biodisponibilidad y baja toxicidad; además de tener reportada actividad antioxidante<sup>142</sup>. De hecho, se ha investigado la factibilidad de utilizar nanopartículas (SeNPs) como antagonistas de radicales para la prevención y tratamiento de estrés oxidativo y diversas enfermedades relacionadas como la diabetes, desordenes de fertilidad, patologías cardiovasculares e inmunológicas, y cáncer<sup>143, 144</sup>. Por otro lado, el potencial de las SeNPs como agentes antimicrobianos y antivirales fue también demostrado y su capacidad como nano acarreadores de drogas fue evidenciada<sup>145, 146</sup>.

La síntesis de SeNPs puede ser realizada mediante procesos físicos, químicos o biológicos. Típicamente, se utiliza una sal inorgánica de Se(IV) y, en el caso de reducción química, los reductores comunes han sido borohidruro de potasio, tiosulfato de sodio, hidracina, ácido ascórbico, mercaptoetanol, y cisteína; agregando como estabilizadores de nanopartículas polisacáridos, cloruro de polivinilo, alcohol polivinílico, algunos surfactantes o proteínas<sup>147, 148</sup>. Por su parte, los agentes de reducción en la síntesis biológica han sido bacterias, hongos, algas, proteínas y plantas, sin la necesidad de agregar ningún aditivo extra para estabilizar NPs<sup>149</sup>. Es claro que cuando se trata de aplicaciones biomédicas, es preferible hacer uso de reactivos y condiciones que aseguren una buena bioseguridad, buen acceso a los sitios objetivo, una distribución de tamaño uniforme, evitando la formación de aglomerados.<sup>150</sup>

El peróxido de hidrogeno es una especie reactiva de oxígeno y como tal induce daño oxidativo; sin embargo, esta molécula juega también un papel importante en señalamiento celular, ayudando al organismo a actuar frente a estímulos externos<sup>151</sup>. Por tanto, los sistemas enzimáticos capaces de controlar los niveles de peróxido de hidrogeno en diferentes partes de cuerpo son de suma importancia ya que el exceso de esta especie debe ser prevenido. En cuanto

al rol de las SeNPs, se ha observado un incremento en la actividad antioxidante de las enzimas como el glutatión peroxidasa (GPX), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), la tiorredoxina reductasa (TrxR) y el ascorbato peroxidasa (APX) cuando se utilizó nanopartículas de selenio en diferentes líneas celulares, plantas y en modelos animales<sup>152-155</sup>. Se ha reportado también que, la concentración de peróxido de hidrógeno disminuye en presencia de SeNPs cuando éstas se les suministraron a diferentes sujetos de estudio sometidos a diferentes tipos de estrés, aunque no es claro si el efecto es asociado al aumento de la actividad enzimática previamente mencionado o podría ser resultado de la participación directa de las nanopartículas de selenio en la reducción del peróxido de hidrógeno al agua<sup>156-158</sup>.

El objetivo en este capítulo de tesis ha sido examinar el rol de las SeNPs como removedores de peróxido de hidrógeno bajo condiciones fisiológicas. A modo de resumen, las nanopartículas fueron sintetizadas a partir de Se(IV) en forma de selenito de sodio utilizando cisteína como agente reductor y en presencia de albumina de suero bovino (BSA). Albumina de suero se seleccionó como proteína mayoritaria en el sistema circulatorio, con capacidad de unir y transportar diferentes tipos de especies químicas y con demostrada actividad reductora, esperando que en el sistema *in vitro* servirá para estabilizar SeNPs y posiblemente contribuirá en la reducción de Se(IV). Los experimentos fueron realizados en dos formas distintas: (i) por medio de generación de peróxido de hidrógeno en un sistema glucosa – glucosa oxidasa (GOX) y (ii) por medio de exposición directa de una concentración conocida de peróxido de hidrógeno a las nanopartículas de selenio (SeNPs) previamente sintetizadas. La reacción fue monitoreada mediante la determinación de Se oxidado, Se(VI), en las soluciones utilizando un sistema de generación de hidruros acoplado a espectrometría de emisión atómica por plasma de microondas (HG-MP-AES) y por determinación del consumo de peróxido de hidrógeno por un procedimiento de espectrofotometría basada en la oxidación de yoduro de potasio al complejo triyoduro<sup>159</sup>.

Es necesario destacar que este estudio fue realizado con participación de dos estudiantes; la aportación del autor de este trabajo (LFMD) consistió en la síntesis de SeNPs y la medición de Se por HG-MP-AES en todas etapas, mientras que aportación de la M.C. María Teresa Muñoz Barbosa (MTMB) correspondió a puesta a punto de las condiciones y en la cuantificación del peróxido de hidrógeno en todas pruebas. Ambos estudiantes realizaron de manera independiente el análisis de datos como una estrategia adicional de control de su confiabilidad. Los resultados de cuantificación se presentan como valores promedio de todas

corridas con respectivas desviaciones estándar. Para un mejor entendimiento, se presenta el estudio en su totalidad.

#### 4.4.2. Objetivos particulares

- Sintetizar SeNPs estabilizadas con albumina de suero bovino (BSA), a partir de Se(IV) y utilizando cisteína como agente reductor y confirmar el tamaño de dichas nanopartículas (LFMD).
- Poner a punto las condiciones para la determinación espectrofotométrica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por medio de espectrofotometría UV/Vis (MTMB).
- Adoptar el procedimiento HG - MP-AES previamente desarrollado en etapas anteriores del trabajo de tesis para la determinación de Se(VI) – producto de reacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (LFMD).
- Monitorear la concentración de diferentes formas de Se y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante reacción utilizando dos sistemas: (i) generación continua de peróxido de hidrógeno con Glu-GOX y (ii) concentración fija inicial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (LFMD y MTMB)
- Realizar el análisis de datos (LFMD y MTMB)

#### 4.4.3 Condiciones experimentales

##### 4.4.3.1 Reactivos y muestras

Todos los reactivos fueron de grado analítico, mayoría de la marca Sigma Aldrich (Milwaukee, USA). Las muestras y estándares utilizados en esta sección fueron diluidos con agua desionizada 18 MΩ cm Labconco (Milwaukee, WI, USA).

El selenito de sodio pentahidratado, selenato de sodio, bromuro de potasio, yoduro de potasio, ácido nítrico ultrapuro, ácido clorhídrico fumante, hidróxido de sodio, borohidruro de sodio, fosfato dibásico de sodio heptahidratado, fosfato monobásico de sodio monohidratado, peróxido de hidrogeno y la glucosa fueron reactivos de Sigma Aldrich. La albúmina sérica bovina libre de proteasas (BSA), glucosa oxidasa de *Aspergillus Niger* tipo VII (GOX) y la peroxidasa de rábano (HRP) también fueron reactivos adquiridos en Sigma Aldrich.

La exactitud del método para la determinación de Se fue validada por medio del análisis del material “High Selenium Yeast Seleno Excell®, concentración de Se 1255 µg/g Se (Cypress System, Inc.).

#### 4.4.3.2 Instrumentación analítica

- Espectrómetro de emisión atómica con plasma de microondas (MP-AES) modelo MP-4100 de Agilent Technologies con generador de nitrógeno Agilent 4107, equipado con módulo de control de gas externo (EGCM) (Agilent Technologies, California, USA.).
- Espectrofotómetro UV/Vis modelo Multiskan GO (Thermo Scientific).

##### 4.4.3.2.1 Equipos utilizados en la preparación de muestras

- Purificador de agua Mili-Q WaterPro Ps (Labconco).
- Placa de calentamiento HB-120-S Dry Bath (DLAB Scientific).
- Centrifuga HERMLE Z 326 (Hermle Labortechnik).
- Speed Vac Vacufuge plus (Eppendorf AG).
- pH metro 3200P (Agilent Technologies).
- Micropipetas BioPette™ A de 2 µL, 10 µL, 20 µL, 200 µL, y 1000 µL (Labnet, NJ, USA).

##### 4.4.3.2.2 Softwares para análisis de datos

- Agilent Expert MP (obtenido de MP-AES 4200)
- Excel Office 365

##### 4.4.3.3 Síntesis de nanopartículas de selenio (SeNPs)

El procedimiento se adoptó de estudios anteriores, donde L-cisteína fue usada como agente reductor<sup>151, 152, 160</sup> y la BSA para estabilización de las nanopartículas<sup>161-163</sup>. Para cada replica experimental, 4 mL de una solución de BSA 25 mg/mL fue mezclada con 4 mL de Se(IV) 1000 mgSe/L (~50 µmol), después 2 mL de L-cisteína 100 mM (200 µmol) fue adicionado gota a gota durante treinta minutos. Un control que contenía solo BSA y L-cisteína fue siempre preparado en paralelo. Las soluciones obtenidas fueron agitadas por 1 h a temperatura ambiente, observando la aparición de una turbidez rojiza característica de la formación de selenio elemental en forma de nanopartículas (SeNPs), sin observar dicha turbidez y cambio de color en los controles. Para cada replica técnica, alícuotas de 4 mL de la suspensión de la nanopartícula fueron diluidas con 4 mL de buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.0. Enseguida, 24 mL de acetona fría fue agregada, y las soluciones fueron dejadas a -20 °C por 5 h y centrifugadas a 3,000 g por 20 min., la pastilla (pellet) de nanopartícula con BSA fue lavada con dos porciones de acetona fría al 70 % y con una porción de agua fría, eliminando el solvente después de cada centrifugación. Finalmente, la pastilla se suspendió en 16 mL de buffer de fosfatos obteniendo una concentración aproximada de Se 100 mg/L en forma de nanopartículas de Se<sup>0</sup>. De la misma manera, un control fue siempre analizado en paralelo.

Para verificar el tamaño de la nanopartícula, la suspensión inicial de Se<sup>0</sup> y la muestra control fueron diluidas 10 veces y se obtuvieron sus espectros de absorción por espectrofotometría UV/Vis en un rango de 220 - 550 nm (Espectrómetro NanoDrop MultiSkan SkyHigh, Thermo Fisher Scientific), y los valores de absorbancia a 300 nm, 400 nm y 500 nm fueron usados para estimar el tamaño de la nanopartícula.

#### 4.4.3.4 Determinación de Se por espectrometría emisión atómica con plasma de microondas previa generación de hidruro de selenio (HG-MP-AES)

Como primer paso, se determinó el selenio total en la suspensión de las nanopartículas. Para ello, 250 µL de la suspensión o del control fueron digeridos de manera independiente en tubos eppendorf con 250 µL de ácido nítrico concentrado en dos pasos: (1) calentamiento a 80 °C por 20 minutos y (2) calentamiento a 90 °C por otras 3 h (HB 120-S Dry Bath, DLAB Scientific, China). Para completar la digestión, las muestras fueron adicionalmente calentadas con 250 µL de peróxido de hidrógeno (30 min, 90 °C). Una vez que las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, el volumen se llevó a 2.0 mL con agua desionizada. Para la pre-reducción de Se(VI) a Se(IV), se tomó 100 µL del digesto después de centrifugar la solución (13,000 g, 10 min), y se le adicionó 1 mL de una solución reductora compuesta de 0.5 M HCl con 1.54 M KBr y las muestras se calentaron a 80 °C por 1 h. Por último, previo a la generación de hidruros, 500 µL de esta nueva solución fueron diluidos con 1.5 mL de HCl 1.0 M. Considerando que la solución inicial de Se<sup>0</sup> estaba en concentración de 100 mg/L y que la dilución final fue de un factor 350, la concentración de Se total esperada en el análisis de HG-MP-AES fue aproximadamente de 0.3 mg/L. Todos los resultados presentados en este capítulo fueron obtenidos con base a tres replicas independientes de SeNPs.

El selenio oxidado disuelto total fue determinado en las muestras, después de que las SeNPs fueran expuestas a peróxido de hidrógeno por 0, 15, 30, 45, 50 y 60 min -se especifica las condiciones en la siguiente sección. Para eliminar las SeNPs residuales (no-oxidadas) y el BSA de las muestras que fueron expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y determinar selectivamente la fracción de Se oxidado, se tomaron alícuotas de 200 µL, se les agregó 600 µL de acetona fría y después de 5 h a -20 °C el sobrenadante que contenía el Se oxidado fue recuperado por centrifugación (4°C, 8000 g, 15 min). Adicionalmente, la pastilla fue lavada con dos porciones de acetona 70 % y una porción de agua fría, los respectivos sobrenadantes fueron colectados después de cada centrifugación y combinados en un solo vial. El solvente fue evaporado (SpeedVac a 60 °C por 3 h), el residuo fue disuelto en 1 mL de la solución reductora (KBr 1.4 M en HCl 0.5 M) y la

mezcla se calentó a 80 °C por 1 h. Finalmente, 1 mL de ácido clorhídrico 1 M fue agregado a cada muestra para la introducción al sistema HG-MP-AES. Para este análisis, tres replicas fueron preparadas y un control que no contenía peróxido de hidrógeno fue corrido en paralelo.

Como ya se ha mencionado, el procedimiento HG-MP-AES fue adoptado de etapas anteriores de este proyecto de tesis con ligeras modificaciones<sup>164</sup>. El hidruro de Se fue generado en el interior de la cámara MSIS, donde las soluciones de calibración o las muestras fueron introducidas a través de la línea inferior del sistema MSIS y acidificando on-line con una solución de HCl 1M mediante una conexión “T”. Por su parte, la solución reductora (NaBH<sub>4</sub> 1.5% m/v + NaOH 1.0% m/v) se introdujo a través de la línea superior; en todo el sistema se utilizó un flujo de 1 mL/min, el cual fue controlado por la bomba peristáltica. Las condiciones de operación del instrumento fueron las siguientes: presión de nitrógeno 140 psi, presión de nebulizador 240 kPa, viewing position -20, tiempo de integración 5 s y longitud de onda para Se,  $\lambda = 196.026$  nm, los cuales se muestran en la Tabla 19. La calibración fue realizada con soluciones del estándar tanto de Se(IV) como Se(VI), en ambos casos utilizando concentraciones 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 y 4.0  $\mu\text{g/mL}$  de selenio. Las funciones de regresión lineal siempre fueron ( $r^2 > 0.999$ ), el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) instrumental evaluado para Se(VI) fueron 10.7  $\mu\text{g Se/L}$  y 35.8  $\mu\text{g Se/L}$ , respectivamente (Tabla 20). Para demostrar la exactitud del procedimiento, la concentración de selenio en el material Seleno Excell® fue determinado, obteniéndose una concentración de Se igual a  $1191 \pm 32$   $\mu\text{g/g}$ , lo cual es consistente con el valor certificado para este material (1255  $\mu\text{g/g}$ ).

**Tabla 19.** Condiciones instrumentales empleadas para el análisis de Se por HG-MP-AES

| Parámetro                  | Elemento                      |
|----------------------------|-------------------------------|
|                            | Se                            |
| Longitud de onda           | 196.026 nm                    |
| Corrección de fondo        | Off-peak left + right // Auto |
| Tiempo de integración      | 5 s                           |
| Posición de visualización  | -20                           |
| Presión del nebulizador    | 240 KPa                       |
| Flujo de inyección de aire | Bajo                          |

**Nota:** La velocidad de la bomba peristáltica fue de 15 rpm, introducción manual de la muestra, el tiempo de introducción fue de 15 s, tiempo de estabilidad de 20 s, número de pixeles igual a 3 y se realizaron 3 réplicas técnicas de cada muestra.

**Tabla 20.** Parámetros analíticos de calibración de Se(IV) por HG-MP-AES -  $\lambda = 196.026$  nm.

| Elemento | Rango de calibración, mg/L | Función de regresión lineal         | R <sup>2</sup> | SE <sub>m</sub>      | SE <sub>b</sub>      | LD (µg/L) | LQ (µg/L) |
|----------|----------------------------|-------------------------------------|----------------|----------------------|----------------------|-----------|-----------|
| Se(IV)   | 0.05 - 2.0                 | $I = 3.35 \cdot 10^3 C_{Se} + 31.2$ | 0.9999         | $18.3 \cdot 10^{-5}$ | $10.2 \cdot 10^{-3}$ | 10.7      | 35.8      |

#### 4.4.3.5 Generación de peróxido de hidrógeno en sistema glucosa-glucosa oxidasa en ausencia y en presencia de SeNPs

Para la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir de glucosa mediante actividad enzimática de glucosa oxidasa, se preparó una solución compuesta por 80 µL de 100 mM glucosa (~8 µmol) en 50 mM buffer de fosfatos, pH 7.4, se le adicionó 100 µL de glucosa oxidasa (GOX) (0.25 U/mL) y se llevó a 2 mL usando la misma solución buffer. Para evaluar el efecto del selenio en el sistema, una serie de soluciones fueron preparadas de la misma manera, adicionando además en cada tubo 1 mL de soluciones correspondientes a SeNPs, Se(VI) o Se(IV), todas las soluciones a concentración inicial de 100 mgSe/L y en 50 mM buffer de fosfatos (la cantidad de Se fue igual a 1.26 µmol). Todas las muestras fueron mantenidas a 37 °C, alícuotas de 100 µL fueron tomadas cada 5 minutos por 1 h, y se les determinó el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De manera similar, otros dos experimentos se realizaron simultáneamente, pero ahora tomando volúmenes de 100 µL y 200 µL a los 0, 15, 30, 45 y 60 min, y fueron utilizados para determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Se, respectivamente.

Por otro lado, 1 mL de cada forma de Se (100 mgSe/L) fue mezclado con 1 mL de 0.02 % de peróxido de hidrógeno en buffer de fosfatos, las muestras fueron incubadas a 37 °C, y las alícuotas fueron tomadas para determinación de Se y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tal como se describió en la sección 4.4.3.4 y se describe en la sección siguiente, respectivamente. .

#### 4.4.3.6 Determinación espectrofotométrica de peróxido de hidrógeno por espectrofotometría UV/Vis

Se adoptó el procedimiento espectrofotométrico indirecto, basado en la oxidación catalítica de yoduro formando el complejo I<sub>3</sub><sup>-</sup> en presencia de peróxido de hidrogeno.<sup>165</sup> Se tomaron 100 µL de muestra y se diluyeron con 900 µL de una solución que contenía yoduro de potasio y enzima HRP en buffer de fosfatos, ajustadas para tener concentraciones finales después de la dilución de 40 mM y 1 U/mL, respectivamente (Tabla 21). Después de 1 minuto de contacto, se adquirieron los espectros de absorción en un rango de 260 a 700 nm, registrando los valores en los máximos de absorción del complejo de triyoduro, los cuales correspondieron a 285 nm y a

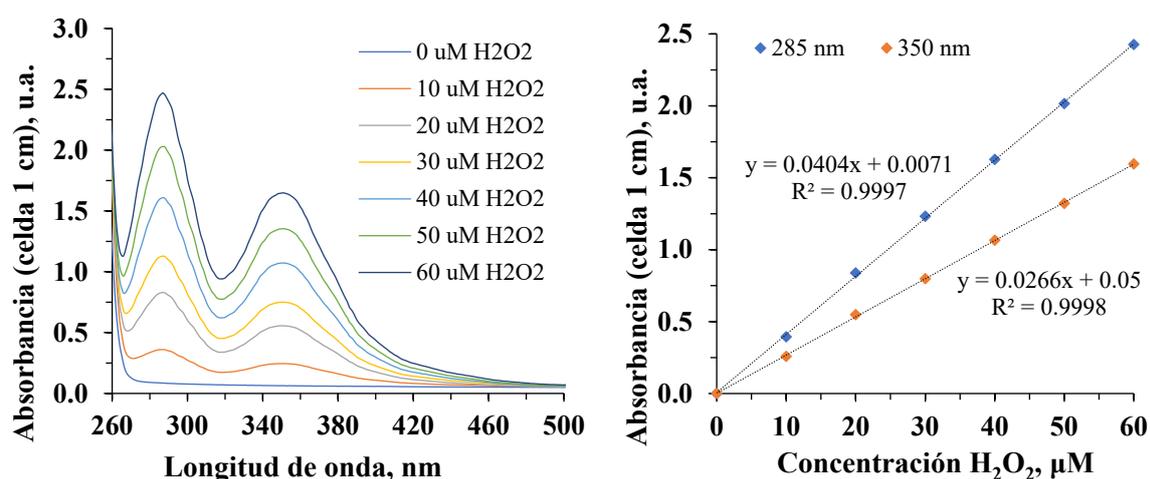
350 nm. Para la calibración, un stock de estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue diluido apropiadamente en buffer de fosfatos para obtener concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 μM. Las funciones de regresión lineal fueron obtenidas diariamente ( $r^2 > 0.999$ ) y el límite de detección y cuantificación instrumental para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 350 nm fueron de 1.4 μM y 4.3 μM, respectivamente (Tabla 22, Figura 40).

**Tabla 21.** Preparación de curva de calibración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para su análisis por UV-Vis a 350 nm

| Concentración H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM) | KI (1M) | HRP (100 unidades/mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mM) | Buffer de fosfatos |
|--|---------|-----------------------|--------------------------------------|--------------------|
| 0  | 40 μL   | 10 μL                 | 0 μL                                 | 950 μL             |
| 10   |         |                       | 10 μL                                | 940 μL             |
| 20   |         |                       | 20 μL                                | 930 μL             |
| 30   |         |                       | 30 μL                                | 920 μL             |
| 40   |         |                       | 40 μL                                | 910 μL             |
| 50   |         |                       | 50 μL                                | 900 μL             |
| 60   |         |                       | 60 μL                                | 890 μL             |

**Tabla 22.** Parámetros analíticos de curva de calibración para el análisis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por UV-VIS.

| Rango de calibración (μM) | Función de regresión lineal             | R <sup>2</sup> | SE <sub>m</sub> | SE <sub>b</sub> | LOD (μM) | LOQ (μM) |
|---------------------------|---|----------------|-----------------|-----------------|----------|----------|
| 0 – 60                    | $I = 2.66 \cdot 10^4 C_{H_2O_2} + 0.05$ | 0.999          | 372.9           | 0.01            | 1.4      | 4.3      |



**Figura 40.** Curva de calibración obtenida para la determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un rango de 0 a 60 μM. Se presentan los espectros de absorción del I<sub>3</sub><sup>-</sup> generado en el sistema de I<sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de HRP. Las condiciones de reacción fueron: [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0 - 60 μM, [KI] = 40 mM, [HRP] = 1 U/mL, solución en 50 mM de buffer de fosfatos a pH 7, T = 26 ± 2 °C y lectura después de 2 min.

#### 4.4.4 Resultados y Discusión

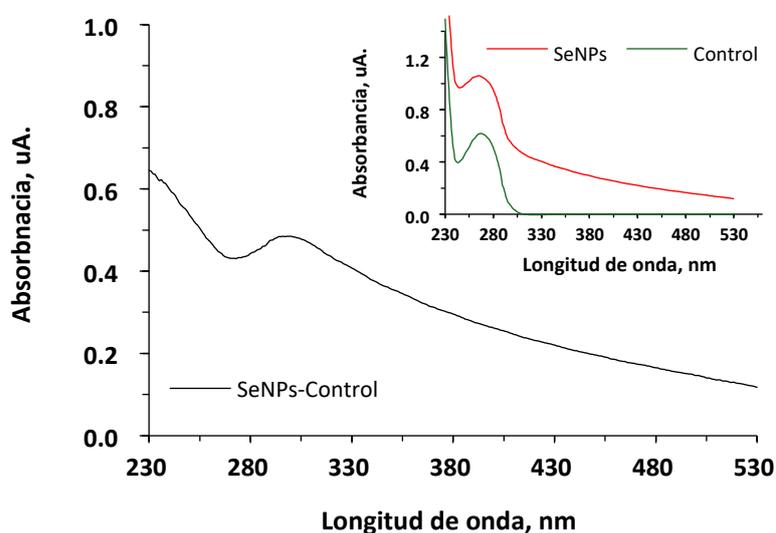
En diferentes estudios se ha reportado que en algunos sistemas biológicos expuestos a SeNPs ocurrió el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes mientras que los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyeron, aunque el rol que jugaron las SeNPs es incierto. Por tal motivo, el objetivo de esta parte del proyecto doctoral fue evidenciar de manera directa la capacidad de las SeNPs para reducir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones de pH fisiológico y en presencia de albúmina. Para completar este estudio, primeramente, las nanopartículas de selenio fueron puestas en contacto con una solución de peróxido de hidrógeno de concentración inicial conocida y con una solución en la cual el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue generando de manera continua a partir del sistema glucosa y glucosa oxidasa (GOX). La enzima GOX de *Aspergillus niger*; fue seleccionada debido a que es una enzima no dependiente de Se, además de ser utilizada en muchas aplicaciones biotecnológicas e industriales mostrando alta especificidad y estabilidad.

##### 4.4.4.1 Síntesis de las nanopartículas de selenio (SeNPs)

Las nanopartículas de selenio fueron sintetizadas agregando L-cisteína a una solución de selenito de sodio, en relación molar 4:1; siguiendo el procedimiento que fue reportado anteriormente para obtener SeNPs homogéneas y esféricas<sup>166</sup>. Una solución de BSA fue utilizada como agente estabilizador para evitar la aglomeración de partículas<sup>163</sup>. Es bien sabido que la BSA es una proteína abundante en suero con propiedades antioxidantes y con la habilidad de unir y transportar diferentes especies endógenas y exógenas; por ello, fue también seleccionada en este estudio por su esperada contribución a la reducción de Se(IV) y por su participación en el transporte de las SeNPs dentro del sistema circulatorio<sup>167</sup>. Basado en estudios anteriores, el tamaño de las nanopartículas fue evaluado en base a espectros de absorción adquiridos para la suspensión de las nanopartículas y para un control con BSA en buffer de fosfatos <sup>168</sup>.

En la Figura 41 se presentan los dos espectros obtenidos de las soluciones preparadas de SeNPs y de un control no expuesto, así como del espectro corregido de las SeNPs obtenido sustrayendo el espectro de la muestra control. En el trabajo de Lin<sup>168</sup>, se relacionó un desplazamiento del máximo de absorción hacia la región del rojo con el incremento del tamaño de SeNPs, dicho efecto fue demostrado por medio del uso de otras técnicas como microscopía electrónica de transmisión. Usando los datos espectrales presentados en el trabajo de Lin y col. se obtuvo una función de regresión lineal para las relaciones de absorbancias 300/500 nm y 400/500 nm obtenidos para los tamaños de partícula correspondientes a 60, 80, 100 y 140 nm. La relación de absorbancias fue utilizada para incrementar la selectividad hacia las SeNPs y

evitando contribuciones espectrales de otros componentes de las muestras. Las funciones obtenidas fueron:  $d = -12.1 A_{300}/A_{500} + 127$  con  $R^2 = 0.9999$ , y  $d = -41.9 A_{400}/A_{500} + 179$  con  $R^2 = 0.9924$  ( $d$  – diámetro de la nanopartícula).



**Figura 41.** Se presenta un espectro UV/Vis típico medido en una solución de SeNPs (rojo) y de un control conteniendo BSA en buffer de fosfatos (verde), ambas diluidas 10 veces. En color negro se observa el espectro de SeNPs después de sustraer el control no expuesto.

**Tabla 23.** Datos obtenidos por espectrofotometría de UV/Vis y evaluación de tamaño de las SeNPs (tres réplicas técnicas analizadas para tres replicas independientes de SeNPs).

| Replica                           | Absorbancia |        |        | Relaciones de absorbancias |         | Diámetro calculado $d^*$ , nm   |         |
|-----------------------------------|-------------|--------|--------|----------------------------|---------|---------------------------------|---------|
|                                   | 300 nm      | 400 nm | 500 nm | 300/400                    | 300/500 | 300/500                         | 400/500 |
| R1                                | 0.81        | 0.48   | 0.25   | 3.24                       | 1.92    | 87.80                           | 98.55   |
| R1                                | 0.88        | 0.51   | 0.28   | 3.14                       | 1.82    | 88.97                           | 102.68  |
| R1                                | 0.86        | 0.5    | 0.26   | 3.31                       | 1.92    | 86.98                           | 98.42   |
| R2                                | 0.95        | 0.52   | 0.29   | 3.28                       | 1.79    | 87.36                           | 103.87  |
| R2                                | 0.93        | 0.53   | 0.3    | 3.10                       | 1.77    | 89.49                           | 104.98  |
| R2                                | 0.96        | 0.55   | 0.31   | 3.10                       | 1.77    | 89.53                           | 104.66  |
| R3                                | 0.86        | 0.49   | 0.26   | 3.31                       | 1.88    | 86.98                           | 100.03  |
| R3                                | 0.84        | 0.48   | 0.26   | 3.23                       | 1.85    | 87.91                           | 101.65  |
| R3                                | 0.82        | 0.47   | 0.26   | 3.15                       | 1.81    | 88.84                           | 103.26  |
| <b>mean <math>d \pm SD</math></b> |             |        |        |                            |         | <b><math>95 \pm 7</math> nm</b> |         |

Las funciones de regresión lineal fueron obtenidas de los datos reportados por Li y col<sup>144</sup>.  
 $d = -12.1 A_{300}/A_{500} + 127$  ( $R^2 = 0.9999$ ) y  $d = -41.9 A_{400}/A_{500} + 179$  ( $R^2 = 0.9924$ )

Para tres réplicas independientes de preparación de SeNPs, las relaciones de las absorbancias fueron medidas en los espectros corregidos y los diámetros de las nanopartículas fueron calculados utilizando respectivas funciones de regresión lineal, obteniéndose el valor promedio de  $95 \pm 7$  nm (Tabla 23). Se debe resaltar que, el tamaño de las SeNPs sintetizadas en este trabajo correspondieron con el tamaño reportado en otros trabajos bajo las mismas condiciones de síntesis<sup>162, 163, 166, 168</sup>.

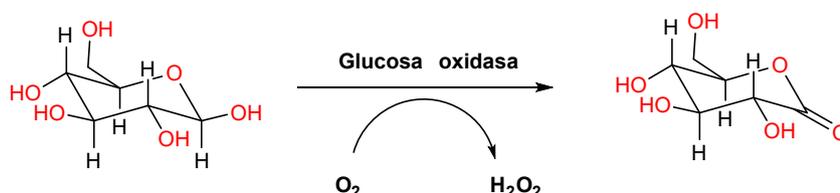
En el siguiente paso, se evaluó la eficacia de formación de SeNPs. Para ello, en una alícuota de la suspensión, se precipitó SeNPs y BSA con acetona fría, tal como se describió en parte experimental. Se llevó a cabo la digestión de la pastilla y, debido a las condiciones fuertes de oxidación aplicadas, el digesto contenía Se(VI) por lo que fue necesaria una etapa de pre-reducción de Se(VI) a Se(IV) antes de generar hidruro de selenio. Cabe recordar que la cinética y eficacia de la reacción es favorecida para Se(IV) pero no para Se(VI). Para la cuantificación, se utilizó calibración externa utilizando estándares de Se(IV) y Se(VI), observando menos de 10 % de diferencia entre los valores de las pendientes para los dos escenarios lo que confirma la eficacia del proceso de pre-reducción empleado en este estudio. A pesar de que la etapa de reducción fue eficiente, Se(VI) fue siempre utilizado en la calibración para asegurar la confiabilidad de resultados.

Basado en el análisis HG-MP-AES de SeNPs sintetizadas en tres réplicas independientes, y analizadas por triplicado, se determinó una concentración de Se en forma de nanopartícula igual a  $98.2 \pm 2.2$  mg/L (en los controles el contenido de Se determinado fue inferior al límite de detección). Considerando que la concentración inicial adicionada en forma de Se(IV) fue de 100 mgSe/L, la eficiencia de la reducción de Se(IV) a Se<sup>0</sup> fue de 98.2 %. Mientras que, la precipitación de la BSA fue eficiente de acuerdo con los resultados obtenidos por la metodología de Bradford, donde se demostró que no había presencia de proteína en los sobrenadantes.

#### 4.4.4.2 Determinación de la actividad enzimática de glucosa oxidasa

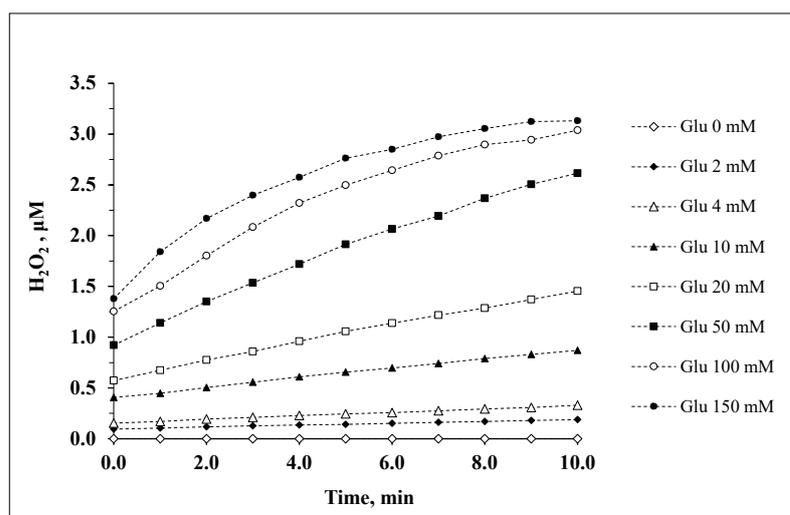
En la Fig. 42, se muestra esquemáticamente el proceso de generación de agua oxigenada en el sistema Glu-GOX. La glucosa oxidasa utilizada (G6125-10KU) fue de la marca comercial Sigma Aldrich, y de acuerdo con la información proveída por el proveedor, la enzima tiene una

actividad de 24800 U/ G. Con esta información, una solución stock de concentración 50 U/mL fue preparada y se determinó su actividad actual. Para este objetivo, la cantidad de  $H_2O_2$  producido en la reacción enzimática fue monitoreada por espectrofotometría UV/Vis tal como se describió anteriormente, mientras que el consumo de glucosa fue determinado por ensayo con ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS).

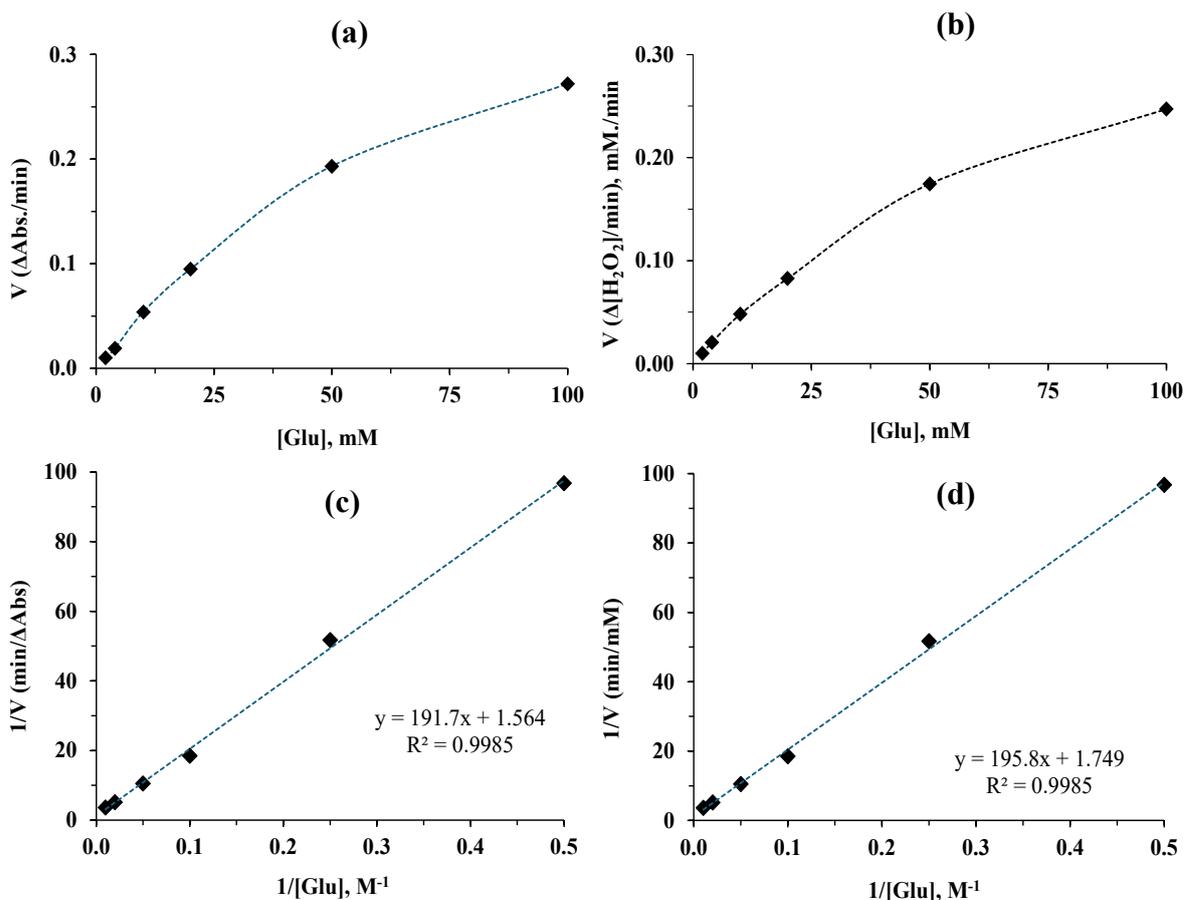


**Figura 42.** Reacción enzimática para producción de peróxido de hidrógeno a partir de oxígeno por acción de la glucosa oxidasa (GOX), convirtiendo glucosa en gluconolactona.

La concentración de  $H_2O_2$  fue medida en una serie de soluciones de 2 mL de glucosa con concentración de 0, 2.0, 4.0, 10, 20, 50, 100 y 150 mM que contenían 50 mM buffer de fosfatos, pH 7.0, y GOX con dilución para tener una concentración final de 0.25 U/mL (de acuerdo con la actividad reportada por el fabricante). De estas soluciones, 100  $\mu$ L fueron tomados de cada muestra y se mezclaron con 900  $\mu$ L de solución que contiene yoduro de potasio (KI) y peroxidasa de rábano (HRP) en buffer de fosfatos (concentraciones finales en 1 mL igual a 40 mM y 1 U/mL, respectivamente). Finalmente, se tomaron dos alícuotas de 200  $\mu$ L de las soluciones preparadas y se transfirieron a una placa ELISA de 96 pocillos, midiendo absorbancia a 350 nm en intervalos de 1 min durante 10 min (Figura 43).



**Figura 43.** Producción de  $H_2O_2$  catalizado por GOX utilizando diferentes concentraciones de glucosa en un rango de 0 a 150 mM, evaluados durante un tiempo de reacción de 10 minutos.



**Figura 44. Arriba:** Velocidad de reacción ( $V$ ) como función de concentración de sustrato: (a)  $V$  es presentadas como un incremento de absorbancia a 350 nm ( $H_2O_2$ ) por minuto; (b)  $V$  es calculada como el incremento en la concentración de  $H_2O_2$  por minuto. **Abajo:** Representación gráfica de la ecuación enzimática de Michaelis-Menten en forma linealizada del tipo Lineweaver-Burk. La abscisa (x) representa las concentraciones recíprocas de la glucosa ( $1/[Glu]$ ) mientras que la ordenada (y) corresponde a la relación inversa de la velocidad ( $1/V$ ); es decir que, (c) y (d) fueron obtenidos de la linealización de los gráficos (a) y (b).

Para conocer los parámetros cinéticos de la enzima, partimos de la ecuación enzimática descrita por Michaelis-Menten (Ec. 10) y después de linealizar dicha ecuación en la forma propuesta por Lineweaver-Burk (Ec. 11), tal como se muestra en Figura 44; se utilizaron los valores obtenidos de pendiente e intercepto para calcular los parámetros cinéticos. Con los resultados obtenidos se estimó que  $K_m$  es igual a 112 mM,  $V_{Máxima}$  de 0.6 mM/min y la **actividad** de la glucosa oxidasa (GOX) en la solución stock fue de 0.025 U/mL.

$$V = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad Ec. 10$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad Ec. 11$$

Una vez obtenidos los parámetros enzimáticos de la glucosa oxidasa, podemos simular la cinética de consumo de glucosa y producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bajo las condiciones estudiadas. Dado que la ecuación de Michaelis Menten (*Ec 10*) es una derivada de la concentración de glucosa con respecto al tiempo, integrar la ecuación nos daría información de cómo la concentración del sustrato varía con el tiempo, lo cual es nuestro objetivo para predecir la cinética teórica y poder compararla con los datos experimentales obtenidos. |

Por otro lado, conocer el consumo de glucosa es necesario para comparar la cinética determinada anteriormente entre el modelo teórico y el experimental. Para determinación de glucosa, se preparó una solución con 1.0 % del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en 1.0 % NaOH que contenía también 0.2 % de fenol y 0.05 % de sulfito de sodio; esta solución fue protegida de la luz en todo momento. La calibración para la cuantificación de glucosa se realizó con seis puntos en un rango de concentración 0.4 – 4.0 mM. Específicamente, 200 µL de la solución de DNS fue mezclada con 200 µL de los estándares de glucosa, calentados a 90 °C por 15 minutos. Después, 100 µL de 40 % de tartrato de sodio potasio fueron agregados para estabilización del color. Una vez que las soluciones se enfrían a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 575 nm. Es importante mencionar que el principio de este ensayo se basa en la reducción del DNS a un rojo-marrón correspondiente al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico acompañada por la oxidación de la aldosa a un grupo carboxílico.<sup>169</sup> La función de calibración tuvo linealidad aceptable ( $R^2 \geq 0.996$ ) obteniendo límites de detección y cuantificación de 0.13 mM y 0.38 mM, respectivamente. Para conocer la actividad real de GOX en nuestras condiciones estudiadas, 2 mL de glucosa 4.0 mM en buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.0) con adición del stock de glucosa oxidasa diluido 20 veces. Cada 5 minutos, una alícuota de 200 µL fue tomada de esta solución y se monitoreó la concentración de glucosa con el método de DNS anteriormente mencionado, midiendo la absorbancia del DNS reducido a 575 nm.

La ecuación de Michaelis-Menten se puede expresar también en su forma diferencial (*Ec.12*), y a partir de esta forma se puede obtener una forma donde se relacione la concentración del sustrato con respecto al tiempo, ( $t, [S]$ ). Sin embargo, esta ecuación llamada ecuación

implícita, la cual no se puede resolver de manera trivial, requiere el uso de un concepto matemático utilizando la función de Lambert W.

$$-dt = \left( \frac{Km}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}} \right) d[S] \quad Ec. 12$$

$$\int_{[S]_0}^{[S]_t} \left( \frac{Km + [S]}{[S]} \right) d[S] = -V_{max} \int_0^t dt \quad Ec. 13$$

$$Km \cdot \ln[S] \Big|_0^t + [S] \Big|_0^t = -V_{max} \cdot t \quad Ec. 14$$

A partir de la ecuación integrada obtenida, después de hacer algunos ajustes matemáticos podemos describirla en una forma exponencial tal como se muestra a continuación:

$$\ln \left( \frac{[S]_t}{[S]_0} \right) + \frac{[S]_t}{Km} - \frac{[S]_0}{km} = \frac{-V_{max} t}{Km} \quad Ec. 15$$

$$e^{\left( \ln \left( \frac{[S]_t}{[S]_0} \right) + \frac{[S]_t}{Km} \right)} = e^{\left( \frac{-V_{max} t}{Km} + \frac{[S]_0}{km} \right)} \quad Ec. 16$$

$$[S]_t * e^{\frac{[S]_t}{Km}} = [S]_0 e^{\left( \frac{-V_{max} t}{Km} + \frac{[S]_0}{km} \right)} \quad Ec. 17$$

Finalmente dividiendo por **Km** en ambos lados de la igualdad, obtenemos la forma mostrada en Ec. 18

$$\frac{[S]_t}{Km} * e^{\frac{[S]_t}{Km}} = \frac{[S]_0}{Km} e^{\left( \frac{-V_{max} t}{Km} + \frac{[S]_0}{km} \right)} \quad Ec. 18$$

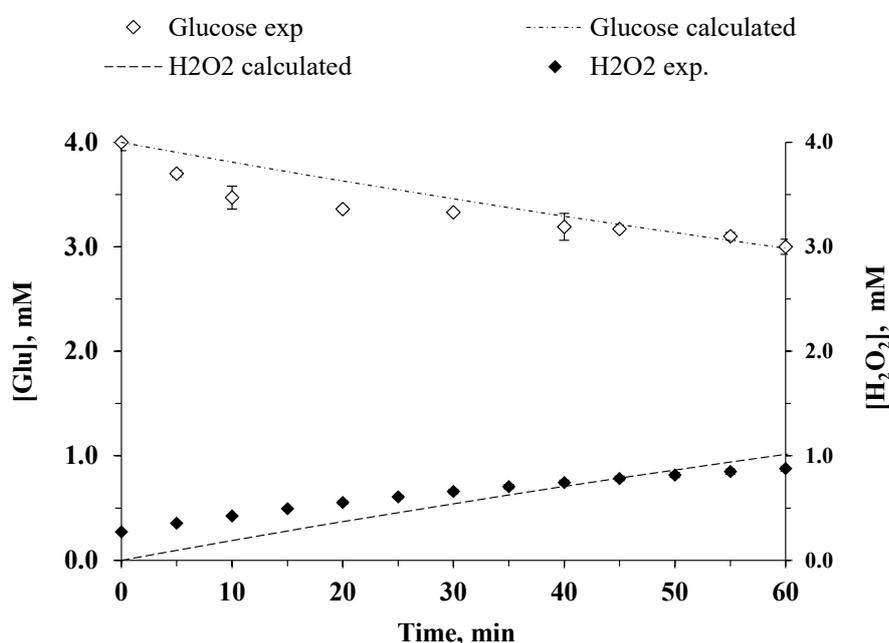
En este punto conocemos todas las variables a excepción de  $[S]_t$ , es aquí donde podemos hacer uso de la función de Lambert W. Básicamente consiste en partir de una función de la forma  $Y = X \cdot e^{(X)}$ , donde obtener Y a partir de la variable X es una tarea fácil y directa. Sin embargo, para resolver nuestra ecuación necesitamos la operación inversa, que consiste en obtener X a partir de un valor de Y conocido. Utilizando la función Lambert W como  $W(Y) = X$  para encontrar el valor de X, podemos definir la función como  $f(X) = X \cdot e^{(X)} - Y$ . En nuestro caso en particular la forma de la función  $f([S]_t)$  está definido en Ec.19, donde X es representado por  $[S]_t/Km$ . Para resolver la ecuación podemos recurrir a métodos numéricos para encontrar las raíces de  $[S]_t/Km$  que satisfacen la ecuación (ej. método de Newton).

$$f([S]_t) = \frac{[S]_t}{Km} * e^{\frac{[S]_t}{Km}} - \frac{[S]_0}{Km} e^{\left( \frac{-V_{max} t}{Km} + \frac{[S]_0}{km} \right)} \quad Ec. 19$$

Por último, la función expresada en la forma de Lambert W se representa en la siguiente ecuación (Ec.20):

$$x = \frac{[S]_t}{K_m} = W\left(\frac{[S]_0}{K_m} e^{\left(\frac{-V_{max} t}{K_m} + \frac{[S]_0}{K_m}\right)}\right) \quad Ec. 20$$

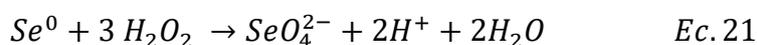
Con la ecuación anterior se calcularon los valores teóricos de  $[S]_t$  para cada tiempo, utilizando los parámetros cinéticos encontrados en la linealización de Lineweaver-Burk,  $K_m = 112 \text{ mM}$ ,  $V_{max} = 0.6 \text{ mM/min}$ ,  $[S]_0 = 4 \text{ mM}$ . Partiendo de un tiempo 0 podemos predecir la concentración de glucosa en dependencia con el tiempo, en la Figura 45 se muestra la cinética teórica comparada con la experimental obtenida durante 1 hora. Los valores de concentración fueron calculados en intervalos de 5 minutos, calculados al resolver la ecuación con la función de Lambert W por medio de un código en R (ver anexos) . Sin embargo, una paquetería en R - *library(renz)*- para el análisis de cinética enzimática fue recientemente desarrollada por Aledo en dicha librería se incluyen diversas funciones, particularmente una que nos permite seguir el progreso del sustrato con respecto al tiempo por medio de la función `sE.progress()`, donde solo es necesario introducir los valores de  $K_m$ ,  $V_{max}$  y  $S_0$ .



**Figura 45.** Producción de  $H_2O_2$  y consumo de glucosa en la reacción catalizada por el sistema Glu-GOX (4.0 mM Glu, 0.0125 U/mL GOX). Las líneas punteadas corresponden a los valores teóricos calculados en R a partir de  $S_0$ ,  $K_m$  y  $V_{max}$  y los puntos individuales representan los valores experimentales determinados (promedio y SD de tres replicas independientes).

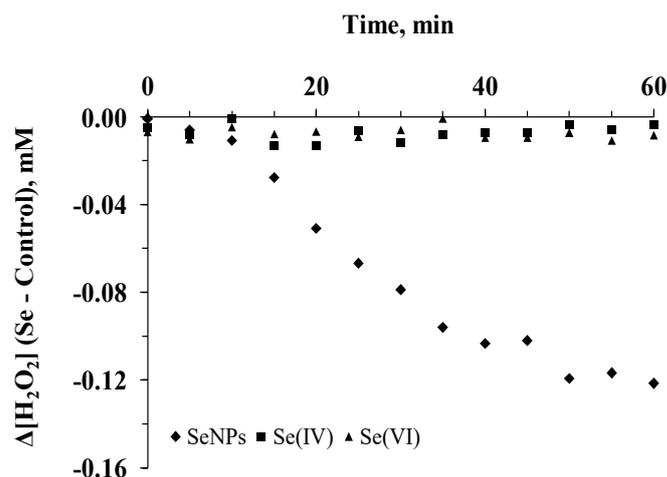
#### 4.4.4.3 Estudio de reacción en sistemas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - SeNPs y Glu-GOX - SeNPs

Las condiciones de reacción fueron seleccionados con base a diferentes experimentos sistemáticos y estimaciones, considerando que se lleva a cabo la reacción presentada en ecuación 21.

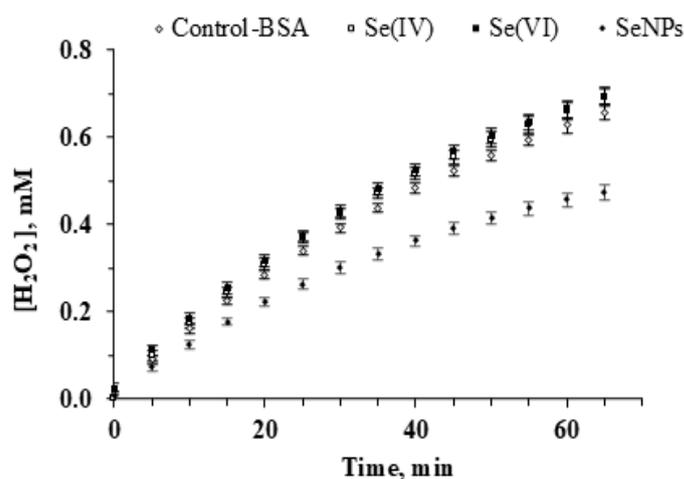


De manera general, la cantidad de SeNPs utilizada para los experimentos de exposición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron ajustados para tener una concentración del selenio oxidado en la solución dentro del rango de calibración del método HG-MP-AES. Como se detalló en la sección experimental, la concentración inicial de SeNPs correspondió a 50 mgSe/L y la concentración de peróxido de hidrógeno fue adicionada en exceso de 5:1. Considerando que la reacción ocurre en relación estequiométrica 3:1 (ver ecuación 24), un exceso de peróxido de hidrógeno fue asegurado. Con esta proporción, es también posible determinar la concentración de peróxido de hidrógeno en la solución utilizando el procedimiento espectrofotométrico descrito en la parte experimental. Cuando el sistema glucosa-glucosa oxidasa fue usado para la generación in vitro de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se calculó que la concentración de peróxido de hidrogeno después de 60 min debería corresponder a 1 mM (esto para una concentración inicial de glucosa de 4 mM y 0.0125 U/mL de GOX, Figura 45, la cual corresponde con un exceso molar 2:1 con respecto a la cantidad de selenio inicial. Por otro lado, muestras controles que no contienen Se fueron preparados y analizados en paralelo.

Adicionalmente, el mismo experimento se realizó también con dos formas inorgánicas de selenio, Se(VI) y Se(IV), utilizando en ambos casos las mismas condiciones de exposición. La concentración de peróxido fue monitoreada en intervalos de 5 minutos durante una hora y los resultados obtenidos de la determinación de peróxido es mostrada en la Figura 46 y 47 para el experimento con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el generado por el sistema Glu-GOX, respectivamente. Para visualizar el efecto del selenio sobre la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la solución, en la Figura 46 se presentan diferencias entre la concentración encontrada en las muestras que contenían Se y la concentración determinada en las muestras control que no contenían selenio, repitiendo el análisis cada cinco minutos durante una hora. Se puede observar un decremento en el contenido de peróxido cuando este fue expuesto a las SeNPs, contrario a las otras dos formas inorgánicas de Se(VI) y Se(VI), las cuales no causaron dicho efecto.



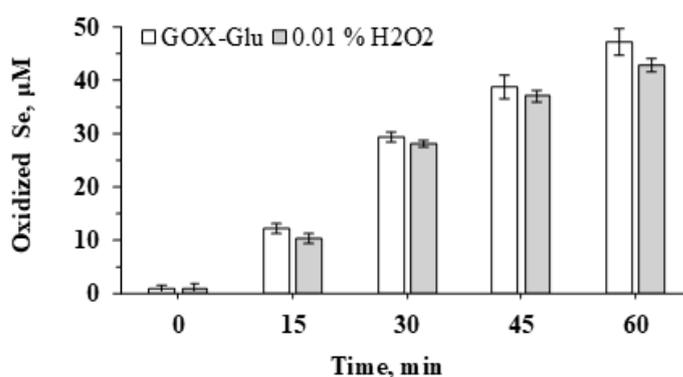
**Figura 46.** Cambios en la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  determinados durante intervalos de 5 minutos durante una hora; en presencia de SeNPs, Se(IV) y Se(VI) (cada solución contenía 50 mgSe/L y 0.01 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), evaluados respecto a la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la solución que no contenía selenio (control). Se presenta el valor promedio de tres replicas, sin embargo, barras de error no son presentadas en el grafico debido a que los valores RSD para los resultados individuales no excedió más de 2 %.



**Figura 47.** Producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el sistema Glu-GOX, determinada en intervalos de 5 minutos durante una hora en ausencia de Se y en presencia de SeNPs, Se(IV) y Se(VI). (Cada solución contenía 50 mgSe/L, 4 mM glucosa y 0.0125 U/mL). Se presenta el valor promedio de tres replicas, y su desviación estándar.

En la Figura 47 se muestra la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producida enzimáticamente en el sistema Glu-GOX en ausencia y en presencia de tres diferentes formas de Se. En este caso, solo las SeNPs causaron un decremento en la concentración de peróxido comparado contra la muestra control.

Por otro lado, el selenio oxidado en las soluciones fue determinado en cada muestra tomando alícuotas cada 15 minutos durante una hora, los resultados obtenidos son presentados en la Figura 48. Cabe mencionar que la determinación se llevó a cabo utilizando el procedimiento HG - MP-AES, previa pre-reducción de Se(VI) a Se(IV). Se puede observar que las concentraciones de Se oxidado, producto de reacción de SeNPs con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron similares en los dos sistemas estudiados (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-SeNPs y Glu-GOX-SeNPs), con ligeramente mayor valor obtenidos cuando peróxido de hidrogeno fue generado enzimáticamente a partir de glucosa.



**Figura 48** Concentraciones de selenio oxidado determinadas en intervalos de 15 minutos en las soluciones correspondientes a los dos sistemas donde el peróxido de hidrógeno fue expuesto a SeNPs.

En Tabla 24 y 25 se presentan las concentraciones de Se en las diferentes soluciones comparadas con los valores esperados de acuerdo con la estequiometría de la Ecuación 21 (oxidación de Se elemental a Se(VI)). Dichas concentraciones esperadas del Se oxidado fueron calculadas a partir del peróxido de hidrogeno determinado espectrofotométricamente. Es decir, el consumo de peróxido de hidrógeno en la reacción con las SeNPs fue obtenida como la diferencia entre la concentración encontrada en las muestras expuestas a Se y los controles no expuestos para cada intervalo medido. Los resultados experimentales presentaron desviaciones respecto a los valores esperados de 1.0 a 5.9% para el sistema Glu-GOX y de 5.4 a 9.7% para la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo cual confirma que la reacción ocurre de acuerdo con la estequiometría de la Ec. 21 y asegura la consistencia de los resultados analíticos obtenidos.

**Tabla 24.** Selenio oxidado determinado en la solución por medio de HG-MP-AES después de exposición a 0.01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con SeNPs para diferentes intervalos de tiempo (experimentalmente) comparando las concentraciones de Se(VI) con las calculadas a partir del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determinado por espectrofotometría y considerando la estequiometría de la reacción mostrada en ecuación 21. El consumo de peróxido en la reacción con las SeNPs es también mostrado en la tabla.

| Tiempo,<br>min | Se oxidado en la solución ± SD, μM <sup>[a]</sup> |             | Δ, % <sup>[b]</sup> | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> reducido,<br>% <sup>[c]</sup> |
|----------------|---|-------------|---------------------|---|
|                | Experimental                                      | Esperado    |                     |   |
| 0              | < QL  | 0.0         | -                   | -   |
| 15             | 10.2 ± 0.1  | 9.32 ± 0.08 | 9.7                 | 1.0   |
| 30             | 28.2 ± 0.2  | 26.3 ± 0.1  | 7.2                 | 3.0   |
| 45             | 37.1 ± 0.2  | 34.1 ± 0.1  | 8.8                 | 4.4   |
| 60             | 42.8 ± 0.3  | 40.6 ± 0.2  | 5.4                 | 5.9   |

[a] promedio y desviación estándar (SD) de tres replicas

[b] Diferencia calculada como  $\Delta = \frac{[\text{Esperado}] - [\text{Experimental}]}{[\text{Esperado}]} * 100$

[c] Porcentaje de la concentración inicial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumida en la reacción con SeNPs.

**Tabla 25.** Selenio oxidado encontrado en la solución después de exposición de NPSe a peróxido de hidrógeno generado en sistema glucosa-GOX para diferentes periodos de tiempo. Los valores esperados fueron calculados a partir de concentraciones H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determinadas espectrofotométricamente y considerando la estequiometría mostrada en la Ecuación 21

| Tiempo,<br>min | Se oxidado en la solución ± SD, μM <sup>[a]</sup> |            | Δ, % <sup>[b]</sup> | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> reducido,<br>% <sup>[c]</sup> |
|----------------|---|------------|---------------------|---|
|                | Experimental                                      | Esperado   |                     |   |
| 0              | < QL  | 0          | -                   | -   |
| 15             | 12.2 ± 0.2  | 12.9 ± 0.1 | 1.0                 | 8.0   |
| 30             | 29.4 ± 0.2  | 26.9 ± 0.1 | 3.0                 | 12.4  |
| 45             | 38.7 ± 0.2  | 39.5 ± 0.2 | 4.4                 | 15.3  |
| 60             | 47.2 ± 0.3  | 50.4 ± 0.2 | 5.9                 | 17.2  |

[a] promedio y desviación estándar (SD) de tres replicas

[b] Diferencia calculada como  $\Delta = \frac{[\text{Esperado}] - [\text{Experimental}]}{[\text{Esperado}]} * 100$

[c] Porcentaje de la concentración inicial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumida en la reacción con SeNPs y con respecto a la producción del sistema Glu-GOX.

Finalmente, el porcentaje de reducción del peróxido de hidrógeno fue calculado como el decremento relativo de su concentración respecto a la concentración inicial en la solución (Tabla 24) o la concentración producida en el sistema Glu-GOX en cada tiempo de reacción medido (Tabla 25). Cuando el peróxido de hidrógeno fue directamente expuesto a las SeNPs, después de 1 h, la reducción fue igual a 5.9% de la concentración original mientras que cuando fue generado enzimáticamente a partir de Glu-GOX, 17.2 % fue reducido durante el mismo intervalo de tiempo.

#### 4.4.5. Conclusión

Los resultados obtenidos en esta etapa del trabajo demuestran la capacidad de las SeNPs como el directo agente reductor del peróxido de hidrógeno a pH fisiológico y en presencia de albumina de suero, siendo el producto de oxidación del Se elemental el Se(VI). Mas importante aún, se demostró con este experimento que las SeNPs actúan como removedores de peróxido de hidrógeno cuando esta especie es generada por medio de reacciones enzimáticas. Las evidencias experimentales de este rol de SeNPs se obtuvieron usando dos sistemas diseñados cuidadosamente, utilizando en ambos experimentos SeNPs sintetizadas con diámetro de  $95 \pm 7$  nm, las cuales fueron añadidas a la solución de  $H_2O_2$  o a la mezcla de Glu-GOX. En ambos casos se mantuvo el pH fisiológico agregando el tampón de fosfatos 450 mM. Las cuantificaciones de Se y de  $H_2O_2$  se llevaron a cabo utilizando procedimientos adoptados a las condiciones del experimento. En concreto, datos cuantitativos para Se y  $H_2O_2$  fueron obtenidos usando generación de hidruros acoplado a espectrometría de emisión atómica (HG-MP-AES) y u procedimiento espectrofotométrico indirecto, respectivamente. En el contexto de estrés oxidativo, la reducción de  $H_2O_2$  por acción de las SeNPs es benéfico, pero también se tiene que considerar la inevitable producción de Se(VI) que puede tener efectos secundarios adversos debido a la conocida toxicidad de esta forma de Se a nivel celular. De manera general, los resultados obtenidos en este capítulo de tesis contribuyen a un mejor entendimiento de la actividad antioxidante de las SeNPs en sistemas biológicos.

## 4.5. Estudio de dos cepas de levadura bajo exposición a Cr(III) dirigido a la producción y caracterización de levadura como suplemento alimenticio.

### 4.5.1 Introducción

Como se mencionó en la introducción de esta tesis, los suplementos dietéticos son productos naturales, intencionalmente enriquecidos con vitaminas, minerales, aminoácidos y/o extractos de ciertos organismos, mismos que se administran para incrementar la ingesta dietética total, complementarla o suplir alguno de sus componentes, reduciendo el riesgo de desarrollar enfermedades<sup>63</sup>. Dentro de los suplementos dietéticos más usados, se encuentran los vitamínicos/ multiminerales, que contienen algunas de las siguientes especies o combinación de ellas: vitaminas A, C, D, E y K, conjunto de vitaminas B; así mismo especies de Ca, Fe, Zn, Co, Se, Cr, etc. En el caso de suplementos que proveen elementos benéficos para la salud, es de suma importancia que contengan concentraciones conocidas y formas adecuadas biodisponibles, bioactivas y estables de los elementos de interés.<sup>134</sup>

Específicamente, el cromo es uno de los elementos químicos extensivamente estudiados en el contexto de salud humana. Se conocen efectos benéficos y adversos, dependiendo de la concentración total, su estado de oxidación e identidad de las especies químicas que entran al organismo para suplementación con Cr(III), existen diversos estudios donde se reportan efectos benéficos para la salud humana, especialmente relacionados con mejoramiento de la función de insulina y decremento de los niveles de triglicéridos; logrando menor incidencia de síndrome metabólico, brinda apoyo en el control de diabetes y mejora el control de masa y composición corporal<sup>2, 3, 11, 50</sup>. Por otro lado, se sabe de algunos casos aislados donde tratamientos prolongados o en dosis altas generan efectos adversos a la salud; incluyendo estrés oxidativo, genotoxicidad y daño renal<sup>61</sup>. Cabe señalar que la EFSA recomienda como dosis de Cr(III) adecuadas en intervalo de 25 a 35 µg/día<sup>5</sup>. Actualmente, exhaustiva investigación es centrada en la búsqueda de suplementos que contengan la forma de Cr(III) más adecuada, buena biodisponibilidad y eficaz para control de metabolismo de carbohidratos y lípidos, evitando al mismo tiempo excesiva acumulación de Cr que pueda provocar efectos adversos<sup>11, 60, 62</sup>. Entre los suplementos más utilizados a nivel mundial y en México son los que contienen picolinato de Cr (CrPic<sub>3</sub>)<sup>170</sup> y la levadura de pan *S. cerevisiae* enriquecida *in vivo*; obtenida agregando cromo al medio de cultivo en forma de cloruro de cromo (III), aunque la identidad química de la especie de Cr(III) en este producto no ha sido elucidada de manera contundente, se ha adoptado el término “factor de tolerancia a glucosa” (GTF, por sus siglas en inglés), en el que el Cr(III) es coordinado con glicina, cisteína, ácido glutámico y ácido nicotínico<sup>18, 53, 171-173</sup>. A

pesar de que la biodisponibilidad de Cr(III) en forma de compuestos inorgánicos como  $\text{CrPic}_3$  es baja (aprox. 2%), la reactividad de ion libre en el ambiente celular puede causar efectos adversos, ya que el Cr(III) puede sustituir Fe(III) en su unión en transferrina, además de que puede formar aductos con otras biomoléculas afectando su estructura y funcionalidad<sup>47, 48</sup>. Aunado a ello, no hay certeza en cuanto a los mecanismos responsables por la absorción y transformación de Cr(III) en el organismo humano.

Durante varias décadas se realizaron estudios muy intensos enfocados en la obtención de productos adecuados para suplementación en humanos con Cr(III). El interés principal en estos estudios ha sido caracterizar las formas/especies del elemento y sus concentraciones, así como evaluar su actividad biológica y establecer las mejores condiciones de su producción (enriquecimiento in vivo)<sup>18, 174, 175</sup>. Por otro lado, relativamente menor esfuerzo se ha dedicado para estudiar el impacto de Cr en los microorganismos utilizados con el fin de transformar formas inorgánicas de estos elementos en las especies orgánicas con mayor actividad biológica. Por su parte, no se han encontrado estudios sobre el impacto de Cr(III) en levadura de pan ni en bacterias probióticas.

Se ha probado también que la levadura enriquecida con concentraciones adecuadas de oligoelementos es segura, rica en proteínas, vitaminas, e inclusive en algunos casos con actividad probiótica y antioxidante; sumado a que se puede realizar de manera reproducible, simple y rápida. Dependiendo de las condiciones de enriquecimiento y el tipo de microorganismo utilizado, la captación, distribución y acumulación de Cr(III) en la biomasa puede diferir, por lo que es necesario realizar su caracterización. Esta parte de proyecto de tesis fue dirigida a obtener cultivos de levadura de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* enriquecida con Cr(III) en medio mínimo YNB (base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos) y comparada con medio rico YPG (extracto de levadura, peptona y glucosa); en ambos cultivos se evaluó el crecimiento celular, producción de biomasa, la cantidad de proteína obtenida y la concentración de cromo en biomasa en diferentes condiciones de exposición.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es lograr una eficiente incorporación de Cr(III) en levadura de *S. cerevisiae* y de *S. boulardii*, examinando estrategias de exposición a diferentes concentraciones de Cr(III) y en dos diferentes medios de crecimiento, medio pobre YNB y rico YPG. Esto con el fin de contribuir en el proceso de obtención de suplementos dietéticos que contengan biodisponibles formas de Cr(III), sin sacrificar el valor nutricional del producto.

#### 4.5.2. Objetivos particulares

- Aislar y propagar las cepas de *S. cerevisiae* y de *S. boulardii*, a partir de levadura de pan comercial y de un probiótico comercial, respectivamente.
- Obtener cultivos de las dos cepas en medio definido YNB (sin aminoácidos y sin sulfato de amonio), bajo exposición a 25mg/L de Cr (III) y un control sin exposición a cromo.
- Obtener cultivos de las dos cepas en medio rico YPD (extracto de levadura, peptona y glucosa), para un control no expuesto y bajo exposición a 250 mg/L de Cr(III).
- Evaluar comparativamente el crecimiento de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* en medios YNB y YPD en base a la biomasa liofilizada y la cantidad de células generadas.
- Determinar la concentración de algunos elementos traza (Zn, Mo, Fe, Cu) y mayoritarios (Na, K, Mg) comparando los resultados obtenidos para dos cepas en dos medios diferentes.
- Determinar la captación de cromo en las fracción citosólica y paredes celulares comparando los resultados obtenidos para las dos cepas en dos medios diferentes.
- Establecer un sistema más prometedor como un posible suplemento nutricional.

#### 4.5.3 Condiciones experimentales

##### 4.5.3.1 Reactivos y muestras

Todos los reactivos fueron de grado analítico, reactivos de la marca Sigma Aldrich fueron ampliamente utilizados. Las muestras y estándares fueron diluidos con agua desionizada (18 MΩ cm Labconco).

Cloruro de cromo (Cr(III)), sulfato de amonio, dextrosa fueron reactivos de Sigma Aldrich.

El medio mínimo YNB (Base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio) fue obtenida de Sigma Aldrich, mientras que medio PDA (agar papa dextrosa), extracto de levadura, y peptona fueron adquiridos en BD Bioxon,

Todas las soluciones de calibración fueron preparadas utilizando agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco) y ácido nítrico (68%) para análisis ultra trazas de la marca Fluka Analytical. Los estándares magnesio, cobre, potasio, calcio, fierro y manganeso fueron adquiridos de Sigma Aldrich con concentración de 1000 mg/L en 5 % HNO<sub>3</sub>, mientras que el estándar de sodio fue de J.T Baker.

Una solución estándar para absorción atómica de Cr con concentración de 1000 mg/L en 1 % HCl de Sigma fue utilizado para calibración y desarrollo de la metodología de MP-AES.

El tuning del instrumento se realizó con una solución a la concentración de 5 mg/L preparada a partir de una mezcla de estándares de calibración de Agilent Technologies que contiene 50 mg/L de Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr, Zn y K a concentración de 50 mg/L en solución de 5.0% HNO<sub>3</sub>.

#### 4.5.3.2 Instrumentación analítica

- Espectrómetro de emisión atómica con plasma de microondas (MP-AES) modelo MP-4100 de Agilent Technologies con generador de nitrógeno Agilent 4107 y con módulo de control de gas externo (EGCM) (Agilent Technologies, California, USA.).
- Espectrofotómetro UV/Vis modelo Multiskan GO (Thermo Scientific).

Equipos utilizados en el procesamiento de muestras y preparación de reactivos

- Purificador de agua Mili-Q WaterPro Ps (Labconco).
- Centrifuga Legend Mrico 17 (Thermo Scientific).
- pH metro 3200P (Agilent Technologies).
- Liofilizador FreeZone 2.5 Plus y Frasco Fast-Freeze 600 mL (Labconco).
- Campana de flujo laminar con lampara UV.
- Micropipetas BioPette™ A de 2 µL, 10 µL, 20 µL, 200 µL, y 1000 µL (Labnet, NJ, USA).

Softwares para análisis de datos

- Agilent Expert MP (actualizado de MP-AES 4200)
- Excel Office 365

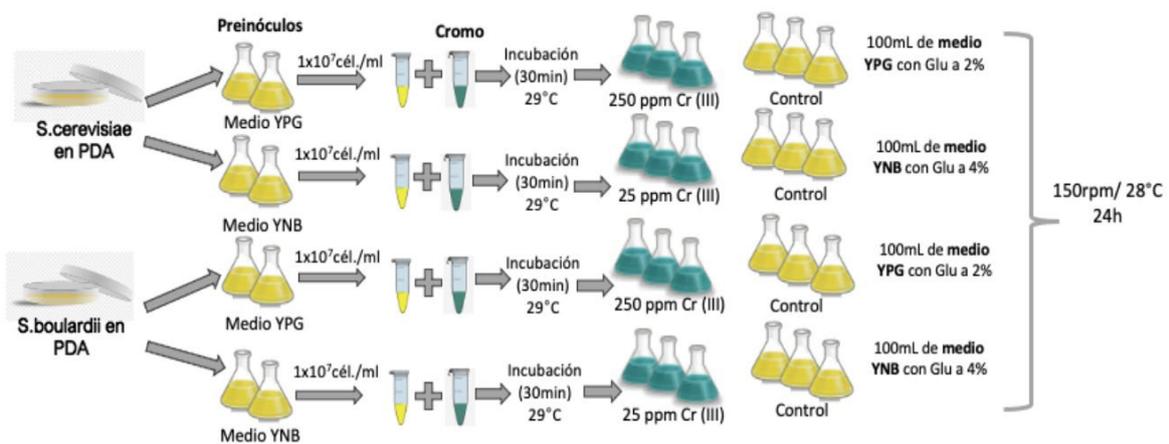
Material biológico

- Levadura panadera de *S. Cerevisiae*
- Levadura probiótica *S. boulardii*

#### 4.5.3.3 Crecimiento de dos cepas de levadura en medio YNB y YPG, enriqueciendo con Cr(III)

Inicialmente, se cultivó de manera individual las cepas de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* en cajas de Petri con medio PDA (agar papa dextrosa). Posteriormente, para la obtención de un preinóculo, cada cepa se cultivó en dos matraces de 250 mL con 100 mL de medio YPG compuesto por 1.0 % (m/v) de extracto de levadura, 2.0 % (m/v) de pectona y 2.0 % (m/v) de glucosa. El segundo medio de cultivo fue medio YNB (base de nitrógeno de levadura, No. de catalogo Y0626) agregando 4.0 % (m/v) de glucosa y 5 g/L de sulfato de amonio. Los cultivos

fueron incubados toda la noche a 28 °C. Posteriormente, las células fueron recuperadas por centrifugación a 3,500 x g y lavadas 3 veces con agua desionizada. Una vez obtenidas las células, se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL un total de  $1 \times 10^7$  células de levadura y se agregó dependiendo del experimento, 0.1 mL y 1.0 mL de Cr (III) de una solución que contenía  $25,000 \text{ mg L}^{-1}$  para los dos experimentos con medio YNB y YPG; un control sin exposición a cromo fue siempre realizado en paralelo. El cromo utilizado fue adicionado en forma de cloruro. Los tubos con células y Cr (III) fueron incubados 30 minutos a 29 °C, transcurrido el tiempo de incubación en presencia de cromo, el contenido de los tubos fue transferido a los matraces de 250 mL con 100 mL de los medios correspondientes. Los matraces fueron incubados por 24 h a 28 °C y 150 rpm. De la misma forma se realizaron los cultivos controles (sin cromo) para cada cepa y medio. Este procedimiento se ejemplifica en la Figura 49. Al finalizar el tiempo de incubación, se midió la D.O a 600 nm y la biomasa fue determinada pesando la pastilla de células para cada uno de los cultivos, después de secar y liofilizar durante 18 h.



**Figura 49.** Diseño experimental para crecimiento de levadura enriquecida con 250 mg/L y 25 mg/L de Cr(III) en medio YPG y YNB, respectivamente. (Tres replicas biológicas fueron estudiadas simultáneamente para cada condición seleccionada).

#### 4.5.3.4 Determinación de cromo total en levadura por MP-AES

Alícuotas de 50 mg de biomasa de las diferentes muestras fueron digeridas con 1 mL de 68 %  $\text{HNO}_3$ . Los tubos fueron calentados a 80°C durante 20 minutos, posteriormente la temperatura se elevó a 120°C y se mantuvo por 3 horas. Cumplido el tiempo las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y las muestras fueron calentadas nuevamente a 120°C por 30 minutos. Posteriormente, los digestos se transfirieron a nuevos tubos eppendorf y se llevó a un volumen de 2 mL con agua desionizada. Las muestras

fueron centrifugadas, diluidas y analizadas por espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (MP-AES). Las longitudes de onda monitoreadas para Cr fueron 425.433 nm y 427.480 nm. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método calibración externa, utilizando seis niveles de concentración en un rango de 30 - 1000 µgCr/L, obteniendo una R<sup>2</sup> de 0.9999 y ecuación de calibración  $Y=1.16 \times 10^4 C - 120$  para longitud de onda de 427.480 nm. Los límites instrumentales de detección y cuantificación fueron 7.9 µgCr/L y 26.6 µgCr/L para 425.433 nm, mientras que 9.4 µgCr/L y 31.4 µgCr/L para 427.480 nm, respectivamente

#### 4.5.3.5 Determinación de algunos elementos mayoritarios y minoritarios por MP-AES

En cuanto al análisis de los elementos mayoritarios (Na, Mg, K y Ca) y trazas (Cu, Fe, Mo, y Zn) realizado por MP-AES, este se llevó a cabo en los mismos digestos de biomasa que se obtuvieron para la determinación de Cr. En la Tabla 26, se presentan los parámetros analíticos obtenidos en el proceso de calibración para cada uno de los elementos. En el caso de Cu, Fe, Mo, Ca, Mg, y Na, el intervalo de calibración fue de 30 a 1000 µg/L, mientras que para Zn en un rango de 50 a 3000 mg/L. En todos los casos, se obtuvo r<sup>2</sup> mayo a 0.999.

**Tabla 26.** Parámetros analíticos del procedimiento por MP-AES evaluados en base al proceso de calibración. Funciones de calibración y coeficientes de linealidad (R<sup>2</sup>), límite de detección (µg/L) y cuantificación (µg/L) instrumentales.

| Elemento | λ (nm) | Calibración (µg/L) | Función de calibración          | R <sup>2</sup> | LD, (µg/L) | LQ, (µg/L) |
|----------|--------|--------------------|---------------------------------|----------------|------------|------------|
| Cu       | 324.75 | 30 – 1000          | $y = 1.55 \times 10^5 c + 488$  | 0.9999         | 2.31       | 6.33       |
| Fe       | 302.06 | 30 – 1000          | $y = 9.76 \times 10^3 c + 32$   | 0.9998         | 3.24       | 9.54       |
| Mo       | 379.82 | 30 – 1000          | $y = 6.22 \times 10^3 c - 7$    | 0.9999         | 6.18       | 18.1       |
| Zn       | 481.05 | 50 - 3000          | $y = 474 c + 5$                 | 0.9998         | 9.44       | 29.3       |
| Ca       | 393.37 | 50 – 1000          | $y = 9.65 \times 10^4 c + 305$  | 0.9988         | 36.4       | 119        |
| Mg       | 279.55 | 50– 1000           | $y = 1.07 \times 10^5 c - 257$  | 0.9999         | 27.2       | 92.2       |
| Na       | 589.59 | 30 – 1000          | $y = 1.77 \times 10^5 c - 102$  | 0.9899         | 39.0       | 130        |
| K        | 266.49 | 50 – 3000          | $y = 2.85 \times 10^4 c + 3932$ | 0.9989         | 25.4       | 85.3       |

#### 4.5.3.6 Determinación de proteína total en extracto de levadura

Para la determinación de proteínas citosólicas, se tomaron alícuotas de 20 mg de biomasa agregando 1 mL de NH<sub>4</sub>OH 0.1 N , la mezcla fue agitada en vortex por 2 minutos. El homogenizado se calentó a 60 °C durante 1 hora y se centrifugó a 12,000 x g por 20 minutos, recuperando tanto el sobrenadante como el pellet. Dos métodos fueron utilizados para hacer

cuantificación de proteínas en los extractos obtenidos, (i) método de Bradford y (i) método de ácido bicinónico (BCA).

Para el ensayo de Bradford, un stock del reactivo (5x) fue preparado disolviendo 100 mg de azul de Coomassie brillante G250 en 25 mL de metanol con 50 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85% , y aforando finalmente a 200 mL. La determinación de proteína se llevó a cabo en una microplaca de 96 pocillos. Para ello, 10 µL de estándar de BSA o de muestra fue mezclada con 240 µL del reactivo de Bradford (1x) y medidos en UV-Vis a 450 nm, 595 nm y 630 nm. La cuantificación de proteína se realizó utilizando calibración externa con seis puntos de calibración, en un rango de 0.2 a 1.0 mg/mL de BSA. La función de regresión lineal de la calibración para el BSA fue  $y = 3.71 x + 0.72$  ( $R^2 > 0.999$ ) y LQ de 0.12 mg/mL. Un ensayo adicional para determinación de proteína fue también realizado también con el kit comercial QuaniPro™ BCA (QPBCA) de Sigma. El método permite monitorear concentración de proteína en un rango de 0.5 a 30 µg/mL a 562 nm. Se inició con la preparación de los reactivos correspondientes, mezclando 7.5 mL del componente QA, compuesto de carbonato de sodio, tartrato de sodio y bicarbonato de sodio en NaOH 0.2 M, pH 11.2 , seguido de adición de 7.5 mL de reactivo QB, que es una solución de ácido bicinónico al 4.0% (m/v) a pH 8.5, y finalmente adicionar 0.3 mL de reactivo QC, que consiste en solución de sulfato de cobre (II) pentahidratado 4.0% (m/v), las soluciones se mezclaron hasta obtener un color verde claro.

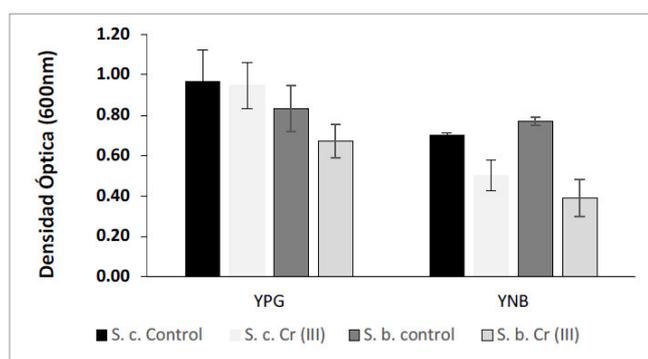
#### 4.5.3.7 Determinación de ácidos nucleicos

Para la determinación de ácido nucleicos en muestras de levadura se utilizó un método espectrofotométrico. Dado que el coeficiente de extinción para el ADN de doble cadena tiene un valor de  $0.020 (\mu\text{g/mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 260 nm; es decir, una absorbancia de 1.0 a 260 nm medida en una celda de 1 cm corresponde a la concentración igual a  $50 \mu\text{g/mL}$ <sup>176</sup>. Se puede estimar la cantidad de ADN en las muestras a partir de esta equivalencia. Para su cuantificación, 2 µL de extracto citosólico fue cargado en la microplaca y se obtuvieron sus espectros de absorción en un rango de 230 a 400 nm. Debido a que la trayectoria de la luz óptica de la µDrop Plate es de 0.5 mm, se debe tener en cuenta un factor de corrección de 20 en los cálculos de concentración, por lo que la concentración de ADN se calcula de la siguiente manera:  $\text{ADN}(\mu\text{g/mL}) = \text{Abs}_{260\text{nm}} \times 50 \times 20$ .

#### 4.5.4 Resultados y Discusión

##### 4.5.4.1 Crecimiento de las levaduras bajo exposición a cromo en medio YNB y YPG

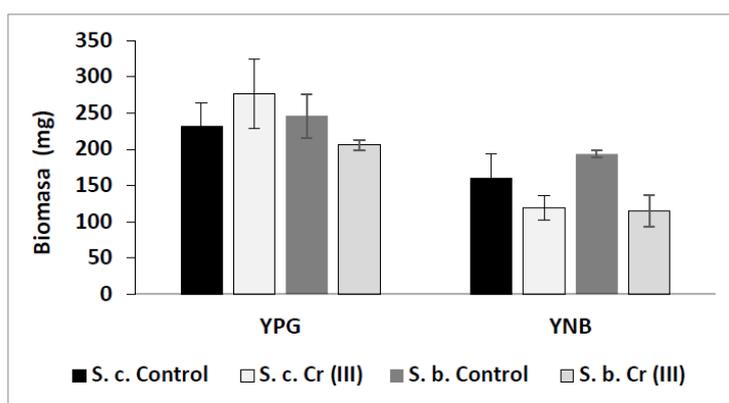
La suplementación con microelementos a partir de levadura enriquecida ofrece buenos resultados debido a que estos elementos están presentes en levadura en sus formas biodisponibles y generalmente no imponen el riesgo toxicológico. Sin embargo, factores como el tipo de cepa utilizada, medio de cultivo, concentración inicial de las sales inorgánicas de interés y la cantidad de inóculo inicial impactan el crecimiento y el rendimiento de enriquecimiento de la levadura con estos oligoelementos. La finalidad de este capítulo fue evaluar el efecto del medio de cultivo y de la concentración de Cr(III) en el medio sobre crecimiento y captación de cromo en biomasa para dos cepas diferentes de levadura. Como se mencionó en la sección 4.5.3.3, se utilizaron dos medios de cultivo, (i) medio mínimo YNB y (ii) medio rico YPG, expuestos a 25 y 250 mg/L de Cr(III), respectivamente. En la Figura 50, se presentan los resultados de crecimiento obtenidos por densidad óptica a 600 nm después de 24 h de crecimiento. En el caso de medio YPG, para *S. cerevisiae* no se observó diferencia en el crecimiento en presencia de 250 mg/L de Cr(III) con respecto al control no expuesto, mientras que para *S. boulardii* hay una disminución en el crecimiento de levadura de aproximadamente 30 % con respecto al control sin exposición. Por otra parte, la presencia de 25 mg/L de Cr(III) en el medio YNB provoca una disminución en el crecimiento entre un 20% y 50 %, para *S. cerevisiae* y *S. boulardii*, respectivamente.



**Figura 50.** Comparación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii* mediante medición de densidad óptica (DO) a 600 nm. Los resultados se obtuvieron tras 24 h de cultivo en medio YPG enriquecido con 250 mg/L de Cr(III) y en medio YNB enriquecido con 25 mg/L de Cr(III). Los controles sin exposición a cromo fueron incluidos para cada condición evaluada.

Asimismo, se determinó la biomasa total por peso seco después de 24 h de crecimiento. Los resultados obtenidos son concordantes con la tendencia encontrada en las mediciones de DO a 600 nm. Por ejemplo, en medio YPG inoculado con *S. cerevisiae*, un aumento fue observado en las muestras expuestas a 250 mg/L de Cr(III) al pasar de  $231 \pm 32$  mg en muestra control hasta  $276 \pm 47$  mg en las expuestas. Mientras que para *S. boulardii*, se observó una disminución en la biomasa desde  $246 \pm 20$  mg presente en control no expuesto hasta  $205 \pm 7$  mg en la muestra con exposición a Cr(III). Por el contrario, en medio YNB, la biomasa obtenida después de 24 h fue siempre menor en las muestras con exposición a cromo. Particularmente, en *S. boulardii* una disminución del 40 % fue notoria al pasar de  $193 \pm 4$  mg hasta  $115 \pm 20$  mg en las muestras expuestas a 25 mg/L de Cr(III). Mientras que en *S. cerevisiae*, la disminución de biomasa pasó de  $160 \pm 33$  mg (controles no expuestos) hasta  $119 \pm 16$  mg en presencia de Cr(III), equivalente a una disminución aproximada del 25 %.

De acuerdo con los resultados de densidad óptica y biomasa total (Figuras 50 y 51) se puede inferir que hay mayor producción de biomasa en ambas cepas cuando se utiliza medio de cultivo rico YPG y que las cepas presentan mayor tolerancia a Cr(III) cuando crecen en medio rico. En el caso de la cepa *S. boulardii*, la biomasa se ve disminuida por la presencia de Cr(III) en los dos medios de crecimiento utilizados. Es necesario evaluar la cantidad de cromo adsorbida por la levadura en ambos medios para determinar la eficiencia de retención de cromo.

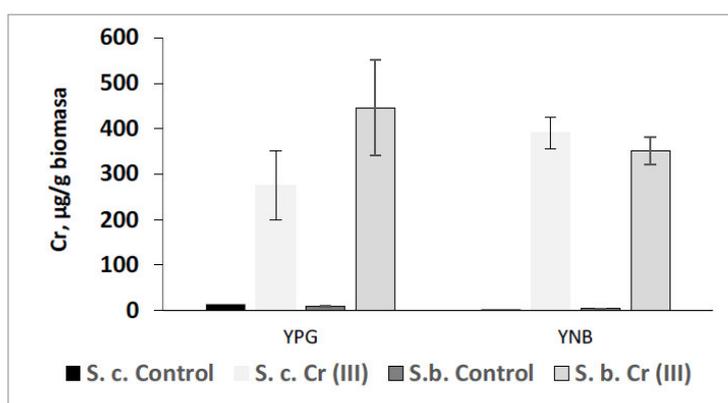


**Figura 51** Efecto del cromo en el crecimiento de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* evaluado por peso seco de biomasa tras 24 h de cultivo. (a) Resultados obtenidos en medio YPG sin Cr (control no expuesto) y enriquecido con 250 mg/L de Cr(III). (b) Resultados obtenidos en medio YNB sin Cr (control no expuesto) y enriquecido con 25 mg/L de Cr(III)

#### 4.5.4.2 Determinación de cromo total en la biomasa de levadura

Actualmente, la forma más común de enriquecer levadura con cromo es a partir de crecimiento de levadura bajo exposición a  $\text{CrCl}_3$ <sup>177</sup>. La eficiencia de incorporación de cromo a biomasa es afectada principalmente por el tipo de medio de cultivo y la forma en la que se administra el cromo. En este trabajo, se utilizó la estrategia de exposición de preinoculo a Cr(III) con el fin de acondicionar las cepas a la presencia de este elemento (Fig. 49), obteniendo un mejor crecimiento y una mejor captación de cromo en el siguiente ciclo de crecimiento comparando con el uso de preinoculos obtenidos en ausencia de Cr(III).. Los resultados obtenidos en la determinación de cromo en biomasa de levadura se muestran en la Figura 52, expresados como  $\mu\text{g}$  de Cr/g en biomasa seca,. Para *S. cerevisiae*, se observa una mayor incorporación de cromo en medio YNB ( $391 \pm 34 \mu\text{g}$  Cr/g de biomasa) comparada con el medio YPG ( $272 \pm 76 \mu\text{g}$  Cr/g de biomasa). Por su parte, en la cepa de *S. boulardii*, se obtuvo más alta concentración de Cr cuando se usó medio YPG ( $447 \pm 104 \mu\text{g}$  Cr/g de biomasa), respecto el resultado obtenido para YNB ( $351 \pm 30 \mu\text{g}$  Cr/ g de biomasa).

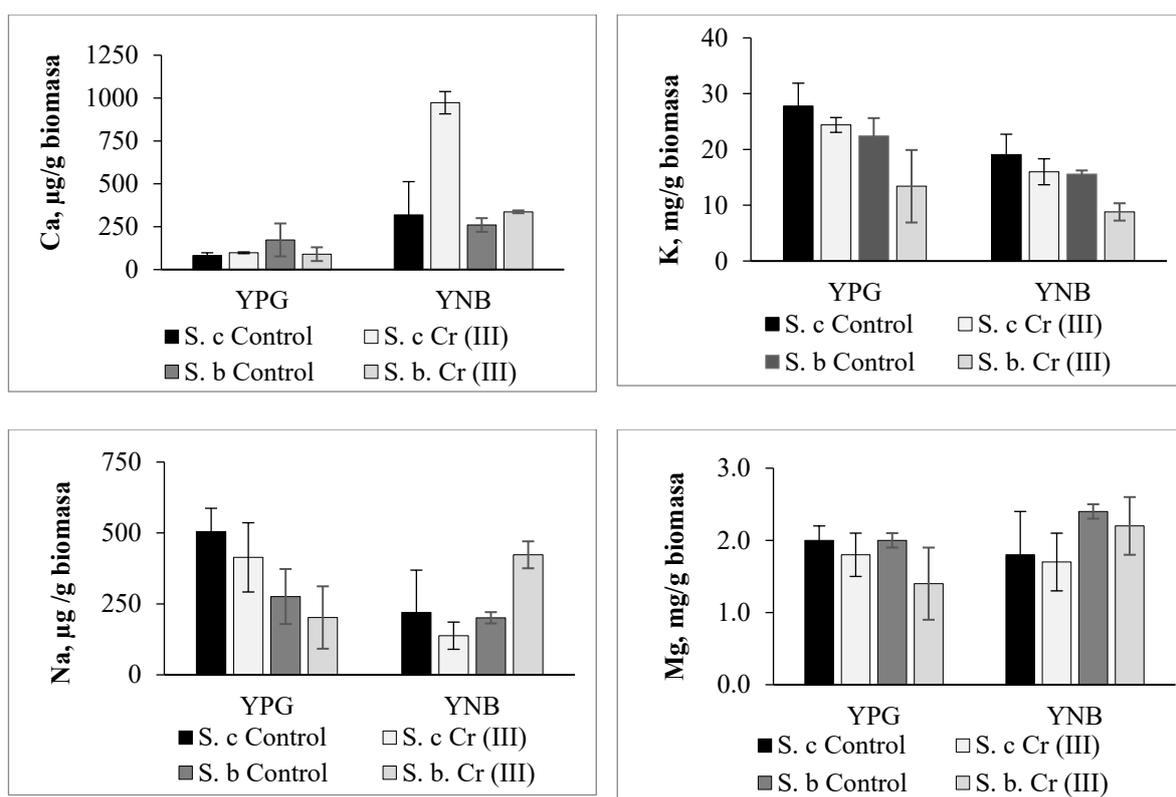
Ya se ha mencionado una mayor tolerancia de ambas cepas a Cr(III) en medio rico respecto el medio pobre; por ello, la concentración de Cr(III) en medio rico YPG fue de 250 mgCr/L mientras que en medio mínimo YNB 25 mg/L. Ambos valores fueron seleccionadas en base a lo reportado en otros estudios<sup>178</sup>. Sin embargo, es interesante que la incorporación de cromo fue muy parecida en ambos casos estudiados según los datos obtenidos por MP-AES. Estos resultados concuerdan con lo reportado en literatura, donde una composición química compleja del medio de cultivo tiende a disminuir la biodisponibilidad de Cr(III)<sup>171</sup>. Este hallazgo es importante porque permite seleccionar el medio YNB, asegurando la misma incorporación de Cr(III) que en medio YPG, pero utilizando 10 veces más baja concentración de cromo en medio de cultivo.



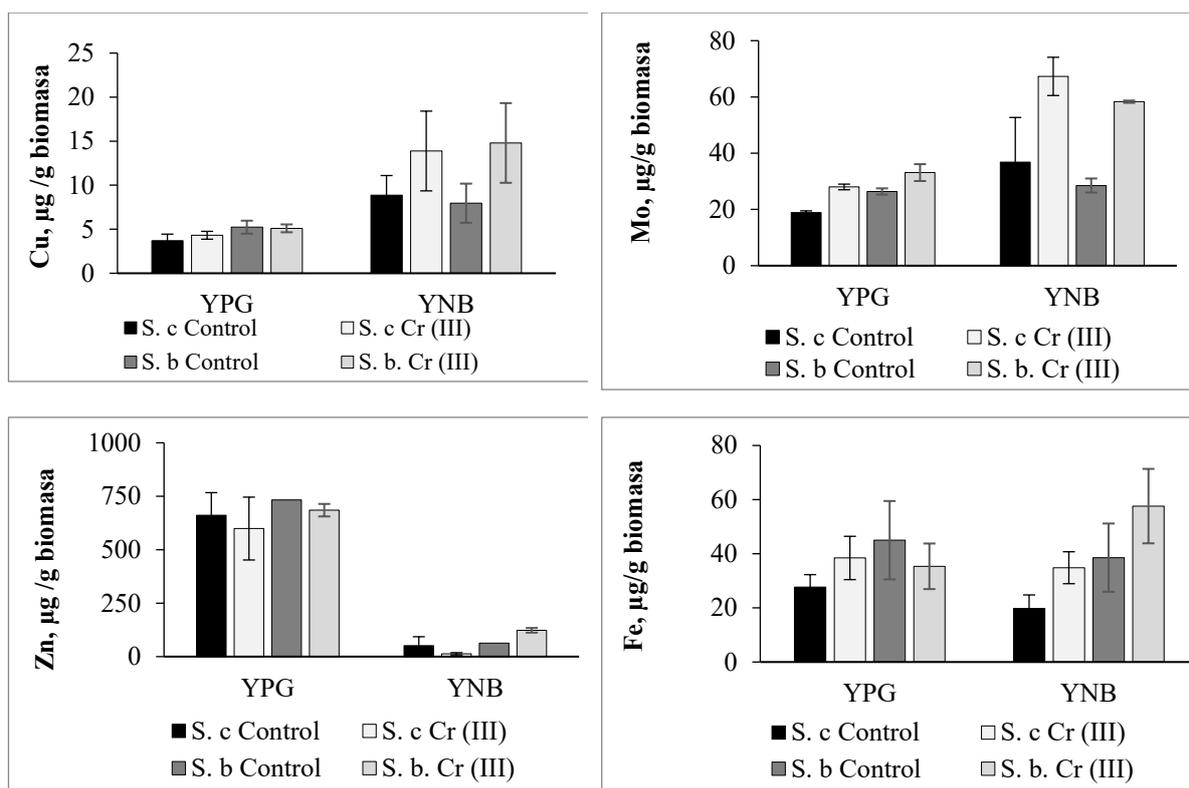
**Figura 52.** Determinación de cromo total incorporado en biomasa de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* mediante MP-AES tras digestión ácida con HNO<sub>3</sub>. La biomasa fue obtenida después de 24 h de cultivo en medio YPG enriquecido con 250 mg/L Cr(III) y medio YNB enriquecido con 25 mg/L Cr(III), respectivamente. (Controles sin exposición a cromo fueron corridos siempre en paralelo).

#### 4.5.4.3 Determinación de elementos mayoritarios y minoritarios en biomasa de levadura

Por otro lado, fue de particular interés conocer también como se modifican los perfiles de elementos mayoritarios y elementos traza beneficios para la salud (importantes en suplementación) entre muestras con y sin exposición a cromo. Para ello un análisis elemental se llevó a cabo en biomasa, obteniéndose los resultados presentados en Figura 53 y Figura 54, para elementos mayoritarios y algunos traza, respectivamente.



**Figura 53.** Perfil de elementos mayoritarios (Ca, K, Na y Mg) obtenidos de la biomasa digerida con HNO<sub>3</sub> y determinadas por MP-AES. Análisis de biomasa crecida en medio YPD y YNB, utilizando *S. cerevisiae* y *S. boulardii* con exposición a 25 mg/L de Cr(III) y comparadas contra un control no expuesto.



**Figura 54.** Perfil de elementos minoritarios (Cu, Mo, Zn y Fe) obtenidos de la biomasa digerida con  $\text{HNO}_3$  y determinadas por MP-AES. Análisis de biomasa crecida en medio YPD y YNB, utilizando *S. cerevisiae* y *S. boulardii* con exposición a 25 mg/L de Cr(III) y comparadas contra un control no expuesto.

En relación con los perfiles de elementos minoritarios, se observó que la concentración de cobre en la biomasa no presentó cambios significativos entre *S. cerevisiae* y *S. boulardii* en medio YPD, independientemente de la presencia o no de Cr(III). Sin embargo, en medio YNB, la cantidad de cobre incorporada en la biomasa se duplicó en ambas cepas cuando el medio contenía Cr(III). Para el molibdeno, en *S. cerevisiae* se detectó un incremento en su incorporación en la biomasa cuando ambos medios fueron enriquecidos con Cr(III), mientras que en *S. boulardii*, este aumento solo se presentó en el medio YNB. Por otro lado, los niveles de hierro no mostraron diferencias significativas entre las dos cepas o debido a la adición de Cr(III) en medio YPD. No obstante, en medio YNB, se registró un mayor enriquecimiento de hierro en la biomasa cuando el medio fue suplementado con Cr(III). Los resultados para Zn son difíciles de interpretar; este es un elemento omnipresente y la mayor concentración encontrada en biomasa de levadura crecida en medio rico simplemente refleja su alto contenido en este medio. Respecto a los elementos mayoritarios (Ca, K, Na y Mg), los resultados mostraron que en *S. cerevisiae* hubo una mayor incorporación de calcio en medio YNB en presencia de Cr(III),

mientras que el potasio disminuyó en estas mismas condiciones. Asimismo, las concentraciones de sodio y magnesio no presentaron cambios estadísticamente significativos entre los tratamientos evaluados.

Estos hallazgos sugieren que la composición del medio YPD favorece una mayor incorporación de Cu, Mg y Fe en ambas cepas cuando los cultivos son enriquecidos con Cr(III). Sin embargo, esta ventaja tiene el efecto secundario de reducir la incorporación de potasio en la biomasa. En contraste, el medio YNB parece ser más eficiente para potenciar la incorporación de ciertos elementos como el calcio, especialmente en *S. cerevisiae*, mientras que también permite un enriquecimiento significativo de Fe y Cu en presencia de Cr(III). Este comportamiento diferencial entre los medios y las cepas subraya la importancia de optimizar las condiciones de cultivo para maximizar el contenido de elementos esenciales.

#### 4.5.4.4 Determinación de proteína total en muestras de las levaduras

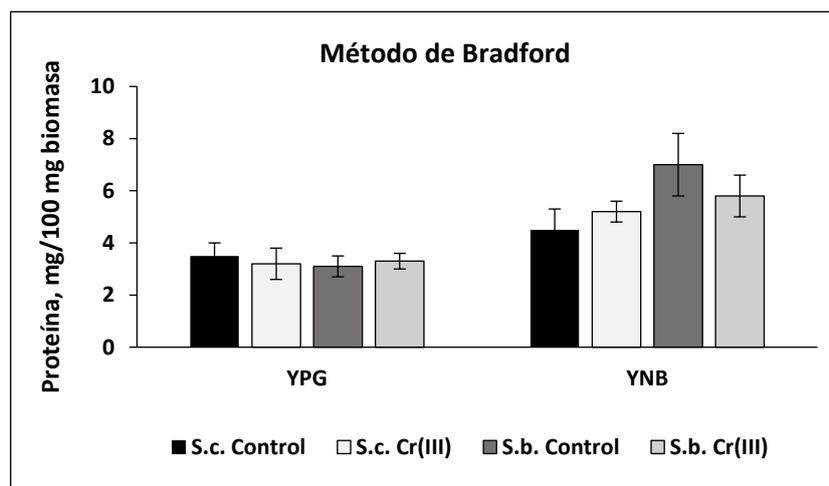
La levadura es una fuente rica en proteínas y su contenido proteico puede llegar hasta un 54% (m/m), considerada como un producto de alto valor nutricional al contener ocho aminoácidos esenciales<sup>179</sup>. Por otro lado, las proteínas tienen capacidad de unir diferentes formas de metales lo que altera su estructura y funcionalidad además de causar acumulación de excesivas cantidades de estos elementos y un riesgo de efectos tóxicos.. En el caso particular del cromo, la forma más aceptada presente en levadura se le conoce como factor de tolerancia a la glucosa (GTF por sus siglas en inglés), mencionado ya en varios puntos del texto<sup>49</sup>.

Para determinar el efecto de Cr(III) sobre el contenido de proteínas citosólicas en levadura, se realizó la lisis y extracción mediante tratamientos con NH<sub>4</sub>OH 0.1 N. El efecto del cromo en la concentración de proteína obtenida en la fracción soluble (fracción citosólica) fue evaluada por medio de la determinación de proteína total por dos métodos: (i) Bradford y (ii) BCA.

Con base en el análisis de muestras de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* cultivadas en medios YPG y YNB (tres réplicas independientes por cada condición), no se observaron diferencias significativas en la concentración de proteína en la biomasa entre las muestras expuestas y no expuestas a cromo. Los resultados obtenidos mediante el método de Bradford se presentan en la Figura 55. Para las dos cepas cultivadas en medio YPG, la presencia de cromo tampoco afectó la concentración de proteína, manteniéndose en niveles aproximados a 4.0 mg de proteína/100 mg de biomasa para la condición control sin exposición y la expuesta a cromo. En contraste, en el caso de *S. boulardii* en medio YNB, la exposición a Cr(III) redujo significativamente la concentración de proteína, pasando de  $7.2 \pm 1.4$  mg de proteína/100 mg

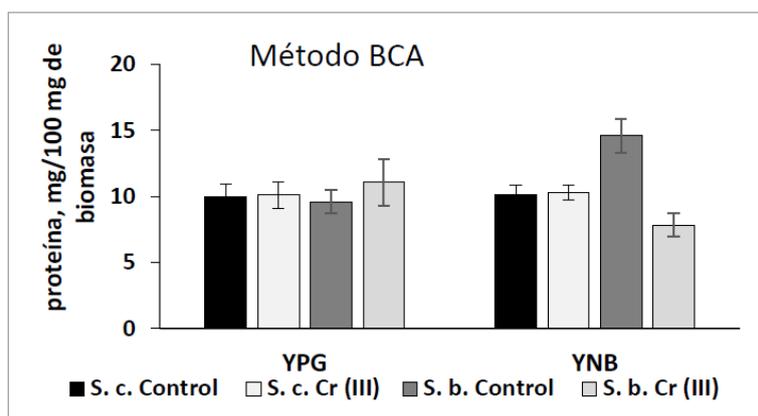
de biomasa en el control hasta una concentración final de  $5.5 \pm 1.9$  mg de proteína/100 mg de biomasa en la muestra expuesta a cromo.

Es importante destacar que, en general, las muestras cultivadas en medio YNB mostraron una mayor concentración de proteína en comparación con aquellas cultivadas en medio YPG, un resultado que contrasta con lo esperado, ya que el medio YPG se considera con mayor disponibilidad de nutrientes.



**Figura 55.** Determinación de proteína total en *S. cerevisiae* y *S. boulardii* por método de Bradford. El extracto libre de células se obtuvo por hidrólisis con  $\text{NH}_4\text{OH}$  de 20 mg de biomasa cultivada durante 24 h en medios YPG y YNB. Los ensayos incluyeron controles sin exposición y muestras con 250 mg/L de Cr(III) para medio YPG y 25 mg/L de Cr(III) para medio YNB. La concentración de proteína se expresa en mg de proteína por cada 100 mg de biomasa.

En la Figura 56 se presentan los resultados de la determinación de proteínas utilizando el método de BCA (ensayo del ácido bicinónico). Para ambas cepas de levadura en medio YPG, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas entre las muestras expuestas a cromo y los controles no expuestos. En el medio mínimo YNB, se observó la misma tendencia que en la metodología de Bradford, sin cambios significativos en la concentración de proteínas. Estos resultados permiten concluir que la mayor cantidad de proteína se obtiene en medio mínimo YNB en ambas cepas. (Ver Figura 55 y Figura 56).



**Figura 56.** Determinación de proteína total en *S. cerevisiae* y *S. boulardii* por método de BCA. El extracto libre de células se obtuvo por hidrólisis con  $\text{NH}_4\text{OH}$  de 20 mg de biomasa cultivada durante 24 h en medios YPG y YNB. Los ensayos incluyeron controles sin exposición y muestras con 250 mg/L de Cr(III) para medio YPG y 25 mg/L de Cr(III) para medio YNB. La concentración de proteína es expresada en mg de proteína por cada 100 mg de biomasa

#### 4.5.4.5 Determinación de cromo total en fracción citosólica y pellet después de hidrólisis

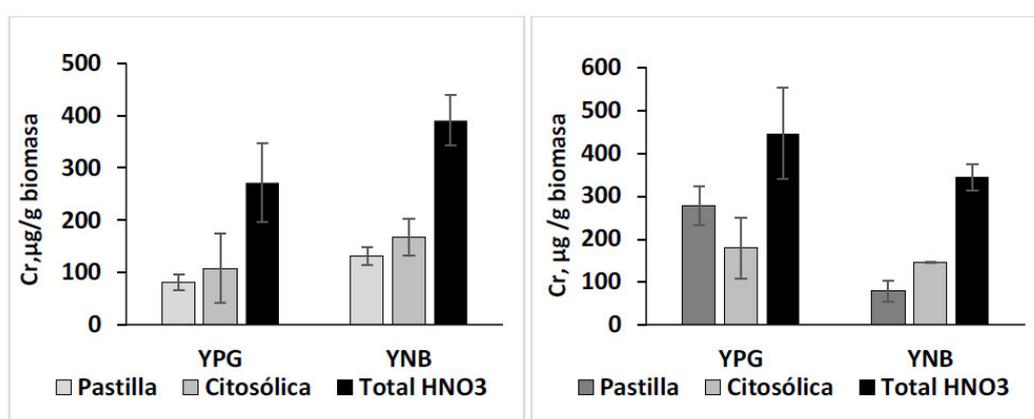
Como se mencionó anteriormente, la forma más fácilmente asimilable de cromo es a través de una forma de cromo orgánica, es decir, unido a aminoácidos, proteínas o metabolitos.<sup>180</sup> Con este antecedente, se realizó un estudio para determinar en qué fracción de las células se concentra mayor cantidad de Cr, analizando tanto la fracción insoluble (pellet) como la fracción soluble o citosólica. El procedimiento consistió en separar la parte citosólica (rica en proteínas y metabolitos) y las paredes celulares (pellet) después de la lisis celular. El sobrenadante fue secado en SpeedVac y la pastilla fue liofilizada. Ambas fracciones se sometieron a digestión ácida con  $\text{HNO}_3$ , y el contenido de Cr se cuantificó por MP-AES.

En la Figura 57 se presentan los resultados obtenidos. En *S. cerevisiae* cultivada en medio YPG, la fracción insoluble (pellet) contenía 81  $\mu\text{g}$  Cr/g biomasa, mientras que la mayor concentración se detectó en la fracción citosólica, con 108  $\mu\text{g}$  Cr/g biomasa. La suma de ambas fracciones representó una recuperación del 67.2 % respecto al Cr total inicial (272  $\mu\text{g}$  Cr/g biomasa). Mientras que, en medio YNB se observó la misma tendencia, con una menor concentración en pellet (131  $\mu\text{g}$  Cr/g biomasa) y una mayor concentración en la fracción citosólica (168  $\mu\text{g}$  Cr/g biomasa). La recuperación total en este caso fue del 71.1 % con respecto al Cr inicial determinado.

Por otro lado, en la cepa de *S. boulardii* cultivada en medio YPG, se detectó un aumento significativo de Cr en la pastilla, alcanzando 278  $\mu\text{g}$  Cr/g biomasa, mientras que la fracción

citoplasmática solo se cuantificó 178.9  $\mu\text{g Cr/g}$  biomasa. La suma de ambas fracciones resultó en una recuperación aparente de cromo de 107.2%. Por último, en el caso del medio YNB, el pellet tuvo una menor concentración de Cr (79.3  $\mu\text{g Cr/g}$  biomasa) con respecto a la fracción citoplasmática, que contenía 145.9  $\mu\text{g Cr/g}$  biomasa.

Con base en estos resultados, el medio YNB se perfila como la mejor opción para la producción de células enriquecidas con Cr(III), dado que favorece una mayor concentración de cromo en la fracción citoplasmática, la cual refleja la incorporación de Cr al interior de la célula y posiblemente su forma biodisponible. Además, este medio requiere una menor cantidad de Cr inicial, lo que lo hace más eficiente y sostenible para aplicaciones biotecnológicas.



**Figura 57.** Determinación de cromo total determinado por MP-AES en pellet y la fracción citoplasmática de las cepas *S. cerevisiae* y *S. boulardii*, comparando el cromo total adsorbido en la biomasa de las levaduras. La biomasa se obtuvo tras 24 h de cultivo en medio YPG enriquecido con 250 mg/L Cr(III) y en medio YNB enriquecido con 25 mg/L de Cr(III).

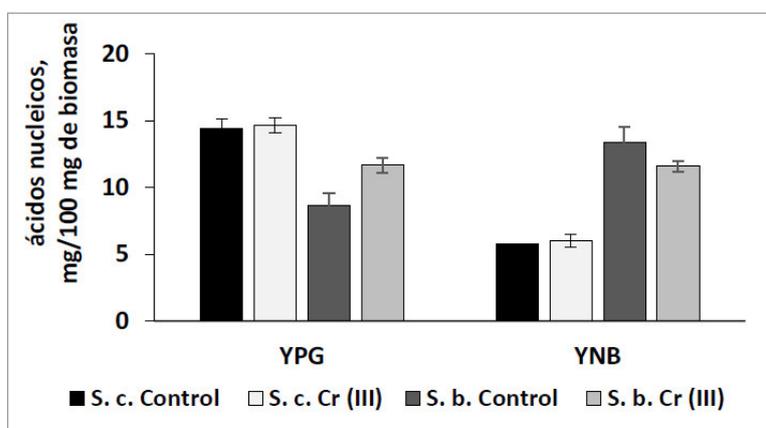
#### 4.5.4.6 Determinación de ácido nucleicos en levadura

La evaluación de la cantidad de ácidos nucleicos (AN) en alimentos y suplementos alimenticios es crucial, ya que concentraciones elevadas de purinas pueden influir directamente en el metabolismo del ácido úrico. La ingesta humana superior a 2 g de AN/día puede incrementar los niveles de ácido úrico en sangre, desencadenando hiperuricemia y aumentando el riesgo de cálculos renales. Alimentos como el hígado, sardinas y levadura presentan altas concentraciones de purinas. Por lo tanto, es fundamental cuantificar impurezas de AN presentes en la levadura enriquecida, especialmente si son encontradas en la parte proteica, ya que podría limitar su aplicación en la nutrición humana.<sup>181</sup> El límite máximo permitido es 2% de AN en base a peso seco (m/m) para garantizar la seguridad en el consumo exclusivo de levadura.<sup>181</sup> No obstante, la concentración típica de AN en la biomasa de levadura varía entre 5% y 8%,

superando ampliamente los niveles recomendados. En la Figura 58 se presentan los resultados de la determinación de ácidos nucleicos en extractos obtenidos de 100 mg de biomasa libre de células. Las concentraciones más altas se observaron en *S. cerevisiae* cultivada en medio YPG, independientemente de la presencia de cromo (14 mg AN/100 mg de biomasa). Curiosamente, los valores más bajos también se obtuvieron en *S. cerevisiae* cultivada en medio YNB (6.0 mg AN/100 mg de biomasa).

En el caso de *S. boulardii*, la presencia de 250 mg/L de Cr(III) en el medio YPG provocó un aumento en los niveles de ácido nucleicos, de 8.7 mg a 11.3 mg de AN por cada 100 mg de biomasa. Sin embargo, en el medio YNB, la adición de 25 mg/L de Cr(III) resultó en una ligera disminución en las concentraciones de ácidos nucleicos.

Aunque los valores de AN detectados en todas las muestras superan el límite recomendado (2 % de AN), resalta la necesidad de implementar estrategias para reducir su contenido en levadura y así garantizar su seguridad de consumo. Entre los métodos sugeridos para disminuir los niveles de AN destacan la hidrólisis alcalina, la precipitación ácida o el choque térmico (60–90°C). Otra alternativa eficiente podría ser la activación de nucleasas endógenas mediante la extensión del tiempo de incubación de la levadura hasta la etapa final de la fase estacionaria.



**Figura 58.** Determinación de ácidos nucleicos por UV-Vis a 260 nm para las cepas de *S. cerevisiae* y *S. Boulardii*. El extracto libre de células se obtuvo por hidrólisis de  $\text{NH}_4\text{OH}$  de 20 mg de biomasa obtenida después de 24 h de crecimiento en medio YPG enriquecida con 250 mg/L Cr(III) y medio YNB enriquecido con 25 mg/L de Cr(III).

#### 4.5.5 Conclusiones

En este capítulo de tesis, se obtuvieron cultivos de dos cepas de levaduras (*S. cerevisiae* y *S. boulardii*) enriquecidas con Cr(III) en forma de  $\text{CrCl}_3$ , utilizando dos medios de cultivo, YPG y YNB. Los resultados demostraron que la mayor producción de biomasa ocurre en el medio YPG para ambas cepas. Sin embargo, la presencia de Cr(III) no afectó significativamente el crecimiento de *S. cerevisiae* en este medio, mientras que en *S. boulardii* la exposición a Cr(III) tuvo un impacto negativo en el crecimiento en ambos medios.

En cuanto a la incorporación de cromo, *S. cerevisiae* mostró una captación de  $272 \pm 76$  y  $391 \pm 34$   $\mu\text{g Cr/g}$  de biomasa en los medios YPG y YNB, respectivamente, mientras que *S. boulardii* captó entre  $351 \pm 30$  y  $447 \pm 104$   $\mu\text{g Cr/g}$ , respectivamente. Aunque las concentraciones de cromo adsorbido fueron similares entre los medios, se concluyó que el medio YNB es el medio más adecuado, debido a que permitió un efectivo bio-enriquecimiento utilizando diez veces menos de Cr(III) que en el medio YPG.

En cuanto al análisis de proteínas, en medio YPG y YNB, no se observaron diferencias significativas en la concentración de proteínas entre las dos cepas con o sin presencia de Cr(III). En relación con la distribución del contenido proteico entre las fracciones analizadas (citósolica y pellet), se concluyó que la concentración de cromo aumentó ligeramente en la fracción citósolica cuando se utilizó medio YNB, mientras que en YPG, la mayor concentración de Cr se encontró en el pellet de *S. boulardii*.

Por último, los niveles más bajos de ácidos nucleicos se detectaron en *S. cerevisiae* cultivada en medio YNB, con aproximadamente 5 mg de ácidos nucleicos por cada 100 mg de biomasa. Este resultado es significativo, ya que niveles elevados de ácidos nucleicos pueden limitar la aplicabilidad de la levadura como suplemento alimenticio.

Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos de biomasa total, concentraciones de cromo, de proteínas citosólicas totales y de AN en todas las muestras analizadas, se puede concluir que la mejor opción según los parámetros evaluados fue el crecimiento de *S. cerevisiae* en medio YNB expuesto a 25 mg/L de Cr(III). Aunque se produjo menor cantidad de biomasa en estas condiciones, se logró una similar incorporación de cromo y similares concentraciones de proteína total, comparando con medio rico y exposición a más altas concentraciones de Cr(III). Lo más relevante es que se determinaron los niveles más bajos de AN en la biomasa analizada, pronosticándola como la forma más eficiente de enriquecimiento de levadura con

romo, poniéndola como una alternativa prometedora para la producción de suplementos alimenticios seguros y funcionales, logrando potencializar sus efectos benéficos para la salud.

## 5. Conclusiones

El trabajo de tesis aborda un estudio integral del impacto de selenio (Se) en levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*), explorando aspectos relacionados con el crecimiento celular, la incorporación de este elemento, su fraccionamiento isotópico, un estudio proteómico con marcaje metabólico y la evaluación de SeNPs como protección antioxidante mediante eliminación de peróxido de hidrógeno. Mientras que en el caso de cromo dos cepas de levadura fueron utilizadas, una panadera (*Saccharomyces cerevisiae*) y la otra del tipo probiótica (*Saccharomyces boulardii*); ambas especies fueron estudiadas enfocándose principalmente en la evaluación del crecimiento celular, la concentración de proteína obtenida en biomasa y la eficiencia de captación del cromo, dependiendo de estrategia de bio-enriquecimiento. Los resultados obtenidos en ambas partes contribuyen en un mejor entendimiento de los mecanismos biológicos y las potenciales aplicaciones biotecnológicas de levaduras enriquecidas con estos elementos esenciales, destacando su relevancia como suplementos para mejorar la salud humana.

En cuanto a la levadura bio-fortificada con Se, se establecieron las condiciones del cultivo de *S. cerevisiae* para lograr un eficiente marcaje metabólico utilizando sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno, ya sea en su forma isotópica natural  $^{14}\text{N}$ , o como enriquecida isotópicamente con  $^{15}\text{N}$ . Este marcaje no afectó el crecimiento ni la producción de biomasa, lo que permitió realizar estudios comparativos entre organismos expuestos a Se(IV) respecto controles no-expuestos de manera confiable. Durante la biofortificación con Se(IV), se observó la reducción extracelular de Se(IV) a  $\text{Se}^0$  y la incorporación de Se(IV) a las células; en ambos procesos se demostró la preferencia por los isótopos ligeros de Se.. Se demostró que la incorporación de Se fue significativamente mayor en presencia de nitrógeno pesado, incrementándose hasta un 92% en comparación con la levadura cultivada en condiciones isotópicas naturales. Considerando evidencia reportada donde isótopos pesados de ciertos elementos son encontrados en células tumorosas, surge la hipótesis de que la mayor presencia de isótopos ligeros en la composición de Se en levadura podría contribuir a su eficacia en su actividad quimiopreventiva de cáncer.

Por otro lado, durante el estudio de proteómica comparativa de levadura utilizando la estrategia de marcaje metabólico, no se encontraron diferencias en el crecimiento de los

microorganismos entre levadura ligera y pesada, con o sin presencia de Se, 10 mg/L. Enseguida se determinó que el porcentaje de incorporación isotópico con  $^{15}\text{N}$  en las proteínas de levadura fue equivalente a  $98 \pm 0.8 \%$ . El estudio proteómico realizado se enfocó en las proteínas citosólicas, generando primeramente una librería local con un total de 370 proteínas identificadas en las muestras de levadura control no expuesta a Se y de cultivo expuesto a Se(IV), 10 mg/L. Para el estudio comparativo, antes de la digestión enzimática, se mezclaron las proteínas provenientes de cultivos  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$  (proporción 1:1). Para estas muestras, se analizaron ocho fracciones de un gel SDS-PAGE por capLC-ESI(+)-QTOF-MS de manera individual, encontrando seleno péptidos en la Fracción 4. Con el uso de las herramientas de análisis de datos, se encontraron en total de 90 proteínas, identificando 10 péptidos con Se incorporado en metionina; dichos péptidos correspondieron a tres proteínas diferentes (y sus isoformas), piruvato quinasa, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, y el piruvato descarboxilasa, las cuales son claves en el metabolismo de la glucosa y fermentación en levadura, y cuya sobreexpresión bajo exposición a Se(IV) estuvo asociada con un aumento significativo en la producción de etanol. Los resultados fueron confirmados mediante la determinación de etanol por GC-FID, obteniendo valores de  $5.1 \pm 0.08$  g etanol/g biomasa y  $6.7 \pm 0.06$  g etanol/g biomasa, para control no expuesto y para levadura expuesta a Se, respectivamente; encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.023$  y  $T_{exp} = -4.4$ ,  $T_{crit} = 2.91$ ). Los resultados obtenidos confirman que Se estimula la producción de etanol en levadura. Estos hallazgos subrayan el papel modulador del Se en rutas metabólicas esenciales de la levadura, lo que amplía su potencial para aplicaciones biotecnológicas, incluyendo también el diseño de alimentos funcionales.

En la parte de estudio enfocada a la actividad antioxidante de NPSe, se sintetizaron nanopartículas con diámetro de  $96 \pm 7$  nm, las cuales fueron agregadas a una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o a una mezcla de Glu-GOX, en ambos casos se mantuvo pH fisiológico añadiendo tampón de fosfatos 50 mM. Los resultados cuantitativos para la concentración de Se y  $\text{H}_2\text{O}_2$  a diferentes tiempos de reacción fueron obtenidos por HG-MP-AES y un procedimiento espectrofotométrico indirecto, respectivamente. En base a estos resultados, se demostró la capacidad de las SeNPs como el directo agente reductor del peróxido de hidrógeno a pH fisiológico y en presencia de albumina de suero. Más importante aún, se demostró con este experimento que las SeNPs actúan como removedores de peróxido de hidrógeno cuando esta especie oxígeno reactiva es generada por medio de reacciones enzimáticas, sin embargo, se

advierte también sobre la formación de Se(VI) como subproducto, cuya toxicidad celular requiere atención para maximizar los beneficios antioxidantes de las SeNPs.

Finalmente, el estudio del enriquecimiento *S. cerevisiae* y *S. boulardii* con Cr(III) permitió seleccionar medio de cultivo YNB como la opción que permitió incorporar cromo de manera eficiente, minimizando simultáneamente los niveles de ácidos nucleicos presente en la levadura obtenida. Este resultado es crucial, ya que altos niveles de ácidos nucleicos limitan la viabilidad de la levadura como suplemento alimenticio.

En *S. cerevisiae*, se logró una captación de hasta 391 µg Cr/g de biomasa en medio YNB, mientras que *S. boulardii* alcanzó valores similares, pero presentó un crecimiento reducido en presencia de Cr(III). Estas diferencias subrayan la importancia de seleccionar las condiciones específicas para cada cepa de acuerdo con los objetivos deseados, encontrando como la mejor opción de bio-enriquecimiento a la *S. cerevisiae* expuesta a 25 mg/L de Cr(III) y crecida en medio YNB.

Los resultados de esta tesis ofrecen un avance en la comprensión del comportamiento de la levadura (*Saccharomyces*). bajo condiciones de enriquecimiento con Se o Cr, proporcionando herramientas valiosas para el diseño de estrategias de biofortificación a través de state-of-the-art de la química analítica. Las levaduras enriquecidas con Se y Cr tienen aplicaciones prometedoras en la industria alimentaria, médica y biotecnológica, ya sea como suplementos nutricionales funcionales, agentes antioxidantes o en la producción de alimentos funcionales.

## 6. Bibliografía

- (1) Rayman, M. Selenium and human health. *Lancet* **2012**, *379*, 1256-1268. DOI: [doi:10.1089/jmf.2005.8.204](https://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.204).
- (2) Achmad, R. T.; Auerkari, E. I. Effects of chromium on human body. *Ann Res Rev Biol* **2017**, *13* (2), 1-8. DOI: [doi.org/10.9734/ARRB/2017/33462](https://doi.org/10.9734/ARRB/2017/33462)
- (3) Hua, Y.; Clark, S.; Ren, J.; Sreejayan, N. Molecular mechanisms of chromium in alleviating insulin resistance. *J Nutr Biochem* **2012**, *23* (4), 313-319. DOI: [doi:10.1016/j.jnutbio.2011.11.001](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.11.001).
- (4) EFSA Panel on Dietetic Products, N. a. A. N. Scientific opinion on dietary reference values for selenium. *EFSA Journal* **2014**, *12* (10), 3846. DOI: [doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3846](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3846).
- (5) EFSA Panel on Dietetic Products, N. a. A. N. Scientific opinion on dietary reference values for chromium. *EFSA Journal* **2014**, *12* (10), 3845. DOI: [doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3845](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3845).
- (6) Cefalu, W. T.; Hu, F. B. Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes care* **2004**, *27* (11), 2741-2751.
- (7) Navarro-Alarcon, M.; Cabrera-Vique, C. Selenium in food and the human body: a review. *Sci Tot Environ* **2008**, *400* (1-3), 115-141. DOI: [doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.024](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.024).
- (8) Whanger, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update dagger. *Br J Nutr* **2004**, *91* (1), 11-28.

- (9) Flores, C. R.; Puga, M. P.; Wrobel, K.; Sevilla, M. E. G.; Wrobel, K. Trace elements status in diabetes mellitus type 2: possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. *Diab Res Clin Pract* **2011**, *91* (3), 333-341. DOI: [doi.org/10.1016/j.diabres.2010.12.014](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2010.12.014).
- (10) Kieliszek, M. Selenium—fascinating microelement, properties and sources in food. *Molecules* **2019**, *24* (7), 1298. DOI: [doi.org/10.3390/molecules24071298](https://doi.org/10.3390/molecules24071298).
- (11) Maret, W. Chromium supplementation in human health, metabolic syndrome, and diabetes. In *Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic*, Carver, P. L. Ed.; Vol. 19; De Gruyter, 2019; pp 231-252.
- (12) Bodnar, M.; Szczygłowska, M.; Konieczka, P.; Namiesnik, J. Methods of selenium supplementation: bioavailability and determination of selenium compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2016**, *56* (1), 36-55.
- (13) Adadi, P.; Barakova, N. V.; Muravyov, K. Y.; Krivoshapkina, E. F. Designing selenium functional foods and beverages: A review. *Food Res Int* **2019**, *120*, 708-725. DOI: [doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.029](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.029).
- (14) Li, Y.; Yin, Z.; Zhang, Y.; Liu, J.; Cheng, Y.; Wang, J.; Sun, X. Perspective of microbe-based minerals fortification in nutrition security. *Food Rev Int* **2020**, 1-14. DOI: [doi.org/10.1080/87559129.2020.1728308](https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1728308)
- (15) Yanez Barrientos, E.; Wrobel, K.; Guzman, J. C. T.; Corrales Escobosa, A. R.; Wrobel, K. Determination of SeMet and Se (IV) in biofortified yeast by ion-pair reversed phase liquid chromatography-hydride generation-microwave induced nitrogen plasma atomic emission spectrometry (HPLC-HG-MP-AES). *J Anal At Spectrom* **2016**, *31* (1), 203-211. DOI: [DOI: 10.1039/C5JA00276A](https://doi.org/10.1039/C5JA00276A).
- (16) Wrobel, K.; Guerrero-Esperanza, M.; Yanez-Barrientos, E.; Corrales-Escobosa, A. R.; Wrobel, K. Different approaches in metabolomic analysis of plants exposed to selenium: a comprehensive review. *Acta Physiol Plant* **2020**, *42* (7), 1-20. DOI: [doi.org/10.1007/s11738-020-03113-0](https://doi.org/10.1007/s11738-020-03113-0).
- (17) Caballero Araúz, I. L.; Afton, S.; Wrobel, K.; Caruso, J. A.; Gutiérrez Corona, J. F.; Wrobel, K. Study on the protective role of selenium against cadmium toxicity in lactic acid bacteria: An advanced application of ICP-MS. *J Hazardous Mater* **2008**, *153* (3), 1157-1164. DOI: [doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.075](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.075).
- (18) Toepfer, E. W.; Mertz, W.; Polansky, M. M.; Roginski, E. E.; Wolf, W. R. Preparation of chromium-containing material of glucose tolerance factor activity from brewer's yeast extracts and by synthesis. *J Agric Food Chem* **1977**, *25* (1), 162-166. DOI: [doi.org/10.1021/jf60209a056](https://doi.org/10.1021/jf60209a056).
- (19) Pырzыnska, K.; Sentkowska, A. Liquid chromatographic analysis of selenium species in plant materials. *TRAC Trend Anal Chem* **2019**, *111*, 128-138.
- (20) Kieliszek, M.; Błażejczak, S.; Bzducha-Wróbel, A.; Kot, A. M. Effect of selenium on growth and antioxidative system of yeast cells. *Mol Biol Rep* **2019**, *46* (2), 1797-1808. DOI: [doi.org/10.1007/s11033-019-04630-z](https://doi.org/10.1007/s11033-019-04630-z).
- (21) Bronzetti, G.; Cini, M.; Andreoli, E.; Caltavuturo, L.; Panunzio, M.; Della Croce, C. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. *Mut Res Gen Toxicol Environ Mutagen* **2001**, *497* (1-2), 105-115. DOI: [doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00213-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00213-3).
- (22) Talbi, W.; Ghazouani, T.; Braconi, D.; Ben Abdallah, R.; Raboudi, F.; Santucci, A.; Fattouch, S. Effects of selenium on oxidative damage and antioxidant enzymes of eukaryotic cells: wine *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* **2019**, *126* (2), 555-566. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14150>.

- (23) Kieliszek, M.; Bierla, K.; Jiménez-Lamana, J.; Kot, A. M.; Alcántara-Durán, J.; Piwowarek, K.; Błażej, S.; Szpunar, J. Metabolic response of the yeast *Candida utilis* during enrichment in selenium. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (15), 5287. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21155287>.
- (24) Chen, Y.; Li, Q.; Xia, C.; Yang, F.; Xu, N.; Wu, Q.; Hu, Y.; Xia, L.; Wang, C.; Zhou, M. Effect of selenium supplements on the antioxidant activity and nitrite degradation of lactic acid bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* **2019**, *35* (4), 61. DOI: [doi.org/10.1007/s11274-019-2609-x](https://doi.org/10.1007/s11274-019-2609-x).
- (25) Kieliszek, M.; Błażej, S.; Bzducha-Wróbel, A.; Kot, A. M. Effect of selenium on lipid and amino acid metabolism in yeast cells. *Biol Tr Elem Res* **2019**, *187* (1), 316-327. DOI: [doi.org/10.1007/s12011-018-1342-x](https://doi.org/10.1007/s12011-018-1342-x).
- (26) Dilsiz, N.; Çelik, S.; Yilmaz, Ö.; Digrak, M. The effects of selenium, vitamin E and their combination on the composition of fatty acids and proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biochem Funct* **1977**, *15* (4), 265-269. DOI: [doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0844\(199712\)15:4<265::AID-CBF750>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0844(199712)15:4<265::AID-CBF750>3.0.CO;2-D).
- (27) Lederberg, J.; McCray, A. T. "Ome sweet" Omics - A genealogical treasury of words. *The Scientist* **2001**, *15* (7), 8-8.
- (28) Buczynski, M. W.; Dumlao, D. S.; Dennis, E. A. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J Lipid Res* **2009**, *50* (6), 1015-1038. DOI: [10.1194/jlr.R900004-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.R900004-JLR200).
- (29) Ouedraogo, M.; Baudoux, T.; Stevigny, C.; Nortier, J.; Colet, J. M.; Efferth, T.; Qu, F.; Zhou, J.; Chan, K.; Shaw, D.; et al. Review of current and "omics" methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. *J Ethnopharmacol* **2012**, *140* (3), 492-512. DOI: [10.1016/j.jep.2012.01.059](https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.059).
- (30) Ma, N. L.; Rahmat, Z.; Lam, S. S. A review of the "Omics" approach to biomarkers of oxidative stress in *Oryza sativa*. *Int J Mol Sci* **2013**, *14* (4), 7515-7541. DOI: [10.3390/ijms14047515](https://doi.org/10.3390/ijms14047515).
- (31) McLean, T. I. "Eco-omics": a review of the application of genomics, transcriptomics, and proteomics for the study of the ecology of harmful algae. *Microb Ecol* **2013**, *65* (4), 901-915. DOI: [10.1007/s00248-013-0220-5](https://doi.org/10.1007/s00248-013-0220-5).
- (32) Robledo, V. R.; Smyth, W. F. Review of the CE-MS platform as a powerful alternative to conventional couplings in bio-omics and target-based applications. *Electrophoresis* **2014**, *35* (16), 2292-2308. DOI: [10.1002/elps.201300561](https://doi.org/10.1002/elps.201300561).
- (33) I-Bayoumy, K.; Das, A.; Russell, S.; Wolfe, S.; Jordan, R.; Renganathan, K.; Loughran, T. P.; Somiari, R. The effect of selenium enrichment on baker's yeast proteome. *J Proteom* **2012**, *75* (3), 1018-1030. DOI: [doi:10.1016/j.jprot.2011.10.013](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.10.013).
- (34) Griffiths, J. A brief history of mass spectrometry. *Anal Chem* **2008**, *80* (15), 5678-5683. DOI: [10.1021/ac8013065](https://doi.org/10.1021/ac8013065).
- (35) Gómez-Gómez, B.; Pérez-Corona, T.; Mozzi, F.; Pescuma, M.; Madrid, Y. Silac-based quantitative proteomic analysis of *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 response to the presence of selenite and selenium nanoparticles. *J Proteom* **2019**, *195*, 53-65. DOI: [doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.025](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.025).
- (36) Behne, D.; Alber, D.; Kyriakopoulos, A. Long-term selenium supplementation of humans: selenium status and relationships between selenium concentrations in skeletal muscle and indicator materials. *J Trace Elem Med Biol* **2010**, *24* (2), 99-105. DOI: [10.1016/j.jtemb.2009.12.001](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2009.12.001) From NLM.
- (37) Abdulah, R.; Miyazaki, K.; Nakazawa, M.; Koyama, H. Chemical forms of selenium for cancer prevention. *J Trace Elem Med Biol* **2005**, *19* (2-3), 141-150. DOI: [10.1016/j.jtemb.2005.09.003](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.09.003).
- (38) Stadtman, T. C. Selenium Biochemistry: Proteins containing selenium are essential components of certain bacterial and mammalian enzyme systems. *Science* **1974**, *183* (4128), 915-922.

- (39) Zhang, J.; Saad, R.; Taylor, E. W.; Rayman, M. P. Selenium and selenoproteins in viral infection with potential relevance to COVID-19. *Redox Biol* **2020**, *37*, 101715. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101715.
- (40) Kieliszek, M.; Błażej, S. Speciation analysis of selenium in *Candida utilis* yeast cells using HPLC-ICP-MS and UHPLC-ESI-Orbitrap MS techniques. *Applied Sciences* **2018**, *8* (11), 2050.
- (41) Arbogast, S.; Ferreiro, A. Selenoproteins and protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis. *Antioxidants & redox signaling* **2010**, *12* (7), 893-904.
- (42) Florian, S.; Krehl, S.; Loewinger, M.; Kipp, A.; Banning, A.; Esworthy, S.; Chu, F. F.; Brigelius-Flohé, R. Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice. *Free Radic Biol Med* **2010**, *49* (11), 1694-1702. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.029.
- (43) Johnson, C. C.; Fordyce, F. M.; Rayman, M. P. Symposium on 'Geographical and geological influences on nutrition' Factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition: Conference on 'Over-and undernutrition: challenges and approaches'. *Proceedings of the Nutrition Society* **2010**, *69* (1), 119-132.
- (44) Navarro-Alarcon, M.; de la Serrana, H. L.-G.; Perez-Valero, V.; López-Martínez, C. Serum and urine selenium concentrations as indicators of body status in patients with diabetes mellitus. *Science of the total environment* **1999**, *228* (1), 79-85.
- (45) Bleys, J.; Navas-Acien, A.; Guallar, E. Serum selenium and diabetes in U.S. adults. *Diabetes Care* **2007**, *30* (4), 829-834. DOI: 10.2337/dc06-1726.
- (46) Bleys, J.; Navas-Acien, A.; Guallar, E. Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults. *Arch Intern Med* **2008**, *168* (4), 404-410. DOI: 10.1001/archinternmed.2007.74.
- (47) Edwards, K. C.; Kim, H.; Vincent, J. B. Release of trivalent chromium from serum transferrin is sufficiently rapid to be physiologically relevant. *Journal of inorganic biochemistry* **2020**, *202*, 110901.
- (48) Vincent, J. B.; Love, S. The binding and transport of alternative metals by transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2012**, *1820* (3), 362-378.
- (49) Vincent, J. B. Elucidating a biological role for chromium at a molecular level. *Acc Chem Res* **2000**, *33* (7), 503-510. DOI: 10.1021/ar990073r.
- (50) Clodfelder, B. J.; Emamaullee, J.; Hepburn, D. D.; Chakov, N. E.; Nettles, H. S.; Vincent, J. B. The trail of chromium(III) in vivo from the blood to the urine: the roles of transferrin and chromodulin. *J Biol Inorg Chem* **2001**, *6* (5-6), 608-617. DOI: 10.1007/s007750100238.
- (51) Steele, N.; Althen, T.; Frobish, L. Biological activity of glucose tolerance factor in swine. *Journal of Animal Science* **1977**, *45* (6), 1341-1345.
- (52) Chen, Y.; Watson, H. M.; Gao, J.; Sinha, S. H.; Cassady, C. J.; Vincent, J. B. Characterization of the organic component of low-molecular-weight chromium-binding substance and its binding of chromium. *The Journal of nutrition* **2011**, *141* (7), 1225-1232.
- (53) Yamamoto, A.; Wada, O.; Ono, T. A low-molecular-weight, chromium-binding substance in mammals. *Toxicol Appl Pharmacol* **1981**, *59* (3), 515-523. DOI: 10.1016/0041-008x(81)90305-7.
- (54) Vincent, J. B. Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proceedings of the Nutrition Society* **2004**, *63* (1), 41-47.
- (55) Dinakarbandian, D.; Morrissette, V.; Chaudhary, S.; Amini, K.; Bennett, B.; Van Horn, J. D. An informatics search for the low-molecular weight chromium-binding peptide. *BMC chemical biology* **2004**, *4* (1), 1-7.
- (56) Hua, Y.; Clark, S.; Ren, J.; Sreejayan, N. Molecular mechanisms of chromium in alleviating insulin resistance. *The Journal of nutritional biochemistry* **2012**, *23* (4), 313-319.

- (57) Wang, H.; Kruszewski, A.; Brautigam, D. L. Cellular chromium enhances activation of insulin receptor kinase. *Biochemistry* **2005**, *44* (22), 8167-8175.
- (58) Vincent, J. B. Quest for the molecular mechanism of chromium action and its relationship to diabetes. *Nutrition reviews* **2000**, *58* (3), 67-72.
- (59) Edwards, K. C.; Kim, H.; Ferguson, R.; Lockart, M. M.; Vincent, J. B. Significance of conformation changes during the binding and release of chromium (III) from human serum transferrin. *Journal of inorganic biochemistry* **2020**, *206*, 111040.
- (60) Broadhurst, C. L.; Domenico, P. Clinical studies on chromium picolinate supplementation in diabetes mellitus—a review. *Diabetes technology & therapeutics* **2006**, *8* (6), 677-687.
- (61) Wasser, W. G.; Feldman, N. S.; D'Agati, V. D. Chronic renal failure after ingestion of over-the-counter chromium picolinate. *Annals of Internal Medicine* **1997**, *126* (5), 410.
- (62) Balk, E. M.; Tatsioni, A.; Lichtenstein, A. H.; Lau, J.; Pittas, A. G. Effect of chromium supplementation on glucose metabolism and lipids: a systematic review of randomized controlled trials. *Diabetes care* **2007**, *30* (8), 2154-2163.
- (63) Health, N. I. o. *Dietary Supplements: What you Need to Know*. 2020. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/WYNTK-Consumer/> (accessed).
- (64) Vindry, C.; Ohlmann, T.; Chavatte, L. Selenium metabolism, regulation, and sex differences in mammals. In *Selenium*, Springer, 2018; pp 89-107.
- (65) Suzuki, K. T.; Kurasaki, K.; Suzuki, N. Selenocysteine  $\beta$ -lyase and methylselenol demethylase in the metabolism of Se-methylated selenocompounds into selenide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2007**, *1770* (7), 1053-1061.
- (66) Yang, L.; Sturgeon, R. E.; McSheehy, S.; Mester, Z. Comparison of extraction methods for quantitation of methionine and selenomethionine in yeast by species specific isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of chromatography A* **2004**, *1055* (1-2), 177-184.
- (67) Zakeri, N.; Asbaghi, O.; Naeini, F.; Afsharfard, M.; Mirzadeh, E.; Kasra Naserizadeh, S. Selenium Supplementation and Oxidative Stress: A review. *PharmaNutrition* **2021**, 100263.
- (68) Schrauzer, G. N. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *The Journal of nutrition* **2000**, *130* (7), 1653-1656.
- (69) Rayman, M. P. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *British Journal of Nutrition* **2004**, *92* (4), 557-573.
- (70) Lazard, M.; Dauplais, M.; Blanquet, S.; Plateau, P. Recent advances in the mechanism of selenoamino acids toxicity in eukaryotic cells. *Biomolecular concepts* **2017**, *8* (2), 93-104.
- (71) Levina, A.; Pham, T. N.; Lay, P. A. Binding of chromium (III) to transferrin could be involved in detoxification of dietary chromium (III) rather than transport of an essential trace element. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (28), 8104-8107.
- (72) Willoughby, D.; Hewlings, S.; Kalman, D. Body composition changes in weight loss: strategies and supplementation for maintaining lean body mass, a brief review. *Nutrients* **2018**, *10* (12), 1876.
- (73) Marmett, B.; Nunes, R. B. Effects of chromium picolinate supplementation on control of metabolic variables: A systematic review. *J Food Nutr Res* **2016**, *4* (10), 633-639.
- (74) Vincent, J. *The nutritional biochemistry of chromium (III)*; Elsevier, 2018.
- (75) Vincent, J. B. Effects of chromium supplementation on body composition, human and animal health, and insulin and glucose metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* **2019**, *22* (6), 483-489.
- (76) Exponent, I. GRAS Notification for the Use of Chromium Polynicotinate in Enhanced Water

Beverages. 2015.

(77) Feng, W.; Wu, H.; Li, Q.; Zhou, Z.; Chen, Y.; Zhao, T.; Feng, Y.; Mao, G.; Li, F.; Yang, L. Evaluation of 90-day repeated dose oral toxicity, glycometabolism, learning and memory ability, and related enzyme of chromium malate supplementation in sprague-dawley rats. *Biological trace element research* **2015**, *168* (1), 181-195.

(78) Król, E.; Krejpcio, Z.; Okulicz, M.; Śmigielka, H. Chromium (III) glycinate complex supplementation improves the blood glucose level and attenuates the tissular copper to zinc ratio in rats with mild hyperglycaemia. *Biological trace element research* **2020**, *193* (1), 185-194.

(79) Alves, S.; Rathahao-Paris, E.; Tabet, J. C. Potential of Fourier transform mass spectrometry for high-throughput metabolomics analysis. In *Advances in botanical research*, Vol. 67; Elsevier, 2013; pp 219-302.

(80) Ong, S.-E.; Mann, M. Mass spectrometry–based proteomics turns quantitative. *Nature chemical biology* **2005**, *1* (5), 252-262.

(81) Brenton, A. G.; Godfrey, A. R. Accurate mass measurement: terminology and treatment of data. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, *21* (11), 1821-1835.

(82) Hillenkamp, F.; Karas, M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol* **1990**, *193*, 280-295. DOI: 10.1016/0076-6879(90)93420-p.

(83) Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* **1991**, *63* (24), 1193A-1203A. DOI: 10.1021/ac00024a002.

(84) Karas, M.; Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **1988**, *60* (20), 2299-2301. DOI: 10.1021/ac00171a028.

(85) El-Aneed, A.; Cohen, A.; Banoub, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied spectroscopy reviews* **2009**, *44* (3), 210-230.

(86) El-Aneed, A.; Cohen, A.; Banoub, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl Spectrosc Rev* **2009**, *44* (3), 210-230.

(87) Thomas, S. N. Chapter 10-Mass spectrometry. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* **2019**, 171-185.

(88) Ranglová, K.; Hájek, J.; Hrouzek, P. Quantification of methionine and selenomethionine in biological samples using multiple reaction monitoring high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (MRM-HPLC-MS/MS). *Journal of Chromatography B* **2018**, *1084*, 36-44.

(89) Morris, H. R.; Paxton, T.; Dell, A.; Langhorne, J.; Berg, M.; Bordoli, R. S.; Hoyes, J.; Bateman, R. H. High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10* (8), 889-896.

(90) Albarède, F.; Albalat, E.; Télouk, P. Instrumental isotope fractionation in multiple-collector icp-ms. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2015**, *30* (8), 1736-1742. DOI: 10.1039/c5ja00188a (accessed 2023-11-27T17:51:07).

(91) Medhe, S. Mass spectrometry: detectors review. *Chem Biomol Eng* **2018**, *3* (4), 51-58.

(92) Koppelaar, D. W.; Barinaga, C. J.; Denton, M. B.; Sperline, R. P.; Hieftje, G. M.; Schilling, G. D.; Andrade, F. J.; Barnes, J. H.; Iv, I. MS detectors. ACS Publications: 2005.

(93) Ibáñez, C.; Simó, C.; García-Cañas, V.; Cifuentes, A.; Castro-Puyana, M. Metabolomics, peptidomics and proteomics applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry in foodomics: A review. *Analytica chimica acta* **2013**, *802*, 1-13.

- (94) Smith, R.; Mathis, A. D.; Ventura, D.; Prince, J. T. Proteomics, lipidomics, metabolomics: a mass spectrometry tutorial from a computer scientist's point of view. *BMC bioinformatics* **2014**, *15* (7), 1.
- (95) Jiang, Y.; Rex, D. A. B.; Schuster, D.; Neely, B. A.; Rosano, G. L.; Volkmar, N.; Momenzadeh, A.; Peters-Clarke, T. M.; Egbert, S. B.; Kreimer, S. Comprehensive overview of bottom-up proteomics using mass spectrometry. *ACS Measurement Science Au* **2024**.
- (96) Pandey, P.; Zaman, K.; Prokai, L.; Shulaev, V. Comparative Proteomics Analysis Reveals Unique Early Signaling Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Oxidants with Different Mechanism of Action. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (1), 167.
- (97) Bantscheff, M.; Schirle, M.; Sweetman, G.; Rick, J.; Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *389* (4), 1017-1031.
- (98) Gouw, J. W.; Krijgsveld, J.; Heck, A. J. Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms. *Mol Cell Proteom* **2010**, *9* (1), 11-24.
- (99) Chahrour, O.; Cobice, D.; Malone, J. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *J Pharm Biomed Anal* **2015**, *113*, 2-20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.04.013>.
- (100) Chahrour, O.; Cobice, D.; Malone, J. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative-proteomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2015**, *113*, 2-20, Review. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.04.013.
- (101) Lanquar, V.; Kuhn, L.; Lelievre, F.; Khafif, M.; Espagne, C.; Bruley, C.; Barbier-Brygoo, H.; Garin, J.; Thomine, S. N-15-Metabolic labeling for comparative plasma membrane proteomics in Arabidopsis cells. *Proteomics* **2007**, *7* (5), 750-754, Article. DOI: 10.1002/pmic.200600791.
- (102) Wang, Y.; Ma, Z.; Quinn, D.; Fu, E. Inverse N-15-metabolic labeling/mass spectrometry for comparative proteomics and rapid identification of protein markers/targets. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16* (14), 1389-1397, Article. DOI: 10.1002/rcm.725.
- (103) Clark, L. C.; Combs, G. F.; Turnbull, B. W.; Slate, E. H.; Chalker, D. K.; Chow, J.; Davis, L. S.; Glover, R. A.; Graham, G. F.; Gross, E. G.; et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: a randomized controlled trial. *JAMA* **1996**, *276* (24), 1957-1963. DOI: doi:10.1001/jama.1996.03540240035027.
- (104) Lü, J.; Zhang, J.; Jiang, C.; Deng, Y.; Özten, N.; Bosland, M. C. Cancer chemoprevention research with selenium in the post-SELECT era: Promises and challenges. *Nutr Cancer* **2016**, *68* (1), 1-17. DOI: <https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1105267>.
- (105) Rayman, M. P. Selenium intake, status, and health: a complex relationship. *Hormones* **2020**, *19*, 9–14. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42000-019-00125-5>.
- (106) Lippman, S. M.; Klein, E. A.; Goodman, P. J.; Lucia, M. C.; Thompson, J. M.; Ford, L. G.; Parnes, H. L.; Minasian, L. M.; Gaziano, J. M.; Hartline, J. A.; et al. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* **2009**, *301* (1), 39-51. DOI: doi:10.1001/jama.2008.864.
- (107) Barger, J.; Kayo, T.; Pugh, T.; Vann, J.; Power, R.; Dawson, K.; Weindruch, R.; Prolla, T. Gene expression profiling reveals differential effects of sodium selenite, selenomethionine, and yeast-derived selenium in the mouse. *Genes Nutr* **2011**, *7* (2), 155–165. DOI: DOI 10.1007/s12263-011-0243-9.
- (108) El-Bayoumy, K.; Das, A.; Russell, S.; Wolfe, S.; Jordan, R.; Renganathan, K.; Loughran, T. P.; Somiari, R. The effect of selenium enrichment on baker's yeast proteome. *J Proteom* **2012**, *75* (3), 1018-1030. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.10.013>.

- (109) Kieliszek, M.; Waśko, A.; Michalak, K.; Kot, A. M.; Piwowarek, K.; Winiarczyk, S. Effect of selenium and methods of protein extraction on the proteomic profile of *Saccharomyces* yeast. *Open Life Sci* **2022**, *17* (1), 1117-1128. DOI: <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0496>.
- (110) Wrobel, K.; Wrobel, K.; Garcia Lara, B.; Guerrero Esperanza, M.; González Roncero, M. I.; Corrales Escobosa, A. R. Comparative evaluation of two *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* strains grown on two different carbon sources: LC-MS - based secretome study after in vivo <sup>15</sup>N metabolic labeling. *Int J Mass Spectrom* **2020**, *449*, 116288. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2019.116288>.
- (111) Lanquar, V.; Kuhn, L.; Lelièvre, F.; Khafif, M.; Espagne, C.; Bruley, C.; Barbier-Brygoo, H.; Garin, J.; Thomine, S. <sup>15</sup>N-metabolic labeling for comparative plasma membrane proteomics in Arabidopsis cells. *Proteomics* **2007**, *7* (5), 750-754. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.200600791>.
- (112) Filiou, M.; Varadarajulu, J.; Teplytska, L.; Reckow, S.; Maccarrone, G.; Turck, C. The N-15 isotope effect in Escherichia coli: A neutron can make the difference. *Proteomics* **2012**, *12* (21), 3121-+, Article. DOI: 10.1002/pmic.201200209.
- (113) Larner, F.; Woodley, L.; Shousha, S.; Moyes, A.; Humphreys-Williams, E.; Strekopytov, S.; Halliday, A.; Rehkamper, M.; Coombes, R. Zinc isotopic compositions of breast cancer tissue. *Metallomics* **2015**, *7* (1), 107-112, Article. DOI: 10.1039/c4mt00260a.
- (114) Lafaye, A.; Labarre, J.; Tabet, J. C.; Ezan, E.; Junot, C. Liquid chromatography– mass spectrometry and <sup>15</sup>N metabolic labeling for quantitative metabolic profiling. *Anal Chem* **2005**, *77* (7), 2026-2033. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac048657g>.
- (115) Wrobel, K.; Karasiński, J.; Tupys, A.; Arroyo Negrete, M. A.; Halicz, L.; Wrobel, K.; Bulska, E. Magnesium–isotope fractionation in chlorophyll-a extracted from two plants with different pathways of carbon fixation (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>). *Molecules* **2020**, *25* (7), 1644. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25071644>.
- (116) Albarède, F.; Télouk, P.; Balter, V. Medical applications of isotope metallomics. *Rev Mineral Geochem* **2017**, *82* (1), 851-885.
- (117) Aramendia, M.; Rello, L.; Resano, M.; Vanhaecke, F. Isotopic analysis of Cu in serum samples for diagnosis of Wilson's disease: a pilot study. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2013**, *28* (5), 675-681, Article. DOI: 10.1039/c3ja30349g.
- (118) Larner, F.; Shousha, S.; Coombes, R. Zinc isotopes: a novel approach to biomarkers of breast cancer? *Biomarkers in Medicine* **2015**, *9* (4), 379-382, Editorial Material. DOI: 10.2217/BMM.15.8.
- (119) Far, J.; Bérail, S.; Preud'Homme, H.; Lobinski, R. Determination of the selenium isotopic compositions in Se-rich yeast by hydride generation-inductively coupled plasma multicollector mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* **2010**, *25* (11), 1695-1703. DOI: <https://doi.org/10.1039/C004933F>.
- (120) Karasinski, J.; Tupys, A.; Yang, L.; Mester, Z.; Halicz, L.; Bulska, E. Novel approach for the accurate determination of Se isotope ratio by multicollector ICP-MS. *Anal Chem* **2020**, *92*, 16097–16104. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03768>.
- (121) Vacchina, V.; Foix, D.; Menta, M.; Martinez, H.; Séby, F. Optimization of elemental selenium (Se(0)) determination in yeasts by anion-exchange HPLC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* **2021**, *413*, 1809-1816. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03129-y>.
- (122) Wrobel, K.; Kannamkumarath, S. S.; Wrobel, K.; Caruso, J. A. Hydrolysis of proteins with methanesulfonic acid for improved HPLC-ICP-MS determination of seleno-methionine in yeast and nuts. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2003**, *375* (1), 133-138.
- (123) Dumont, E.; De Cremer, K.; Van Hulle, M.; Chery, C. C.; Vanhaecke, F.; Cornelis, R. Identification of the major selenium compound, Se-Methionine, in three yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) dietary

- supplements by on-line narrowbore liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2005**, *1071*, 191–196. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.046>.
- (124) Karasinski, J.; Tupys, A.; Halicz, L.; Bulska, E. A novel approach for the determination of the Ge isotope ratio using liquid–liquid Eextraction and hydride generation by multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem* **2021**, *93* (40), 13548–13554. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02491>.
- (125) Kumar, A. R.; Riyazuddin, P. Chemical interferences in hydride-generation atomic spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* **2010**, *29* (2), 166-176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.002>.
- (126) Karasiński, J.; Tupys, A.; Yang, L.; Mester, Z.; Halicz, L.; Bulska, E. Novel Approach for the Accurate Determination of Se Isotope Ratio by Multicollector ICP-MS. *Analytical Chemistry* **2020**, *92* (24), 16097-16104. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c03768 (accessed 2022-09-27T03:27:51).
- (127) Far, J.; Bérail, S.; Preud'Homme, H.; Lobinski, R. Determination of the selenium isotopic compositions in Se-rich yeast by hydride generation-inductively coupled plasma multicollector mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* **2010**, *25* (11), 1695-1703. DOI: <https://doi.org/10.1039/C004933F>.
- (128) Young, E. D.; Galy, A.; Nagahara, H. Kinetic and equilibrium mass-dependent isotope fractionation laws in nature and their geochemical and cosmochemical significance. *Geochim Cosmochim Acta* **2002**, *66*, 1095-1104. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(01\)00832-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00832-8).
- (129) Stüeken, E. E.; Buick, R.; Anbar, A. D. Selenium isotopes support free O<sub>2</sub> in the latest Archean. *Geology* **2015**, *43* (3), 259-262. DOI: <https://doi.org/10.1130/G36218.1>.
- (130) Stüeken, E. E.; Foriel, J.; Nelson, B.; Buick, R.; Catling, D. Selenium isotope analysis of organic-rich shales: advances in sample preparation and isobaric interference correction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2013**, *28* (11), 1734-1749.
- (131) Schilling, K.; Basu, A.; Wanner, C.; Sanford, R. A.; Pallud, C.; Johnson, T. M.; Mason, P. R. Mass-dependent selenium isotopic fractionation during microbial reduction of seleno-oxyanions by phylogenetically diverse bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2020**, *276*, 274-288.
- (132) Kieliszek, M.; Błażej, S.; Gientka, I.; Bzducha-Wróbel, A. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Applied microbiology and biotechnology* **2015**, *99* (13), 5373-5382.
- (133) Filiou, M. D.; Varadarajulu, J.; Teplytska, L.; Reckow, S.; Maccarrone, G.; Turck, C. W. The <sup>15</sup>N isotope effect in *Escherichia coli*: A neutron can make the difference. *Proteomics* **2012**, *12*, 3121–3128. DOI: DOI 10.1002/pmic.201200209.
- (134) Mejia Diaz, L. F.; Karasinski, J.; Wrobel, K.; Corrales Escobosa, A. R.; Yanez Barrientos, E.; Halicz, L.; Bulska, E.; Wrobel, K. Fractionation of selenium isotopes during biofortification of *Saccharomyces cerevisiae* and the influence of metabolic labeling with <sup>15</sup>N. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2023**, *28* (7), 655-667.
- (135) Kieliszek, M.; Waśko, A.; Michalak, K.; Kot, A. M.; Piwowarek, K.; Winiarczyk, S. Effect of selenium and methods of protein extraction on the proteomic profile of *Saccharomyces* yeast. *Open Life Sciences* **2022**, *17* (1), 1117-1128.
- (136) Galano, E.; Mangiapane, E.; Bianga, J.; Palmese, A.; Pessione, E.; Szpunar, J.; Lobinski, R.; Amoresano, A. Privileged Incorporation of Selenium as Selenocysteine in *Lactobacillus reuteri* Proteins Demonstrated by Selenium-specific Imaging and Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* **2013**, *12* (8), 2196-2204. DOI: 10.1074/mcp.m113.027607 (accessed 2023-09-06T15:01:38).
- (137) Tastet, L.; Schaumlöffel, D.; Lobinski, R. ICP-MS-assisted proteomics approach to the identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2008**, *23* (3), 309-317.

- (138) Faramarzi, S.; Anzabi, Y.; Jafarizadeh-Malmiri, H. Selenium supplementation during fermentation with sugar beet molasses and *Saccharomyces cerevisiae* to increase bioethanol production. *Green Processing and Synthesis* **2019**, *8* (1), 622-628.
- (139) Yuan, Y.-J.; Ding, M.-Z.; Xia, J.-M.; Cheng, J.-S. Metabolomics for ethanologenic yeast. In *Microbial Stress Tolerance for Biofuels*, Springer, 2012; pp 239-258.
- (140) Kieliszek, M.; Błażej, S. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: a review. *Molecules* **2016**, *21* (5), 609. DOI: DOI: 10.3390/molecules21050609.
- (141) Haiyan, J.; Lin, W.; Jiao, H.; Liu, J.; Chan, L.; Liu, X.; Wang, R.; Chen, T. Uptake, transport, and metabolism of selenium and its protective effects against toxic metals in plants: A review. *Metallomics* **2021**, *13* (7), mfab040. DOI: DOI: 10.1093/mtomcs/mfab040.
- (142) Skalickova, S.; Milosavljevic, V.; Cihalova, K.; Horoky, P.; Richtera, L.; Adam, V. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition* **2017**, *33*, 83-90. DOI: DOI: 10.1016/j.nut.2016.05.001.
- (143) Nassar, A. R. A.; Eid, A. M.; Atta, H. M.; El Naghy, W. S.; Fouda, A. Exploring the antimicrobial, antioxidant, anticancer, biocompatibility, and larvicidal activities of selenium nanoparticles fabricated by endophytic fungal strain *Penicillium verhagenii*. *Sci Rep* **2023**, *13* (1), 9054. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35360-9>.
- (144) Xiang, X.; Deng, H.; Lin, X.; Mohamed Ali, A. S.; Viscardi, A.; Guo, Z.; Qiao, L.; He, Y.; Han, J. Selenium nanoparticles: properties, preparation methods, and therapeutic applications. *Chem-Biol Interact* **2023**, *378*, 110483. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110483>.
- (145) Martínez-Esquivias, F.; Guzmán-Flores, J. M.; Pérez-Larios, A.; González Silva, N.; Becerra-Ruiz, J. S. A review of the antimicrobial activity of selenium nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* **2021**, *21* (11), 5383-5398. DOI: DOI: 10.1166/jnn.2021.19471.
- (146) Davarani Asl, F.; Mousazadeh, M.; Azimzadeh, M.; Ghaani, M. R. Mesoporous selenium nanoparticles for therapeutic goals: a review. *J Nanopart Res* **2022**, *24* (10), 210. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11051-022-05572-7>.
- (147) Shi, X. D.; Tian, Y. Q.; Wu, J. L.; Wang, S. Y. Synthesis, characterization, and biological activity of selenium nanoparticles conjugated with polysaccharides. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2020**, *61* (13), 2225–2236. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1774497>.
- (148) Bisht, N.; Phalswal, P.; Khanna, P. K. Selenium nanoparticles: A review on synthesis and biomedical applications. *Mater Adv* **2022**, *3* (3), 1415-1431. DOI: <https://doi.org/10.1039/D1MA00639H>.
- (149) Vijayakumar, S.; Chen, J.; Divya, M.; Durán-Lara, E. F.; Prasannakumar, M.; Vaseeharan, B. A review on biogenic synthesis of selenium nanoparticles and its biological applications. *J Inorg Organomet Polym Mater* **2022**, *32* (7), 2355-2370. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10904-022-02366-1>.
- (150) Zambonino, M. C.; Quizhpe, E. M.; Mouheb, L.; Rahman, A.; Agathos, S. N.; Dahoumane, S. A. Biogenic selenium nanoparticles in biomedical sciences: properties, current trends, novel opportunities and emerging challenges in theranostic nanomedicine. *Nanomaterials (Basel)* **2023**, *13* (3), 424. DOI: doi: 10.3390/nano13030424.
- (151) Veal, E. A.; Day, A. M.; Morgan, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* **2007**, *26* (1), 1-14. DOI: doi: 10.1016/j.molcel.2007.03.016.
- (152) Zhai, X.; Zhang, C.; Zhao, G.; Stoll, S.; Ren, F.; Leng, X. Antioxidant capacities of the selenium nanoparticles stabilized by chitosan. *J Nanobiotechnol* **2017**, *5*, 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0243-4>.
- (153) Freire, B. M.; Lange, C. N.; Cavalcanti, Y. T.; Monteiro, L. R.; Pieretti, J. C.; Seabra, A. B.; Batista, B. L. The dual effect of Selenium nanoparticles in rice seedlings: From increasing antioxidant activity to

- inducing oxidative stress. *Plant Stress* **2024**, *11*, 100372. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100372>.
- (154) Debata, N. R.; Sethy, K.; Swain, R. K.; Mishra, S. K.; Panda, N.; Maity, S. Supplementation of nano-selenium (SeNPs) improved growth, immunity, antioxidant enzyme activity, and selenium retention in broiler chicken during summer season. *Trop Anim Health Prod* **2023**, *55* (4), 260. DOI: DOI: 10.1007/s11250-023-03678-1.
- (155) Wang, H. L.; Zhang, J. S.; Yu, H. Q. Free Radical Biol Med. *Wang2007* **2007**, *42*, 1524-1533.
- (156) Ishtiaq, M.; Mazhar, M. W.; Maqbool, M.; Hussain, T.; Hussain, S. A.; Casini, R.; Abd-ElGawad, A. M.; Elansary, H. O. Seed priming with the selenium nanoparticles maintains the redox status in the water stressed tomato plants by modulating the antioxidant defense enzymes. *Plants* **2023**, *12* (7), 1556. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12071556>.
- (157) Jin, Y.; He, Y.; Liu, L.; Tao, W.; Wang, G.; Sun, W.; Pei, X.; Xiao, Z.; Wang, H.; Wang, M. Effects of supranutritional selenium nanoparticles on immune and antioxidant capacity in Sprague-Dawley rats. *Biol Tr Elem Res* **2021**, *199* (12), 4666-4674. DOI: DOI: 10.1007/s12011-021-02601-9.
- (158) Ikram, M.; Raja, N. I.; Mashwani, Z. U. R.; Omar, A. A.; Mohamed, A. H.; Satti, S. H.; Zohra, E. Phytogenic selenium nanoparticles elicited the physiological, biochemical, and antioxidant defense system amelioration of Huanglongbing-infected 'Kinnow' mandarin plants. *Nanomaterials* **2022**, *12* (3), 356. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano12030356>.
- (159) Wang, M.; Qiu, S.; Yang, H.; Huang, Y.; Dai, L.; Zhang, B.; Zou, J. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water with peroxidase-catalyzed oxidation of potassium iodide and its applications to hydroxylamine-involved Fenton and Fenton-like systems. *Chemosphere* **2021**, *279*, 129448. DOI: DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129448.
- (160) Çiçek, S.; Özoğul, F. A. T. I. H. Effects of selenium nanoparticles on growth performance, hematological, serum biochemical parameters, and antioxidant status in fish. *Animal Feed Sci Technol* **2021**, *281*, 115099. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115099>.
- (161) Loeschner, K.; Hadrup, N.; Hansen, M.; Pereira, S. A.; Gammelgaard, B.; Møller, L. H.; Mortensen, A.; Lam, H. R.; Larsen, E. H. Absorption, distribution, metabolism and excretion of selenium following oral administration of elemental selenium nanoparticles or selenite in rats. *Metallomics* **2014**, *6* (2), 330-337. DOI: DOI: 10.1039/c3mt00309d.
- (162) Chung, S.; Zhou, R.; Webster, T. J. Green synthesized BSA-coated selenium nanoparticles inhibit bacterial growth while promoting mammalian cell growth. *International Journal of Nanomedicine* **2020**, 115-124.
- (163) Webster, T. J.; Tran. Selenium nanoparticles inhibit Staphylococcus aureus growth. *International Journal of Nanomedicine* **2011**, 1553. DOI: 10.2147/ijn.s21729 (accessed 2024-08-16T17:17:17).
- (164) Barrientos, E. Y.; Wrobel, K.; Guzman, J. C. T.; Escobosa, A. R. C.; Wrobel, K. Determination of SeMet and Se (IV) in biofortified yeast by ion-pair reversed phase liquid chromatography-hydride generation-microwave induced nitrogen plasma atomic emission spectrometry (HPLC-HG-MP-AES). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2016**, *31* (1), 203-211.
- (165) Wang, M.; Qiu, S.; Yang, H.; Huang, Y.; Dai, L.; Zhang, B.; Zou, J. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water with peroxidase-catalyzed oxidation of potassium iodide and its applications to hydroxylamine-involved Fenton and Fenton-like systems. *Chemosphere* **2021**, *270*, 129448.
- (166) Li, Q.; Chen, T.; Yang, F.; Liu, J.; Zheng, W. Facile and controllable one-step fabrication of selenium nanoparticles assisted by L-cysteine. *Materials letters* **2010**, *64* (5), 614-617.

- (167) Merlot, A. M.; Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R. Unraveling the mysteries of serum albumin—more than just a serum protein. *Frontiers in physiology* **2014**, *5*, 299.
- (168) Lin, Z.-H.; Wang, C. C. Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics* **2005**, *92* (2-3), 591-594.
- (169) Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* **1959**, *31* (3), 426-428. DOI: 10.1021/ac60147a030.
- (170) Negrete, M. A. A.; Wrobel, K.; Barrientos, E. Y.; Escobosa, A. R. C.; Donis, I. E.; Wrobel, K. Determination of chromium (III) picolinate in dietary supplements by flow injection-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, using cobalt (II) picolinate as internal standard. *Talanta* **2022**, *240*, 123161.
- (171) DWLb, M.; Štupar, J.; Bayer, K.; Raspor, P. Effect of chromium (III) in batch mode on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals* **1999**.
- (172) Raspor, P.; Batič, M.; Jamnik, P.; Josić, D.; Milačič, R.; Paš, M.; Recek, M.; Režić-Dereani, V.; Skrt, M. The influence of chromium compounds on yeast physiology: (A review). *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* **2000**, *47* (2-3), 143-173.
- (173) Jianlong, W.; Zeyu, M.; Xuan, Z. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to chromium stress. *Process Biochemistry* **2004**, *39* (10), 1231-1235.
- (174) Kumpulainen, J.; Koivistoinen, P. Effects of glucose and chromium (iii) concentrations in the medium on the uptake of <sup>51</sup>Cr by brewer's yeast. *Bioinorganic chemistry* **1978**, *8* (5), 431-438.
- (175) Guo, X.; Liu, W.; Bai, X.; He, X.; Zhang, B. Speciation of chromium in chromium yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2014**, *30* (12), 3245-3250.
- (176) Schmid, F. X. Biological macromolecules: UV-visible spectrophotometry. *e LS* **2001**.
- (177) Food, E. P. o. F. a. a. N. S. a. t. Scientific Opinion on ChromoPrecise® cellular bound chromium yeast added for nutritional purposes as a source of chromium in food supplements and the bioavailability of chromium from this source. *EFSA Journal* **2012**, *10* (11), 2951.
- (178) Vincent, J. B.; Edwards, K. C. The absorption and transport of chromium in the body. In *The Nutritional Biochemistry of Chromium (III)*, Elsevier, 2019; pp 129-174.
- (179) Kolkman, A.; Daran-Lapujade, P.; Fullaondo, A.; Olsthoorn, M. M.; Pronk, J. T.; Slijper, M.; Heck, A. J. Proteome analysis of yeast response to various nutrient limitations. *Molecular systems biology* **2006**, *2* (1), 2006.0026.
- (180) Liu, L., Lv, J.-p.,; Uluko, H. Purification and characterization of chromium-binding substances from highchromium yeast. *Journal of agricultural and food chemistry* **2013**, *61* (6), 1279-1287.
- (181) Ansari, F., Alian Samakkhah, S., Bahadori, A., Jafari, S. M., Ziaee, M., Khodayari, M. T.,; Pourjafar, H. Healthpromoting properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2023**, *63* (4), 457-485.

**Anexos:**

**Anexo 1:** Productos de investigación.

- 1.- [Characterization of Tequila by High Performance Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry \(HPLC-HRMS\) and Partial Least Squares Regression \(PLS\)](#)
- 2.- [Fractionation of selenium isotopes during biofortification of \*Saccharomyces cerevisiae\* and the influence of metabolic labeling with <sup>15</sup>N](#)
- 3.- [Producción y caracterización de levaduras enriquecidas con Cr \(III\) como suplemento alimenticio.](#)
- 4.- [Selenium Nanoparticles Act as Hydrogen Peroxide Scavengers in a Simulated Biological Environment.](#) (in review at ChemistrySelect)

**Anexo 2.** En la tabla se presentan los resultados de la búsqueda de proteínas (Mascot Score > 25) para las muestras L1 y Lc1, una librería local DDA (Data-Dependent Acquisition) fue construida a partir de estos resultados y utilizando el archivo FASTA *Saccharomyces cerevisiae* UP000002311 de UniProtKB. Entre los parámetros de búsqueda más importantes se incluyeron: tolerancia MS (10 ppm), tolerancia MS/MS (0.1 Da), tripsina como enzima de corte, carga de péptidos de +2 a +5, carbamido-metilación de cisteínas como modificación fija ( $\Delta m = 57.0214$  Da), y las modificaciones variables incluyeron oxidación de metionina ( $\Delta m = 15.9949$  Da), acetilación en *N*-terminal ( $\Delta m = 42.0106$  Da) y sustitución de selenio-azufre en metionina y cisteína ( $\Delta m = 47.9444$  Da).

Las columnas de la tabla incluyen:

- 1.-Protein:** ID de la proteína, nombre de la proteína identificada en la levadura.
- 2.- Name:** Nombre común o descriptivo de la proteína.
- 3.- Accession:** Código único de la proteína en la base de datos encontrada.
- 4.- Score:** Puntaje de identificación del algoritmo de MASCOT indicando nivel de confianza en la identificación de la proteína.
- 5.- Peptides:** Número de péptidos identificados que pertenecen a la proteína.
- 6.- MW[Da]:** Peso molecular de la proteína.
- 7.- pI:** Punto isoeléctrico de la proteína (pH al cual la proteína tiene carga neutra).
- 8.- Modification:** Indica las modificaciones encontradas en los péptidos correspondientes a tal proteína.
- 9.- SC%:** Porcentaje de cobertura de la secuencia de la proteína cubierta por los péptidos identificados.
- 10 RMS(pppm):** Error en partes por millón en la identificación de los espectros de MS y MS/MS para los péptidos identificados.
- 11.- Lc1 y L1:** Indican si la proteína fue detectada en las muestras L1(tratadas con Se) y L1(control no expuesto).

| #  | Protein     | Name  | Accession | Score  | Peptides | MW [Da] | pI  | Modification   | SC [%] | RMS [ppm] | Lc1  | L1    |
|----|-------------|---|-----------|--------|----------|---------|-----|--|--------|-----------|------|-------|
| 1  | ENO1_YEAST  | Enolase 1   | P00924    | 2851.8 | 53       | 46.8    | 6.2 |  | 88     | 4.6       | TRUE | TRUE  |
| 2  | ENO2_YEAST  | Enolase 2   | P00925    | 2713.8 | 49       | 46.9    | 5.7 | Carbamidomethyl, Acetyl, Oxidation                   | 88     | 3.6       | TRUE | TRUE  |
| 3  | G3P3_YEAST  | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3          | P00359    | 2292.4 | 41       | 35.7    | 6.5 | Carbamidomethyl, Acetyl, Oxidation, Delta:S(-1)Se(1) | 92     | 1.9       | TRUE | TRUE  |
| 4  | G3P1_YEAST  | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1          | P00360    | 2161.7 | 37       | 35.7    | 8.3 | Carbamidomethyl, Acetyl, Oxidation                   | 80     | 3.1       | TRUE | TRUE  |
| 5  | PDC1_YEAST  | Pyruvate decarboxylase isozyme 1                    | P06169    | 2156.2 | 38       | 61.5    | 5.8 | Carbamidomethyl, Acetyl, Oxidation, Delta:S(-1)Se(1) | 60     | 3.2       | TRUE | TRUE  |
| 6  | KPYK1_YEAST | Pyruvate kinase 1                                   | P00549    | 2116.9 | 41       | 54.5    | 7.6 | Carbamidomethyl, Oxidation                           | 84     | 3.2       | TRUE | TRUE  |
| 7  | PGK_YEAST   | Phosphoglycerate kinase                             | P00560    | 2106.7 | 44       | 44.7    | 7.1 | Carbamidomethyl, Oxidation                           | 85     | 2.8       | TRUE | TRUE  |
| 8  | G3P2_YEAST  | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2          | P00358    | 1929.5 | 37       | 35.8    | 6.5 | Carbamidomethyl, Acetyl, Oxidation, Delta:S(-1)Se(1) | 79     | 2.1       | TRUE | TRUE  |
| 9  | TPIS_YEAST  | Triosephosphate isomerase                           | P00942    | 1304.3 | 23       | 26.8    | 5.7 | Carbamidomethyl, Acetyl                              | 86     | 3.0       | TRUE | TRUE  |
| 10 | HSP71_YEAST | Heat shock protein SSA1                             | P10591    | 1296.4 | 26       | 69.6    | 5.0 | Carbamidomethyl                                      | 49     | 3.1       | TRUE | TRUE  |
| 11 | INO1_YEAST  | Inositol-3-phosphate synthase                       | P11986    | 1296.4 | 28       | 59.6    | 5.6 | Carbamidomethyl, Acetyl, Oxidation                   | 50     | 3.6       | TRUE | TRUE  |
| 12 | PMG1_YEAST  | Phosphoglycerate mutase 1                           | P00950    | 1187.9 | 24       | 27.6    | 8.8 |  | 78     | 3.7       | TRUE | TRUE  |
| 13 | HSP72_YEAST | Heat shock protein SSA2                             | P10592    | 1161.9 | 25       | 69.4    | 4.9 | Carbamidomethyl, Oxidation                           | 48     | 3.4       | TRUE | TRUE  |
| 14 | SSB1_YEAST  | Ribosome-associated molecular chaperone SSB1        | P11484    | 920.1  | 24       | 66.6    | 5.3 | Carbamidomethyl, Acetyl                              | 55     | 2.6       | TRUE | TRUE  |
| 15 | HSP82_YEAST | ATP-dependent molecular chaperone HSP82             | P02829    | 879.6  | 25       | 81.4    | 4.8 |  | 43     | 2.7       | TRUE | TRUE  |
| 16 | EF2_YEAST   | Elongation factor 2                                 | P32324    | 872.6  | 21       | 93.2    | 5.9 | Carbamidomethyl, Oxidation                           | 41     | 2.7       | TRUE | TRUE  |
| 17 | HSC82_YEAST | ATP-dependent molecular chaperone HSC82             | P15108    | 864.0  | 23       | 80.8    | 4.8 |  | 41     | 2.8       | TRUE | TRUE  |
| 18 | EF1A_YEAST  | Elongation factor 1-alpha                           | P02994    | 852.7  | 21       | 50      | 9.1 | Carbamidomethyl, Acetyl, Oxidation                   | 49     | 2.5       | TRUE | TRUE  |
| 19 | PDC5_YEAST  | Pyruvate decarboxylase isozyme 2                    | P16467    | 833.4  | 17       | 61.9    | 6.0 | Carbamidomethyl, Acetyl, Delta:S(-1)Se(1)            | 57     | 3.0       | TRUE | TRUE  |
| 20 | DHE4_YEAST  | NADP-specific glutamate dehydrogenase 1             | P07262    | 815.5  | 18       | 49.5    | 5.6 | Carbamidomethyl, Acetyl, Oxidation                   | 51     | 4.0       | TRUE | FALSE |
| 21 | ALF_YEAST   | Fructose-bisphosphate aldolase                      | P14540    | 815.0  | 15       | 39.6    | 5.5 | Carbamidomethyl                                      | 66     | 3.1       | TRUE | TRUE  |
| 22 | 6PGD1_YEAST | 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 | P38720    | 743.0  | 18       | 53.5    | 6.2 | Carbamidomethyl, Oxidation                           | 52     | 3.4       | TRUE | TRUE  |
| 23 | TKT1_YEAST  | Transketolase 1                                     | P23254    | 731.6  | 19       | 73.8    | 6.5 | Carbamidomethyl                                      | 48     | 2.7       | TRUE | TRUE  |
| 24 | G6PI_YEAST  | Glucose-6-phosphate isomerase                       | P12709    | 724.0  | 17       | 61.3    | 6.0 | Acetyl, Oxidation                                    | 48     | 3.7       | TRUE | TRUE  |
| 25 | IPYR_YEAST  | Inorganic pyrophosphatase                           | P00817    | 670.3  | 15       | 32.3    | 5.4 | Carbamidomethyl                                      | 77     | 2.9       | TRUE | TRUE  |
| 26 | HSP74_YEAST | Heat shock protein SSA4                             | P22202    | 664.2  | 15       | 69.6    | 5.0 | Carbamidomethyl                                      | 27     | 2.7       | TRUE | TRUE  |
| 27 | ILV5_YEAST  | Ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial          | P06168    | 633.2  | 17       | 44.3    | 9.1 | Carbamidomethyl                                      | 63     | 3.4       | TRUE | TRUE  |
| 28 | METK2_YEAST | S-adenosylmethionine synthase 2                     | P19358    | 584.1  | 14       | 42.2    | 5.2 | Carbamidomethyl                                      | 60     | 2.9       | TRUE | TRUE  |
| 29 | HXKG_YEAST  | Glucokinase-1                                       | P17709    | 580.6  | 12       | 55.3    | 5.8 | Carbamidomethyl, Acetyl                              | 38     | 2.7       | TRUE | TRUE  |
| 30 | HSP26_YEAST | Heat shock protein 26                               | P15992    | 544.4  | 12       | 23.9    | 5.3 | Acetyl   | 78     | 2.3       | TRUE | TRUE  |
| 31 | HSP73_YEAST | Heat shock protein SSA3                             | P09435    | 533.4  | 11       | 70.5    | 5.0 | Carbamidomethyl                                      | 18     | 2.4       | TRUE | FALSE |
| 32 | ADH4_YEAS7  | Alcohol dehydrogenase 4                             | P10127    | 526.5  | 12       | 41.1    | 5.9 | Acetyl, Oxidation                                    | 35     | 2.5       | TRUE | TRUE  |
| 33 | KAR_YEAST   | NADPH-dependent alpha-keto amide reductase          | Q07551    | 524.6  | 9        | 35.5    | 5.8 | Acetyl, Oxidation                                    | 54     | 2.7       | TRUE | TRUE  |
| 34 | TSA1_YEAST  | Peroxioredoxin TSA1                                 | P34760    | 517.9  | 11       | 21.6    | 5.0 |  | 54     | 1.7       | TRUE | TRUE  |
| 35 | ACT_YEAST   | Actin   | P60010    | 512.5  | 12       | 41.7    | 5.4 | Carbamidomethyl, Oxidation, Acetyl                   | 56     | 4.5       | TRUE | TRUE  |

|    |             |   |                        |       |    |       |      |                                    |    |     |       |       |
|----|-------------|---|------------------------|-------|----|-------|------|------------------------------------|----|-----|-------|-------|
| 36 | PGM2_YEAST  | Phosphoglucomutase 2  | P37012                 | 511.1 | 15 | 63    | 6.2  | Carbamidomethyl, Acetyl, Oxidation | 38 | 4.7 | TRUE  | TRUE  |
| 37 | TAL1_YEAST  | Transaldolase   | P15019                 | 488.4 | 11 | 37    | 6.1  | Oxidation                          | 42 | 2.5 | TRUE  | TRUE  |
| 38 | ATPB_YEAST  | ATP synthase subunit beta, mitochondrial                              | P00830                 | 470.3 | 11 | 54.8  | 5.5  | Oxidation                          | 38 | 4.0 | TRUE  | TRUE  |
| 39 | METE_YEAST  | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase | P05694                 | 434.2 | 11 | 85.8  | 6.1  | Carbamidomethyl                    | 24 | 3.4 | TRUE  | TRUE  |
| 40 | HSP77_YEAST | Import motor subunit, mitochondrial                                   | P0CS90                 | 433.1 | 10 | 70.6  | 5.5  |                                    | 21 | 2.5 | TRUE  | TRUE  |
| 41 | ALDH4_YEAST | Potassium-activated aldehyde dehydrogenase, mitochondrial             | P46367                 | 417.8 | 10 | 56.7  | 6.3  | Carbamidomethyl                    | 37 | 3.6 | TRUE  | TRUE  |
| 42 | CARP_YEAST  | Saccharopepsin  | P07267                 | 415.7 | 12 | 44.5  | 4.7  | Carbamidomethyl                    | 36 | 1.6 | TRUE  | TRUE  |
| 43 | GRE3_YEAST  | NADPH-dependent aldose reductase GRE3                                 | P38715                 | 389.4 | 8  | 37.1  | 6.6  | Carbamidomethyl, Acetyl            | 34 | 2.8 | TRUE  | TRUE  |
| 44 | RL4A_YEAST  | 60S ribosomal protein L4-A  | P10664                 | 382.4 | 10 | 39.1  | 10.6 | Acetyl                             | 51 | 2.4 | TRUE  | TRUE  |
| 45 | TKT2_YEAST  | Transketolase 2   | P33315                 | 371.1 | 10 | 75    | 5.8  | Acetyl                             | 29 | 1.1 | TRUE  | TRUE  |
| 46 | ALDH3_YEAST | Aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] 2                                    | P54114                 | 369.3 | 11 | 55.4  | 5.6  | Carbamidomethyl, Oxidation         | 35 | 3.4 | TRUE  | TRUE  |
| 47 | PST2_YEAST  | Protoplast secreted protein 2   | Q12335                 | 368.7 | 8  | 21    | 5.5  | Carbamidomethyl, Oxidation         | 80 | 2.6 | TRUE  | TRUE  |
| 48 | VATA_YEAST  | V-type proton ATPase catalytic subunit A                              | P17255                 | 366.0 | 8  | 118.6 | 5.8  | Carbamidomethyl, Acetyl, Oxidation | 13 | 2.4 | TRUE  | TRUE  |
| 49 | SAHH_YEAST  | Adenosylhomocysteinase  | P39954                 | 359.7 | 9  | 49.1  | 5.8  | Carbamidomethyl                    | 30 | 3.9 | TRUE  | TRUE  |
| 50 | HSP31_YEAST | Glutathione-independent glyoxalase HSP31                              | Q04432                 | 355.9 | 9  | 25.7  | 5.3  | Carbamidomethyl                    | 60 | 2.2 | TRUE  | TRUE  |
| 51 | ATPA_YEAST  | ATP synthase subunit alpha, mitochondrial                             | P07251                 | 355.7 | 8  | 58.6  | 9.1  |                                    | 18 | 2.3 | TRUE  | TRUE  |
| 52 | 6PGD2_YEAST | 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2                   | P53319                 | 351.0 | 9  | 53.9  | 6.8  | Oxidation                          | 31 | 2.9 | TRUE  | TRUE  |
| 53 | FAS1_YEAST  | Fatty acid synthase subunit beta                                      | P07149                 | 343.1 | 8  | 228.5 | 5.6  | Acetyl, Oxidation                  | 6  | 2.3 | TRUE  | TRUE  |
| 54 | HXKA_YEAST  | Hexokinase-1  | P04806                 | 334.9 | 8  | 53.7  | 5.3  | Carbamidomethyl                    | 26 | 3.1 | TRUE  | TRUE  |
| 55 | THIL_YEAST  | Acetyl-CoA acetyltransferase  | <a href="#">P41338</a> | 326.8 | 10 | 41.7  | 7.0  | Acetyl, Carbamidomethyl            | 39 | 3.2 | TRUE  | TRUE  |
| 56 | MSC1_YEAST  | Meiotic sister chromatid recombination protein 1                      | Q03104                 | 323.4 | 9  | 59.6  | 7.1  | Oxidation                          | 20 | 3.1 | TRUE  | TRUE  |
| 57 | CATT_YEAST7 | Catalase T  | A6ZV70                 | 320.9 | 7  | 64.5  | 6.1  | Carbamidomethyl, Oxidation         | 24 | 4.5 | TRUE  | TRUE  |
| 58 | OYE2_YEAST  | NADPH dehydrogenase 2   | Q03558                 | 309.5 | 8  | 45    | 6.1  |                                    | 34 | 3.5 | TRUE  | TRUE  |
| 59 | PDC6_YEAST  | Pyruvate decarboxylase isozyme 3                                      | P26263                 | 301.3 | 6  | 61.5  | 5.8  | Acetyl                             | 15 | 1.2 | TRUE  | TRUE  |
| 60 | METK1_YEAST | S-adenosylmethionine synthase 1                                       | P10659                 | 300.2 | 7  | 41.8  | 5.0  |                                    | 20 | 2.8 | FALSE | TRUE  |
| 61 | HSP60_YEAST | Heat shock protein 60, mitochondrial                                  | P19882                 | 295.4 | 7  | 60.7  | 5.2  |                                    | 14 | 2.6 | TRUE  | TRUE  |
| 62 | BCA1_YEAST  | Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial             | P38891                 | 293.4 | 6  | 43.6  | 9.0  | Carbamidomethyl                    | 23 | 2.3 | TRUE  | TRUE  |
| 63 | CYS3_YEAST  | Cystathionine gamma-lyase   | P31373                 | 286.0 | 7  | 42.5  | 6.1  |                                    | 41 | 3.5 | TRUE  | TRUE  |
| 64 | MDHM_YEAST  | Malate dehydrogenase, mitochondrial                                   | P17505                 | 283.4 | 5  | 35.6  | 8.5  |                                    | 31 | 3.7 | TRUE  | TRUE  |
| 65 | ALDH6_YEAST | Magnesium-activated aldehyde dehydrogenase, cytosolic                 | P54115                 | 277.0 | 6  | 54.4  | 5.3  | Carbamidomethyl, Acetyl            | 18 | 3.3 | TRUE  | TRUE  |
| 66 | FPPS_YEAST  | Farnesyl pyrophosphate synthase                                       | <a href="#">P08524</a> | 275.7 | 6  | 40.5  | 5.3  | Carbamidomethyl                    | 25 | 3.7 | TRUE  | FALSE |
| 67 | DHOM_YEAST  | Homoserine dehydrogenase  | P31116                 | 275.2 | 7  | 38.5  | 6.9  |                                    | 33 | 2.5 | TRUE  | TRUE  |
| 68 | ZPS1_YEAST  | Protein ZPS1  | Q12512                 | 259.8 | 6  | 27.5  | 4.9  | Carbamidomethyl, Oxidation         | 35 | 1.6 | TRUE  | TRUE  |
| 69 | GLYC_YEAST  | Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic                            | P37291                 | 258.5 | 5  | 52.2  | 7.0  |                                    | 22 | 3.2 | TRUE  | TRUE  |
| 70 | PUR92_YEAST | Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17                        | P38009                 | 254.1 | 8  | 65.2  | 6.1  | Carbamidomethyl                    | 24 | 4.1 | TRUE  | TRUE  |
| 71 | VATB_YEAST  | V-type proton ATPase subunit B  | P16140                 | 253.0 | 6  | 57.7  | 5.0  | Carbamidomethyl                    | 21 | 2.0 | TRUE  | TRUE  |

|     |             |   |        |       |   |       |      |  |    |     |       |       |
|-----|-------------|---|--------|-------|---|-------|------|--|----|-----|-------|-------|
| 72  | AMPL_YEAST  | Vacuolar aminopeptidase 1   | P14904 | 250.4 | 6 | 57.1  | 5.5  | Carbamidomethyl                          | 22 | 2.0 | TRUE  | TRUE  |
| 73  | PIL1_YEAST  | Sphingolipid long chain base-responsive protein PIL1                  | P53252 | 246.8 | 6 | 38.3  | 4.5  |  | 27 | 2.7 | TRUE  | TRUE  |
| 74  | YM71_YEAST  | NADP-dependent 3-hydroxy acid dehydrogenase                           | Q05016 | 244.2 | 5 | 29.1  | 6.3  |  | 33 | 3.6 | TRUE  | TRUE  |
| 75  | TPS1_YEAST  | Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 56 kDa subunit | Q00764 | 243.3 | 7 | 56.1  | 5.7  | Carbamidomethyl                          | 24 | 4.4 | TRUE  | TRUE  |
| 76  | APE3_YEAST  | Aminopeptidase Y  | P37302 | 237.4 | 6 | 60.1  | 5.1  | Carbamidomethyl                          | 25 | 2.6 | TRUE  | TRUE  |
| 77  | ARLY_YEAST  | Argininosuccinate lyase   | P04076 | 227.8 | 6 | 52    | 5.5  | Acetyl, Oxidation                        | 15 | 1.9 | TRUE  | TRUE  |
| 78  | CYSD_YEAST  | Homocysteine/cysteine synthase  | P06106 | 224.8 | 6 | 48.6  | 6.0  |  | 21 | 1.3 | TRUE  | TRUE  |
| 79  | GBLP_YEAST  | Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein          | P38011 | 224.6 | 7 | 34.8  | 5.8  | Carbamidomethyl, Acetyl                  | 40 | 2.2 | TRUE  | TRUE  |
| 80  | G6PD_YEAST  | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase                                   | P11412 | 222.6 | 6 | 57.5  | 5.9  |  | 19 | 4.3 | TRUE  | TRUE  |
| 81  | UGPA1_YEAST | UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase                          | P32861 | 220.2 | 5 | 56    | 7.0  | Carbamidomethyl, Acetyl                  | 17 | 2.9 | TRUE  | TRUE  |
| 82  | IF4A_YEAS7  | ATP-dependent RNA helicase eIF4A                                      | A6ZQJ1 | 211.9 | 6 | 44.7  | 5.0  |  | 26 | 2.1 | TRUE  | TRUE  |
| 83  | PUR8_YEAST  | Adenylosuccinate lyase  | Q05911 | 209.5 | 4 | 54.5  | 6.0  |  | 16 | 3.9 | TRUE  | TRUE  |
| 84  | ADH1_YEAST  | Alcohol dehydrogenase 1   | P00330 | 208.2 | 3 | 36.8  | 6.2  |  | 14 | 2.4 | TRUE  | FALSE |
| 85  | AHP1_YEAST  | Peroxisome protein AHP1   | P38013 | 207.9 | 4 | 19.1  | 5.0  | Carbamidomethyl, Oxidation               | 48 | 1.5 | TRUE  | TRUE  |
| 86  | HS104_YEAST | Heat shock protein 104  | P31539 | 201.1 | 6 | 102   | 5.3  | Acetyl                                   | 10 | 2.0 | TRUE  | TRUE  |
| 87  | RL4B_YEAST  | 60S ribosomal protein L4-B  | P49626 | 197.8 | 5 | 39    | 10.6 |  | 26 | 2.7 | FALSE | TRUE  |
| 88  | CPY1_YEAST  | Carboxypeptidase Y inhibitor  | P14306 | 196.8 | 4 | 24.3  | 6.1  | Acetyl, Oxidation                        | 26 | 3.2 | TRUE  | FALSE |
| 89  | GOR1_YEAST  | Glyoxylate reductase 1  | P53839 | 196.5 | 3 | 38.8  | 5.9  |  | 15 | 3.9 | TRUE  | FALSE |
| 90  | TRXB1_YEAST | Thioredoxin reductase 1   | P29509 | 194.8 | 6 | 34.2  | 5.7  | CarbamidomethylCarbamidomethyl           | 38 | 1.9 | TRUE  | TRUE  |
| 91  | PET10_YEAST | Protein PET10   | P36139 | 193.4 | 4 | 31.2  | 7.8  | Acetyl, Oxidation                        | 32 | 2.4 | TRUE  | TRUE  |
| 92  | YNN4_YEAST  | Uncharacterized protein YNL134C                                       | P53912 | 192.5 | 6 | 41.1  | 5.8  | Carbamidomethyl                          | 27 | 2.8 | TRUE  | TRUE  |
| 93  | VDAC1_YEAST | Mitochondrial outer membrane protein porin 1                          | P04840 | 191.6 | 4 | 30.4  | 7.7  |  | 21 | 2.8 | TRUE  | TRUE  |
| 94  | BGL2_YEAST  | Glucan 1,3-beta-glucosidase   | P15703 | 191.4 | 4 | 34.1  | 4.3  |  | 15 | 2.2 | TRUE  | TRUE  |
| 95  | DAK1_YEAST  | Dihydroxyacetone kinase 1   | P54838 | 188.1 | 7 | 62.2  | 5.2  | Carbamidomethyl                          | 19 | 2.4 | TRUE  | FALSE |
| 96  | SYDC_YEAST  | Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic                                   | P04802 | 186.5 | 6 | 63.5  | 6.2  | Acetyl                                   | 16 | 5.5 | TRUE  | TRUE  |
| 97  | BIP_YEAST   | Endoplasmic reticulum chaperone BiP                                   | P16474 | 183.7 | 5 | 74.4  | 4.8  | Acetyl                                   | 10 | 3.5 | TRUE  | TRUE  |
| 98  | RLA0_YEAST  | 60S acidic ribosomal protein P0                                       | P05317 | 181.9 | 5 | 33.7  | 4.7  |  | 20 | 4.0 | TRUE  | TRUE  |
| 99  | OAT_YEAST   | Ornithine aminotransferase  | P07991 | 181.1 | 5 | 46.1  | 6.5  | Carbamidomethyl                          | 27 | 4.2 | TRUE  | TRUE  |
| 100 | RL2A_YEAST  | 60S ribosomal protein L2-A  | P0CX45 | 179.5 | 6 | 27.4  | 11.1 |  | 37 | 3.8 | TRUE  | TRUE  |
| 101 | GPD1_YEAST  | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] 1                         | Q00055 | 176.7 | 5 | 42.8  | 5.3  | AcetylCarbamidomethyl, Acetyl, Oxidation | 27 | 3.9 | TRUE  | TRUE  |
| 102 | PHSG_YEAST  | Glycogen phosphorylase  | P06738 | 174.4 | 5 | 103.2 | 5.4  | Carbamidomethyl                          | 9  | 3.0 | TRUE  | TRUE  |
| 103 | MCR1_YEAS7  | NADH-cytochrome b5 reductase 2  | A6ZZH2 | 168.8 | 6 | 34.1  | 8.7  | Oxidation                                | 37 | 2.4 | TRUE  | TRUE  |
| 104 | GSP1_YEAST  | GTP-binding nuclear protein GSP1/CNR1                                 | P32835 | 168.7 | 4 | 24.8  | 6.1  | Carbamidomethyl                          | 15 | 2.5 | TRUE  | TRUE  |
| 105 | QCR2_YEAST  | Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial                      | P07257 | 167.3 | 3 | 40.5  | 7.7  |  | 14 | 1.2 | TRUE  | FALSE |
| 106 | DHAS_YEAST  | Aspartate-semialdehyde dehydrogenase                                  | P13663 | 166.0 | 4 | 39.5  | 6.3  | Carbamidomethyl                          | 15 | 1.5 | TRUE  | TRUE  |
| 107 | RS5_YEAST   | 40S ribosomal protein S5  | P26783 | 165.9 | 3 | 25    | 8.6  |  | 13 | 0.6 | TRUE  | TRUE  |

|     |             |   |        |       |   |       |      |                            |    |     |       |       |
|-----|-------------|---|--------|-------|---|-------|------|----------------------------|----|-----|-------|-------|
| 108 | BMH1_YEAST  | Protein BMH1  | P29311 | 165.6 | 4 | 31    | 4.8  |                            | 26 | 4.3 | TRUE  | TRUE  |
| 109 | MPG1_YEAST  | Mannose-1-phosphate guanyltransferase                     | P41940 | 163.3 | 3 | 39.5  | 6.0  | Carbamidomethyl            | 14 | 2.5 | TRUE  | TRUE  |
| 110 | PRTB_YEAST  | Cerevisin   | P09232 | 162.1 | 4 | 69.6  | 5.9  | Carbamidomethyl            | 8  | 1.8 | TRUE  | TRUE  |
| 111 | HXKB_YEAST  | Hexokinase-2  | P04807 | 160.8 | 6 | 53.9  | 5.2  | Carbamidomethyl            | 18 | 0.8 | TRUE  | TRUE  |
| 112 | LYS9_YEAST  | Saccharopine dehydrogenase [NADP(+), L-glutamate-forming] | P38999 | 160.0 | 6 | 48.9  | 5.1  | Carbamidomethyl            | 22 | 3.2 | TRUE  | TRUE  |
| 113 | LSP1_YEAST  | Sphingolipid long chain base-responsive protein LSP1      | Q12230 | 159.1 | 4 | 38    | 4.6  |                            | 22 | 3.2 | TRUE  | TRUE  |
| 114 | ADK_YEAST   | Adenosine kinase  | P47143 | 158.4 | 7 | 36.3  | 5.0  | Carbamidomethyl            | 37 | 3.2 | TRUE  | TRUE  |
| 115 | H2B2_YEAST  | Histone H2B.2   | P02294 | 156.2 | 2 | 14.2  | 10.1 | Oxidation                  | 12 | 1.6 | TRUE  | TRUE  |
| 116 | SDO1L_YEAST | Restriction of telomere capping protein 3                 | P38804 | 156.1 | 4 | 12    | 5.0  |                            | 63 | 2.7 | TRUE  | FALSE |
| 117 | COF1_YEAST  | Cofilin   | Q03048 | 149.1 | 4 | 15.9  | 5.1  |                            | 41 | 1.0 | TRUE  | TRUE  |
| 118 | EF3A_YEAST  | Elongation factor 3A                                      | P16521 | 149.0 | 4 | 115.9 | 5.7  | Carbamidomethyl            | 9  | 3.7 | TRUE  | TRUE  |
| 119 | GVP36_YEAST | Protein GVP36   | P40531 | 147.0 | 5 | 36.6  | 4.9  | Acetyl                     | 30 | 3.5 | TRUE  | FALSE |
| 120 | RL8B_YEAST  | 60S ribosomal protein L8-B                                | P29453 | 145.6 | 4 | 28.1  | 10.0 |                            | 24 | 3.0 | TRUE  | FALSE |
| 121 | RL7A_YEAST  | 60S ribosomal protein L7-A                                | P05737 | 143.4 | 4 | 27.6  | 10.1 |                            | 19 | 1.4 | TRUE  | TRUE  |
| 122 | GABAT_YEAST | 4-aminobutyrate aminotransferase                          | P17649 | 141.4 | 4 | 52.9  | 6.3  |                            | 17 | 2.2 | TRUE  | TRUE  |
| 123 | YCP4_YEAST  | Flavoprotein-like protein YCP4                            | P25349 | 141.3 | 4 | 26.3  | 8.3  |                            | 34 | 3.0 | TRUE  | TRUE  |
| 124 | RIR4_YEAST  | Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain 2        | P49723 | 138.5 | 5 | 40    | 5.1  | Acetyl                     | 20 | 2.2 | TRUE  | TRUE  |
| 125 | CISY1_YEAST | Citrate synthase, mitochondrial                           | P00890 | 135.9 | 4 | 53.3  | 8.2  |                            | 11 | 3.2 | TRUE  | TRUE  |
| 126 | ADT2_YEAST  | ADP,ATP carrier protein 2                                 | P18239 | 134.0 | 2 | 34.4  | 9.8  |                            | 8  | 1.8 | FALSE | TRUE  |
| 127 | AATC_YEAST  | Aspartate aminotransferase, cytoplasmic                   | P23542 | 132.7 | 4 | 46    | 8.5  | Carbamidomethyl            | 25 | 3.7 | TRUE  | TRUE  |
| 128 | GPP1_YEAST  | Glycerol-1-phosphate phosphohydrolase 1                   | P41277 | 132.5 | 2 | 27.9  | 5.3  | Carbamidomethyl            | 12 | 0.2 | TRUE  | TRUE  |
| 129 | PLR1_YEAST  | Putative pyridoxal reductase                              | Q06494 | 132.5 | 3 | 38.6  | 5.7  | Carbamidomethyl            | 17 | 0.8 | TRUE  | TRUE  |
| 130 | HMCS_YEAST  | Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase                        | P54839 | 131.9 | 4 | 55    | 8.4  |                            | 18 | 0.4 | TRUE  | TRUE  |
| 131 | YMY0_YEAST  | UPF0659 protein YMR090W                                   | Q04304 | 131.8 | 4 | 24.9  | 5.6  |                            | 21 | 1.6 | TRUE  | TRUE  |
| 132 | PMA1_YEAST  | Plasma membrane ATPase 1                                  | P05030 | 130.9 | 6 | 99.6  | 5.0  | Carbamidomethyl, Oxidation | 16 | 1.3 | TRUE  | TRUE  |
| 133 | CBS_YEAST   | Cystathionine beta-synthase                               | P32582 | 128.1 | 4 | 56    | 6.2  |                            | 15 | 5.0 | TRUE  | FALSE |
| 134 | BLH1_YEAS1  | Cysteine proteinase 1, mitochondrial                      | B3LP78 | 127.8 | 5 | 55.5  | 8.9  |                            | 13 | 0.9 | TRUE  | TRUE  |
| 135 | SODM_YEAST  | Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial                  | P00447 | 126.7 | 4 | 25.8  | 8.5  | Carbamidomethyl            | 28 | 1.2 | TRUE  | TRUE  |
| 136 | DCE_YEAST   | Glutamate decarboxylase                                   | Q04792 | 126.6 | 4 | 65.9  | 6.2  |                            | 11 | 1.5 | TRUE  | TRUE  |
| 137 | RL15B_YEAST | 60S ribosomal protein L15-B                               | P54780 | 125.2 | 3 | 24.4  | 11.4 | Carbamidomethyl            | 17 | 0.7 | TRUE  | TRUE  |
| 138 | ARP2_YEAST  | Actin-related protein 2                                   | P32381 | 123.2 | 3 | 44    | 5.5  |                            | 13 | 4.5 | TRUE  | FALSE |
| 139 | RL16B_YEAST | 60S ribosomal protein L16-B                               | P26785 | 122.7 | 2 | 22.2  | 10.5 | Acetyl                     | 14 | 2.2 | TRUE  | FALSE |
| 140 | RS6A_YEAST  | 40S ribosomal protein S6-A                                | P0CX37 | 118.8 | 3 | 27    | 10.4 |                            | 20 | 2.3 | TRUE  | TRUE  |
| 141 | EMI2_YEAST  | Putative glucokinase-2                                    | Q04409 | 117.8 | 4 | 55.9  | 5.9  | Carbamidomethyl            | 11 | 2.6 | FALSE | TRUE  |
| 142 | ETR1_YEAST  | Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase, mitochondrial     | P38071 | 117.4 | 3 | 42    | 9.0  |                            | 18 | 5.1 | TRUE  | FALSE |
| 143 | CBPY_YEAST  | Carboxypeptidase Y  | P00729 | 116.1 | 3 | 59.8  | 4.6  | Carbamidomethyl            | 10 | 4.3 | TRUE  | FALSE |

|     |             |  |        |       |   |       |      |                            |    |     |       |       |
|-----|-------------|--|--------|-------|---|-------|------|----------------------------|----|-----|-------|-------|
| 144 | NOP3_YEAST  | Nucleolar protein 3  | Q01560 | 115.5 | 4 | 45.4  | 5.4  | Carbamidomethyl, Oxidation | 16 | 0.3 | TRUE  | TRUE  |
| 145 | PFKA1_YEAST | ATP-dependent 6-phosphofructokinase subunit alpha          | P16861 | 113.8 | 3 | 107.9 | 6.0  |                            | 5  | 3.3 | TRUE  | TRUE  |
| 146 | GPP2_YEAST  | Glycerol-1-phosphate phosphohydrolase 2                    | P40106 | 112.8 | 3 | 27.8  | 5.8  |                            | 22 | 1.6 | TRUE  | FALSE |
| 147 | NPC2_YEAST  | Phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein | Q12408 | 112.5 | 3 | 19.1  | 4.4  | Carbamidomethyl            | 42 | 2.5 | TRUE  | TRUE  |
| 148 | VATC_YEAST  | V-type proton ATPase subunit C                             | P31412 | 109.4 | 3 | 44.2  | 6.2  |                            | 12 | 2.9 | TRUE  | FALSE |
| 149 | PSA4_YEAST  | Proteasome subunit alpha type-4                            | P40303 | 109.3 | 2 | 28.4  | 6.9  |                            | 10 | 0.7 | TRUE  | FALSE |
| 150 | RL18A_YEAST | 60S ribosomal protein L18-A                                | P0CX49 | 108.9 | 2 | 20.6  | 11.7 | Carbamidomethyl            | 15 | 0.3 | TRUE  | TRUE  |
| 151 | KAD2_YEAS7  | Adenylate kinase   | A6ZYI0 | 106.8 | 2 | 24.2  | 6.2  |                            | 11 | 1.9 | TRUE  | FALSE |
| 152 | CYPH_YEAST  | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase                        | P14832 | 106.4 | 3 | 24.3  | 6.9  | Acetyl, Oxidation          | 32 | 3.4 | TRUE  | TRUE  |
| 153 | WTM1_YEAST  | Transcriptional modulator WTM1                             | Q12363 | 102.4 | 2 | 48.4  | 5.2  | Carbamidomethyl            | 7  | 3.5 | TRUE  | TRUE  |
| 154 | VATE_YEAST  | V-type proton ATPase subunit E                             | P22203 | 101.2 | 3 | 26.5  | 5.3  |                            | 22 | 1.3 | TRUE  | TRUE  |
| 155 | FADH_YEAST  | S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase                 | P32771 | 99.9  | 2 | 41    | 6.3  | Carbamidomethyl            | 9  | 3.9 | TRUE  | TRUE  |
| 156 | MVD1_YEAST  | Diphosphomevalonate decarboxylase                          | P32377 | 99.5  | 4 | 44.1  | 5.5  |                            | 16 | 2.3 | TRUE  | FALSE |
| 157 | TAL2_YEAST  | Transaldolase NQM1   | P53228 | 99.2  | 4 | 37.2  | 6.0  |                            | 18 | 3.8 | TRUE  | TRUE  |
| 158 | SSBP1_YEAST | Single-stranded nucleic acid-binding protein               | P10080 | 98.5  | 5 | 33    | 5.5  | Oxidation                  | 30 | 2.6 | TRUE  | TRUE  |
| 159 | KPYK2_YEAST | Pyruvate kinase 2  | P52489 | 98.2  | 2 | 55.2  | 6.4  | Carbamidomethyl, Acetyl    | 4  | 2.0 | TRUE  | TRUE  |
| 160 | YPR1_YEAST  | Putative reductase 1                                       | Q12458 | 96.5  | 3 | 34.7  | 6.6  |                            | 14 | 2.4 | TRUE  | TRUE  |
| 161 | DCPS_YEAST  | m7GpppX diphosphatase                                      | Q06151 | 94.6  | 3 | 40.7  | 5.8  | Carbamidomethyl, Acetyl    | 14 | 1.8 | TRUE  | FALSE |
| 162 | RS4A_YEAST  | 40S ribosomal protein S4-A                                 | P0CX35 | 93.2  | 4 | 29.4  | 10.1 |                            | 21 | 1.0 | TRUE  | TRUE  |
| 163 | RPN10_YEAST | 26S proteasome regulatory subunit RPN10                    | P38886 | 93.0  | 3 | 29.7  | 10.0 | Carbamidomethyl            | 16 | 0.5 | TRUE  | TRUE  |
| 164 | IDH2_YEAST  | Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 2, mitochondrial    | P28241 | 92.9  | 3 | 39.7  | 8.8  |                            | 16 | 3.4 | TRUE  | TRUE  |
| 165 | LYS12_YEAST | Homoisocitrate dehydrogenase, mitochondrial                | P40495 | 92.8  | 2 | 40    | 8.1  |                            | 7  | 1.8 | TRUE  | TRUE  |
| 166 | RL5_YEAST   | 60S ribosomal protein L5                                   | P26321 | 92.4  | 4 | 33.7  | 6.4  |                            | 32 | 3.3 | TRUE  | TRUE  |
| 167 | RL3_YEAST   | 60S ribosomal protein L3                                   | P14126 | 92.3  | 3 | 43.7  | 10.3 | Acetyl                     | 8  | 3.3 | TRUE  | TRUE  |
| 168 | RS22A_YEAST | 40S ribosomal protein S22-A                                | P0COW1 | 92.2  | 2 | 14.6  | 9.9  |                            | 14 | 5.2 | FALSE | TRUE  |
| 169 | DLHH_YEAST  | Putative carboxymethylenebutenolidase                      | Q07505 | 89.6  | 3 | 30.8  | 5.9  | Carbamidomethyl            | 25 | 5.8 | TRUE  | TRUE  |
| 170 | PPID_YEAST  | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CPR6                   | P53691 | 89.3  | 2 | 42    | 5.8  | Carbamidomethyl            | 7  | 3.4 | TRUE  | FALSE |
| 171 | RL8A_YEAST  | 60S ribosomal protein L8-A                                 | P17076 | 88.6  | 3 | 28.1  | 10.0 |                            | 19 | 2.7 | FALSE | TRUE  |
| 172 | HOSC_YEAST  | Homocitrate synthase, cytosolic isozyme                    | P48570 | 88.2  | 2 | 47.1  | 6.8  |                            | 5  | 0.6 | TRUE  | TRUE  |
| 173 | TCTP_YEAST  | Translationally-controlled tumor protein homolog           | P35691 | 86.2  | 3 | 18.7  | 4.4  |                            | 22 | 4.3 | TRUE  | TRUE  |
| 174 | RS3_YEAST   | 40S ribosomal protein S3                                   | P05750 | 83.9  | 2 | 26.5  | 9.4  |                            | 19 | 4.6 | TRUE  | FALSE |
| 175 | QCR7_YEAST  | Cytochrome b-c1 complex subunit 7, mitochondrial           | P00128 | 83.1  | 3 | 14.6  | 5.6  | Carbamidomethyl            | 46 | 6.4 | TRUE  | FALSE |
| 176 | RL40A_YEAST | Ubiquitin-60S ribosomal protein L40                        | P0CH08 | 82.5  | 2 | 17    | 10.3 |                            | 27 | 2.5 | TRUE  | TRUE  |
| 177 | HIS1_YEAST  | ATP phosphoribosyltransferase                              | P00498 | 81.0  | 2 | 32.2  | 5.9  | Carbamidomethyl, Acetyl    | 9  | 2.9 | TRUE  | FALSE |
| 178 | GLGB_YEAST  | 1,4-alpha-glucan-branching enzyme                          | P32775 | 80.6  | 2 | 81.1  | 5.8  |                            | 4  | 5.4 | TRUE  | FALSE |
| 179 | SSZ1_YEAST  | Ribosome-associated complex subunit SSZ1                   | P38788 | 80.6  | 2 | 58.2  | 4.9  |                            | 7  | 3.7 | TRUE  | FALSE |

|     |             |  |        |      |   |       |      |                                    |    |     |       |       |
|-----|-------------|--|--------|------|---|-------|------|------------------------------------|----|-----|-------|-------|
| 180 | PAA1_YEAST  | Polyamine N-acetyltransferase 1                  | Q12447 | 80.2 | 2 | 21.9  | 5.6  |                                    | 15 | 4.2 | TRUE  | FALSE |
| 181 | OTC_YEAST   | Ornithine carbamoyltransferase                   | P05150 | 80.1 | 2 | 37.8  | 5.9  | Carbamidomethyl, Acetyl, Oxidation | 11 | 1.9 | TRUE  | FALSE |
| 182 | RL1A_YEAST  | 60S ribosomal protein L1-A                       | P0CX43 | 79.9 | 3 | 24.5  | 9.7  |                                    | 22 | 2.9 | TRUE  | TRUE  |
| 183 | YM94_YEAST  | Uncharacterized protein YMR315W                  | Q04869 | 79.4 | 2 | 38.2  | 6.2  | Carbamidomethyl                    | 11 | 1.9 | TRUE  | FALSE |
| 184 | RL10_YEAST  | 60S ribosomal protein L10                        | P41805 | 79.2 | 2 | 25.3  | 10.0 | Carbamidomethyl                    | 19 | 1.0 | TRUE  | FALSE |
| 185 | EF1G1_YEAST | Elongation factor 1-gamma 1                      | P29547 | 78.5 | 2 | 47.1  | 8.4  | Acetyl                             | 6  | 1.3 | TRUE  | TRUE  |
| 186 | KHSE_YEAST  | Homoserine kinase                                | P17423 | 78.3 | 3 | 38.7  | 5.3  |                                    | 16 | 5.7 | TRUE  | FALSE |
| 187 | YG4D_YEAST  | Putative elongation factor 1 gamma homolog       | P42936 | 78.1 | 2 | 26.3  | 5.4  | Acetyl                             | 11 | 2.3 | TRUE  | FALSE |
| 188 | ARA1_YEAST  | D-arabinose dehydrogenase [NAD(P)+] heavy chain  | P38115 | 77.0 | 2 | 38.9  | 5.6  |                                    | 11 | 2.5 | TRUE  | TRUE  |
| 189 | GCY1_YEAST  | Glycerol 2-dehydrogenase (NADP(+))               | P14065 | 77.0 | 3 | 35.1  | 7.8  | Carbamidomethyl                    | 17 | 2.0 | TRUE  | FALSE |
| 190 | LEU3_YEAST  | 3-isopropylmalate dehydrogenase                  | P04173 | 76.3 | 2 | 38.9  | 5.5  |                                    | 9  | 6.0 | TRUE  | TRUE  |
| 191 | RS3A1_YEAS1 | 40S ribosomal protein S1-A                       | B3RHV0 | 75.2 | 2 | 28.7  | 10.1 |                                    | 10 | 3.9 | TRUE  | TRUE  |
| 192 | EF1B_YEAST  | Elongation factor 1-beta                         | P32471 | 75.1 | 2 | 22.6  | 4.3  | Acetyl                             | 11 | 1.5 | FALSE | TRUE  |
| 193 | RL28_YEAST  | 60S ribosomal protein L28                        | P02406 | 74.2 | 1 | 16.7  | 10.6 |                                    | 10 | 3.1 | FALSE | TRUE  |
| 194 | RS8A_YEAST  | 40S ribosomal protein S8-A                       | P0CX39 | 74.0 | 2 | 22.5  | 10.7 |                                    | 14 | 3.5 | TRUE  | TRUE  |
| 195 | SNU13_YEAST | 13 kDa ribonucleoprotein-associated protein      | P39990 | 73.7 | 1 | 13.6  | 7.7  |                                    | 19 | 0.1 | TRUE  | FALSE |
| 196 | ACAC_YEAST  | Acetyl-CoA carboxylase                           | Q00955 | 72.7 | 2 | 250.2 | 5.9  |                                    | 2  | 0.5 | TRUE  | TRUE  |
| 197 | PSA6_YEAST  | Proteasome subunit alpha type-6                  | P40302 | 72.4 | 2 | 25.6  | 6.9  |                                    | 16 | 1.1 | TRUE  | TRUE  |
| 198 | ERG6_YEAST  | Sterol 24-C-methyltransferase                    | P25087 | 72.0 | 2 | 43.4  | 5.5  |                                    | 10 | 3.2 | TRUE  | TRUE  |
| 199 | GCSH_YEAST  | Glycine cleavage system H protein, mitochondrial | P39726 | 70.8 | 2 | 18.8  | 4.7  |                                    | 22 | 0.5 | TRUE  | TRUE  |
| 200 | RSSA2_YEAS1 | 40S ribosomal protein S0-B                       | B3LT19 | 70.4 | 2 | 27.9  | 4.7  |                                    | 12 | 1.1 | TRUE  | TRUE  |
| 201 | RL12A_YEAST | 60S ribosomal protein L12-A                      | P0CX53 | 69.0 | 1 | 17.8  | 9.4  |                                    | 9  | 1.9 | TRUE  | TRUE  |
| 202 | RS24A_YEAST | 40S ribosomal protein S24-A                      | P0CX31 | 68.9 | 1 | 15.3  | 10.5 |                                    | 11 | 1.7 | TRUE  | TRUE  |
| 203 | PNC1_YEAST  | Nicotinamidase                                   | P53184 | 67.4 | 2 | 25    | 5.8  |                                    | 18 | 1.6 | TRUE  | TRUE  |
| 204 | RL20A_YEAST | 60S ribosomal protein L20-A                      | P0CX23 | 67.2 | 2 | 20.4  | 10.3 |                                    | 19 | 2.9 | TRUE  | FALSE |
| 205 | SPEE_YEAST  | Spermidine synthase                              | Q12074 | 67.2 | 2 | 33.3  | 5.3  | Carbamidomethyl                    | 12 | 4.8 | TRUE  | FALSE |
| 206 | FAS2_YEAST  | Fatty acid synthase subunit alpha                | P19097 | 65.9 | 2 | 206.8 | 5.3  |                                    | 1  | 5.6 | FALSE | TRUE  |
| 207 | RL14B_YEAST | 60S ribosomal protein L14-B                      | P38754 | 65.1 | 1 | 15.1  | 10.9 |                                    | 14 | 2.2 | TRUE  | FALSE |
| 208 | MDHP_YEAST  | Malate dehydrogenase, peroxisomal                | P32419 | 64.9 | 3 | 37.2  | 9.2  |                                    | 16 | 0.9 | TRUE  | TRUE  |
| 209 | PYR1_YEAST  | Protein URA2                                     | P07259 | 64.9 | 1 | 244.9 | 5.6  | Acetyl, Oxidation                  | 1  | 0.2 | TRUE  | TRUE  |
| 210 | SYEC_YEAST  | Glutamate--tRNA ligase, cytoplasmic              | P46655 | 64.5 | 3 | 80.8  | 7.2  |                                    | 5  | 3.2 | TRUE  | FALSE |
| 211 | AIP1_YEAST  | Actin-interacting protein 1                      | P46680 | 64.1 | 2 | 67.3  | 5.4  | Carbamidomethyl                    | 5  | 1.9 | TRUE  | FALSE |
| 212 | THRC_YEAST  | Threonine synthase                               | P16120 | 63.6 | 3 | 57.4  | 5.5  |                                    | 12 | 4.1 | TRUE  | TRUE  |
| 213 | ARO8_YEAST  | Aromatic/aminoadipate aminotransferase 1         | P04076 | 63.4 | 1 | 56.1  | 5.7  |                                    | 3  | 1.0 | TRUE  | TRUE  |
| 214 | RL19A_YEAST | 60S ribosomal protein L19-A                      | P0CX82 | 63.4 | 2 | 21.7  | 11.4 |                                    | 14 | 4.5 | TRUE  | FALSE |
| 215 | SYRC_YEAST  | Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic               | Q05506 | 62.9 | 2 | 69.5  | 6.3  | Oxidation                          | 5  | 1.9 | TRUE  | FALSE |

|     |             |   |        |      |   |       |      |                 |    |      |       |       |
|-----|-------------|---|--------|------|---|-------|------|-----------------|----|------|-------|-------|
| 216 | HSP7F_YEAST | Heat shock protein homolog SSE1                                 | P32589 | 62.6 | 2 | 77.3  | 5.1  | Carbamidomethyl | 4  | 5.1  | TRUE  | FALSE |
| 217 | SUB2_YEAST  | ATP-dependent RNA helicase SUB2                                 | A6ZXP4 | 61.5 | 1 | 50.2  | 5.3  | Carbamidomethyl | 2  | 7.4  | TRUE  | FALSE |
| 218 | HRI1_YEAST  | Protein HRI1  | Q05905 | 61.3 | 2 | 27.5  | 5.1  |                 | 14 | 6.4  | TRUE  | TRUE  |
| 219 | SHB17_YEAST | Sedoheptulose 1,7-bisphosphatase                                | P36136 | 61.3 | 2 | 31    | 5.6  |                 | 12 | 1.3  | TRUE  | FALSE |
| 220 | APE2_YEAST  | Aminopeptidase 2, mitochondrial                                 | P32454 | 61.0 | 1 | 107.7 | 8.1  |                 | 2  | 0.5  | TRUE  | TRUE  |
| 221 | RL16A_YEAST | 60S ribosomal protein L16-A                                     | P26784 | 61.0 | 1 | 22.2  | 10.5 | Acetyl          | 9  | 1.5  | TRUE  | FALSE |
| 222 | CBPS_YEAST  | Carboxypeptidase S  | P27614 | 60.7 | 2 | 64.6  | 5.3  | Carbamidomethyl | 4  | 2.8  | TRUE  | FALSE |
| 223 | APA1_YEAST  | Protein APA1  | P16550 | 59.6 | 2 | 36.5  | 4.9  | Acetyl          | 16 | 2.4  | TRUE  | FALSE |
| 224 | LCF1_YEAST  | Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1                             | P30624 | 59.5 | 1 | 77.8  | 7.5  |                 | 2  | 0.6  | TRUE  | TRUE  |
| 225 | ARC1_YEAST  | tRNA-aminoacylation cofactor ARC1                               | P46672 | 59.3 | 2 | 42.1  | 7.7  | Oxidation       | 11 | 0.9  | TRUE  | TRUE  |
| 226 | GVP36_YEAST | Protein GVP36   | P40531 | 59.1 | 2 | 36.6  | 4.9  | Acetyl          | 7  | 3.3  | FALSE | TRUE  |
| 227 | FSH1_YEAST  | Family of serine hydrolases 1                                   | P38777 | 58.9 | 2 | 27.3  | 5.9  | Carbamidomethyl | 16 | 2.3  | TRUE  | TRUE  |
| 228 | PYRX_YEAST  | Orotate phosphoribosyltransferase 2                             | P30402 | 58.9 | 2 | 24.8  | 8.7  | Carbamidomethyl | 9  | 3.2  | TRUE  | FALSE |
| 229 | EF1G2_YEAST | Elongation factor 1-gamma 2                                     | P36008 | 58.8 | 2 | 46.5  | 7.6  |                 | 9  | 2.0  | TRUE  | FALSE |
| 230 | ACS2_YEAST  | Acetyl-coenzyme A synthetase 2                                  | P52910 | 57.8 | 1 | 75.4  | 6.2  | Acetyl          | 3  | 1.1  | TRUE  | TRUE  |
| 231 | EXG1_YEAST  | Glucan 1,3-beta-glucosidase I/II                                | P23776 | 57.2 | 2 | 51.3  | 4.6  |                 | 5  | 3.7  | TRUE  | FALSE |
| 232 | RL17A_YEAST | 60S ribosomal protein L17-A                                     | P05740 | 56.0 | 1 | 20.5  | 10.9 |                 | 9  | 3.4  | TRUE  | TRUE  |
| 233 | SYFB_YEAST  | Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit                         | P15624 | 55.4 | 1 | 67.3  | 5.5  |                 | 3  | 8.2  | TRUE  | FALSE |
| 234 | RIR2_YEAST  | Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain 1              | P09938 | 55.1 | 1 | 46.1  | 5.1  |                 | 5  | 1.4  | TRUE  | TRUE  |
| 235 | QCRI_YEAST  | Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial                | P07256 | 54.8 | 3 | 50.2  | 6.8  |                 | 18 | 3.5  | TRUE  | FALSE |
| 236 | SS100_YEAST | Sporulation-specific wall maturation protein                    | P13130 | 54.7 | 1 | 34.2  | 5.2  |                 | 7  | 0.4  | TRUE  | TRUE  |
| 237 | GRE2_YEAST  | NADPH-dependent methylglyoxal reductase GRE2                    | Q12068 | 54.4 | 2 | 38.1  | 5.8  |                 | 12 | 4.8  | TRUE  | TRUE  |
| 238 | SYKC_YEAST  | Lysine--tRNA ligase, cytoplasmic                                | P15180 | 54.0 | 2 | 67.9  | 5.8  | Carbamidomethyl | 6  | 6.1  | TRUE  | FALSE |
| 239 | NNRD_YEAST  | ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase                   | P36059 | 52.8 | 1 | 37.3  | 7.5  |                 | 4  | 1.6  | TRUE  | FALSE |
| 240 | RL6A_YEAST  | 60S ribosomal protein L6-A                                      | Q02326 | 52.1 | 2 | 19.9  | 10.1 |                 | 14 | 4.0  | TRUE  | FALSE |
| 241 | OLA1_YEAST  | Obg-like ATPase 1   | P38219 | 52.0 | 2 | 44.1  | 7.1  |                 | 8  | 1.0  | TRUE  | TRUE  |
| 242 | RS7A_YEAST  | 40S ribosomal protein S7-A                                      | P26786 | 51.5 | 2 | 21.6  | 9.8  |                 | 21 | 1.2  | TRUE  | TRUE  |
| 243 | SCW4_YEAST  | Probable family 17 glucosidase SCW4                             | P53334 | 51.5 | 1 | 40.1  | 4.7  |                 | 5  | 1.0  | TRUE  | TRUE  |
| 244 | TBB_YEAST   | Tubulin beta chain  | P02557 | 51.5 | 1 | 50.9  | 4.6  |                 | 2  | 3.4  | FALSE | TRUE  |
| 245 | RS22A_YEAST | 40S ribosomal protein S22-A                                     | P0C0W1 | 51.0 | 2 | 14.6  | 9.9  |                 | 24 | 1.6  | TRUE  | TRUE  |
| 246 | IF2A_YEAST  | Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha        | P20459 | 50.9 | 1 | 34.7  | 4.9  |                 | 6  | 6.2  | TRUE  | FALSE |
| 247 | ODPB_YEAST  | Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial | P32473 | 49.9 | 2 | 40    | 5.2  |                 | 10 | 2.8  | TRUE  | TRUE  |
| 248 | PSA2_YEAST  | Proteasome subunit alpha type-2                                 | P23639 | 49.3 | 2 | 27.1  | 5.5  |                 | 10 | 1.3  | TRUE  | TRUE  |
| 249 | AIM2_YEAST  | Protein AIM2  | P39721 | 48.8 | 1 | 96    | 9.9  |                 | 8  | 1.3  | TRUE  | TRUE  |
| 250 | LGUL_YEAST  | Lactoylglutathione lyase  | P50107 | 48.8 | 2 | 37.2  | 6.4  | Carbamidomethyl | 8  | 6.4  | TRUE  | FALSE |
| 251 | GST1_YEAST  | Glutathione S-transferase 1                                     | P40582 | 48.6 | 1 | 26.8  | 6.2  | Acetyl          | 5  | 13.7 | FALSE | TRUE  |

|     |                 |   |        |      |   |       |     |                 |    |     |       |       |
|-----|-----------------|---|--------|------|---|-------|-----|-----------------|----|-----|-------|-------|
| 252 | CDC48_YEAST     | Cell division control protein 48  | P25694 | 47.8 | 1 | 91.9  | 4.8 | Carbamidomethyl | 2  | 3.7 | TRUE  | FALSE |
| 253 | MIL1_YEAST      | Probable lipase MIL1  | P43564 | 47.3 | 1 | 119.4 | 5.1 | Acetyl          | 1  | 9.3 | TRUE  | FALSE |
| 254 | OSTB_YEAST      | Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit WBP1 | P33767 | 47.3 | 1 | 49.4  | 5.6 |                 | 3  | 4.6 | TRUE  | FALSE |
| 255 | KYNU_YEAST      | Kynureninase  | Q05979 | 45.3 | 1 | 51    | 5.1 |                 | 4  | 3.4 | TRUE  | FALSE |
| 256 | ODPA_YEAST      | Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, mitochondrial            | P16387 | 44.8 | 1 | 46.3  | 8.3 |                 | 3  | 0.8 | TRUE  | TRUE  |
| 257 | FMP45_YEAST     | SUR7 family protein FMP45   | Q07651 | 44.3 | 1 | 34.1  | 9.5 |                 | 5  | 1.4 | FALSE | TRUE  |
| 258 | APT1_YEAST      | Adenine phosphoribosyltransferase 1   | P49435 | 44.2 | 2 | 20.6  | 5.0 | Acetyl          | 13 | 4.1 | TRUE  | FALSE |
| 259 | PSB7_YEAST      | Proteasome subunit beta type-7  | P30657 | 44.1 | 1 | 29.4  | 5.7 |                 | 9  | 0.6 | TRUE  | FALSE |
| 260 | RS7B_YEAST      | 40S ribosomal protein S7-B  | P48164 | 43.9 | 2 | 21.6  | 9.9 |                 | 21 | 5.2 | TRUE  | FALSE |
| 261 | RS20_YEAST      | 40S ribosomal protein S20   | P38701 | 43.2 | 1 | 13.9  | 9.5 |                 | 11 | 0.8 | TRUE  | TRUE  |
| 262 | DCS2_YEAST      | Inactive diphosphatase DCS2   | Q12123 | 43.1 | 1 | 40.9  | 6.1 |                 | 5  | 1.8 | TRUE  | FALSE |
| 263 | ADT3_YEAST      | ADP,ATP carrier protein 3   | P18238 | 42.8 | 1 | 33.3  | 9.8 |                 | 4  | 0.2 | TRUE  | FALSE |
| 264 | PSB3_YEAST      | Proteasome subunit beta type-3  | P25451 | 42.7 | 1 | 22.6  | 5.0 |                 | 9  | 0.0 | TRUE  | FALSE |
| 265 | RL9A_YEAST      | 60S ribosomal protein L9-A  | P05738 | 42.0 | 2 | 21.6  | 9.7 |                 | 14 | 2.2 | TRUE  | FALSE |
| 266 | DUG1_YEAST      | Cys-Gly metallopeptidase DUG1   | P43616 | 41.5 | 1 | 52.8  | 5.4 |                 | 4  | 2.8 | FALSE | TRUE  |
| 267 | HMDH1_YEAS<br>T | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1                           | P12683 | 41.5 | 1 | 115.6 | 8.2 |                 | 2  | 0.0 | TRUE  | FALSE |
| 268 | PCNA_YEAST      | Proliferating cell nuclear antigen  | P15873 | 41.5 | 1 | 28.9  | 4.4 |                 | 5  | 0.4 | TRUE  | TRUE  |
| 269 | SODC_YEAST      | Superoxide dismutase [Cu-Zn]  | P00445 | 41.4 | 1 | 15.8  | 5.6 | Carbamidomethyl | 17 | 1.4 | TRUE  | TRUE  |
| 270 | SOL3_YEAS1      | 6-phosphogluconolactonase 3   | B3LSS7 | 41.4 | 1 | 27.8  | 5.3 |                 | 10 | 4.1 | TRUE  | TRUE  |
| 271 | PABP_YEAST      | Polyadenylate-binding protein, cytoplasmic and nuclear                      | P04147 | 41.3 | 1 | 64.3  | 5.7 |                 | 4  | 0.6 | TRUE  | TRUE  |
| 272 | SGT2_YEAST      | Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein 2          | Q12118 | 40.5 | 1 | 37.2  | 4.7 |                 | 4  | 1.3 | TRUE  | FALSE |
| 273 | PMM_YEAST       | Phosphomannomutase  | P07283 | 40.4 | 1 | 29    | 5.1 |                 | 8  | 0.3 | TRUE  | TRUE  |
| 274 | SEC31_YEAST     | Protein transport protein SEC31   | P38968 | 39.7 | 1 | 138.6 | 5.5 |                 | 2  | 0.4 | TRUE  | TRUE  |
| 275 | MRH1_YEAST      | Protein MRH1  | Q12117 | 39.6 | 1 | 36.2  | 9.3 |                 | 4  | 4.8 | FALSE | TRUE  |
| 276 | ASSY_YEAST      | Argininosuccinate synthase  | P22768 | 39.5 | 1 | 46.9  | 5.4 |                 | 5  | 0.1 | TRUE  | TRUE  |
| 277 | SER33_YEAST     | D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 2  | P40510 | 39.5 | 2 | 51.2  | 6.0 |                 | 6  | 1.5 | TRUE  | TRUE  |
| 278 | MPCP_YEAST      | Mitochondrial phosphate carrier protein                                     | P23641 | 39.2 | 1 | 32.8  | 9.4 |                 | 6  | 0.4 | TRUE  | TRUE  |
| 279 | IF5A1_YEAST     | Eukaryotic translation initiation factor 5A-1                               | P23301 | 39.0 | 1 | 17.1  | 4.8 |                 | 8  | 2.8 | TRUE  | TRUE  |
| 280 | OM45_YEAST      | Mitochondrial outer membrane protein OM45                                   | P16547 | 39.0 | 2 | 44.6  | 8.6 |                 | 11 | 4.4 | TRUE  | FALSE |
| 281 | TMEDA_YEAS<br>T | Endoplasmic reticulum vesicle protein 25                                    | P54837 | 38.9 | 1 | 24.1  | 5.4 |                 | 8  | 6.4 | TRUE  | FALSE |
| 282 | PLB1_YEAST      | Lysophospholipase 1   | Q06494 | 38.2 | 2 | 71.6  | 4.5 |                 | 4  | 3.3 | FALSE | TRUE  |
| 283 | GLRX1_YEAST     | Glutaredoxin-1  | P25373 | 37.0 | 1 | 12.4  | 5.0 |                 | 12 | 2.1 | TRUE  | FALSE |
| 284 | MTD1_YEAST      | Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase [NAD(+)]                            | Q02046 | 36.5 | 1 | 36.2  | 6.6 |                 | 6  | 3.7 | TRUE  | FALSE |
| 285 | ADPP_YEAST      | ADP-ribose pyrophosphatase  | Q01976 | 36.0 | 1 | 26.1  | 6.0 |                 | 7  | 0.6 | TRUE  | TRUE  |
| 286 | DLDH_YEAST      | Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial                                  | P09624 | 33.9 | 1 | 54    | 8.1 |                 | 4  | 0.5 | TRUE  | TRUE  |

|     |             |  |        |      |   |       |      |                                    |    |      |       |       |
|-----|-------------|--|--------|------|---|-------|------|------------------------------------|----|------|-------|-------|
| 287 | MAN1_YEAST  | Alpha-mannosidase  | P22855 | 33.8 | 1 | 124.4 | 6.8  |                                    | 1  | 0.4  | FALSE | TRUE  |
| 288 | SGT2_YEAST  | Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein 2 | Q12118 | 33.6 | 1 | 37.2  | 4.7  |                                    | 4  | 3.3  | FALSE | TRUE  |
| 289 | NSR1_YEAST  | Nuclear localization sequence-binding protein                      | P27476 | 33.4 | 1 | 44.5  | 4.9  |                                    | 4  | 0.9  | TRUE  | TRUE  |
| 290 | CRP1_YEASV  | Cruciform DNA-recognizing protein 1                                | E7LVH4 | 33.1 | 1 | 51.1  | 6.9  | Carbamidomethyl                    | 3  | 6.4  | TRUE  | FALSE |
| 291 | RS19B_YEAST | 40S ribosomal protein S19-B  | P07281 | 32.8 | 1 | 15.9  | 9.6  |                                    | 12 | 0.4  | TRUE  | TRUE  |
| 292 | ATR_YEAST   | Serine/threonine-protein kinase MEC1                               | P38111 | 32.7 | 1 | 273.2 | 8.5  | Carbamidomethyl, Acetyl, Oxidation | 1  | 18.5 | FALSE | TRUE  |
| 293 | PSA3_YEAST  | Proteasome subunit alpha type-3                                    | P23638 | 32.6 | 1 | 28.7  | 5.1  |                                    | 5  | 0.5  | TRUE  | FALSE |
| 294 | H4_YEAST    | Histone H4   | P02309 | 32.5 | 1 | 11.4  | 11.4 |                                    | 10 | 3.9  | FALSE | TRUE  |
| 295 | IF4E_YEAST  | Eukaryotic translation initiation factor 4E                        | P07260 | 31.4 | 1 | 24.2  | 5.3  |                                    | 5  | 2.7  | TRUE  | FALSE |
| 296 | PDI_YEAST   | Protein disulfide-isomerase  | P17967 | 31.4 | 1 | 58.2  | 4.4  |                                    | 4  | 2.2  | TRUE  | TRUE  |
| 297 | SYV_YEAST   | Valine--tRNA ligase, mitochondrial                                 | P07806 | 31.1 | 1 | 125.7 | 6.5  |                                    | 2  | 3.5  | TRUE  | FALSE |
| 298 | IDH1_YEAST  | Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1, mitochondrial            | P28834 | 30.9 | 1 | 39.3  | 9.0  |                                    | 6  | 3.2  | FALSE | TRUE  |
| 299 | PDX3_YEAST  | Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase                                  | P38075 | 30.2 | 1 | 26.9  | 6.9  |                                    | 5  | 3.8  | TRUE  | FALSE |
| 300 | PSA1_YEAST  | Proteasome subunit alpha type-1                                    | P21243 | 30.1 | 1 | 28    | 5.9  |                                    | 6  | 0.9  | TRUE  | FALSE |
| 301 | YMY9_YEAST  | Glucose-6-phosphate 1-epimerase                                    | Q03161 | 29.9 | 1 | 33.9  | 5.8  |                                    | 4  | 4.2  | TRUE  | FALSE |
| 302 | PRX1_YEAST  | Peroxisredoxin PRX1, mitochondrial                                 | P34227 | 29.6 | 1 | 29.5  | 9.0  |                                    | 4  | 0.5  | TRUE  | TRUE  |
| 303 | CLH_YEAST   | Clathrin heavy chain   | P22137 | 29.4 | 1 | 187.1 | 5.1  |                                    | 2  | 3.9  | TRUE  | FALSE |
| 304 | NAM9_YEAST  | 37S ribosomal protein NAM9, mitochondrial                          | P27929 | 29.0 | 1 | 56.3  | 9.7  |                                    | 2  | 9.9  | FALSE | TRUE  |
| 305 | ERF1_YEAST  | Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1                  | P12385 | 28.7 | 1 | 49    | 4.9  |                                    | 3  | 3.3  | TRUE  | FALSE |
| 306 | PSB5_YEAST  | Proteasome subunit beta type-5                                     | P30656 | 28.7 | 1 | 31.6  | 5.8  |                                    | 4  | 3.7  | TRUE  | FALSE |
| 307 | YRO2_YEAST  | Protein YRO2   | P38079 | 28.4 | 1 | 38.7  | 9.2  |                                    | 6  | 3.5  | TRUE  | FALSE |
| 308 | TREA_YEAST  | Cytosolic neutral trehalase  | P32356 | 27.5 | 1 | 85.8  | 7.6  |                                    | 2  | 7.1  | TRUE  | FALSE |
| 309 | KGUA_YEAST  | Guanylate kinase   | P15454 | 27.4 | 1 | 20.6  | 6.6  |                                    | 8  | 2.5  | TRUE  | FALSE |
| 310 | SAR1_YEAST  | Small COPII coat GTPase SAR1                                       | P20606 | 27.3 | 1 | 21.4  | 5.2  |                                    | 6  | 1.3  | TRUE  | FALSE |
| 311 | GYS2_YEAST  | Glycogen [starch] synthase isoform 2                               | P27472 | 27.2 | 1 | 80    | 5.9  |                                    | 2  | 5.7  | TRUE  | FALSE |
| 312 | NDH1_YEAST  | External NADH-ubiquinone oxidoreductase 1, mitochondrial           | P40215 | 27.1 | 1 | 62.7  | 9.3  |                                    | 4  | 5.1  | TRUE  | FALSE |
| 313 | YRA1_YEAST  | RNA annealing protein YRA1   | Q12159 | 27.0 | 1 | 24.9  | 11.3 | Acetyl                             | 7  | 0.6  | FALSE | TRUE  |
| 314 | ARPC5_YEAST | Actin-related protein 2/3 complex subunit 5                        | P40518 | 26.9 | 1 | 17.1  | 5.1  |                                    | 7  | 5.4  | FALSE | TRUE  |
| 315 | SYG_YEAST   | Glycine--tRNA ligase 1, mitochondrial                              | P38088 | 26.8 | 1 | 78.1  | 6.1  |                                    | 3  | 0.6  | TRUE  | FALSE |
| 316 | PUT2_YEAST  | Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial       | P07275 | 26.6 | 1 | 64.4  | 6.5  |                                    | 5  | 2.1  | TRUE  | FALSE |
| 317 | YRF14_YEAST | Y' element ATP-dependent helicase protein 1 copy 4                 | O13559 | 26.5 | 1 | 156.3 | 6.8  | Acetyl                             | 1  | 13.5 | FALSE | TRUE  |
| 318 | ACON_YEAST  | Aconitate hydratase, mitochondrial                                 | P19414 | 26.4 | 1 | 85.3  | 8.2  |                                    | 2  | 4.1  | TRUE  | FALSE |
| 319 | RS12_YEAST  | 40S ribosomal protein S12  | P48589 | 26.2 | 1 | 15.5  | 4.7  |                                    | 12 | 1.9  | FALSE | TRUE  |
| 320 | PUR2_YEAST  | Bifunctional purine biosynthetic protein ADE5,7                    | P07244 | 26.1 | 1 | 86    | 5.1  |                                    | 2  | 0.1  | TRUE  | TRUE  |
| 321 | IF6_YEAST   | Eukaryotic translation initiation factor 6                         | Q12522 | 25.9 | 1 | 26.4  | 4.5  |                                    | 7  | 3.0  | FALSE | TRUE  |
| 322 | RAS2_YEAST  | Ras-like protein 2   | P01120 | 25.5 | 1 | 34.7  | 6.8  |                                    | 8  | 3.5  | TRUE  | FALSE |

|     |             |   |        |      |   |       |      |                 |    |      |       |       |
|-----|-------------|---|--------|------|---|-------|------|-----------------|----|------|-------|-------|
| 323 | RL11A_YEAST | 60S ribosomal protein L11-A                               | P0C0W9 | 25.4 | 1 | 19.7  | 9.9  |                 | 9  | 3.9  | TRUE  | FALSE |
| 324 | VAC8_YEAST  | Vacuolar protein 8  | P39968 | 25.4 | 1 | 63.2  | 5.0  |                 | 4  | 2.2  | TRUE  | FALSE |
| 325 | DPM1_YEAST  | Dolichol-phosphate mannosyltransferase                    | P14020 | 25.1 | 1 | 30.3  | 7.7  |                 | 5  | 0.2  | TRUE  | TRUE  |
| 326 | PMG2_YEAST  | Phosphoglycerate mutase 2                                 | Q12008 | 25.1 | 1 | 36.1  | 6.1  |                 | 4  | 1.5  | TRUE  | FALSE |
| 327 | SEC4_YEAST  | Ras-related protein SEC4                                  | P07560 | 25.0 | 1 | 23.5  | 6.6  |                 | 5  | 6.4  | TRUE  | FALSE |
| 328 | CAP_YEAST   | Adenylyl cyclase-associated protein                       | P17555 | 24.3 | 1 | 57.5  | 5.5  |                 | 2  | 0.6  | TRUE  | FALSE |
| 329 | ARGD_YEAST  | Acetylmethionine aminotransferase, mitochondrial          | P18544 | 23.9 | 1 | 46.7  | 7.2  |                 | 5  | 5.2  | TRUE  | FALSE |
| 330 | ASNS1_YEAST | Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] 1           | P49089 | 23.9 | 1 | 64.4  | 5.7  |                 | 2  | 3.6  | TRUE  | FALSE |
| 331 | NNRE_YEAST  | NAD(P)H-hydrate epimerase                                 | P40165 | 23.3 | 1 | 27.5  | 8.5  |                 | 5  | 0.4  | TRUE  | FALSE |
| 332 | STM1_YEAST  | Suppressor protein STM1                                   | P39015 | 23.3 | 1 | 30    | 9.7  | Acetyl          | 10 | 2.3  | TRUE  | TRUE  |
| 333 | CCW14_YEAST | Covalently-linked cell wall protein 14                    | O13547 | 22.8 | 1 | 23.3  | 5.7  | Carbamidomethyl | 10 | 6.3  | FALSE | TRUE  |
| 334 | SYTC_YEAST  | Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic                       | P04801 | 22.7 | 1 | 84.5  | 6.6  |                 | 1  | 3.6  | FALSE | TRUE  |
| 335 | ATPF_YEAST  | ATP synthase subunit 4, mitochondrial                     | P05626 | 22.2 | 1 | 26.9  | 9.2  |                 | 6  | 2.4  | FALSE | TRUE  |
| 336 | RS9B_YEAST  | 40S ribosomal protein S9-B                                | P05755 | 22.1 | 2 | 22.3  | 10.1 |                 | 14 | 1.2  | TRUE  | FALSE |
| 337 | STI1_YEAST  | Heat shock protein STI1                                   | P15705 | 22.1 | 1 | 66.2  | 5.4  | Carbamidomethyl | 3  | 4.6  | TRUE  | FALSE |
| 338 | YP204_YEAST | Y' element ATP-dependent helicase YPR204W                 | Q08995 | 21.8 | 1 | 115.1 | 6.3  | Acetyl          | 1  | 15.5 | TRUE  | FALSE |
| 339 | SYSC_YEAST  | Serine--tRNA ligase, cytoplasmic                          | P07284 | 21.4 | 1 | 53.3  | 5.8  |                 | 5  | 4.6  | TRUE  | TRUE  |
| 340 | COPG_YEAST  | Coatomer subunit gamma                                    | P32074 | 21.2 | 1 | 104.8 | 5.0  |                 | 2  | 0.5  | TRUE  | FALSE |
| 341 | LYS1_YEAST  | Saccharopine dehydrogenase [NAD(+), L-lysine-forming]     | P38998 | 20.9 | 1 | 41.4  | 9.2  |                 | 5  | 1.6  | TRUE  | TRUE  |
| 342 | FKBP_YEAST  | FK506-binding protein 1                                   | P20081 | 20.7 | 1 | 12.2  | 5.7  |                 | 11 | 5.5  | FALSE | TRUE  |
| 343 | SERC_YEAST  | Phosphoserine aminotransferase                            | P33330 | 20.5 | 1 | 43.4  | 6.1  |                 | 7  | 8.8  | TRUE  | FALSE |
| 344 | NOPI3_YEAST | Nucleolar protein 13                                      | P53883 | 20.1 | 1 | 45.6  | 9.3  | Oxidation       | 4  | 9.5  | TRUE  | FALSE |
| 345 | RS11A_YEAST | 40S ribosomal protein S11-A                               | P0CX47 | 19.9 | 1 | 17.7  | 10.8 | Carbamidomethyl | 11 | 0.1  | FALSE | TRUE  |
| 346 | ATP7_YEAST  | ATP synthase subunit d, mitochondrial                     | P30902 | 19.4 | 1 | 19.8  | 8.9  |                 | 8  | 3.6  | TRUE  | FALSE |
| 347 | TCB1_YEAST  | Tricalbin-1   | Q12466 | 18.8 | 1 | 133.5 | 6.7  | Oxidation       | 2  | 3.7  | TRUE  | FALSE |
| 348 | THI4_YEAST  | Thiamine thiazole synthase                                | P32318 | 18.5 | 1 | 35    | 5.8  |                 | 6  | 3.7  | TRUE  | FALSE |
| 349 | ILV3_YEAST  | Dihydroxy-acid dehydratase, mitochondrial                 | P39522 | 18.4 | 1 | 62.8  | 7.9  |                 | 3  | 5.4  | FALSE | TRUE  |
| 350 | PFKA2_YEAST | ATP-dependent 6-phosphofructokinase subunit beta          | P16862 | 18.1 | 1 | 104.6 | 6.2  |                 | 4  | 4.6  | TRUE  | FALSE |
| 351 | RL13B_YEAST | 60S ribosomal protein L13-B                               | P40212 | 17.9 | 1 | 22.5  | 11.1 |                 | 15 | 4.9  | TRUE  | FALSE |
| 352 | ATPG_YEAST  | ATP synthase subunit gamma, mitochondrial                 | P38077 | 17.7 | 1 | 34.3  | 9.3  |                 | 7  | 8.7  | TRUE  | FALSE |
| 353 | PUR7_YEAST  | Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase  | P27616 | 17.6 | 1 | 34.6  | 5.7  |                 | 4  | 3.3  | TRUE  | FALSE |
| 354 | RS2_YEAST   | 40S ribosomal protein S2                                  | P25443 | 17.6 | 1 | 27.4  | 10.4 |                 | 6  | 6.4  | TRUE  | TRUE  |
| 355 | SET2_YEAST  | Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-36 specific | P46995 | 17.2 | 1 | 84.4  | 8.7  | Acetyl          | 2  | 5.7  | TRUE  | FALSE |
| 356 | SC61G_YEAST | Protein transport protein SSS1                            | P35179 | 17.0 | 1 | 8.9   | 9.5  |                 | 13 | 1.0  | FALSE | TRUE  |
| 357 | PYC1_YEAST  | Pyruvate carboxylase 1                                    | P11154 | 16.9 | 1 | 130   | 5.8  |                 | 1  | 0.6  | FALSE | TRUE  |
| 358 | PRP8_YEAST  | Pre-mRNA-splicing factor 8                                | P33334 | 16.8 | 1 | 279.3 | 6.9  |                 | 1  | 18.9 | FALSE | TRUE  |

|     |             |   |        |      |   |       |     |                   |   |      |       |       |
|-----|-------------|---|--------|------|---|-------|-----|-------------------|---|------|-------|-------|
| 359 | GSHR_YEAST  | Glutathione reductase   | P41921 | 16.6 | 1 | 53.4  | 7.7 |                   | 3 | 6.1  | TRUE  | FALSE |
| 360 | PUF6_YEAST  | Pumilio homology domain family member 6                         | Q04373 | 16.6 | 1 | 75.1  | 6.4 | Acetyl            | 2 | 5.9  | TRUE  | FALSE |
| 361 | SNU66_YEAST | 66 kDa U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein component       | Q12420 | 16.5 | 1 | 66.4  | 6.3 |                   | 2 | 9.9  | FALSE | TRUE  |
| 362 | C1TC_YEAST  | C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic                      | P07245 | 16.0 | 1 | 102.1 | 6.4 |                   | 1 | 0.6  | FALSE | TRUE  |
| 363 | YIJ2_YEAST  | Uncharacterized protein YIL092W                                 | P40497 | 15.8 | 1 | 71    | 9.1 | Acetyl, Oxidation | 1 | 3.7  | FALSE | TRUE  |
| 364 | ISW1_YEAST  | ISWI chromatin-remodeling complex ATPase ISW1                   | P38144 | 15.7 | 1 | 131   | 6.2 | Acetyl            | 2 | 10.5 | FALSE | TRUE  |
| 365 | SSU72_YEAST | RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase SSU72 | P53538 | 15.4 | 1 | 23.5  | 5.1 | Acetyl            | 8 | 4.8  | FALSE | TRUE  |
| 366 | CAPZA_YEAST | F-actin-capping protein subunit alpha                           | P28495 | 15.3 | 1 | 30.7  | 5.2 |                   | 6 | 5.2  | TRUE  | FALSE |
| 367 | SYYC_YEAST  | Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic                              | P36421 | 15.1 | 1 | 44    | 8.6 | Acetyl            | 4 | 2.5  | TRUE  | FALSE |
| 368 | RAS1_YEAST  | Ras-like protein 1  | P01119 | 15.0 | 1 | 34.3  | 5.2 |                   | 8 | 3.1  | TRUE  | FALSE |

**Anexo 3.** Captura de pantalla del software Skyline donde se presenta la exploración de la librería local de péptidos DDA generada con los resultados de las muestras L1 y Lc1 (Anexo 2).

1.-. Lista de péptidos totales identificados. Cada entrada corresponde a un péptido identificado con su secuencia de aminoácidos y la carga asignada (indicada por +, ++, +++, o ++++). Se puede hacer una búsqueda exploratoria dentro de la librería, filtrando y buscando péptidos de interés.

2.-Se visualiza un espectro de MS/MS para un péptido seleccionado. Se observan iones tipo b (fragmentos que incluyen el extremo N-terminal del péptido) y iones tipo y (fragmentos que incluyen el extremo C-terminal del péptido). Junto a cada pico se presenta el error de masa con respecto a su valor teórico expresado en partes por millón (ppm).

3.- Número total de péptidos agregados a la librería a partir de la muestra L1. Se aprecia un total de 2,272 péptidos los cuales se asocian con un espectro de MS/MS, incluyendo iones ( $b_i$  y  $y_i$ ) y tiempo de retención.

Spectral Library Explorer

Library: pool

Filter: By: Peptide

Peptide:

- FAPDFADEEYVKNLEGEIPEKYGEHSIEVPGAVK+++
- FAPDFADEEYVKNLEGEIPEKYGEHSIEVPGAVK, +5
- FAPDFANEYVKNLEAEIPVKYGEK+++
- FASDPGC(+5)AFTK++
- FATAPFWNLFPK++
- FDGILGLGYDTISVDK++
- FDGILGLGYDTISVDK+++
- FDVTPVQDYVFK++
- FDVTPVQDYVFK++
- FDVTPVQDYVFKDLK+++
- FDVTPVQDYVFKDLKPKK+++
- FDVTPVQDYVFKDLKPKK, +5
- FEDLNAALFK++
- FEELC(+5)ADLFR++
- FFGFTPEGVAER++
- FFISNPDLVDRLEK+++
- FFISNPDLVYRLEGLPLNKYDR+++
- RGFNPDKSFVPOEYVDHYQK+++
- RGIEWADGTTETR++
- FGPSLMPGGSAAWPHIK+++
- FGQTVLDGVER++
- FGQTVLDGVERDGLNDAYDGLAMGVHAEK+++
- FHGGGFTNH(+5)LFWENLAPESQGGEPPTGALAK+++
- FHPSVNLILK++
- FHPSVNLILK+++
- FIAEGSNMGSSTPEAIAVFETAR++
- FIAEGSNM(+16)GSSTPEAIAVFETAR++
- FIAEGSNMGSSTPEAIAVFETAR+++
- FIAEGSNM(+16)GSSTPEAIAVFETAR+++**
- FIDEPPFAAILPEFTGNPINDNLKY+++
- FIGDSVAALGIPVKNK++
- FILFGLNDAK++
- FILLANHPHFELK+++
- FILLANHPHFELK+++
- FIIPSGSSISK++
- FISEVENTPQQRVNVIGGHSGITIPLISQTNHK, +5
- FKGDITWLPVRR++
- FKGDITWLPVRR+++
- FLEDSNLAVTTNVLNLYLK+++
- FLEDSNLAVTTNVLNLYLK+++
- FLEQQNQVLQTK++
- FLEQQNQVLQTKWELLQQVDSTR+++
- FLEQQNQVLQTKWELLQQVDSTR+++
- FLFIAPPSVEDLKK+++
- FLGFEQIFKNSLTGLDMGGGK+++

1

2

3

pool - FIAEGSNMGSSTPEAIAVFETAR, Charge 3

| Label | m/z    | Isotopic Shift (ppm) |
|-------|--------|----------------------|
| b2    | 261.2  | -0.3                 |
| y2    | 246.2  | -0.6                 |
| b3    | 347.2  | -16.6                |
| b6++  | 361.7  | -6.0                 |
| b7++  | 376.7  | -1.7                 |
| b8++  | 433.7  | -5.6                 |
| y4    | 476.2  | -3.9                 |
| y11+  | 602.3  | -13.2                |
| y5    | 623.3  | -1.2                 |
| y11+  | 623.3  | -13.2                |
| y6    | 722.4  | -3.7                 |
| y7    | 793.4  | -4.1                 |
| y11+  | 722.4  | -13.2                |
| y8    | 906.5  | -5.4                 |
| y9    | 977.5  | +5                   |
| y10   | 1106.6 | -9.5                 |
| y11   | 1203.6 | -1.6                 |
| y12   | 1304.7 | -6.1                 |
| y14   | 1408.6 | +3.7                 |

File: AM\_RC2\_01\_2723.d (43.74 min) RT: 43.74

Add Add All... Associate proteins Close

Type here to search

23:42 23/01/2025

**Anexo 4.** Dos capturas de pantalla correspondientes al análisis comparativo proteómico entre levadura expuesta a selenio y un control no expuesto, basado en experimento de marcaje metabólico con  $^{15}\text{N}$  y utilizando Skyline: Identificación, cuantificación y evaluación de péptidos y proteínas de la Fracción 4.

**1.-** Lista de péptidos: En esta sección se encuentran los péptidos, asociados con sus proteínas correspondientes, seleccionados para el análisis con idotp mayor a 0.9. Incluye información detallada sobre los iones precursores, productos y sus transiciones, junto con los valores de intensidad, tiempo de retención y proporciones (light/heavy) en las réplicas analizadas.

**2.-** Ejemplo del cromatograma EIC para réplicas de uno de los péptidos. En este caso se muestra el péptido **MSANISSETTAMIDTATAPAEDIR**, se comparan intensidades de péptido ligero, cromatograma rojo, y péptido pesado, cromatograma azul.

**3.-** Se representa las proporciones entre las áreas de los péptidos “light” y “heavy” en las réplicas analizadas (L1+H1, L1+H1\_R2, etc.), esta relación proporciona una comparación directa de la abundancia entre las condiciones analizadas.

**4.-** Gráfico que muestra los tiempos de retención del mismo péptido entre las diferentes réplicas, incluyendo fracciones “light” y “heavy” para verificar la reproducibilidad del análisis.

**5.-** Se muestra el “document grid” de los resultados procesados, incluyendo nombre de proteínas, descripción, y abundancia entre las diferentes muestras analizadas. En la captura de pantalla se observa la proteína Piruvato quinasa (KPYK1\_yeast) y su abundancia entre las diferentes muestras.

**6.-** Gráfico de barras de fold-change comparando proteínas presentes en las muestras con exposición a Se contra controles no expuestos, las barras representan la magnitud del cambio para cada proteína.

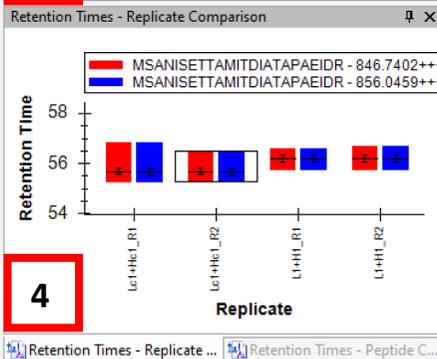
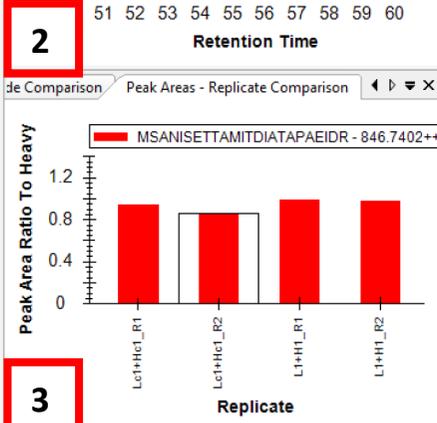
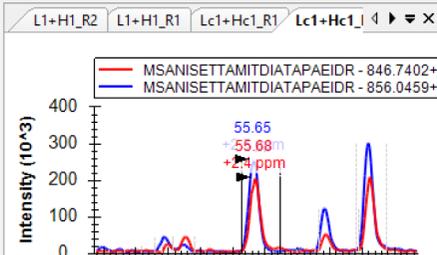
**7.-** Espectro de MS/MS del péptido seleccionado **MSANISSETTAMIDTATAPAEDIR** con carga 3.

**8.-** Valores de idotp para péptido seleccionado **MSANISSETTAMIDTATAPAEDIR** con carga 3, comparando valores calculados para las diferentes réplicas (proteínas con  $^{14}\text{N}$ ).

**9.-** Comparación de los tiempos de retención para ion precursor, [M+1], y [M+2] para péptido correspondiente entre diferentes tipos de réplicas.

5

- 1**
- Targets
- Replicates: Lc1+Hc1\_R2
- sp|P04807|HXKB\_YEAST
    - K.G[+1]F[+1]D[+1]I[+1]P[+1]N[+2]I[+1]E[+1]N[+2]H[+3]D[+1]
    - R.T[+1]K[+2]Y[+1]D[+1]I[+1]T[+1]I[+1]D[+1]E[+1]E[+1]S[+1]
    - K.M[+1]S[+1]S[+1]G[+1]Y[+1]Y[+1]L[+1]G[+1]E[+1]I[+1]L[+1]
    - R.LALMDMYK.Q [316, 323]
  - sp|P05740|RL17A\_YEAST
    - K.F[+1]V[+1]Q[+2]G[+1]L[+1]L[+1]Q[+2]N[+2]A[+1]A[+1]A[+1]
    - R.I[+1]N[+2]K[+2]Y[+1]E[+1]S[+1]S[+1]P[+1]S[+1]H[+3]I[+1]
  - sp|P06168|LV5\_YEAST
    - K.NLFTVEDAIKR.G [127, 137] (missed 1)
    - R.G[+1]I[+1]N[+2]S[+1]S[+1]Y[+1]A[+1]V[+1]W[+2]N[+2]D[+1]
    - K.Y[+1]G[+1]M[+1]D[+1]Y[+1]M[+1]Y[+1]D[+1]A[+1]C[+1]S[+1]
  - sp|P06169|PDC1\_YEAST
    - R.W[+2]A[+1]G[+1]N[+2]A[+1]N[+2]E[+1]L[+1]N[+2]A[+1]A[+1]
    - K.Q[+2]L[+1]L[+1]H[+3]H[+3]T[+1]L[+1]G[+1]N[+2]G[+1]
    - R.M[+1]S[+1]A[+1]N[+2]I[+1]S[+1]E[+1]T[+1]T[+1]A[+1]M[+1]
    - R.M[+1]S[+1]A[+1]N[+2]I[+1]S[+1]E[+1]T[+1]T[+1]A[+1]M[+1]
    - 846.7402+++ (idotp 0.98, dotp 0.99, rdotp 0.95, total ratio 0.86)
    - 856.0459+++ (heavy) (idotp 0.98, dotp 0.96)
    - R.M[+1]S[+1]A[+1]N[+2]I[+1]S[+1]E[+1]T[+1]T[+1]A[+1]M[+1]
    - R.M[+1]S[+1]A[+1]N[+2]I[+1]S[+1]E[+1]T[+1]T[+1]A[+1]M[+1]
    - R.T[+1]T[+1]Y[+1]V[+1]T[+1]Q[+2]R[+4]P[+1]V[+1]Y[+1]L[+1]
    - 1371.7631+++ (idotp 1, rdotp 0.93, total ratio 0.71)
    - 1387.7156+++ (heavy) (idotp 1)
    - 914.8445+++ (idotp 0.99, dotp 0.97, rdotp 0.93, total ratio 0.78)
    - precursor - 914.8445+++ (rank 3) | 3 | (ratio 0.58)
    - precursor [M+1] - 915.1788+++ (rank 1) | 1 | (ratio 0.83)
    - precursor [M+2] - 915.5131+++ (rank 2) | 2 | (ratio 0.98)
    - P [y12] - 1250.7103+ (rank 2) | 2 |
    - V [y8] - 855.4934+ (rank 3) | 3 |
    - P [y3] - 315.2027+ (rank 1) | 1 |
    - 925.4795+++ (heavy) (idotp 1, dotp 0.94)
    - 686.3852+++ (idotp 0.99, dotp 0.98, rdotp 0.94, total ratio 0.74)
    - 694.3615+++ (heavy) (idotp 1, dotp 0.99)
    - K.D[+1]A[+1]K[+2]N[+2]P[+1]V[+1]I[+1]L[+1]A[+1]D[+1]A[+1]
    - K.N[+2]P[+1]V[+1]I[+1]L[+1]A[+1]D[+1]A[+1]C[+1]C[+1]S[+1]R[+1]
    - K.K[+2]L[+1]I[+1]D[+1]L[+1]T[+1]Q[+2]F[+1]P[+1]A[+1]F[+1]
    - K.K[+2]L[+1]I[+1]D[+1]L[+1]T[+1]Q[+2]F[+1]P[+1]A[+1]F[+1]
    - K.L[+1]I[+1]D[+1]L[+1]T[+1]Q[+2]F[+1]P[+1]A[+1]F[+1]V[+1]
    - K.L[+1]I[+1]D[+1]L[+1]T[+1]Q[+2]F[+1]P[+1]A[+1]F[+1]V[+1]
    - R.Y[+1]G[+1]G[+1]V[+1]Y[+1]V[+1]G[+1]T[+1]L[+1]S[+1]K[+2]
    - R.N[+2]A[+1]T[+1]F[+1]P[+1]G[+1]V[+1]Q[+2]M[+1]K[+2]F [3]
    - R.N[+2]A[+1]T[+1]F[+1]P[+1]G[+1]V[+1]Q[+2]M[+1]K[+2]F [3] 18
    - K.L[+1]L[+1]T[+1]T[+1]I[+1]A[+1]D[+1]A[+1]K[+2]G [3] 33
    - R.W[+2]G[+1]L[+1]K[+2]P[+1]Y[+1]L[+1]L[+1]F[+1]V[+1]L[+1]N[+2]
    - K.A[+1]Q[+2]Y[+1]N[+2]E[+1]Q[+2]G[+1]W[+2]D[+1]H[+3]
    - R.V[+1]A[+1]T[+1]T[+1]G[+1]E[+1]W[+2]D[+1]K[+2]L[+1]T[+1]
    - R.V[+1]A[+1]T[+1]T[+1]G[+1]E[+1]W[+2]D[+1]K[+2]L[+1]T[+1]
    - R.M[+1]I[+1]E[+1]I[+1]M[+1]L[+1]P[+1]V[+1]F[+1]D[+1]A[+1]
    - R.M[+1]I[+1]E[+1]I[+1]M[+1]L[+1]P[+1]V[+1]F[+1]D[+1]A[+1]



Document Grid: Protein\_abundance\_14N

Reports - 13 of 304

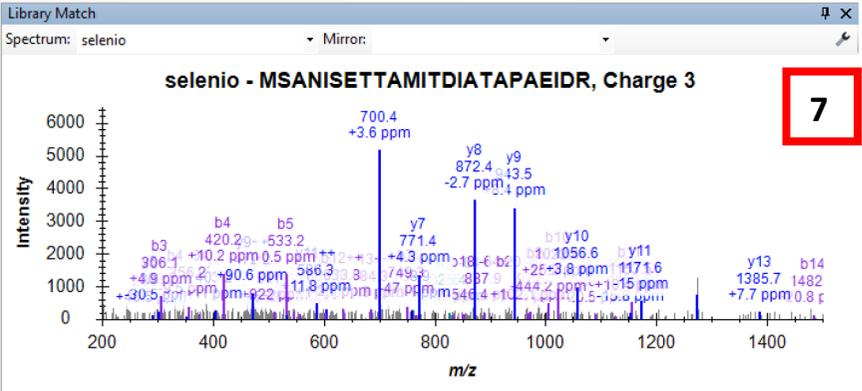
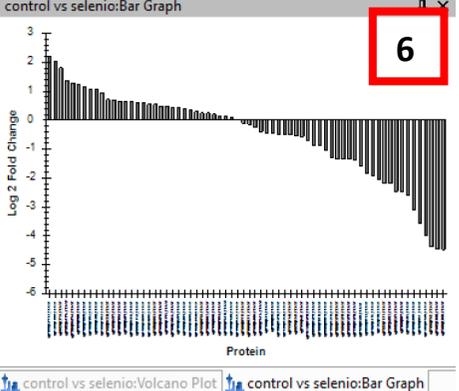
| Protein            | Protein Description | Protein Abundance | Protein Accession | Replicate  | Protein Preferred Name | Protein Gene |
|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|------------|------------------------|--------------|
| sp P00549 KPYK1... | Pyruvate kinase ... | 1.0333E+6         | P00549            | Lc1+Hc1_R1 | KPYK1_YEAST            | CDC19        |
| sp P00549 KPYK1... | Pyruvate kinase ... | 3.5555E+6         | P00549            | L1+H1_R1   | KPYK1_YEAST            | CDC19        |
| sp P00549 KPYK1... | Pyruvate kinase ... | 3.5495E+6         | P00549            | L1+H1_R2   | KPYK1_YEAST            | CDC19        |
| sp P00549 KPYK1... | Pyruvate kinase ... | 1.0264E+6         | P00549            | Lc1+Hc1_R2 | KPYK1_YEAST            | CDC19        |

control vs selenio:Grid

Volcano Plot Bar Graph Settings

Reports - 1 of 68

| Protein                 | Fold Change Result        | F  |
|-------------------------|---------------------------|----|
| sp P00549 KPYK1_YEAS... | 4.6 (95% CI: NaN to ...)  | 1. |
| sp P53912 YNN4_YEAS...  | 4.05 (95% CI: NaN to ...) | 1. |
| sp Q12512 ZPS1_YEAS...  | 3.51 (95% CI: NaN to ...) | 1. |
| sp P07251 ATPA_YEAS...  | 2.6 (95% CI: NaN to ...)  | 1. |
| sp P32861 UGPA1_YEA...  | 2.43 (95% CI: NaN to ...) | 1. |
| sp P29453 RL8B_YEAS...  | 2.34 (95% CI: NaN to ...) | 1. |
| sp P38009 PUR92_YEA...  | 2.24 (95% CI: NaN to ...) | 1. |
| sp P16467 PDC5_YEAS...  | 2.11 (95% CI: NaN to ...) | 1. |
| sp Q04409 EMJ2_YEAS...  | 2.11 (95% CI: NaN to ...) | 1. |
| sp P06169 PDC1_YEAS...  | 1.94 (95% CI: NaN to ...) | 1. |





**Anexo 5.** Acercamiento de la zona donde se observa el cambio de expresión de diferentes proteínas en levadura causadas por la presencia de selenio, en la gráfica se presenta “log2 fold change” para evaluar la variación en abundancia de las principales proteínas diferenciadas entre las condiciones establecidas. En la izquierda, proteínas con un incremento en su expresión en respuesta a la exposición a Se. Se detectan proteínas como KPYK1, YNN4, ZPS1, ATPA, UGP1, PDC5 y PDC1 (enmarcadas en verde). Mientras que, en la derecha, se presentan proteínas cuya expresión disminuyó tras la exposición a Se. Entre las proteínas más afectadas se encuentran HSP26, HSP74, ENO1 y ENO2, resaltadas en verde.

