

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EFECTO *in vivo* DE DIVERSAS ANTRACENONAS
DIMERICAS SOBRE PEROXISOMAS DE *Candida boidinii*

Por

Q.C.B. RICARDO SALAZAR ARANDA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias con Especialidad
en Química Analítica Biomédica

Diciembre, 1997.

TM

QP981

.K37

S2

c.1



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



EFFECTO *in vivo* DE DIVERSAS ANTRACENONAS DIMERICAS
SOBRE PEROXISOMAS DE *Candida boidinii*

Por

Q. C. B. RICARDO SALAZAR ARANDA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad
en Química Analítica Biomédica

Diciembre, 1997

TM
QP981
.K37
S2

EFFECTO IN VIVO DE DIVERSAS ANTRACENONAS DIMERICAS SOBRE

PEROXISOMAS DE *Candida boidinii*

Aprobación de la Tesis:



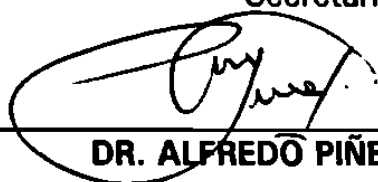
DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES

Presidente



DRA. MA. DEL SOCORRO FLORES DE CASTAÑEDA

Secretario



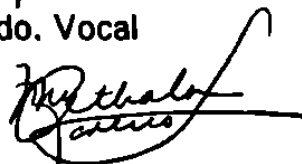
DR. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ

1er. Vocal



DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA

2do. Vocal



DRA. MYRTHALA MORENO SEPULVEDA

3er. Vocal



Dr. med. MA. ESTHELA MORALES PEREZ

Secretario Académico del Area Básica

BMU Rauli Rangel Files
UANL
FONDO
TESIS
(77193)

BURauli Rangel Files
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

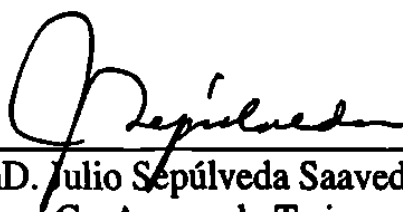
**EFFECTO *in vivo* DE DIVERSAS ANTRACENONAS DIMERICAS
SOBRE PEROXISOMAS DE *Candida boidinii***

Presentado por Q. C. B. Ricardo Salazar Aranda

Este trabajo fue realizado en el departamento de Farmacología y Toxicología y en el departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la asesoría de la Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda y la coasesoría del PhD. Julio Sepúlveda Saavedra.



**Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda
Asesor de Tesis**



**PhD. Julio Sepúlveda Saavedra
Co-Asesor de Tesis**

AGRADEZCO

A Dios por tomarme en cuenta en su creación.

Al ser humano mas grande que he conocido, mi padre, por habarme dado todo, sin tener la obligación.

A la persona mas bella en mi vida, mi madre, por guiarme y cuidarme hasta estos dias.

A mis hermanos, que junto con sus hijos me han motivado a vivir y perseguir mis ideales.

A mis amigos, que aunque pocos siempre han estado cerca de mi con su cariño apoyo y comprensión.

A mis innumerables compañeros por haber compartido conmigo sus experiencias y darme así la oportunidad de aprender y crecer con más rapidez.

A mis maestros por los recuerdos que guardo de ellos y por participar en mi formación.

A las instituciones que me han apoyado a lo largo de mi carrera: muy especialmente a la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. así como al CONACYT por el apoyo brindado a través del Proyecto 3870-M con el cual se realizó esta tesis.

A mi comisión de tesis por darme parte de su tiempo en sus multiples quehaceres.

Al Dr. Alfredo Piñeyro por permitirme trabajar en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina U.A.N.L. así como en la línea de investigación que también dirige.

A todo el personal del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. En partícular a los laboratorios de

producción y síntesis por proporcionarme los compuestos antracénicos que fueron básicos para la realización de esta tesis.

A la Dra. Noemí Waksman por aceptarme en este programa de maestría, además por transmitirme parte de sus conocimientos.

Al M. C. Alberto Alcorta por orientarme en el análisis estadístico utilizado en esta tesis.

Al Dr. Julio Sepúlveda por darme la oportunidad de trabajar bajo su dirección en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina U.A.N.L., por haberme dado su tiempo y su paciencia.

A todo el personal del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina U.A.N.L. por auxiliarme en los procesos técnicos requeridos en los experimentos.

A la Sra. Petra Montoya por ayudarme en la obtención de los cortes finos para microscopía electrónica

A la Dra. Myrthala Moreno por todo, que es mucho y me resultaría difícil enumerarlo.

Gracias.

*En mi esfuerzo por ser mas espiritual,
mi intención es recordar a todas las personas que me han amado.*

DEDICADA

**A las personas mas importantes en mi vida,
por y para quienes vivo.**

*Si para los seres humanos
los sentimientos son muy complejos,
para los científicos los son más todavía.*

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCION	1
2 MATERIAL Y METODOS	19
2.1. Material	19
2.1.1. Reactivos	19
2.1.2. Material Biológico	19
2.1.3. Equipo	20
2.2. Métodos	20
2.2.1. Preparación de Soluciones Concentradas de los Compuestos Antracénicos	20
2.2.2. Métodos de Cultivo	20
2.2.3. Métodos Analíticos	21
2.2.3.1. Medición de la Turbidez del Medio de Cultivo	21
2.2.3.2. Determinación de la Actividad de Catalasa	21
2.2.3.3. Determinación de Proteínas Totales	21
2.2.4. Preparación del Extracto Celular Crudo de	

<i>Candida boidinii</i>	22
2.2.5. Curvas de Crecimiento de <i>Candida boidinii</i>	23
2.2.6. Conteo de Colonias en Placas de Agar	23
2.2.7. Métodos Microscópicos	24
2.2.7.1. Microscopía de Luz de Contraste de Fase	24
2.2.7.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (Ultraestructura)	24
2.2.7.3. Inmunocitoquímica	25
2.2.8. Análisis Estadístico	25
3 RESULTADOS	27
3.1. Curva de Crecimiento de <i>Candida boidinii</i> en Medio Mínimo con Glucosa (0,25%)	27
3.2. Curva de Crecimiento de <i>Candida boidinii</i> en Medio Mínimo con Metanol (0,5%)	30
3.3. Supervivencia de <i>Candida boidinii</i> en Presencia de los Compuestos Antracénicos	30
3.4. Valoración de la Organización Celular de <i>Candida boidinii</i>	42
3.5. Analisis Ultraestructural de Peroxisomas de <i>Candida boidinii</i>	47
3.5.1. Evaluación de la Integridad Peroxisomal de <i>Candida boidinii</i>	47
3.5.2. Demostración Inmunocitoquímica de la Alcohol Oxidasa de <i>Candida boidinii</i>	51

3.6. Determinación de la Actividad de Catalasa en Extractos Celulares Crudos de <i>Candida boidinii</i>	53
4 DISCUSION	58
5 CONCLUSIONES	62
APENDICE	63
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	75

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Porcentaje de toxinas en diferentes especies del género <i>Karwinskia</i> que existen en el país	5
II	Porcentaje de supervivencia de <i>C. boidinii</i> cultivada en placas de agar con 0,5% de glucosa o con 0,5% de metanol después de la administración de varias conc. de la T-514 en la fase exponencial media	11
III	Efecto inhibitorio (CI50) de compuestos antracénicos sobre la actividad de catalasa y el porcentaje de actividad de la enzima a una concentración constante de estos compuestos	13
IV	Curva de crecimiento de <i>C. boidinii</i> en medio mínimo con glucosa (0,25%)	28
V	Curva de crecimiento de <i>C. boidinii</i> en medio mínimo con metanol (0,5%)	31
VI	Supervivencia de <i>C. boidinii</i> en medio mínimo con glucosa (0,25%). Medición de la turbidez del medio de cultivo	34
VII	Supervivencia de <i>C. boidinii</i> en medio mínimo con metanol (0,5%). Medición de la turbidez del medio de cultivo	36
VIII	Supervivencia de <i>C. boidinii</i> en medio mínimo con glucosa (0,25%). Conteo de colonias en placas de agar	38
IX	Supervivencia de <i>C. boidinii</i> en medio mínimo con metanol (0,5%). Conteo de colonias en placas de agar	40

X	Actividad de catalasa en extracto celular crudo de <i>Candida boidinii</i>	56
XI	Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteínas totales	70

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura principal de los compuestos antracénicos	2
2	Compuestos antracénicos aislados de <i>K. humboltiana</i>	3
3	Estructura química del diastereoisómero de la T-514	6
4	Metabolismo del metanol en peroxisomas de levaduras metilotróficas	8
5	Inducción de la proliferación de peroxisomas en <i>C. boidinii</i>	9
6	Compuestos antracénicos aislados de <i>K. parvifolia</i>	15
7	Estructura química de los compuestos antracénicos analizados en el presente trabajo	16
8	Curva de crecimiento de <i>C. boidinii</i> en medio mínimo con glucosa (0,25%)	29
9	Curva de crecimiento de <i>C. boidinii</i> en medio mínimo con metanol (0,5%)	32
10	Supervivencia de <i>C. boidinii</i> en medio mínimo con glucosa (0,25%). Medición de la turbidez del medio de cultivo	35
11	Supervivencia de <i>C. boidinii</i> en medio mínimo con metanol (0,5%). Medición de la turbidez del medio de cultivo	37
12	Supervivencia de <i>C. boidinii</i> en medio mínimo con glucosa (0,25%). Conteo de colonias en placas de agar	39
13	Supervivencia de <i>C. boidinii</i> en medio mínimo con metanol (0,5%). Conteo de colonias en placas de agar	41

14	Microscopía de contraste de fase. Células de <i>C. boidinii</i> cultivadas en medio mínimo con glucosa (0,25%)	43
15	Microscopía de contraste de fase. Células de <i>C. boidinii</i> cultivadas en medio mínimo con metanol (0,5%). 10µg/mL de los compuestos antracénicos	45
16	Microscopía de contraste de fase. Células de <i>C. boidinii</i> cultivadas en medio mínimo con metanol (0,5%). 50µg/mL de los compuestos antracénicos	46
17	Microscopía electrónica. Células de <i>C. boidinii</i> expuestas 1 hr a 2 µg/mL de los compuestos antracénicos	48
18	Microscopía electrónica. Células de <i>C. boidinii</i> expuestas 4 hr a 2 µg/mL de los compuestos antracénicos	50
19	Microscopía electrónica. Células de <i>C. boidinii</i> expuestas 24 hr a 2 µg/mL de los compuestos antracénicos	52
20	Inmunocitoquímica. Células de <i>C. boidinii</i> expuestas 1 hr a 2 µg/mL de los compuestos antracénicos	54
21	Inmunocitoquímica. Células de <i>C. boidinii</i> expuestas 24 hr a 2 µg/mL de los compuestos antracénicos	55
22	Actividad específica de catalasa en extractos celulares crudos de <i>Candida boidinii</i>	57

LISTA DE SIMBOLOS

- * Diferencia estadística significativa con respecto al control negativo**
- √ Diferencia estadística significativa con respecto al control positivo**
- No determinado**
- ± Mas menos**
- > Mayor que**
- < Menor que**
- Menos**
- % Por ciento**

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
Act.	Actividad
ATCC	American type culture collection
b	Trayecto óptico
C.	<i>Candida</i>
C	Concentración
°C	Grados celsius
CI50	Concentración inhibitoria cincuenta
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro cuadrado
cm ³	Centímetro cúbico
cols.	Colaboradores
conc.	Concentración
D	Dilución
ΔA	Cambio de absorbancia
ΔC	Cambio de concentración
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidad óptica
DTE	Dithioeritrol
ϵ	Absortividad molar
ec'n	Ecuación
Fig.	Figura
g	Gramo
hr	Hora
hrs	Horas
Iso-p A ₁	Isoperoxisomicina A ₁

K.	<i>Karwinskia</i>
M	Molar
mesh	Divisiones
mg	Miligramo
μg	Microgramo
min	Minutos
mL	Mililitros
μL	microlitros
μm	micrómetro
μM	micromolar
μmol	micromol
Neg.	Control negativo
nm	Nanómetros
PA₂	Peroxisomicina A₂
PAG	Placas de agar con glucosa
PAM	Placas de agar con metanol
PBS	Amortiguador de fosfato de potasio
pH	Potencial de hidrógeno
PMSF	Fosfil-metil-sulfonil fluoruro
Pos.	Control positivo
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundo
t	Tiempo
T	Toxina
U	Unidades internacionales
YPD	Medio con extracto de levadura, peptona y dextrosa