

CAPITULO UNO

INTRODUCCION

Las antracenas diméricas son compuestos químicos cuya estructura esta constituida por monómeros representados en la Figura 1. Este tipo de compuestos químicos se han aislado de algunas especies de hongos ¹ y de plantas de los géneros *Cassia* y *Karwinskia* ^{2,3}.

El género *Karwinskia* pertenece a la familia Rhamnaceae y está constituido básicamente por arbustos y árboles pequeños encontrados tanto en zonas tropicales como en áreas desérticas, desde el suroeste de Estados Unidos hasta América Central incluyendo México ^{4,5}. Se ha reportado que a los quince días de la ingestión del fruto de estas plantas se presentan manifestaciones clínicas como polineuropatía progresiva, caracterizada por parálisis sistémica ascendente, la cual puede terminar en muerte por paro respiratorio. Si el paciente sobrevive, la recuperación es lenta pero puede ser completa ^{6,7}. Este cuadro clínico se ha comparado con el de los síndromes paralíticos tales como el de Guillain-Barre, la poliomiелitis y otras neuropatías periféricas ⁸.

La especie del género *Karwinskia* más común en México es la *K. humboldtiana*. Dreyer y cols. aislaron por primera vez del fruto de esta planta cuatro antracenas diméricas responsables de las propiedades tóxicas de dicha planta. Estos compuestos antracénicos fueron nombrados de acuerdo a su peso molecular como T-514, T-544, T-516 y T-496 ³ (Figura 2).

En base a estos antecedentes, en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., en el año de 1981 se inició una línea de investigación encaminada a estudiar la actividad biológica de los compuestos antracénicos aislados de diferentes especies del género

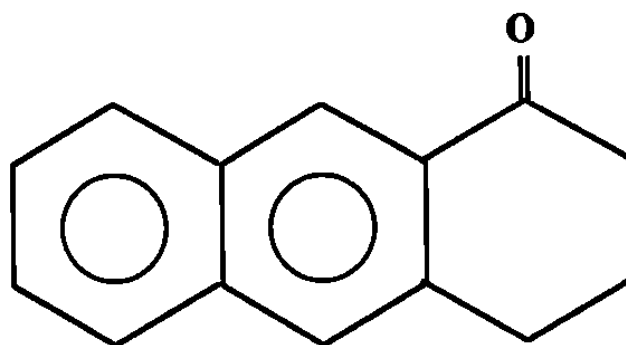
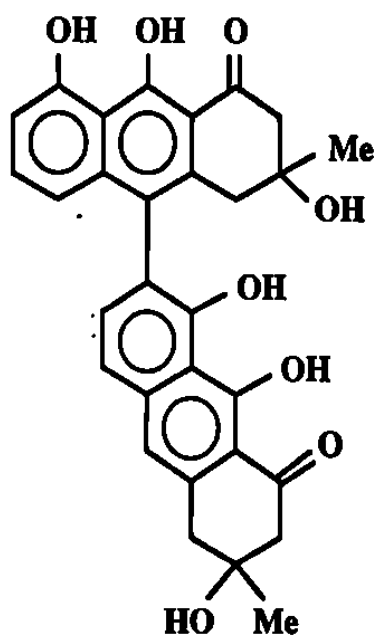
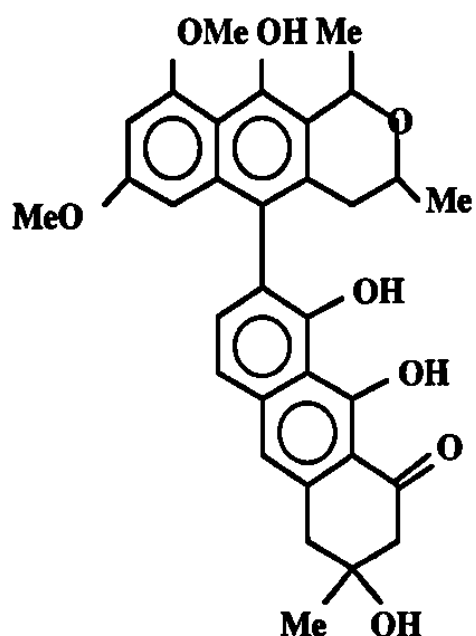


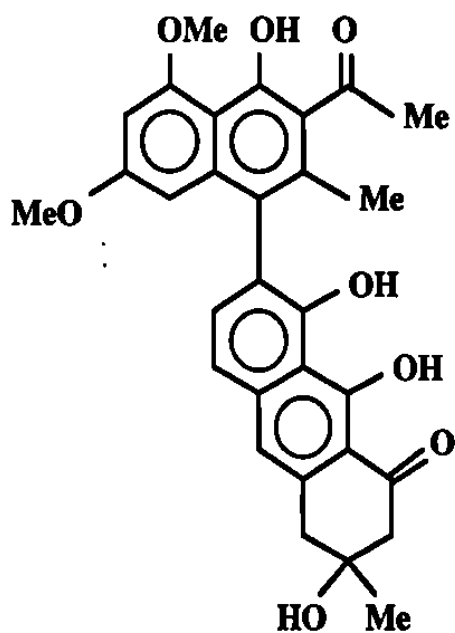
Figura 1 Estructura principal de los compuestos antracénicos



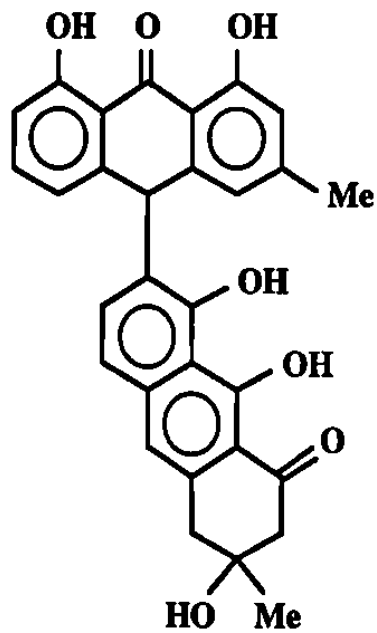
T-514



T-544



T 516



T 496

Figura 2 Compuestos antracénicos aislados de *K. humboldtiana*.

Dreyer y cols., 1975

Karwinskia. Para el aislamiento y purificación de estos compuestos se realizó una modificación al método utilizado por Dreyer y cols. ³. Este método optimizado fue descrito por Guerrero y cols. ⁹.

Waksman y cols. efectuaron el análisis químico y toxicológico de los extractos clorofórmicos de los frutos de 10 especies de plantas del género *Karwinskia*. Estos estudios demostraron que todas las plantas examinadas son tóxicas y su toxicidad recuerda cualitativamente a la intoxicación aguda con *K. humboldtiana*. Todas las plantas se caracterizan por la presencia de compuestos antracenónicos, sin embargo se encontró diferente contenido de las toxinas, así la T-544 está presente en mayor cantidad en *Karwinskia humboldtiana*, la T-496 se produce más en *Karwinskia calderonii* y la T-514 se recupera en mayor cantidad de *Karwinskia parvifolia* ¹⁰ (Tabla I).

Ramírez y cols. aislaron por primera vez del fruto molido de la planta *Karwinskia parvifolia* un compuesto de estructura química idéntica a la T-514, pero con diferente configuración espacial, por lo que fue identificado como un diastereoisómero de la T-514 ¹¹ (Figura 3). Con el propósito de investigar la actividad biológica de las toxinas T-514, T-544 y T-496 Bermúdez y cols. realizaron estudios toxicológicos en diversas especies animales. Los resultados de estos estudios indicaron que la T-544 es responsable del efecto neurológico; la T-496 únicamente causa diarrea cuando se administra oralmente y la T-514 causa daño severo al pulmón, riñón e hígado. En el hígado la T-514 induce la formación de depósitos de grasa intracelulares y necrosis ¹². Estudios efectuados para determinar la dosis letal media de estos compuestos demostraron que la T-514 es la más tóxica de las toxinas arriba mencionadas ¹².

Por otro lado Garza y cols. efectuaron estudios para comparar la citotoxicidad *in vitro* de las toxinas T-514 y T-544 de *K. humboldtiana*, realizando estudios en cultivos de células de piel y de hepatocitos. Respecto a la T-514 los resultados coincidieron con lo observado *in vivo*, demostrándose además que la T-514 causa mayor toxicidad hepática que la T-544 *in vitro* ¹³. Además se analizó la toxicidad del diastereoisómero de la T-514. La toxicidad de este compuesto en las células hepáticas *in vitro* es muy similar a la de la T-514 ¹⁴. En contraste, se ha demostrado que bajo condiciones *in vivo* la toxicidad hepática causada por la T-514 es mucho mayor que la producida por su diastereoisómero ¹⁵.

Tabla I

Porcentaje de toxinas en diferentes especies del género
Karwinskia que existen en el país

<i>Karwinskia</i>	<u>Porcentaje</u>		
	T-514	T-544	T-496
<i>humboldtiana</i>	0,70	1,60	0,80
<i>mollis</i>	0,95	1,33	1,08
<i>umbellata</i>	0,05	0,75	0,50
<i>subcordata</i>	1,07	1,51	0,98
<i>latifolia</i>	0,50	--	1,10
<i>parvifolia</i>	1,02	--	1,58
<i>calderoni</i>	0,70	0,75	2,00
<i>rzedowski</i>	--	--	1,60
<i>tehuacana</i>	0,33	0,83	0,40
<i>johnstonii</i>	--	2,10	0,70
	-- No detectado.		

Waksman y cols., 1989

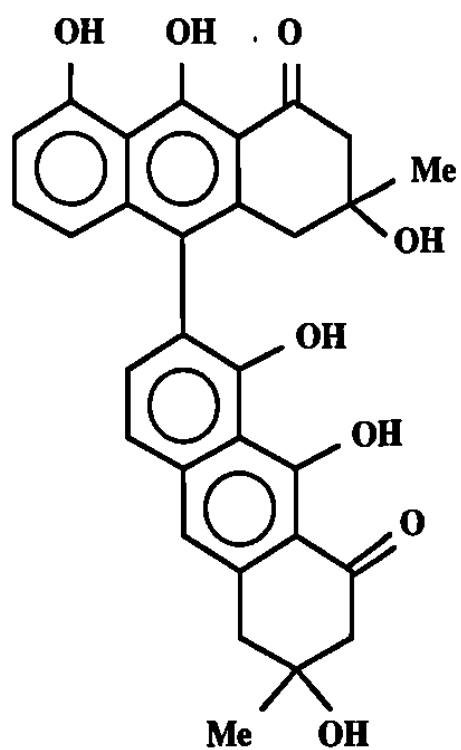


Figura 3 Estructura química del diastereoisómero de la T-514.

Ramírez y cols., 1992

La selectividad hacia determinados tejidos de cada una de las toxinas y la forma particularmente empinada de las curvas dosis-respuesta de la T-514, permitieron plantear la hipótesis de que si hubiera toxicidad selectiva de este compuesto hacia células de origen benigno y maligno, la sustancia podría tener potencial uso antineoplásico.

Estudios realizados por Piñeyro y cols. en once líneas celulares humanas tres benignas y 8 de origen maligno demostraron por primera vez la toxicidad selectiva *in vitro* de la T-514 sobre diversas líneas celulares de origen neoplásico ¹⁶. Por esto se ha propuesto el uso de esta toxina como agente antineoplásico y se ha solicitado una patente para su uso, la cual fue otorgada primero por la Comunidad Económica Europea ¹⁷, y recientemente por los Estados Unidos de Norteamérica ¹⁸, y Japón ¹⁹.

Debido a que el mecanismo de acción de la T-514 aún se desconoce, en los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios bioquímicos y morfológicos con el propósito de obtener información acerca de éste. Estudios morfológicos realizados por Sepúlveda y cols. demostraron una disminución del número de peroxisomas presentes en hepatocitos de ratas y monos intoxicados con T-514 ²⁰. Este hallazgo es muy interesante, ya que con excepción del factor de necrosis tumoral alfa ²¹, no existen reportes en la literatura de compuestos que producen disminución en el número de peroxisomas. Los resultados anteriores sugieren que el peroxisoma es el organelo blanco de la T-514.

Las levaduras constituyen un sistema modelo muy adecuado para el estudio de la biogénesis y función peroxisomal, ya que son fáciles de manipular y en ellas se puede inducir la proliferación de peroxisomas, cuando se utilizan medios específicos ²². El sustrato induce la proliferación del organelo ya que en la matriz peroxisomal se encuentran las enzimas necesarias para metabolizarlo. Tal es el caso de las levaduras metilotróficas, las cuales utilizan el metanol como fuente de carbono y en ellas se induce la proliferación peroxisomal debido a que la matriz contiene las enzimas que catalizan las reacciones iniciales para el metabolismo del metanol, estas enzimas son alcohol oxidasa, dihidroxiacetona sintasa y catalasa ²³ (Figura 4). En levaduras metilotróficas se forman grupos de peroxisomas como resultado del proceso de proliferación peroxisomal, ocupando estos organelos hasta un 80% del volumen citoplasmático de la célula ^{22, 24, 25} (Figura 5).

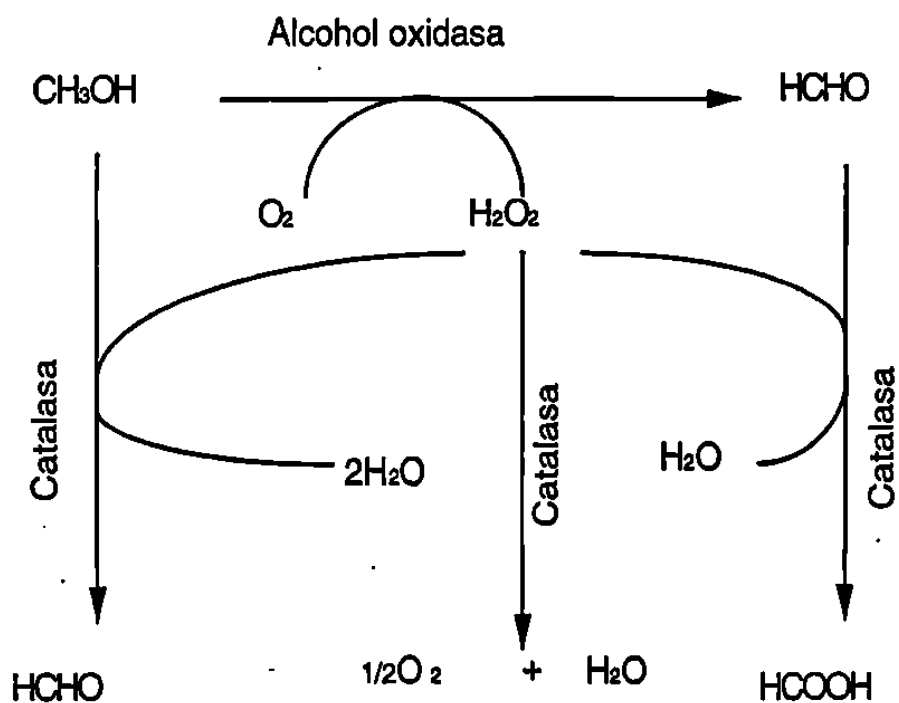


Figura 4 Metabolismo del metanol en peroxisomas de levaduras metilotróficas.

Goodman y cols., 1990

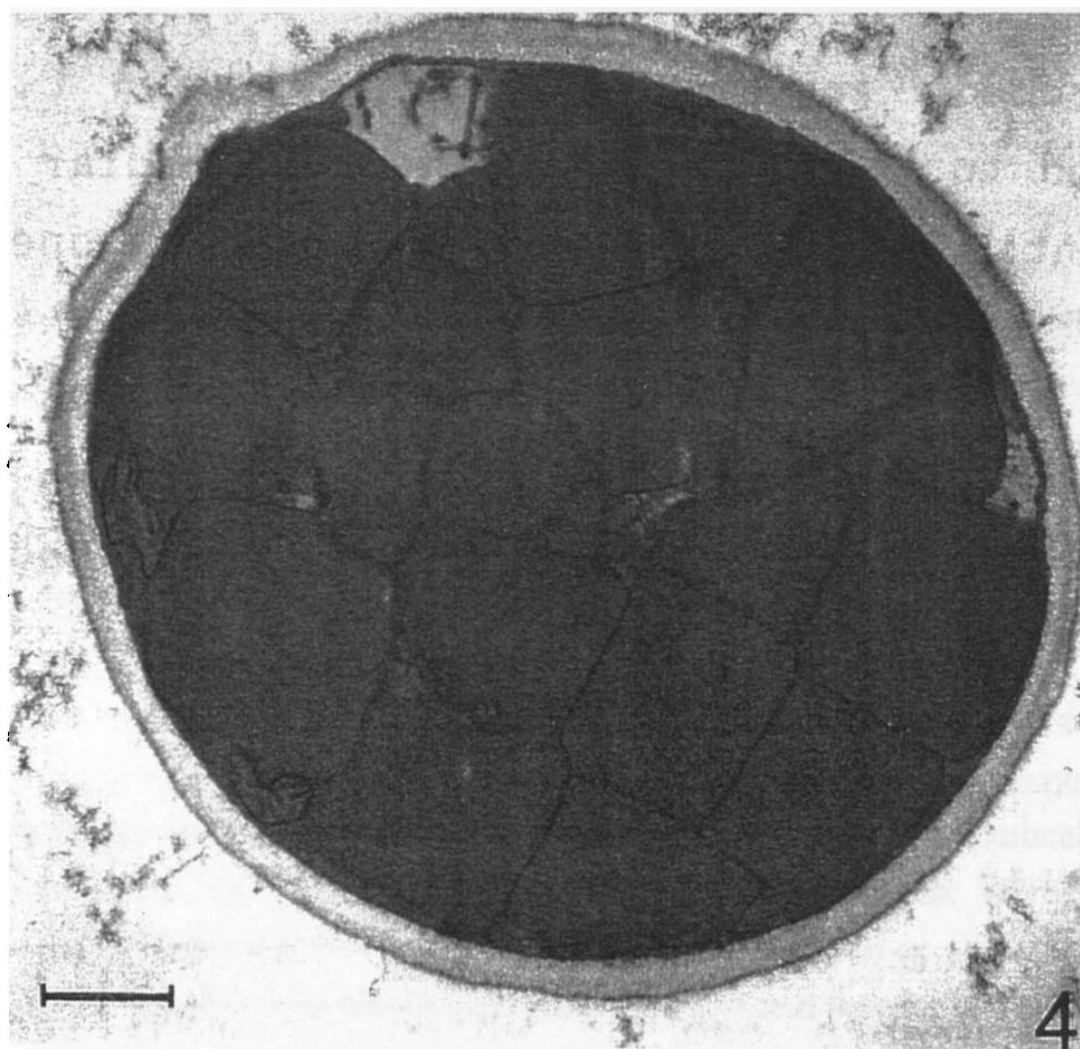


Figura 5 Inducción de la proliferación de peroxisomas en *C. boidinii*

Con el propósito de investigar si realmente el peroxisoma constituye el organelo blanco de la T-514, Sepúlveda y cols. realizaron estudios ultraestructurales en cultivos de células de levadura para determinar el efecto de esta toxina sobre los peroxisomas *in vivo*. Estos estudios se realizaron en cultivos de dos especies de levaduras metilotróficas: *Hansenula polymorpha* y *Candida boidinii* utilizando medio mínimo con metanol como única fuente de carbono ²⁶. Los resultados obtenidos de estos estudios demostraron que respecto a la supervivencia de *Candida boidinii* cultivada en medios específicos, con glucosa o con metanol como única fuente de carbono respectivamente, y en presencia de T-514 a una concentración de 50 µg/mL, se produjo un efecto drástico sobre la viabilidad de esta levadura, muriendo el 100% de las células después de 60 min de exposición a la toxina (Tabla II). Además, en las células cultivadas en metanol, se observó un efecto casi inmediato sobre la organización total de los peroxisomas después de la adición del compuesto. A los diez minutos muchos de los grupos de peroxisomas en las células migraron hacia dentro de la vacuola, ocurriendo después la desintegración del citoplasma. Efectos comparables fueron observados en cultivos de *Hansenula polymorpha* utilizando metanol como única fuente de carbono ²⁶.

En presencia de una dosis no letal (2 µg/mL) se obtuvo un efecto de dosis-respuesta: el crecimiento cesó inicialmente, reiniciándose después de un período de 4 hr. Desde los 30 min de incubación, a nivel subcelular, se encontró un efecto específico sobre la integridad peroxisomal. Ultraestructuralmente este daño sobre los peroxisomas se observó como la fragmentación de la membrana peroxisomal, lo cual permite que el contenido enzimático del peroxisoma salga hacia el citoplasma de la célula. Cuando ocurrió este efecto sobre los peroxisomas, el importe de proteínas recién sintetizadas pareció estar bloqueado, ya que se observaron agregados citosólicos de las proteínas de la matriz. El daño peroxisomal fue irreversible ya que los organelos afectados fueron degradados en la vacuola autofágica. Sin embargo no se observó daño sobre otras membranas. No se afectó la actividad de las enzimas peroxisomales alcohol oxidasa y catalasa en las primeras dos horas de exposición ²⁶.

Debido a estos hallazgos que demostraron el efecto selectivo e irreversible sobre los peroxisomas de levaduras se le ha renombrado a la

Tabla II

Porcentaje de supervivencia de *Candida boidinii* cultivada en placas de agar con 0,5% de glucosa o con 0,5% de metanol después de la administración de varias concentraciones de la T-514 en la fase exponencial media (A600 aprox. 2,0)

Sustrato	Concentración de T-514 (µg/mL)					
	0,5	1,0	2,0	10,0	20,0	50,0
Glucosa	> 90	> 90	70	20	5	0
Metanol	> 90	> 90	60	10	0 - 5	0

Sepúlveda y cols., 1992

T-514 como peroxisomicina A₁. Asimismo se renombraron sus isómeros espaciales con números progresivos según han sido caracterizados. En el caso de los isómeros de posición se antepone el prefijo iso-, al nombre peroxisomiciana A₁.

Hasta el momento los datos obtenidos acerca del mecanismo de acción de la peroxisomicina A₁ sugieren que el peroxisoma es el organelo blanco en levaduras y en hígado de monos y ratas.

En los peroxisomas se llevan a cabo una gran variedad de reacciones tanto biosintéticas como oxidativas, estas últimas conducen a la generación de peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es un metabolito tóxico para la célula y es desdoblado por la catalasa, la cual se encuentra exclusivamente en el peroxisoma; por este motivo se le considera una enzima marcadora peroxisomal ²⁷.

Estudios realizados por Moreno y cols. demostraron que los compuestos antracénicos aislados de las plantas del género *Karwinskia* producen inhibición de la actividad de la catalasa bovina *in vitro*. En estos estudios se encontró una relación estrecha entre la estructura química de los compuestos antracénicos y el grado de inhibición de la catalasa. Los compuestos más activos fueron aquellos que contienen dos grupos antracénicos, correspondientes a las peroxisomicinas A₁ y A₂ las cuales produjeron el mayor grado de inhibición y no hubo diferencia significativa entre ellas. Por otro lado, el resto de las toxinas mostraron un menor grado de inhibición, correspondiendo a los dímeros que contienen una unidad antrona o antraquinona. En estos estudios se utilizó como control positivo de inhibición el aminotriazol el cual es un potente inhibidor de la actividad de catalasa *in vivo*, pero menos potente *in vitro*. Todos los compuestos antracénicos analizados son inhibidores de la catalasa *in vitro* más potentes que el aminotriazol ²⁸ (Tabla III).

El efecto de la peroxisomicina A₁ sobre la actividad de la catalasa hepática del ratón albino también ha sido investigado tanto en cortes de tejido hepático incubados con toxina (*in situ*) como en cortes de tejido y en fracciones hepáticas de ratones intoxicados con peroxisomicina A₁ (*in vivo*). En estos estudios no se demostró inhibición de catalasa por medio de procedimientos histoquímicos y bioquímicos. Este hallazgo indica que la peroxisomicina A₁ solamente inhibe la actividad de catalasa *in vitro* cuando

Tabla 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

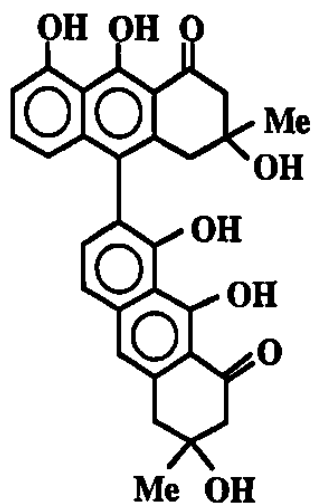
Compuesto	CI ₅₀ (μM)	% de actividad (3,9 μM)
Peroxisomicina A ₁	3,34 ± 0,99	45,29 ± 1,38
Peroxisomicina A ₂	3,64 ± 1,10	48,06 ± 1,38
Flegmacina A ₁	6,33 ± 2,79	62,05 ± 1,64
Flegmacina A ₂	8,54 ± 3,23	64,62 ± 1,59
T-544	40,08 ± 1,57	100,00
T-496	99,50 ± 19,03	100,00
T-510	120,00 ± 10,44	100,00
Aminotriazol	4 x 10 ⁵	100,00

Moreno y cols., 1995

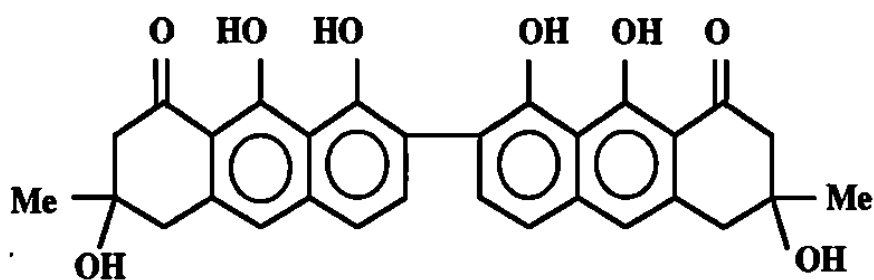
se utiliza enzima purificada y no es capaz de inhibirla cuando la enzima se encuentra dentro de los peroxisomas, ya sea en fragmentos de tejido o en animales completos intoxicados. Esto sugiere que la catalasa no está involucrada en el daño peroxisomal causado por la peroxisomicina A₁ ²⁹.

Recientemente, Rivas aisló y caracterizó del fruto de *K. parvifolia*, otros compuestos antracénicos estructuralmente semejantes a la peroxisomicina A₁. Dichos compuestos fueron identificados como un diastereoisómero y un isómero de posición de la peroxisomicina A₁, y una antracena de peso molecular de 516, la cual resultó ser el mismo compuesto antracénico aislado por Dreyer de *K. humboldtiana* ³. A los nuevos compuestos se les nombró como peroxisomicina A₃ e isoperoxisomicina A₁, respectivamente ³⁰ (Figura 6).

En base a la gran semejanza estructural entre la peroxisomicina A₁ y los compuestos antracénicos: peroxisomicinas A₂, isoperoxisomicina A₁ y la T-544 (Figura 7), consideramos de suma importancia investigar si estas toxinas causan el mismo efecto selectivo e irreversible sobre los peroxisomas de levaduras tal como lo produce la peroxisomicina A₁. Lo anterior con el propósito de esclarecer si este efecto es exclusivo de esta toxina y para obtener mayor conocimiento acerca de la actividad biológica y del mecanismo de acción de estos compuestos.



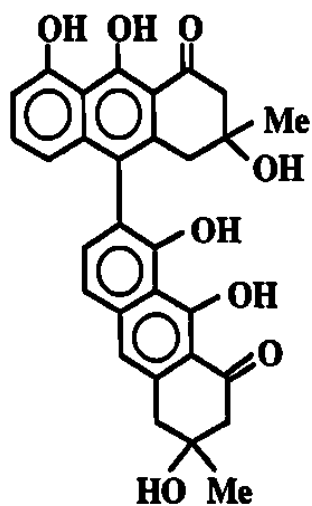
Peroxisomicina A₃



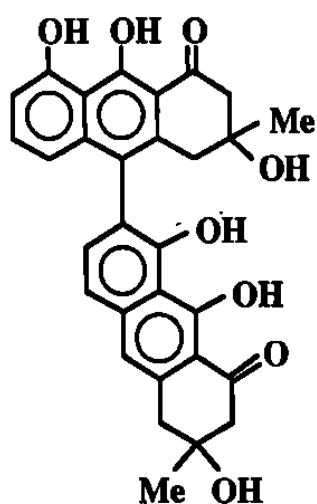
Isoperoxisomicina A₁

Figura 6 Compuestos antracénicos aislados de *K. parvifolia*.

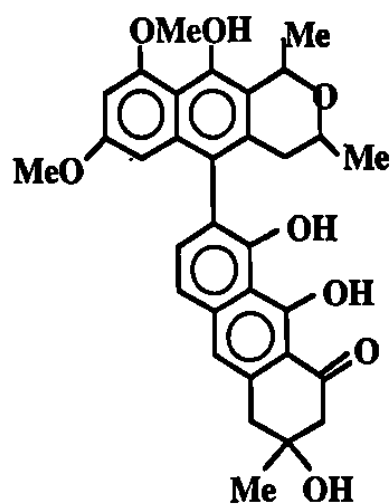
Rivas, 1995



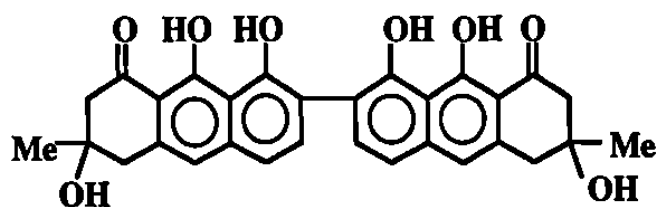
Peroxisomicina A₁



Peroxisomicina A₂



T-544



Isoperoxisomicina A₁

Figura 7. Estructura química de los compuestos antracénónicos analizados en el presente trabajo.

HIPOTESIS

Los compuestos antracénicos de las plantas del género *Karwinskia* producen el mismo daño sobre los peroxisomas de *Candida boidinii* que el reportado para la peroxisomicina A₁ sobre estos organelos.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de diferentes antracenas diméricas estructuralmente semejantes a la peroxisomicina A₁, sobre los peroxisomas de *Candida boidinii*, *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Establecer las condiciones óptimas de cultivo de *Candida boidinii*, realizando curvas de crecimiento en medios específicos.
- 2.- Analizar el efecto de los compuestos antracénicos sobre la supervivencia de las células de *Candida boidinii*, determinando la turbidez del medio de cultivo, realizando cuenta de colonias en placas de agar y a través de observaciones directas con microscopía de luz de contraste de fase.
- 3.- Determinar el efecto a nivel morfológico sobre peroxisomas de *Candida boidinii* a dosis de 2 µg/ml de los compuestos antracénicos utilizando microscopía electrónica de transmisión e inmunocitoquímica.
- 4.- Analizar el efecto de estos compuestos sobre la actividad de catalasa, en extractos celulares de *Candida boidinii*.
- 5.- Comparar los resultados obtenidos de los diferentes compuestos antracénicos, con el control positivo y el control negativo.

CAPITULO DOS

MATERIAL Y METODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Reactivos

Se utilizaron productos químicos obtenidos comercialmente de las siguientes compañías: Productos Químicos Monterrey, Merck, Sigma, Difco, Biorad, Pelco.

2.1.2. Material Biológico

Levadura metilotrófica *Candida boidinii* cepa ATCC 32195.

Antracenas diméricas: peroxisomicina A₁, peroxisomicina A₂ e isoperoxisomicina A₁ de *Karwinskia parvifolia* y T-544 de *Karwinskia humboldtiana*. Estos compuestos antracénicos fueron aislados y purificados en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Anticuerpo monoclonal de conejo, anti-alcohol oxidasa proporcionado por el Prof. Dr. Joel M. Goodman.

Anticuerpo policlonal de cabra, anti-conejo marcado con partículas de oro coloidal de 10nm de diámetro, adquirido comercialmente.

2.1.3. Equipo

Incubadora estática, Riossa.

Incubadora con agitador mecánico, Lab-line.

Espectrofotómetro Beckman, DU 7500 con arreglo de diodos y paquete de cinética enzimática.

Fotomicroscopio Carl-Zeiss.

Centrífuga para Ependorff IEC Micro-MB centrifuge.

Ultramicrotomo, Ultratome LKB V.

Microscopio Electrónico de Transmisión Carl-Zeiss, EM 109.

Centrífuga con controlador de temperatura IEC CRU 5000.

2.2. METODOS

2.2.1. Preparación de Soluciones Concentradas de los Compuestos Antracénicos.

Para los experimentos en células de cultivo de *C. boidinii* se requirió de soluciones concentradas de cada antracenona en un medio de cultivo mínimo. Debido a la baja solubilidad de los compuestos antracénicos en soluciones acuosas, se disolvieron primero en solventes adecuados para su posterior disolución en el medio de cultivo mínimo (Apéndice).

2.2.2. Métodos de Cultivo.

Las células de *Candida boidinii* se mantienen viables a través de su resiembra cada dos meses en placas de agar YPD (Apéndice). Las placas de cultivo de *C. boidinii* se almacenan a 4°C.

Los cultivos líquidos de *C. boidinii* se efectuaron de la forma siguiente: se tomó una colonia de la levadura y se inoculó en un medio enriquecido con glucosa al 2% (YPD), después se incubó por 24 horas a 30°C bajo agitación

constante (250 rpm). Las células cultivadas en YPD se transfirieron a medios mínimos conteniendo glucosa o metanol como única fuente de carbono (Apéndice). Estos cultivos de *C. boidinii* se iniciaron en todos los casos con una turbidez del medio de 0,1 D.O./mL. Posteriormente todos los cultivos se incubaron a 30°C bajo agitación constante (250 rpm). Los cultivos se revisaron periódicamente bajo el microscopio de luz para evaluar su pureza y descartar su contaminación.

2.2.3. Métodos Analíticos

2.2.3.1. Medición de la turbidez del medio de cultivo.

La turbidez del medio de cultivo se determinó a través del valor de su densidad óptica (D.O./mL).

Para medir la densidad óptica se tomaron alícuotas de los cultivos de *C. boidinii* y se realizaron diluciones seriadas en agua destilada hasta tener 1:1000. A un mL de la última dilución (1:1000) se le determinó el valor de su densidad óptica a una longitud de onda de 600nm en un espectrofotómetro Beckman DU-7500.

2.2.3.2. Determinación de la actividad de catalasa.

La actividad de catalasa en los extractos celulares crudos de *C. boidinii* se determinó según el método descrito por Aebi ³¹. Este es un método espectrofotométrico basado en la medición de la disminución de peróxido de hidrógeno a 240nm, a un pH de 7,4 y a 25°C (Apéndice A).

2.2.3.3. Determinación de proteínas totales

La concentración de proteínas de los extractos celulares crudos de *C. boidinii* se determinó por el método de Bradford ³² el cual se basa en la unión del colorante azul de Coomassie brillante G-250 a las proteínas causando un cambio del pico máximo de absorción del colorante de 465nm a 595nm. El incremento de absorbancia a 595nm

es proporcional a la concentración de proteínas.

Curva de calibración.

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de albúmina sérica bovina conteniendo 2,5 a 20 μg de proteína (Apéndice).

Determinación de la concentración de proteínas en el extracto crudo de *Candida boidinii*

Para determinar la concentración de proteínas en el extracto celular crudo de *C. boidinii* se prepararon diluciones de la muestra en agua destilada (1:20 a 1:50). Se tomaron tres alícuotas de 200 μL de cada una de estas diluciones y se les adicionó un mL del reactivo de Bradford (diluido 1:5 en agua destilada). Se agitaron en el vortex, se dejaron reposar por 30 min a temperatura ambiente y se determinó el valor de absorbancia a 595nm. Los valores de absorbancia de cada dilución se interpolaron en la curva de calibración y se obtuvo la concentración de proteínas (μg) en un volumen de 200 μL . La concentración de proteínas (mg/mL) en el extracto crudo se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{mg/mL} = \frac{(\text{C}) (\text{D}) (5)}{1000}$$

donde:

C = Concentración promedio

D = Dilución realizada

5 = Factor para expresar el valor en 1 mL

1000 = Factor para transformar de μg a mg

2.2.4. Preparación del Extracto Celular Crudo de *Candida boidinii*.

En un tubo de ensayo se pesaron 400 mg (peso húmedo) de células de *C. boidinii*, se resuspendieron en amortiguador de fosfato de potasio (Apéndice) y se mezclaron con 3,5 g de perlas de vidrio. Las células se

trituran mecánicamente por agitación en el vortex 6 veces durante 30 seg, manteniendo a 4°C por 10 seg entre cada agitación. Las células trituradas se separaron de las perlas de vidrio utilizando una jeringa con cartucho de algodón al fondo y centrifugando a 6000 rpm por 3 min a 4°C. Las perlas de vidrio se lavaron con 0,5 mL del amortiguador de fosfato de potasio y se centrifugaron de nuevo a las mismas condiciones. Una vez separadas las células trituradas de las perlas de vidrio se centrifugó en una microcentrífuga durante 30 seg. La fracción del sobrenadante resultante de la centrifugación corresponde al extracto celular crudo conteniendo las proteínas solubles.

2.2.5. Curvas de crecimiento de *Candida boidinii*.

Para realizar la curva de crecimiento de *C. boidinii* se inoculó una colonia de la levadura en un medio enriquecido con glucosa al 2% (YPD) como única fuente de carbono. Este cultivo líquido, denominado precultivo, se incubó durante 24 hr a 30°C bajo agitación constante (250 rpm). Se determinó la turbidez del precultivo y se transfirió el volumen necesario a dos medios mínimos conteniendo glucosa y metanol como única fuente de carbono, respectivamente. Estos cultivos se iniciaron en todos los casos con una turbidez de 0,1 D.O./mL. Se incubaron a 30°C bajo agitación constante. Se tomaron alícuotas del cultivo cada dos horas y se diluyeron en agua destilada (1:1000). Se tomó el valor de densidad óptica/mL de cada dilución y se graficaron los datos en función del tiempo para obtener la curva de crecimiento celular de *C. boidinii* en los dos medios mínimos con glucosa y con metanol como única fuente de carbono, respectivamente.

La fase exponencial media de la curva de crecimiento celular corresponde al punto medio del segmento ascendente de esta curva.

2.2.6. Conteo de Colonias en Placas de Agar.

Se efectuaron cultivos de *C. boidinii* en medios mínimos con glucosa y con metanol. En la fase exponencial media de cada uno de los cultivos se adicionaron los compuestos antracénicos a partir de soluciones concentradas (1 mg/mL) de: peroxisomicina A₂, isoperoxisomicina A₁ y T-544. Para cada uno de los compuestos se prepararon cultivos de

concentración final de 0,5, 2, 10, 20 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como controles positivo y negativo se utilizaron células en presencia de peroxisomicina A_1 y sin tratamiento, respectivamente. Después de la adición de los compuestos, los cultivos se incubaron a 30°C bajo agitación constante durante 2 hr. Se realizaron diluciones seriadas de los cultivos de *C. boidinii* hasta tener una dilución final de $1:1 \times 10^6$. Un volumen de 0,1 mL de la última dilución se sembró por extensión, tanto en placas de agar YPD como en placas de agar YPM (Apéndice). Las placas se incubaron en una incubadora estática a 30°C durante 48 hr. Posteriormente se realizó el conteo de las colonias en las placas de agar.

2.2.7. Métodos Microscópicos.

2.2.7.1. Microscopía de Luz de Contraste de Fase.

Sobre un portaobjetos se colocó una gota de los cultivos de *C. boidinii* expuestos durante dos horas a diferentes concentraciones de los compuestos antracénicos y se realizó la observación directa bajo el microscopio de luz de contraste de fase (Fotomicroscopio Carl-Zeiss). Se utilizaron objetivos de 63x y 100x.

2.2.7.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (Ultraestructura).

Se prepararon series de cultivos de *C. boidinii* en medio mínimo con metanol como única fuente de carbono hasta alcanzar la fase exponencial media en cada uno de los cultivos. A este tiempo se adicionó el volumen necesario de la solución concentrada del compuesto antracénico (Peroxisomicina A_2 , Isoperoxisomicina A_1 ó T-544) correspondiente, para tener una concentración final en el medio de cultivo de $2 \mu\text{g}/\text{mL}$. Como control positivo y negativo se utilizaron células en presencia de peroxisomicina A_1 ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$) y sin tratamiento, respectivamente. Los cultivos se incubaron a 30°C bajo agitación constante (250 rpm). Se tomaron dos alícuotas de 2 mL a diferentes tiempos: 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 hrs. Las muestras se procesaran

para microscopía electrónica de transmisión por la técnica de inclusión en resina epóxica (Apéndice).

2.2.7.3. Inmunocitoquímica.

Para la demostración inmunocitoquímica de la alcohol oxidasa de *C. boidinii* se tomaron alícuotas de los cultivos en presencia de 2 µg/mL de los compuestos antracénicos (peroxisomicina A₂, isoperoxisomicina A₁ ó T-544) a los mismos tiempos de exposición utilizados para microscopía electrónica de transmisión. Las muestras se trataron hasta su inclusión en lowicryl K4M (Apéndice). Para realizar la técnica inmunocitoquímica se obtuvieron cortes finos de las muestras incluidas en lowicryl K4M y se colocaron en rejillas de níquel (200 mesh) con soporte. Las rejillas con los cortes se colocaron sobre una gota de albúmina sérica bovina (0,5% en agua ultrapura) por 5 min. Luego se incubaron en presencia del anticuerpo específico anti-alcohol oxidasa de conejo diluído 1:5000 en amortiguador PBS-glicina durante 12 a 16 hrs a 4°C en cámara húmeda. Después se lavaron las rejillas con amortiguador PBS-glicina tres veces por 20 min. Nuevamente se lavaron las rejillas ahora con agua ultrapura tres veces por 20 min. Las rejillas se incubaron con un segundo anticuerpo (anti-conejo obtenido de cabra) conjugado con partículas de oro coloidal (dilución 1:80) por 60 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente las rejillas se lavaron con amortiguador PBS-glicina tres veces por 20 min. Luego se lavaron las rejillas con agua ultrapura tres veces por 20 min. Los cortes finos se contrastaron con acetato de uranilo (5% en agua ultrapura) por 2 min. Finalmente se realizó la observación bajo el microscopio electrónico de transmisión Carl-Zeiss, EM 109 a aumentos de 12 000x y 20 000x.

2.2.8. Análisis Estadístico

Cada una de las determinaciones analíticas (medición de la turbidez del medio, determinación de la actividad de catalasa y determinación de proteínas totales) así como el conteo de colonias en placas de agar se

realizaron por triplicado y se sometieron a la prueba t de Student para determinar la posible diferencia significativa con respecto al control negativo y al control positivo.

La prueba t de Student se realizó con un valor de $n = 3$, utilizando un grado de significancia de $p \leq 0,005$. El valor crítico de la prueba t fue de 2,896.

CAPITULO TRES

RESULTADOS

3.1. Curva de Crecimiento de *Candida boidinii* en Medio Mínimo con Glucosa (0,25%)

Se efectuaron curvas de crecimiento celular de *C. boidinii* en medios con glucosa como única fuente de carbono para establecer la fase exponencial media de crecimiento de este microorganismo. Se tomaron alícuotas de los cultivos cada dos horas y se midió la turbidez del medio de cultivo a una longitud de onda de 600nm. En la Tabla IV se incluyen los promedios de tres valores de absorbancia que no mostraron diferencia estadística significativa entre sí además se incluye su desviación estándar. La Figura 8 muestra una gráfica de los valores de absorbancia en función del tiempo de incubación. Esta gráfica corresponde a la curva de crecimiento de *C. boidinii* en medio mínimo con glucosa (0,25%).

A partir de la curva de crecimiento de *C. boidinii* en medio mínimo con glucosa (0,25%) se estableció la fase exponencial media de crecimiento a las 7,0 hrs con 2,100 D.O./mL.

Tabla IV

Curva de Crecimiento de *Candida boidinii* en medio mínimo con glucosa (0,25%)

Tiempo (hr)	Absorbancia (600nm)
0	0,105 ± 0,003
2	0,199 ± 0,012
4	0,406 ± 0,024
6	1,263 ± 0,110
8	2,966 ± 0,094
10	4,520 ± 0,184
12	5,010 ± 0,140
14	4,967 ± 0,231
16	4,893 ± 0,135
18	4,820 ± 0,024
20	4,803 ± 0,125
22	4,750 ± 0,115
24	4,803 ± 0,067

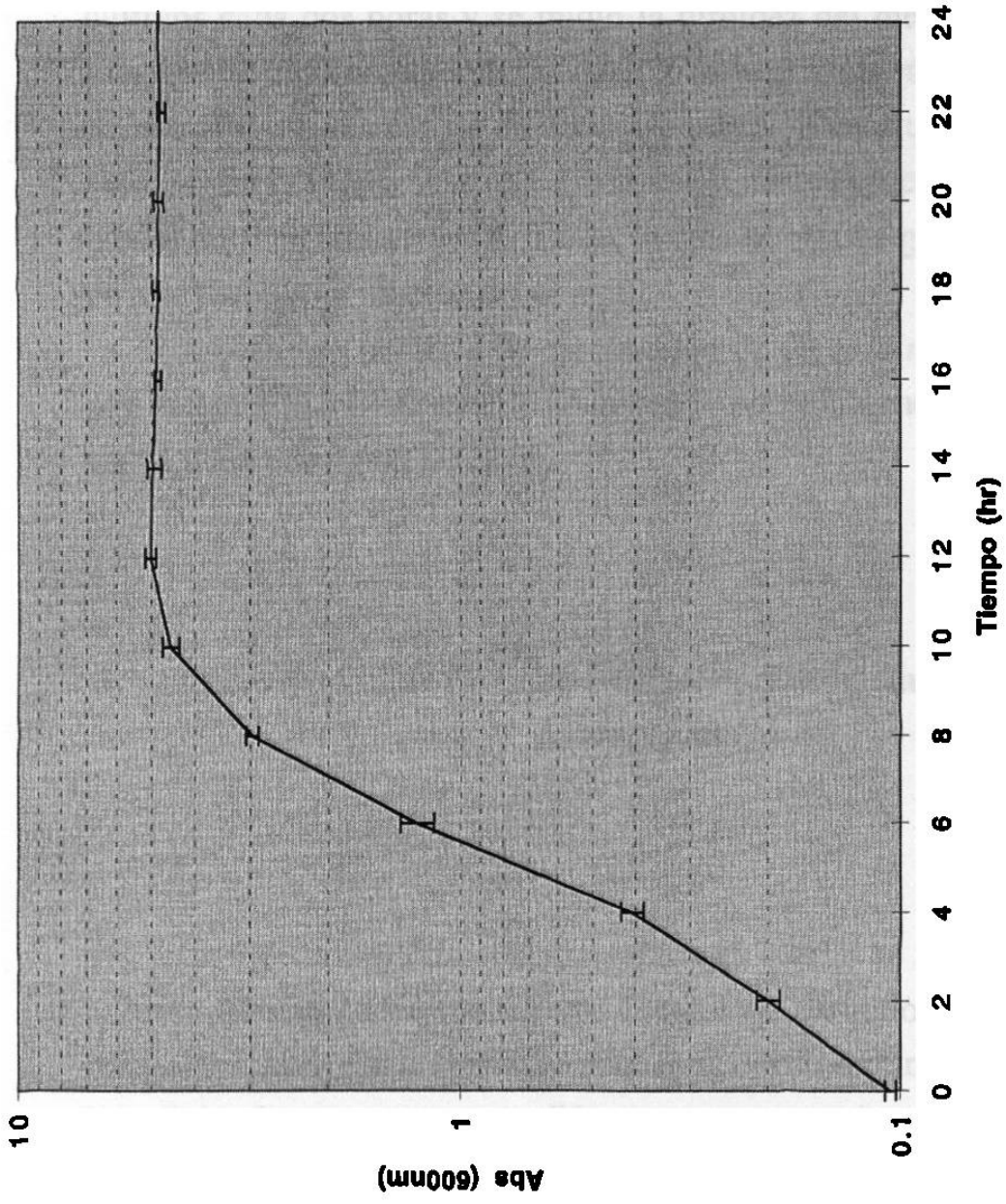


Figura 8 Curva de crecimiento de *Candida boldinii* en medio mínimo con glucosa (0,25%)

3.2. Curva de Crecimiento de *Candida boidinii* en Medio Mínimo con Metanol (0,5%)

Se realizaron curvas de crecimiento celular de *C. boidinii* en medios con metanol como única fuente de carbono para establecer la fase exponencial media de crecimiento de este microorganismo. Se tomaron alícuotas de los cultivos cada dos horas y se midió la turbidez del medio de cultivo a una longitud de onda de 600nm. La Tabla V incluye los promedios de tres valores de absorbancia los cuales no mostraron diferencia estadística significativa entre sí. En la Figura 9 se muestra la curva de crecimiento de *C. boidinii* en medio mínimo con metanol (0,5%), la cual se obtuvo graficando los valores de absorbancia en función del tiempo.

A partir de la curva de crecimiento de *C. boidinii* en medio mínimo con metanol (0,5%) se estableció la fase exponencial media de crecimiento a las 14,0 hrs con 2,000 D.O./mL.

3.3. Supervivencia de *Candida boidinii* en Presencia de los Compuestos Antracénicos

La determinación de la supervivencia celular se realizó en medios de cultivo mínimos conteniendo dos fuentes de carbono: glucosa y metanol respectivamente. En la fase exponencial media de crecimiento de *C. boidinii*, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones (0,5, 2, 10, 20 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de los compuestos antracénicos (peroxisomicina A₁ y A₂, isoperoxisomicina A₁ y T-544) durante dos horas. La supervivencia celular se determinó por dos métodos: La medición de la turbidez del medio de cultivo y el conteo de colonias en placas de agar.

Tabla V

Curva de Crecimiento de *Candida boidinii* en medio mínimo con metanol (0,5%)

Tiempo (hr)	Absorbancia (600nm)
0	0,097 ± 0,007
2	0,193 ± 0,018
4	0,307 ± 0,013
6	0,429 ± 0,152
8	0,554 ± 0,032
10	0,943 ± 0,054
12	1,347 ± 0,050
14	2,000 ± 0,127
16	2,772 ± 0,082
18	3,532 ± 0,053
20	4,372 ± 0,193
22	5,139 ± 0,039
24	5,281 ± 0,036

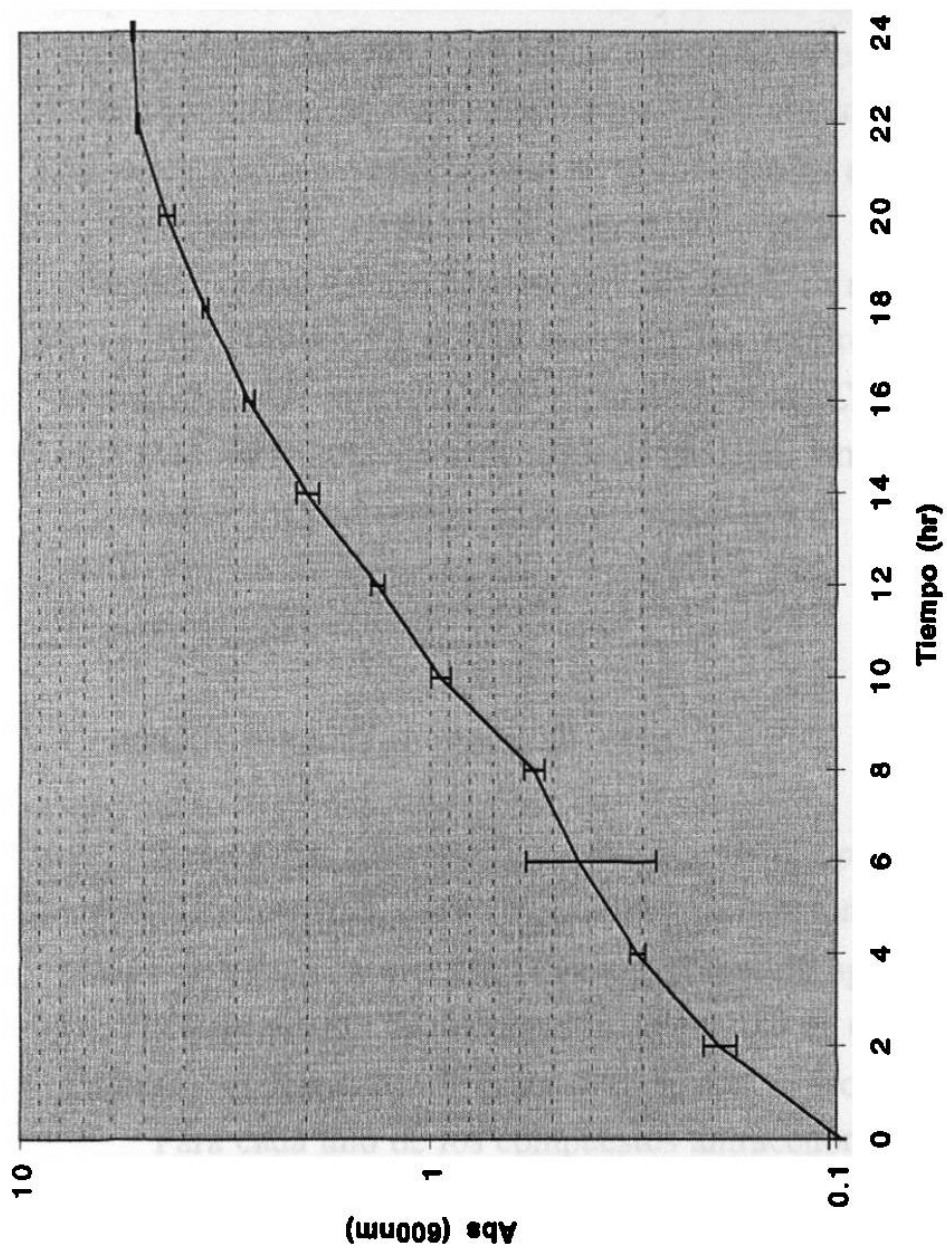


Figura 9 Curva de crecimiento de *Candida boidinii* en medio mínimo con metanol (0,5%)

Los resultados de la supervivencia celular fueron analizados estadísticamente por medio de la prueba t de Student con una $p \leq 0,005$. El valor crítico de la prueba t fue de 2,896.

Medición de la turbidez del medio de cultivo.

De los cultivos de *C. boidinii* en medios con glucosa y con metanol respectivamente, se tomaron alícuotas y se midió la turbidez del cultivo antes y después de dos horas de haber agregado el compuesto antracénico correspondiente. Se realizaron varios experimentos para cada antracena dimérica y se tomó el promedio de tres resultados que fueron reproducibles, es decir que no mostraron diferencia estadística significativa entre sí. Se consideró que el control negativo tuvo el 100 % de supervivencia celular.

Las Tablas VI y VII incluyen los valores de absorbancia y el correspondiente porcentaje de supervivencia de *C. boidinii* en los cultivos con glucosa y con metanol respectivamente. En las Figuras 10 y 11 se representan los porcentajes de supervivencia de *C. boidinii* obtenidos por la medición de la turbidez de los cultivos con glucosa y con metanol respectivamente.

Conteo de colonias en placas de agar.

Se tomaron alícuotas de los cultivos de *C. boidinii* (con glucosa y con metanol) expuestos a los compuestos antracénicos y se sembraron en placas de agar con glucosa (YPD) y placas de agar con metanol (YPM). Después de 48 hrs de incubación se realizó el conteo de colonias y se determinó el porcentaje de supervivencia con respecto al control negativo.

Para cada uno de los compuestos antracénicos se realizaron varios experimentos y se tomó el promedio de tres resultados que fueron reproducibles, es decir cuentas que no mostraron diferencia estadística significativa entre sí.

En las Tablas VIII y IX se incluyen las cuentas de colonias y el correspondiente porcentaje de supervivencia de *C. boidinii* en los cultivos con glucosa y con metanol respectivamente. En las Figuras 12 y 13 se muestran los porcentajes de supervivencia de *C. boidinii* cultivada en medio

Tabla VI
Supervivencia de *Candida boidinii* en medio mínimo con glucosa (0,25%)
Medición de la turbidez del medio de cultivo

Conc. µg/mL	Control Positivo		Peroxisomicina A ₂		Isoperoxisomicina A ₁		T-544	
	Abs600	% sup.	Abs600	% sup.	Abs600	% sup.	Abs600	% sup.
0	2,73 ± 0,16	100,0	3,15 ± 0,15	100,0	2,56 ± 0,11	100,0	2,84 ± 0,15	100,0
0,5	2,67 ± 0,13	97,8 ± 1,2	3,10 ± 0,14	98,4 ± 0,4	2,35 ± 0,12	91,8 ± 3,0	2,81 ± 0,15	98,9 ± 0,3
2,0	2,65 ± 0,18	97,1 ± 2,0	2,90 ± 0,07	92,1 ± 2,5	2,18 ± 0,15	85,1 ± 3,5*	2,79 ± 0,14	98,2 ± 0,3
10,0	1,78 ± 0,04	65,2 ± 3,5*	2,82 ± 0,12	89,5 ± 3,6*√	1,59 ± 0,10	62,1 ± 4,0*	2,73 ± 0,14	96,1 ± 0,2 √
20,0	1,53 ± 0,20	56,0 ± 4,3*	2,69 ± 0,08	85,4 ± 1,6*√	1,15 ± 0,04	44,9 ± 2,6*	2,68 ± 0,14	94,3 ± 0,4 √
50,0	1,10 ± 0,12	40,3 ± 2,8*	2,51 ± 0,13	79,7 ± 2,8*√	0,93 ± 0,05	36,3 ± 1,3*	2,60 ± 0,14	91,5 ± 0,2*√

* Diferencia significativa con respecto al control negativo (p ≤ 0,005)

√ Diferencia significativa con respecto al control positivo (p ≤ 0,005)

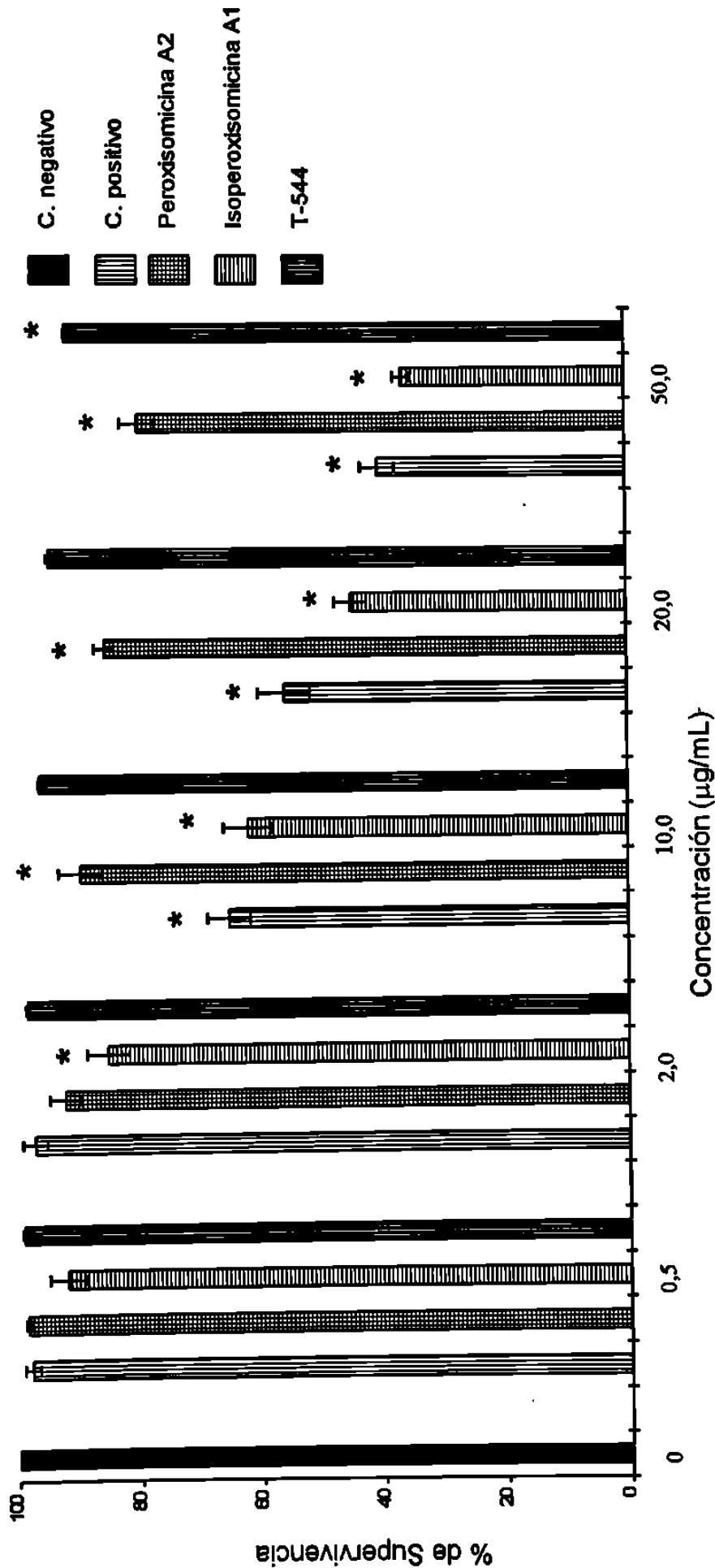


Figura 10. Supervivencia de *Candida boidinii* en medio mínimo con glucosa (0,25%). Medición de la turbidez del medio de cultivo. * Diferencia significativa con respecto al control negativo ($p \leq 0,005$)

Tabla VII

Supervivencia de *Candida boidinii* en medio mínimo con metanol (0,5%)
Medición de la turbidez del medio de cultivo

Conc. µg/mL	Control Positivo		Peroxisomicina A2		Isoperoxisomicina A1		T-544	
	Abs600	% sup.	Abs600	% sup.	Abs600	% sup.	Abs600	% sup.
0	1,11 ± 0,12	100,0	0,81 ± 0,16	100,0	0,74 ± 0,12	100,0	1,09 ± 0,53	100,0
0,5	1,03 ± 0,11	92,8 ± 0,8	--	--	0,69 ± 0,10	93,2 ± 1,9	1,07 ± 0,50	98,2 ± 1,3
2,0	0,90 ± 0,09	81,1 ± 1,0*	0,68 ± 0,14	83,9 ± 2,1*	0,57 ± 0,10	77,0 ± 2,7*	1,06 ± 0,52	97,2 ± 1,3√
10,0	0,87 ± 0,10	78,4 ± 0,7*	0,62 ± 0,11	76,5 ± 2,1*	0,46 ± 0,06	62,2 ± 4,3*	1,02 ± 0,50	93,6 ± 0,9√
20,0	0,83 ± 0,10	74,8 ± 1,1*	0,59 ± 0,10	72,8 ± 2,7*	0,41 ± 0,05	55,4 ± 2,4*	0,99 ± 0,47	90,8 ± 1,2*√
50,0	0,74 ± 0,04	66,7 ± 4,0*	0,51 ± 0,10	63,0 ± 3,3*	0,41 ± 0,06	55,4 ± 6,1*	0,99 ± 0,48	90,8 ± 0,8*√

* = Diferencia significativa con respecto al control negativo (p ≤ 0,005)

√ = Diferencia significativa con respecto al control positivo (p ≤ 0,005)

-- = No determinado

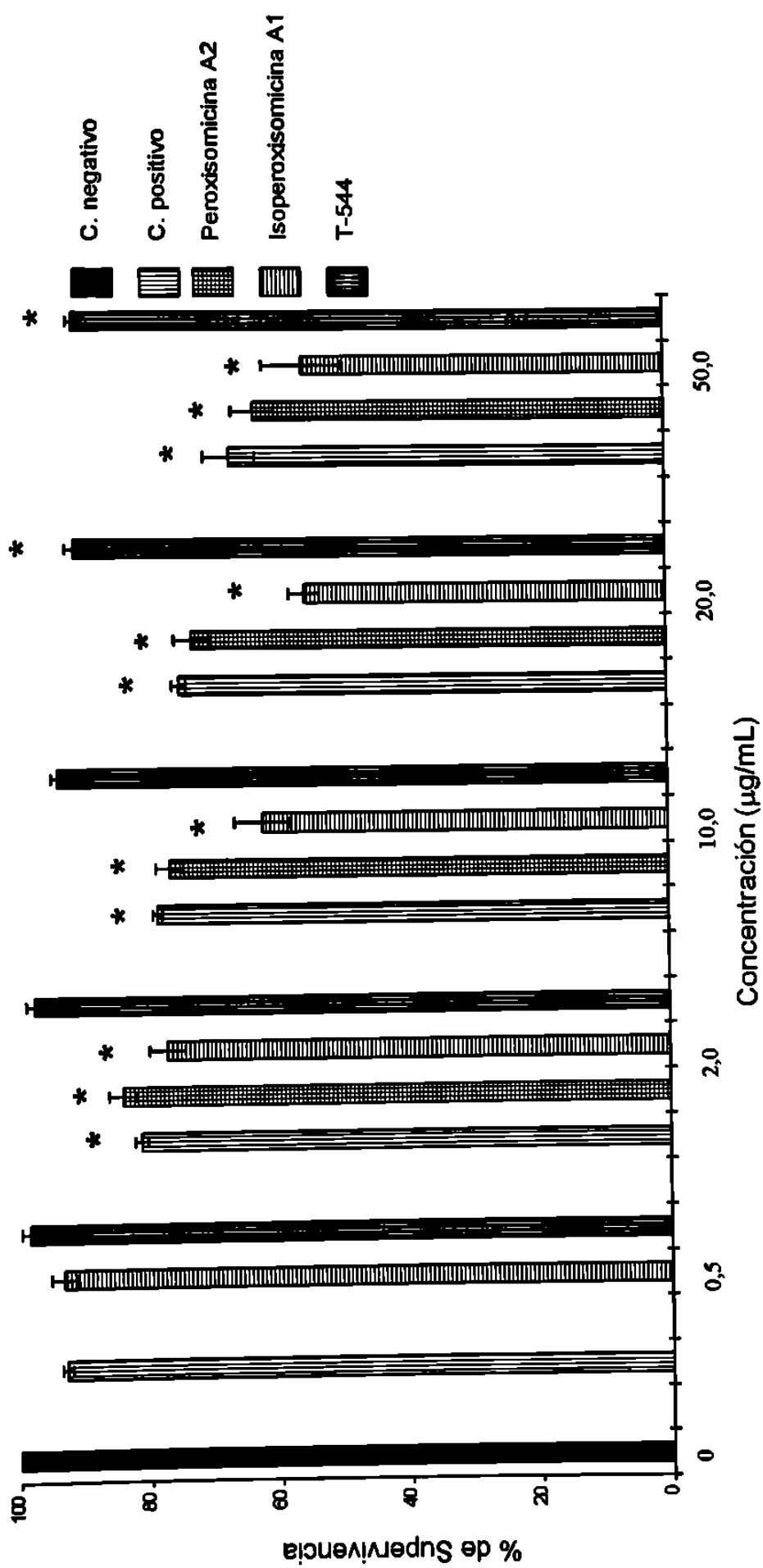


Figura 11. Supervivencia de *Candida boidinii* en medio mínimo con metanol (0,5%). Medición de la turbidez del medio de cultivo.

* Diferencia significativa con respecto al control negativo ($p \leq 0,005$)

Tabla VIII

Supervivencia de *Candida boidinii* en medio mínimo con glucosa (0,25%)
 Conteo de colonias en placas de agar

Conc. µg/mL	Control Positivo		Peroxisomicina A ₂		Isoperoxisomicina A ₁		T-544	
	# colonias	% sup.	# colonias	% sup.	# colonias	% sup.	# colonias	% sup.
0	PAG	125,2 ± 9,7 - 100,0	107,7 ± 4,5 - 100,0	99,0 ± 8,2 - 100,0	96,5 ± 4,8 - 100,0			
	PAM	130,3 ± 12,1 - 100,0	109,5 ± 4,6 - 100,0	100,8 ± 14,6 - 100,0	104,5 ± 15,2 - 100,0			
0,5	PAG	120,2 ± 10,3 - 96,0 ± 0,9	103,8 ± 2,9 - 96,4 ± 1,3	95,7 ± 8,0 - 96,7 ± 1,4	90,5 ± 4,6 - 98,4 ± 0,5			
	PAM	125,8 ± 12,8 - 96,5 ± 1,3	100,2 ± 1,3 - 91,5 ± 2,7*	97,0 ± 12,5 - 96,2 ± 2,6	93,0 ± 13,4 - 89,0 ± 0,1*			
2,0	PAG	103,7 ± 9,7 - 82,8 ± 1,9*	100,5 ± 4,3 - 93,3 ± 1,8	85,0 ± 7,0 - 85,8 ± 1,1*	93,5 ± 4,6 - 96,9 ± 0,5√			
	PAM	120,3 ± 9,6 - 92,3 ± 1,7	96,3 ± 2,3 - 87,9 ± 1,8*	87,0 ± 9,5 - 83,3 ± 3,1*	90,8 ± 13,1 - 86,9 ± 0,1*			
10,0	PAG	95,2 ± 6,3 - 76,0 ± 2,0*	96,2 ± 1,9 - 89,3 ± 3,6*	65,7 ± 7,1 - 66,4 ± 2,3*	89,3 ± 4,0 - 92,5 ± 0,5√			
	PAM	75,5 ± 8,2 - 57,9 ± 2,9*	92,0 ± 4,5 - 84,0 ± 1,0*√	72,3 ± 12,7 - 71,7 ± 2,7*	88,0 ± 12,1 - 84,2 ± 0,6*√			
20,0	PAG	65,2 ± 4,1 - 52,1 ± 1,9*	94,0 ± 1,8 - 87,3 ± 2,4*√	47,3 ± 4,3 - 47,8 ± 1,9*	86,0 ± 4,1 - 89,1 ± 0,5*√			
	PAM	68,3 ± 3,6 - 52,4 ± 2,2*	89,0 ± 6,1 - 81,3 ± 2,1*√	64,0 ± 6,6 - 63,5 ± 2,8*	84,5 ± 11,7 - 80,9 ± 0,5*√			
50,0	PAG	60,5 ± 3,0 - 48,3 ± 1,4*	89,0 ± 6,1 - 82,6 ± 2,5*√	40,8 ± 3,7 - 41,2 ± 3,7*	83,7 ± 4,3 - 86,7 ± 0,4*√			
	PAM	64,0 ± 8,3 - 49,1 ± 1,9*	84,7 ± 5,3 - 77,3 ± 3,7*√	56,0 ± 5,6 - 55,5 ± 2,3*	81,8 ± 11,8 - 78,3 ± 0,2*√			

* = Diferencia significativa con respecto al control negativo (p ≤ 0,005)

√ = Diferencia significativa con respecto al control positivo (p ≤ 0,005)

PAG = Placas de agar con glucosa

PAM = Placas de agar con metanol

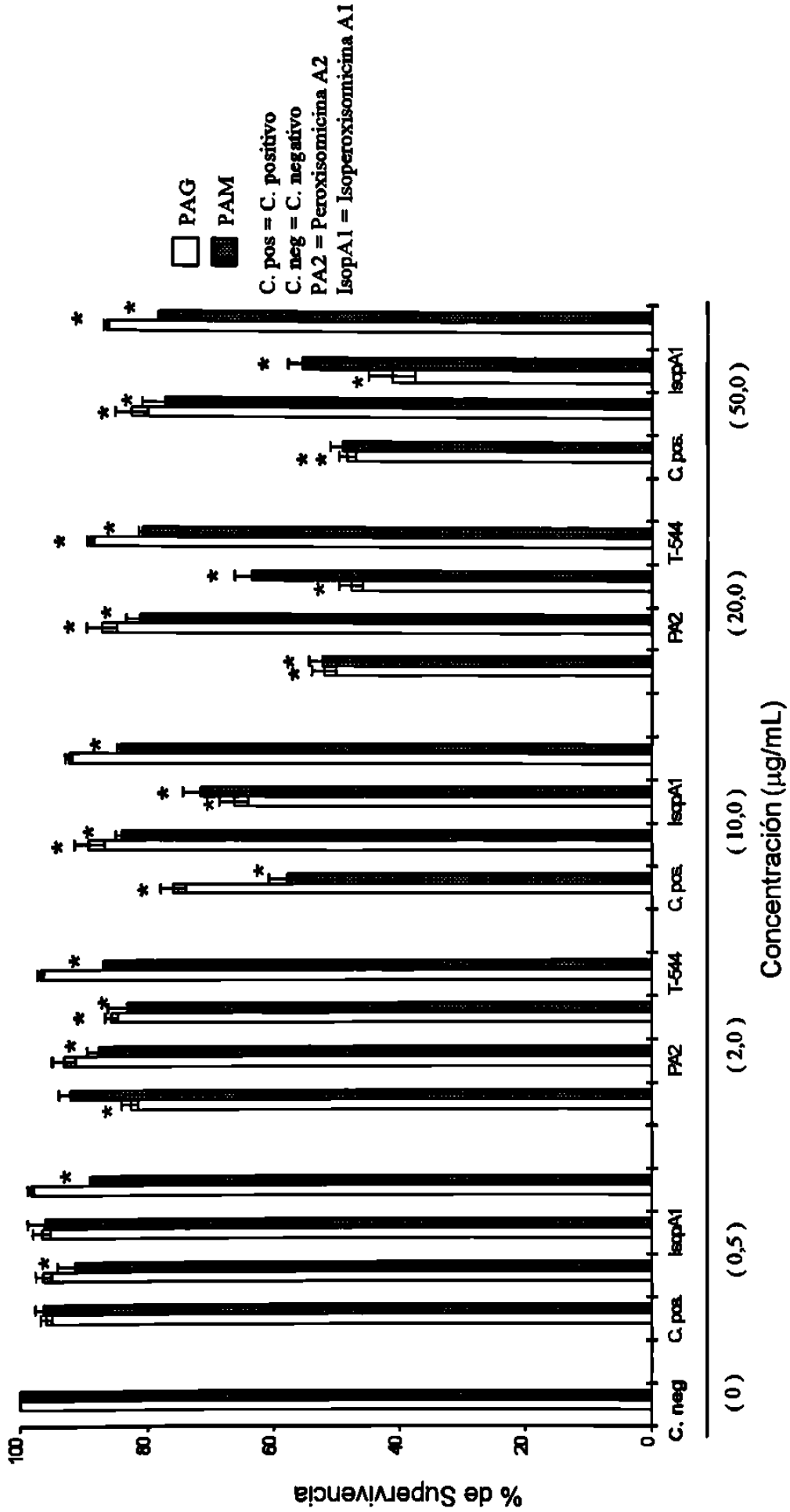


Figura 12. Supervivencia de *Candida boidinii* en medio mínimo con glucosa (0,25%). Cuento de colonias en placas de agar.
 * Diferencia significativa con respecto al control negativo ($p \leq 0,005$)

Tabla IX

Supervivencia de *Candida boidinii* en medio mínimo con metanol (0,5%)
 Cuento de colonias en placas de agar

Conc. µg/mL	Control Positivo		Peroxisomicina A ₂		Isoperoxisomicina A ₁		T-544	
	# colonias	% sup.	# colonias	% sup.	# colonias	% sup.	# colonias	% sup.
0	PAG	69,8 ± 6,2 - 100,0	59,7 ± 12,9 - 100,0		65,8 ± 2,8 - 100,0		66,2 ± 5,3 - 100,0	
	PAM	65,0 ± 0,9 - 100,0	72,6 ± 24,9 - 100,0		56,7 ± 4,2 - 100,0		71,5 ± 4,8 - 100,0	
0,5	PAG	63,8 ± 4,9 - 91,4 ± 1,1*	--		54,8 ± 0,6 - 83,2 ± 2,7*		59,2 ± 3,3 - 89,4 ± 3,1*	
	PAM	62,7 ± 0,6 - 96,5 ± 1,5	--		53,8 ± 4,7 - 94,9 ± 2,3		59,8 ± 4,0 - 83,6 ± 2,9*√	
2,0	PAG	59,7 ± 4,7 - 85,5 ± 1,5*	58,3 ± 12,2 - 97,6 ± 0,9√		47,5 ± 1,8 - 72,2 ± 3,0*		59,0 ± 6,2 - 89,1 ± 3,2*	
	PAM	59,3 ± 2,5 - 91,2 ± 3,0*	66,0 ± 22,3 - 90,9 ± 0,6*		51,8 ± 4,2 - 91,3 ± 1,0*		56,6 ± 2,2 - 79,2 ± 2,8*	
10,0	PAG	56,7 ± 4,3 - 81,2 ± 4,6*	55,3 ± 12,8 - 92,6 ± 1,6		39,8 ± 3,7 - 60,5 ± 5,8*		54,5 ± 3,1 - 82,3 ± 2,4*	
	PAM	54,6 ± 2,3 - 84,0 ± 2,5*	64,2 ± 21,4 - 88,4 ± 0,7*		40,7 ± 2,3 - 71,8 ± 3,1*		48,8 ± 4,0 - 68,2 ± 7,1*	
20,0	PAG	53,0 ± 3,6 - 75,9 ± 2,4*	52,7 ± 11,1 - 88,3 ± 0,7*		37,8 ± 2,5 - 57,4 ± 2,7*		51,8 ± 5,1 - 78,2 ± 2,4*	
	PAM	48,3 ± 1,1 - 74,3 ± 2,4*	61,6 ± 20,4 - 84,8 ± 1,5*		39,0 ± 2,6 - 68,8 ± 3,0*		47,5 ± 4,4 - 66,4 ± 6,9*	
50,0	PAG	46,7 ± 3,0 - 66,9 ± 2,1*	47,7 ± 8,7 - 79,9 ± 0,6*√		32,5 ± 3,0 - 49,4 ± 2,7*		49,3 ± 4,0 - 74,5 ± 1,9*	
	PAM	42,7 ± 2,1 - 65,7 ± 4,7*	60,0 ± 19,6 - 82,6 ± 1,9*		37,0 ± 2,6 - 62,2 ± 2,8*		37,9 ± 8,9 - 53,0 ± 0,9*	

* = Diferencia significativa con respecto al control negativo ($p \leq 0,005$)

√ = Diferencia significativa con respecto al control positivo ($p \leq 0,005$)

-- = No determinado

PAG = Placas de agar con glucosa

PAM = Placas de agar con metanol

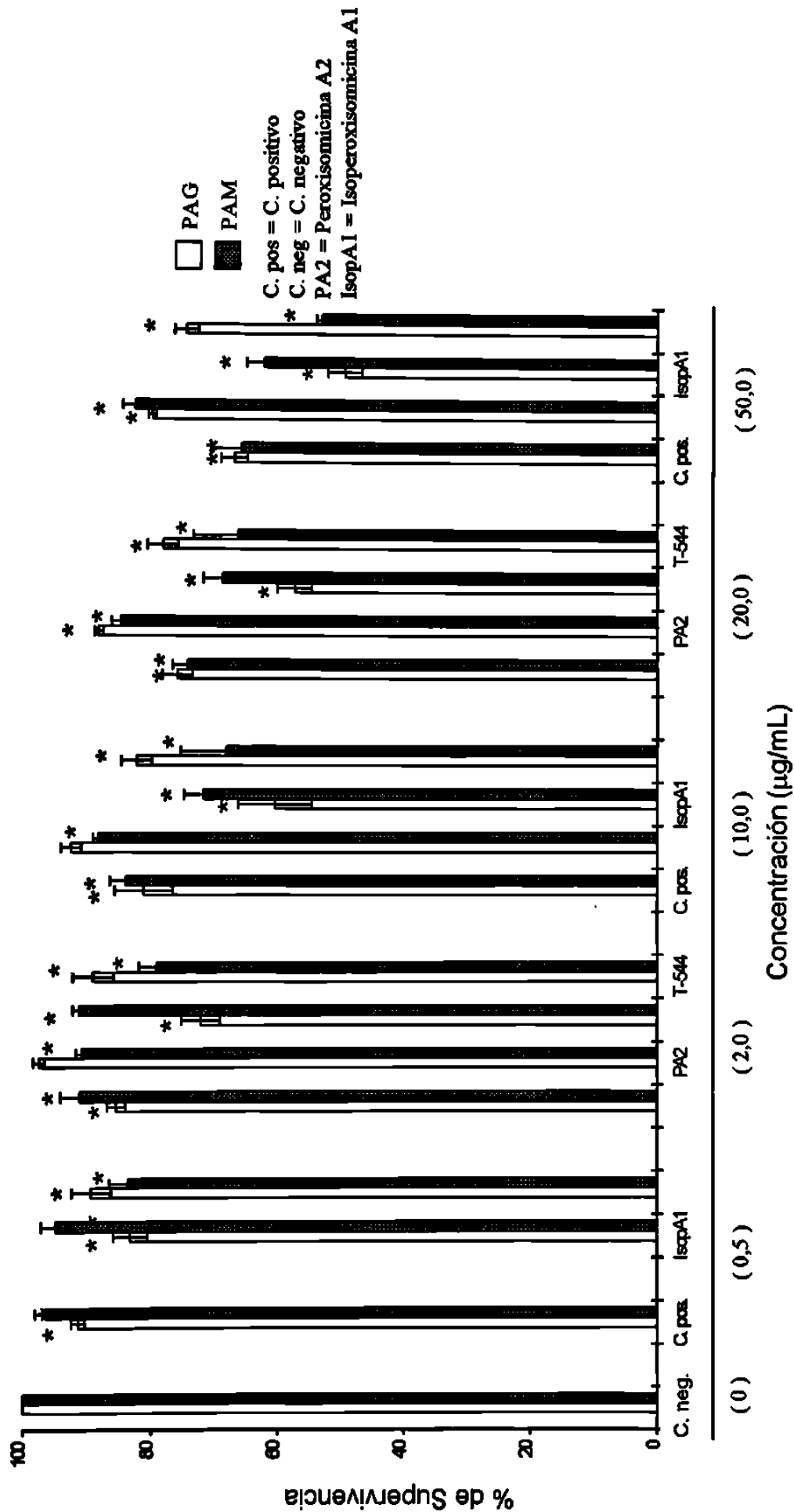


Figura 13. Supervivencia de *Candida boidinii* en medio mínimo con metanol (0,5%). Conteo de colonias en placas de agar.

* Diferencia significativa con respecto al control negativo ($p \leq 0,005$)

con glucosa (0,25%) y con metanol (0,5%), respectivamente. Estos porcentajes de supervivencia fueron obtenidos por el conteo de colonias tanto en placas de agar con glucosa (YPD) como en placas de agar con metanol (YPM).

3.4. Valoración de la Organización Celular de *Candida boidinii*

De cultivos de *C. boidinii* expuestos durante dos horas a diferentes concentraciones de los compuestos antracénicos se tomaron alícuotas con el propósito de evaluar la organización total de la célula. Esta valoración se realizó bajo el microscopio de luz de contraste de fase utilizando objetivos de 63x y 100x.

Cultivos de *Candida boidinii* en medio mínimo con glucosa (0,25%)

La morfología de las células del control negativo de *C. boidinii* (cultivo sin tratamiento) fue la siguiente: una vacuola central bien definida así como escasos peroxisomas bien formados y localizados al azar en el citoplasma (Figura 14).

Tanto las células control positivo como las expuestas a las diferentes concentraciones (0,5, 2, 10, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$) de los compuestos antracénicos en estudio (peroxisomicina A₂, isoperoxisomicina A₁ y T-544) se observaron muy semejantes a las células del control negativo, tal como se muestra en la Figura 14.

Cultivos de *Candida boidinii* en medio mínimo con metanol (0,5%)

La morfología de las células control negativo de *C. boidinii* (cultivo sin tratamiento) fue la siguiente: una vacuola central bien definida y un gran número de peroxisomas en el citoplasma (Figura 15). Esto como resultado de la inducción de la proliferación peroxisomal cuando las células se cultivan en

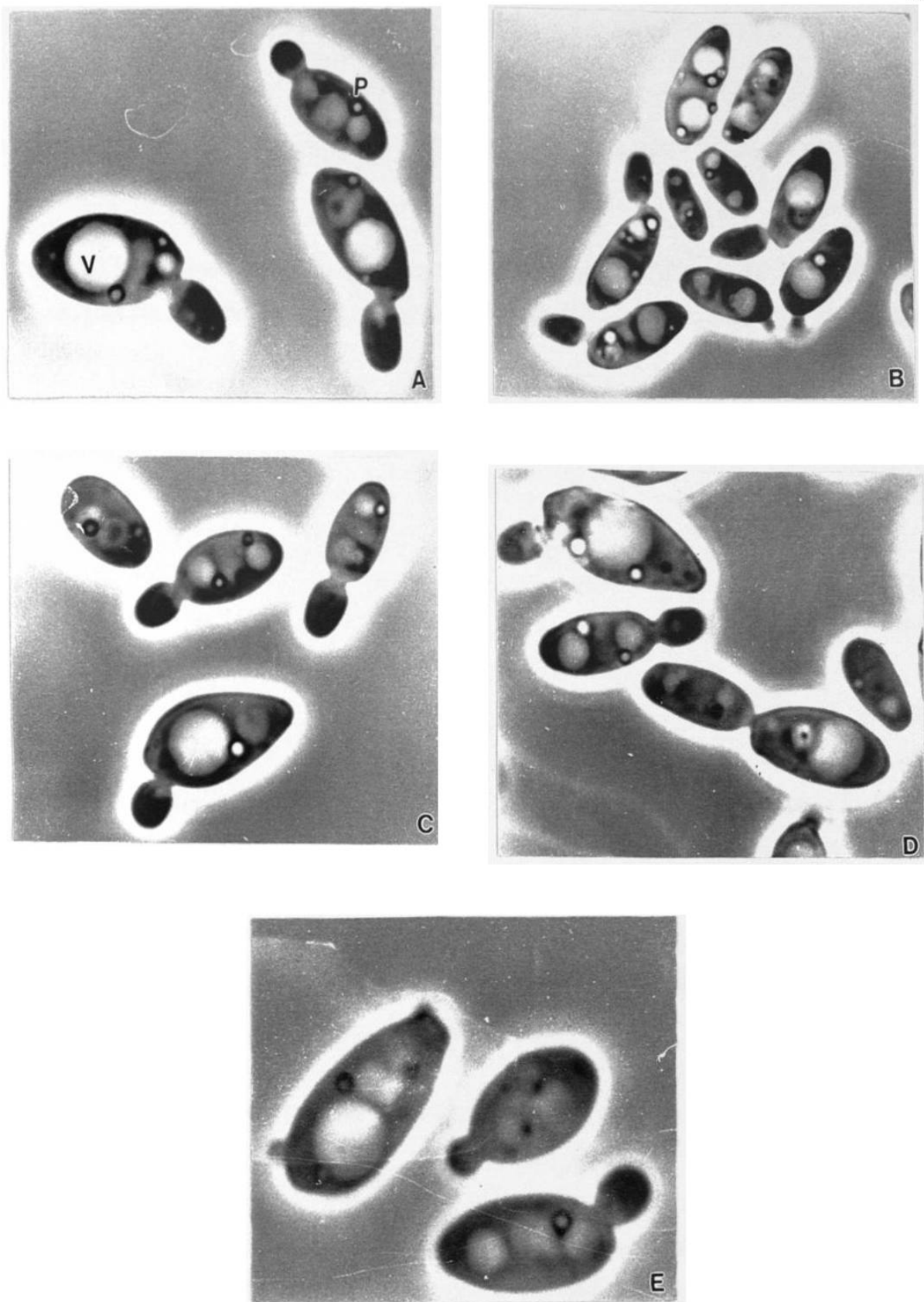


Figura 14. Microscopía de contraste de fase (100x). (A) Células de *C. boidinii* cultivadas en medio mínimo con glucosa (0,25%). (B-E) Células expuestas a 10 $\mu\text{g/mL}$ de los compuestos antracénicos durante 2 hrs. En todos los casos se observó una vacuola central bien definida así como escasos peroxisomas localizados al azar en el citoplasma. (A) Control negativo. (B) Control positivo. (C) Peroxisomicina A2. (D) Isoperoxisomicina A1. (E) T-544. V = Vacuola; P = Peroxisoma.

medio con metanol como única fuente de carbono.

Las células de *C. boidinii* control positivo mostraron cambios en su morfología a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$: se apreció un aumento del volumen de la vacuola y los peroxisomas se observaron agrupados orientados hacia un solo punto, o dentro de la vacuola autofágica (Figura 15). Estos cambios se acentuaron a medida que aumentó la concentración del compuesto antracénico. En presencia de 20 $\mu\text{g/mL}$ el grupo de peroxisomas estuvo localizado dentro de la vacuola, la cual siguió observándose de forma irregular. En presencia de la máxima concentración, 50 $\mu\text{g/mL}$, las células mostraron alteración importante, no distinguiéndose peroxisomas en el citoplasma y observándose vacuolas con material autofágico, tal como se aprecia en la Figura 16.

En presencia de peroxisomicina A_2 , las células de *C. boidinii* no mostraron cambios a ninguna de las concentraciones analizadas, observándose éstas muy semejantes al control negativo (Figuras 15 y 16).

En el caso de las células de levadura expuestas a la isoperoxisomicina A_1 se observó un cambio en su morfología cuando se utilizó una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$: las células se apreciaron con una vacuola grande e irregular, los peroxisomas estuvieron agrupados y orientados hacia un solo punto o dentro de la vacuola autofágica (Figura 15). En presencia de 20 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto antracénico, la alteración aumentó observándose los peroxisomas dentro de la vacuola autofágica. Los cambios morfológicos de las célula fueron más intensos cuando se utilizó la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$: no distinguiéndose peroxisomas en el citoplasma y observandose vacuolas conteniendo material autofágico, como se aprecia en la Figura 16.

Las células de *C. boidinii* en presencia de T-544 solo mostraron cambios en su organización cuando fueron expuestas a la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, la cual fue la máxima concentración utilizada. Las células se apreciaron con una vacuola grande e irregular y con los peroxisomas agrupados orientados hacia un punto o dentro de la vacuola autofágica (Figura 16).

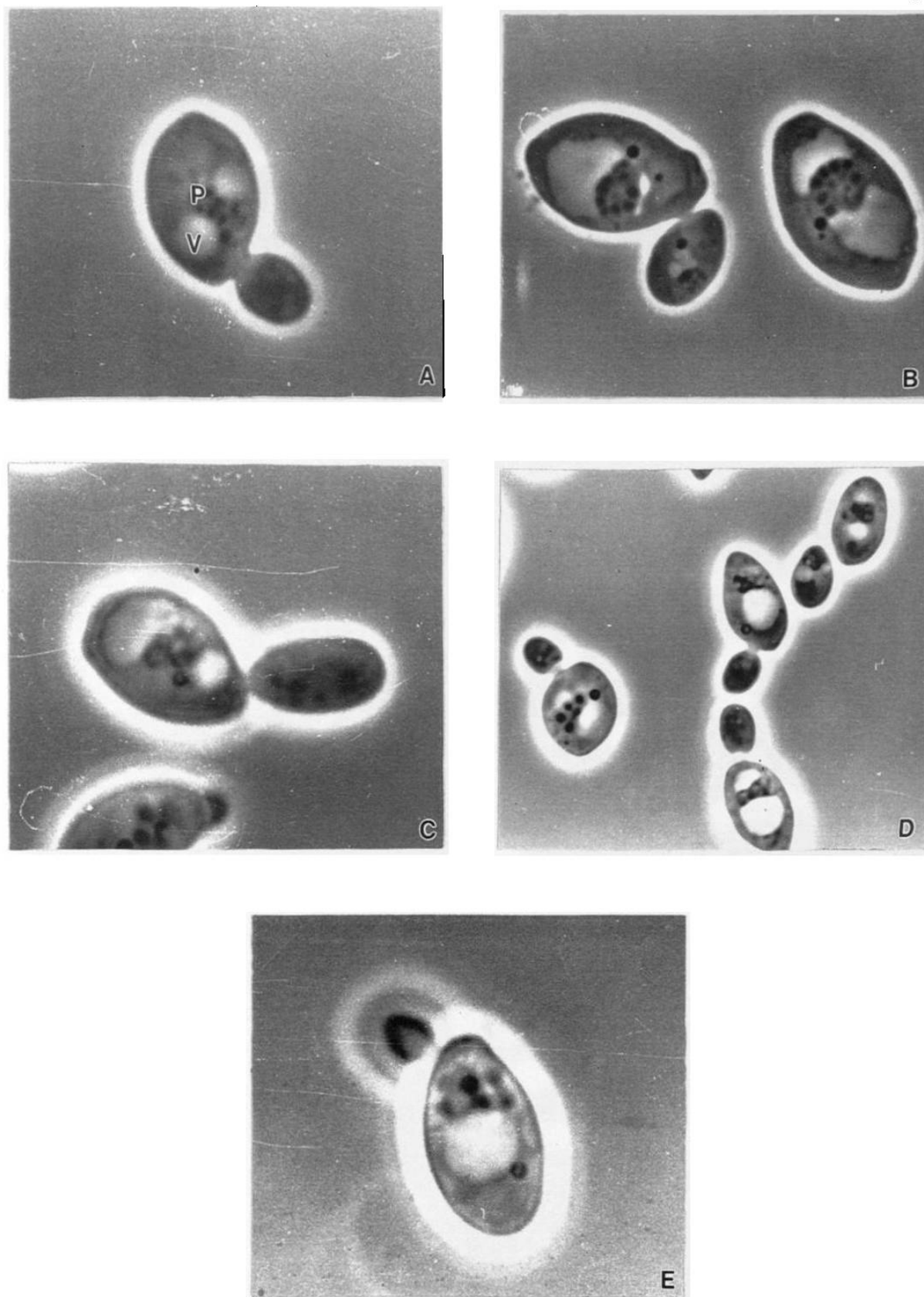


Figura 15. Microscopía de contraste de fase (100x). (A) Células de *C. boidinii* cultivadas en medio mínimo con metanol (0,5%). (B-E) Células expuestas a 10 $\mu\text{g/mL}$ de los compuestos antracénicos durante 2 hrs. Tanto en presencia del control positivo como de la isoperoxisomicina A1 se observaron cambios en la organización celular. (A) Control negativo. (B) Control positivo. (C) Peroxisomicina A2. (D) Isoperoxisomicina A1. (E) T-544. V = Vacuola; P = Peroxisoma.

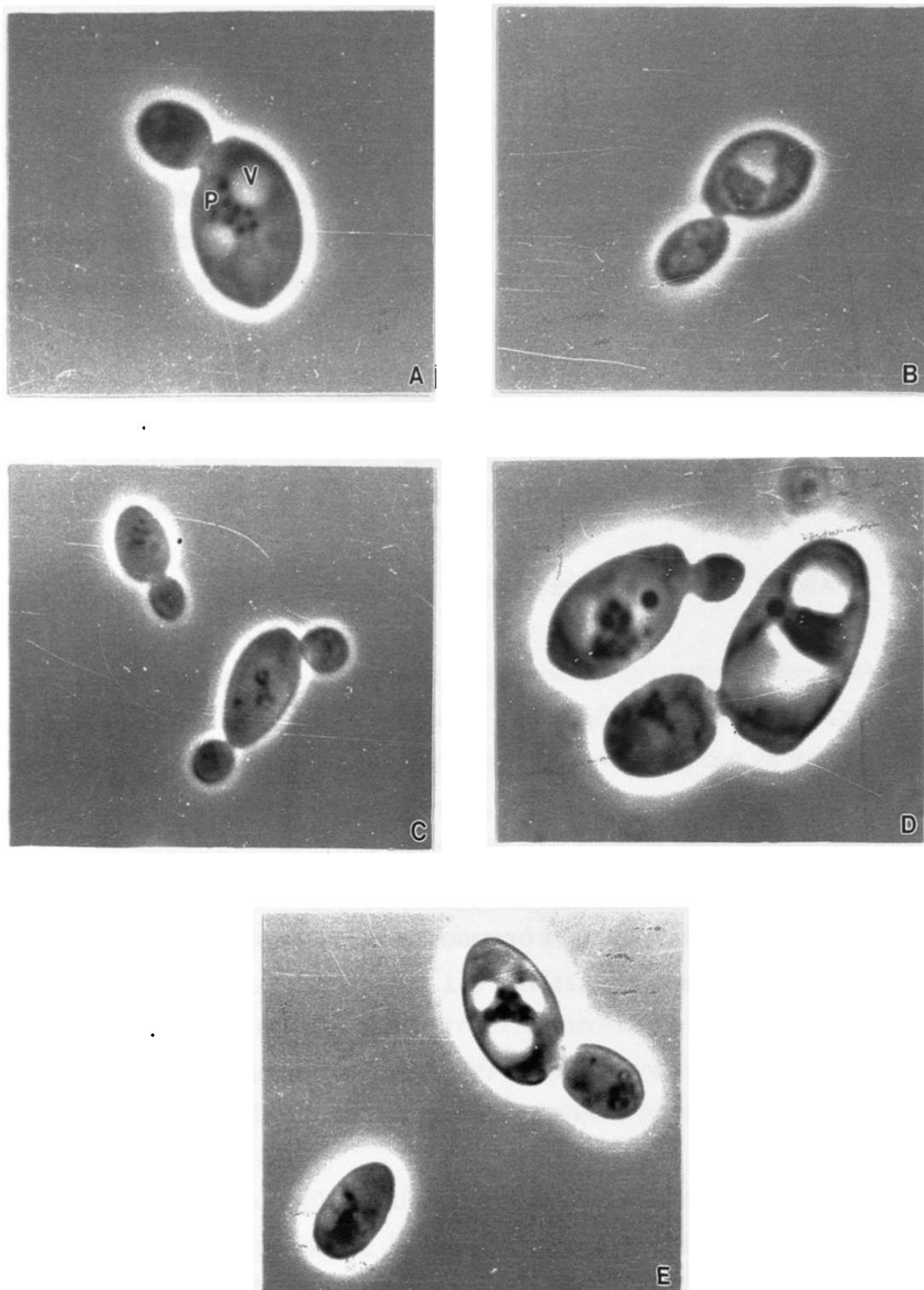


Figura 16. Microscopía de contraste de fase. (A) Células de *C. boidinii* cultivadas en medio mínimo con metanol (0,5%). (B-E) Células expuestas a 50 $\mu\text{g/mL}$ de los compuestos antracénicos durante 2 hrs. (A) Control negativo (100x). (B) Control positivo: se observó alteración importante sobre la organización celular (63x). (C) Peroxisomicina A2 (63x). (D) Isoperoxisomicina A1: las células mostraron marcada desorganización de los organelos (100x). (E) T-544: se apreció el grupo de peroxisomas dentro de la vacuola (100x). V = Vacuola; P = Peroxisoma.

3.5. Análisis Ultraestructural de Peroxisomas de *Candida boidinii*

La valoración ultraestructural de los peroxisomas en la levadura *C. boidinii* se realizó bajo condiciones de inducción de proliferación peroxisomal, es decir, en medio mínimo con metanol como única fuente de carbono. Los cultivos de *C. boidinii* se expusieron durante varios tiempos (0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 hrs) a una sola concentración (2 µg/mL) de los compuestos antracénicos. El análisis ultraestructural incluyó la valoración de la integridad peroxisomal por microscopía electrónica de transmisión y la localización de la alcohol oxidasa por inmunocitoquímica.

3.5.1. Evaluación de la Integridad Peroxisomal de *Candida boidinii*

Las células control negativo (sin tratamiento) presentaron una vacuola central y vacía, además de núcleo y mitocondrias bien definidos; los peroxisomas se observaron agrupados fuera de la vacuola con su membrana continua como se aprecia en la Figura 17.

Las células expuestas a la peroxisomicina A₁ (control positivo) durante 30 minutos mostraron fragmentación de la membrana peroxisomal así como la coagulación del citoplasma. No se observó alteración sobre otros organelos subcelulares bajo estas condiciones. Las células expuestas a los compuestos antracénicos en estudio mostraron fragmentación de la membrana peroxisomal así como la coagulación del citoplasma con excepción de la T-544 en presencia de la cual además se apreciaron mayor número de membranas fragmentadas.

Las células control positivo después de una hora de incubación mostraron discontinuidad de la membrana peroxisomal, se apreciaron peroxisomas rodeados de membranas pre-autofágicas, el citoplasma se observó coagulado en algunas células, dentro de la vacuola se apreció escasa cantidad de material electrodensito y no se observaron alteraciones sobre otros organelos subcelulares, como se aprecia en la Figura 17. A este tiempo de exposición las células cultivadas en presencia de los compuestos en estudio mostraron discontinuidad de la membrana peroxisomal, peroxisomas

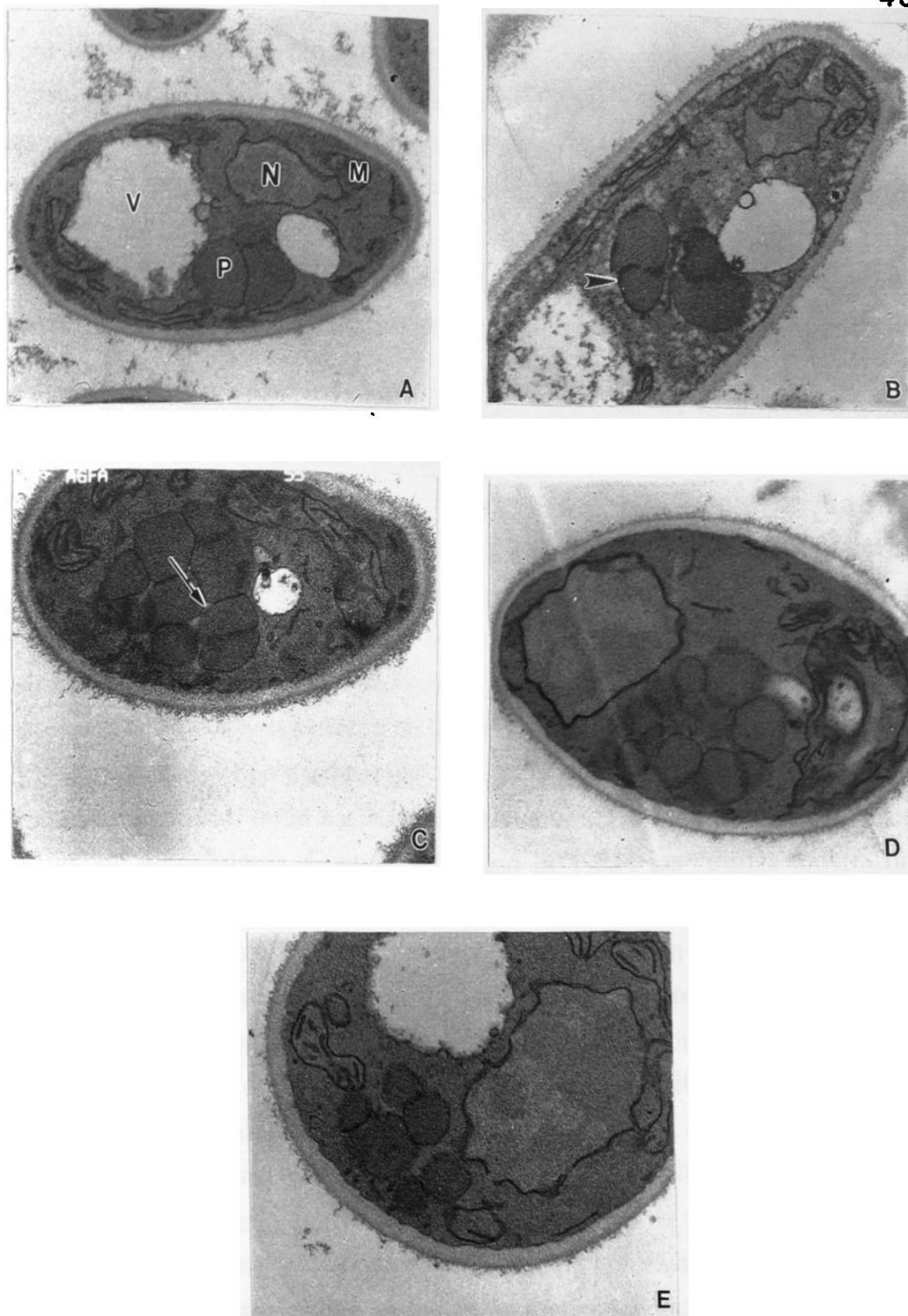


Figura 17. Microscopía Electrónica (12 000x). (A) Células de *C. boydii* cultivadas en medio mínimo con metanol (0,5%). (B-E) Células expuestas a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los compuestos antracénicos durante 1 hr. Las células en presencia de los compuestos antracénicos mostraron fragmentación de la membrana peroxisomal (\rightarrow), así como membranas preautofágicas (\blacktriangleright). (A) Control negativo. (B) Control positivo. (C) Peroxisomicina A2. (D) Isoperoxisomicina A1. (E) T-544. V = Vacuola; P = Peroxisoma; N = Núcleo; M = Mitochondrias; (•) Citoplasma coagulado.

rodeados de membranas preautofágicas, citoplasma coagulado (excepto en presencia de T-544), material electrodense dentro de la vacuola autofágica y no se observó alteración sobre otros organelos subcelulares. En el caso de las células en presencia de la isoperoxisomicina A₁ además se apreciaron peroxisomas completos dentro de la vacuola autofágica. Por otro lado aquellas células cultivadas en presencia de T-544 además de lo anterior mostraron peroxisomas de tamaño variable y peroxisomas dentro de la vacuola (Figura 17).

Las células de *C. boidinii* cultivadas en presencia de peroxisomicina A₁ (control positivo) después de 2 hrs de exposición mostraron pérdida de la membrana peroxisomal; además el grupo de peroxisomas se localizó íntimamente relacionado con la vacuola y dentro de ésta se observó material electrodense en cantidad abundante, no observándose alteraciones sobre otros organelos subcelulares. Las células en presencia de los compuestos antracénicos en estudio mostraron fragmentación de la membrana peroxisomal, peroxisomas cerca de la vacuola autofágica o dentro de ella (en el caso de la isoperoxisomicina A₁ y la T-544), abundante material electrodense dentro de la vacuola pero no se observó alteración sobre otros organelos subcelulares. Cuando se utilizó la T-544 las células mostraron además peroxisomas de tamaño variable.

Las alteraciones ultraestructurales aumentaron gradualmente en función del tiempo de exposición. Las células control positivo después de 4 hrs de exposición presentaron pérdida total de la membrana peroxisomal y material autofágico dentro de la vacuola, no se observó alteración sobre otros organelos subcelulares. A este tiempo de exposición las células expuestas a los compuestos antracénicos en estudio mostraron pérdida de la membrana peroxisomal y material autofágico dentro de la vacuola pero no se observó alteración en otros organelos subcelulares. En el caso de las células expuestas a la T-544 además presentaron peroxisomas de tamaño variable (Figura 18).

Las células de *C. boidinii* cultivadas en presencia de peroxisomicina A₁ (control positivo) después de 8 hrs de exposición mostraron citoplasma más electrodense y coagulado, la vacuola se observó con material electrodense y los peroxisomas se apreciaron cerca de éstas sin membrana peroxisomal, no se observó alteración sobre otros organelos subcelulares. Las células en presencia de los compuestos antracénicos en estudio mostraron:

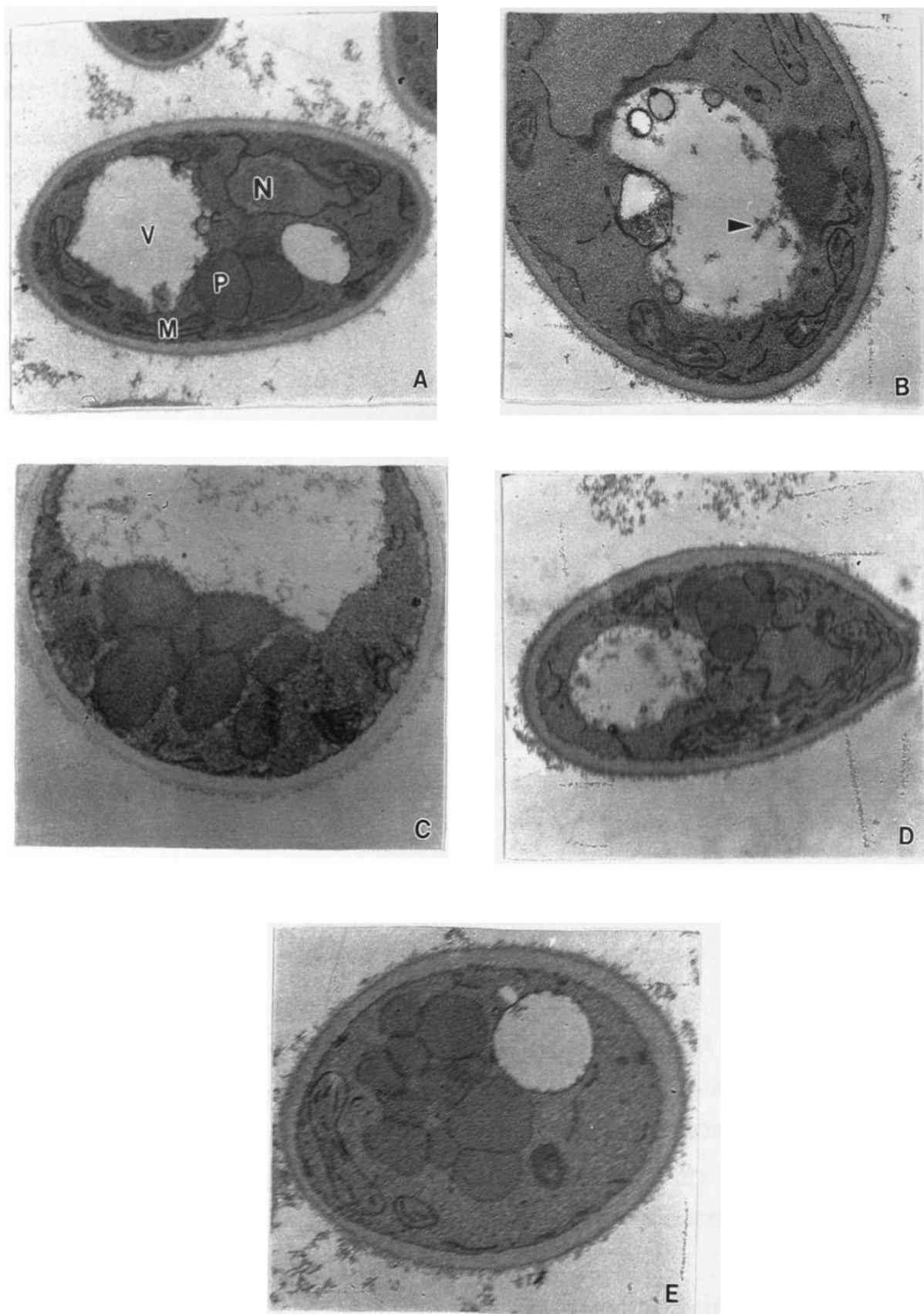


Figura 18. Microscopía Electrónica (12 000x). (A) Células de *C. boidinii* cultivadas en medio mínimo con metanol (0,5%). (B-E) Células expuestas a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los compuestos antracénónicos durante 4 hrs. En las células cultivadas en presencia de los compuestos antracénónicos se observó material electrodensó dentro de la vacuola autofágica (\blacktriangleright). (A) Control negativo. (B) Control positivo. (C) Peroxisomicina A2. (D) Isoperoxisomicina A1. (E) T-544. V = Vacuola; P = Peroxisoma; N = Núcleo; M = Mitochondrias; (•) Citoplasma coagulado.

citoplasma electrodense y coagulado (con excepción de la T-544), material electrodense dentro de la vacuola autofágica, peroxisomas sin membrana localizados estrechamente relacionados con la vacuola o dentro de ella, pero no se observó alteración sobre otros organelos subcelulares.

Al máximo tiempo de exposición (24 hrs) Las alteraciones fueron muy importantes. Las células control positivo presentaron peroxisomas irregulares dentro de la vacuola autofágica o muy cerca de ella, se observó el citoplasma coagulado, se encontró material electrodense en cantidad abundante dentro de la vacuola autofágica, no se apreció daño sobre otros organelos subcelulares. Al mismo tiempo de incubación las células expuestas a los compuestos antracénicos en estudio mostraron más frecuentemente peroxisomas dentro de la vacuola autofágica y en mayor número que el control positivo, citoplasma coagulado (con excepción de la T-544), abundante material electrodense dentro de la vacuola, pero no se apreció alteración sobre otros organelos subcelulares. En el caso de las células expuestas a la T-544 además mostraron peroxisomas de tamaño variable y aparentemente un mayor grado de fragmentación de la membrana. En la Figura 19 se muestra una serie de micrografías electrónicas describiendo estas observaciones.

3.5.2. Demostración Inmunocitoquímica de la Alcohol Oxidasa de *Candida boidinii*

De los cultivos de *C. boidinii* utilizados para la evaluación de la integridad peroxisomal se tomaron muestras a los mismos tiempos de exposición y se procesaron por la técnica de inclusión en lowicryl (Apéndice). Se escogieron las muestras expuestas durante 1 y 24 hrs a los compuestos antracénicos y se sometieron a la técnica de inmunocitoquímica para la demostración de la alcohol oxidasa.

Las células de *C. boidinii* control negativo (sin tratamiento) se observaron de la forma siguiente: la marca de las partículas de oro coloidal unidas a la alcohol oxidasa se observaron bien localizadas dentro de los peroxisomas como se observa en las Figuras 20 y 21.

En las células incubadas en presencia de las antracenas diméricas después de 1 y 24 hr de exposición, se detectó la marca de la alcohol oxidasa

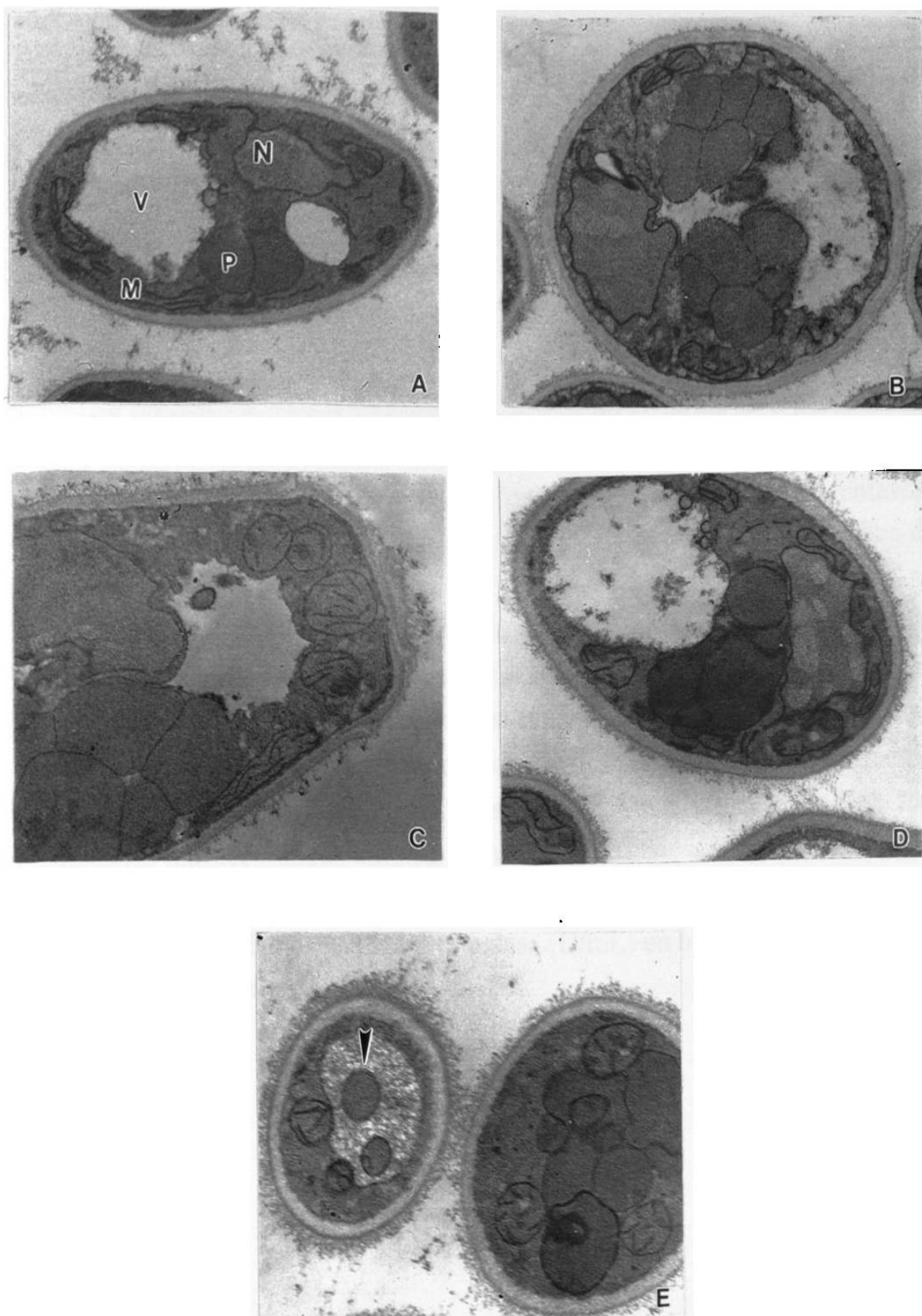


Figura 19. Microscopía Electrónica (12 000x). (A) Células de *C. boidinii* cultivadas en medio mínimo con metanol (0,5%). (B-E) Células expuestas a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los compuestos antracénicos durante 24 hrs. Se observaron peroxisomas dentro de la vacuola autofágica (\blacktriangleright) en las células expuestas a los compuestos antracénicos. (A) Control negativo. (B) Control positivo. (C) Peroxisomicina A2. (D) Isoperoxisomicina A1. (E) T-544. V = Vacuola; P = Peroxisoma; N = Núcleo; M = Mitochondrias; (•) Citoplasma coagulado.

fuera del peroxisoma, así como dentro de la vacuola autofágica tal como se observa en las Figuras 20 y 21.

3.6. Determinación de la Actividad de Catalasa en Extractos Celulares Crudos de *Candida boidinii*

Se prepararon extractos celulares crudos de *C. boidinii* a partir de los mismos cultivos utilizados para los estudios ultraestructurales, con un período de incubación de 24 hrs. En ellos se determinó la actividad de catalasa (U/mL), la concentración de proteínas (mg/mL) y la actividad específica de catalasa (U/mg).

Para cada compuesto antracénónico se realizaron varios experimentos tomándose el promedio de tres resultados que fueron reproducibles, es decir que no mostraron diferencia estadística significativa entre sí. En la Tabla X se incluyen los resultados de la actividad de catalasa determinada en extractos celulares crudos de *C. boidinii* expuestas a 2 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los compuestos antracénónicos durante 24 hrs.

En la Figura 22 se representan por medio de una gráfica de barras los valores de la actividad específica de catalasa (U/mL) en los extractos celulares crudos de *C. boidinii*.

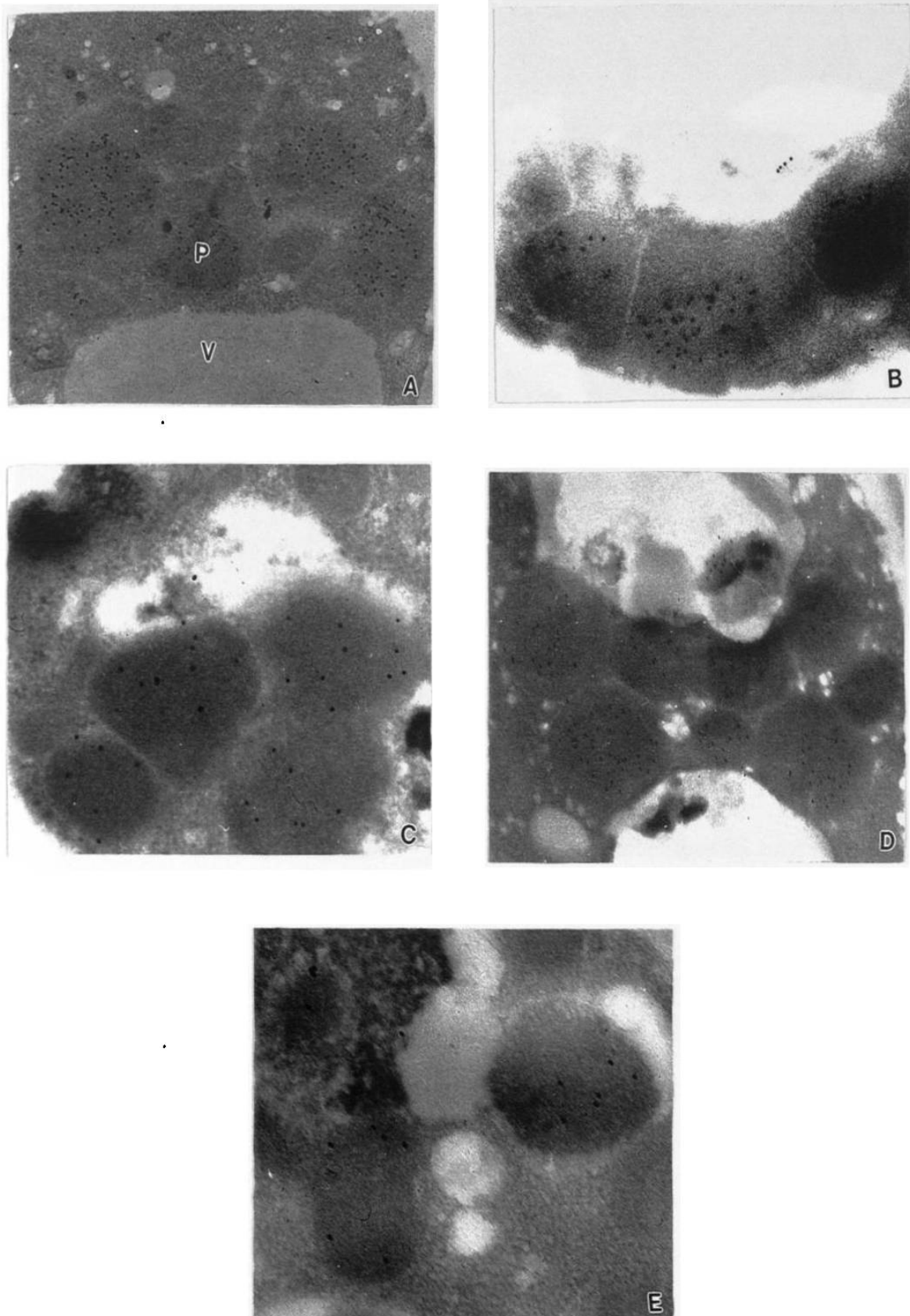


Figura 20. Células de *C. boidinii* tratadas para inmunocitoquímica (20 000x). (A) En el control negativo se observó la marca de alcohol oxidasa bien localizada dentro del peroxisoma. (B-E) Células expuestas a 2 µg/mL de los compuestos antracénicos durante 1 hr. Las células en presencia de los compuestos antracénicos mostraron la marca fuera del peroxisoma así como dentro de la vacuola autofágica. (B) Control positivo. (C) Peroxisomicina A2. (D) Isoperoxisomicina A1. (E) T-544. V = Vacuola; P = Peroxisoma.

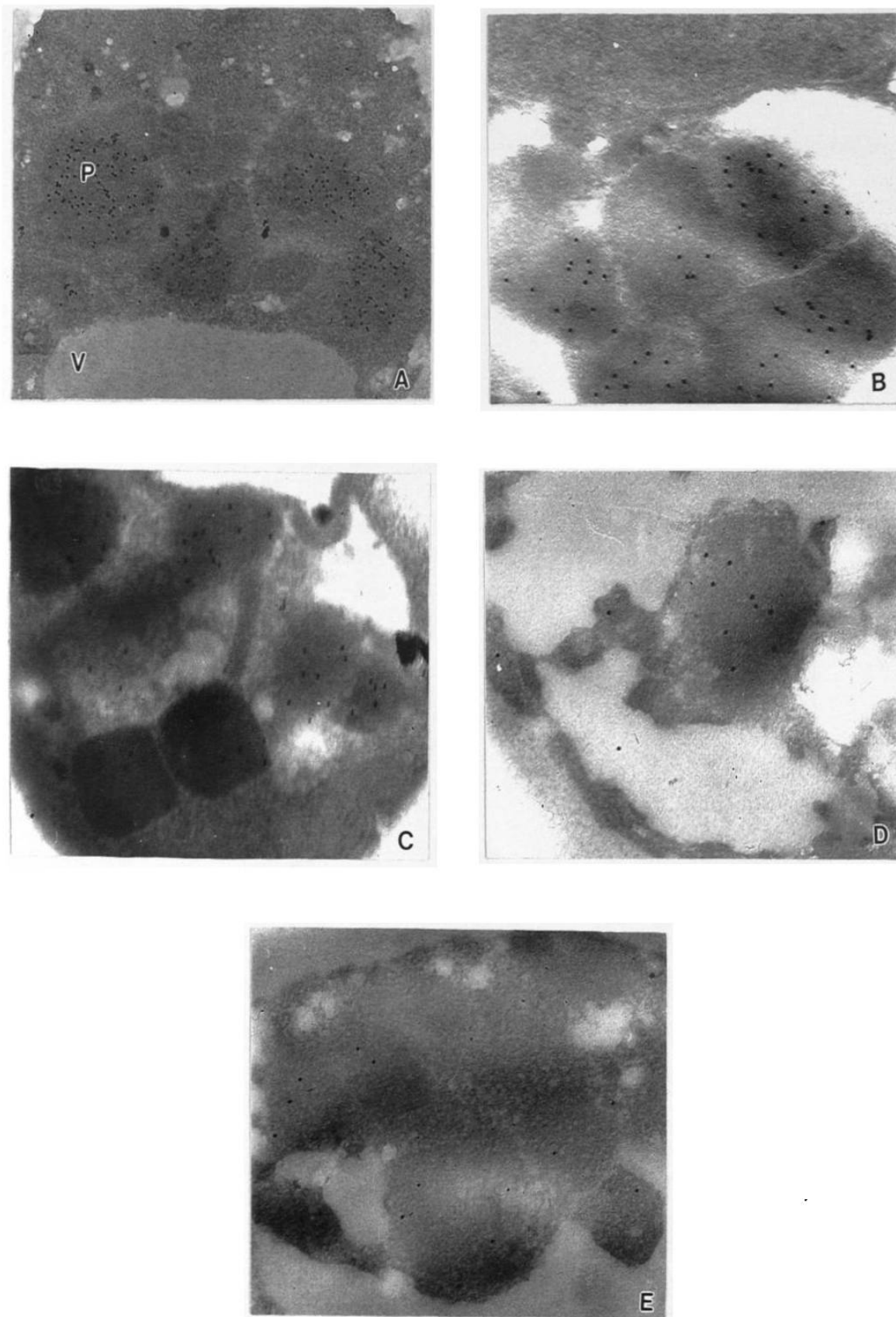


Figura 21. Células de *C. boidinii* tratadas para inmunocitoquímica (20 000x). (A) En el control negativo se observó la marca de alcohol oxidasa bien localizada dentro del peroxisoma. (B-E) Células expuestas a 2 µg/mL de los compuestos antracénicos durante 24 hrs. Las células en presencia de los compuestos antracénicos mostraron la marca fuera del peroxisoma así como dentro de la vacuola autofágica. (B) Control positivo. (C) Peroxisomicina A2. (D) Isoperoxisomicina A1. (E) T-544. V = Vacuola; P = Peroxisoma.

Tabla X

Actividad de catalasa en extracto celular crudo de *Candida boidinii*

	Actividad total de catalasa (U/mL)	Concentración de Proteínas (mg/mL)	Actividad específica de catalasa (U/mg)
Control Negativo	8 762,5 ± 170,3	1,97 ± 0,05	4 448,0 ± 69,0
Control Positivo	9 068,1 ± 123,9	2,07 ± 0,10	4 380,7 ± 246,0
Peroxisomicina A2	8 863,3 ± 37,7	2,03 ± 0,05	4 366,2 ± 127,8
Isoperoxisomicina A1	8 972,8 ± 129,8	1,94 ± 0,11	4 625,1 ± 335,6
T-544	9 045,9 ± 62,0	2,14 ± 0,06	4 227,1 ± 89,7

$p \leq 0,005$

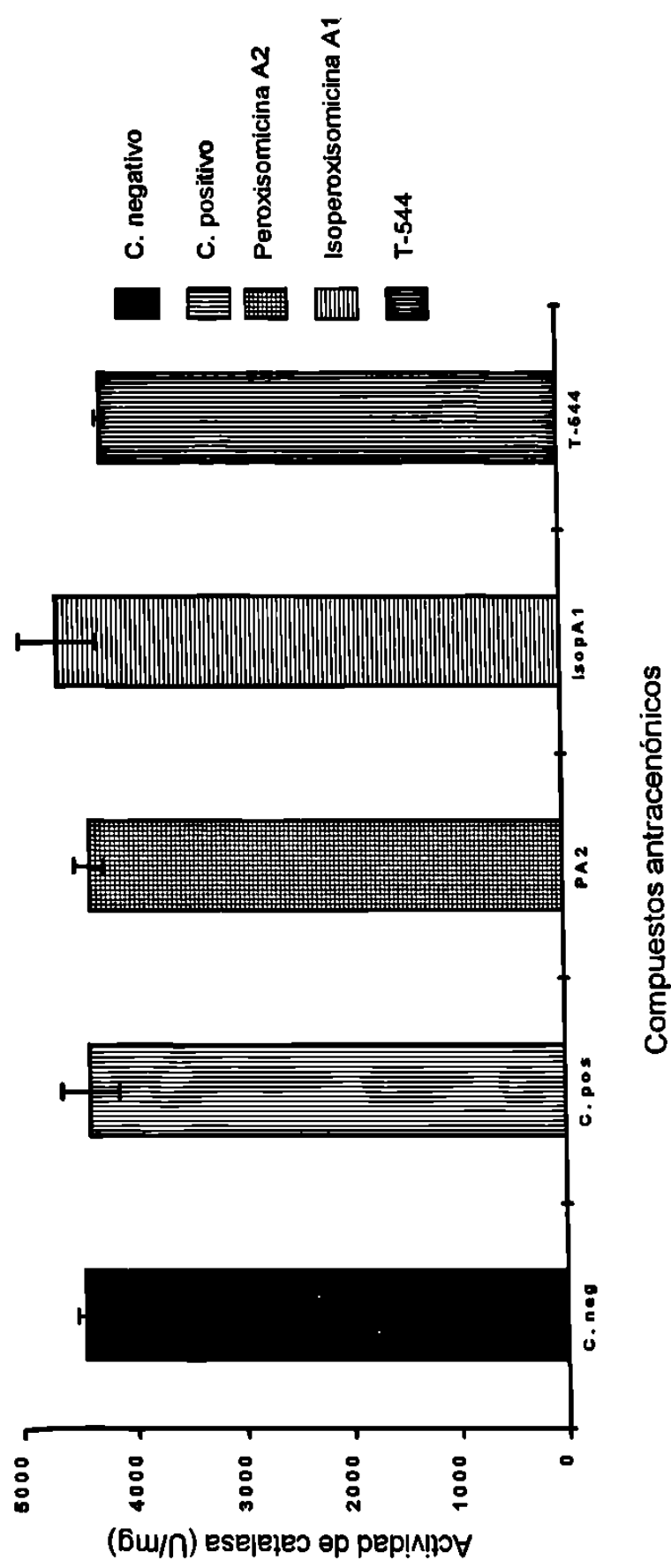


Figura 22. Actividad específica de catalasa en extractos celulares crudos de *C. boidinii*

CAPITULO CUATRO

DISCUSION

Los peroxisomas son organelos presentes en casi todas las células eucariotas. En ellos se llevan a cabo una gran variedad de reacciones metabólicas tanto biosintéticas como oxidativas ³³.

Las células de levadura constituyen un sistema modelo adecuado para el estudio de la función peroxisomal, ya que en ellas se puede inducir la proliferación del organelo cuando son cultivadas en medios específicos ²². En levaduras metilotróficas se induce la proliferación masiva de este organelo llegando a ocupar hasta el 80% del volumen citoplasmático, cuando estas células se cultivan en presencia de metanol como única fuente de carbono y de energía ³⁴. Durante la proliferación peroxisomal se induce la síntesis de varias enzimas involucradas en el metabolismo del metanol como son la alcohol oxidasa, la dihidroxiacetona sintasa y la catalasa ²³.

Varios compuestos antracenónicos han sido aislados y caracterizados de diversas especies de plantas del género *Karwinskia* ^{3, 11, 30}. Uno de estos compuestos, la toxina T-514, ha sido renombrada como peroxisomicina A₁ debido a que produce un efecto selectivo e irreversible sobre peroxisomas de levaduras metilotróficas, *in vivo* ²⁶.

El propósito de la presente investigación fue analizar el efecto *in vivo* de compuestos antracenónicos estructuralmente semejantes a la peroxisomicina A₁, tales como la peroxisomicina A₂ (diastereoisómero de T-514) la isoperoxisomicina A₁ (isómero de posición de T-514) y la T-544 sobre los peroxisomas de *Candida boidinii*. Las células expuestas a la peroxisomicina A₁ fueron utilizadas como control positivo.

La viabilidad de *C. boidinii* fue evaluada a través de los porcentajes de

supervivencia de este microorganismo en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos antracénicos. Todos los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente para determinar la reproducibilidad y la posible diferencia significativa con respecto al control negativo y al control positivo. En general, todos los compuestos analizados mostraron efecto sobre la viabilidad celular, tanto en las células cultivadas en medio con glucosa como en las células cultivadas en medio con metanol. En los cultivos control positivo y expuestos a la isoperoxisomicina A₁ se encontraron los porcentajes de supervivencia más bajos en ambas fuentes de carbono (glucosa y metanol) desde la concentración de 2 µg/mL, indicando un mayor efecto sobre la viabilidad celular. La T-544 fue ligeramente más activa sobre las células cultivadas en metanol, es decir causó porcentajes de supervivencia celular más bajos comparados con las células cultivadas en glucosa.

En forma simultánea, durante los estudios de viabilidad celular se efectuaron observaciones bajo el microscopio de contraste de fase con el propósito de valorar la morfología de la célula completa. Las células de *C. boidinii* cultivadas en medio con glucosa no mostraron cambios morfológicos aparentes bajo el microscopio de luz en presencia de cada una de las concentraciones de los compuestos antracénicos, incluyendo las células control positivo. En contraste, las células control positivo y las expuestas a la isoperoxisomicina A₁ cultivadas en medio con metanol mostraron cambios en la organización celular desde la concentración de 10 µg/mL observándose un aumento del volumen de la vacuola y el grupo de peroxisomas dentro o muy cerca de ella. Estos resultados son semejantes a los hallazgos reportados por Sepúlveda y cols. para la peroxisomicina A₁²⁶. Por otro lado la T-544 solo fue capaz de causar daño a las células de *C. boidinii* a la máxima concentración analizada (50 µg/mL).

Los resultados anteriores indican que los compuestos antracénicos afectan la viabilidad celular de *C. boidinii* en forma diferente. Además la fuente de carbono del medio de cultivo parece influir en la susceptibilidad de las células hacia los compuestos antracénicos.

En el presente trabajo se reprodujo el efecto selectivo e irreversible de la peroxisomicina A₁ sobre los peroxisomas de *C. boidinii* en presencia de una dosis de 2 µg/mL, *in vivo*. Este efecto fue descrito por primera vez por

Sepúlveda y cols. en levaduras metilotróficas ²⁶. Ultraestructuralmente el efecto sobre los peroxisomas se observó como la fragmentación de la membrana peroxisomal, detectando por medio de la técnica de inmunociquímica la marca de la alcohol oxidasa fuera del peroxisoma. Bajo estas condiciones no se observó daño sobre otros organelos celulares.

El análisis ultraestructural de las células de *C. boidinii* cultivadas en medio con metanol en presencia de 2 µg/mL de peroxisomicina A₂, isoperoxisomicina A₁ y T-544 demostró que estos tres compuestos, tal como se observa en las células control positivo, producen la ruptura de la membrana peroxisomal. Cada uno de los compuestos produce daño sobre la membrana peroxisomal con diferente grado de intensidad. Tanto las diferencias espaciales entre las peroxisomicinas A₁ y A₂ (diferencias estéricas) como las diferencias estructurales entre las antracenas diméricas analizadas, no parecen ser determinantes para el efecto selectivo sobre peroxisomas. Sin embargo, las diferencias estructurales entre las peroxisomicinas (A₁, A₂) y los compuestos: isoperoxisomicina A₁ y T-544 sí determinan el grado de intensidad del daño sobre la membrana peroxisomal. Un hallazgo similar relacionado a las diferencias estructurales entre los compuestos antracénicos ha sido reportado por Garza-Ocañas y cols. en estudios realizados en cultivos primarios de hepatocitos de rata, *in vitro*. Las peroxisomicinas A₁ y A₂ demostraron ser hepatotóxicas y su toxicidad fue mayor que la causada por la T-544 ^{13,14}.

Los resultados de los estudios ultraestructurales realizados en este trabajo demuestran que el efecto sobre peroxisomas no es exclusivo de la peroxisomicina A₁.

La actividad de catalasa (enzima marcadora peroxisomal) fue determinada en extractos crudos de células de *C. boidinii* cultivadas en medio con metanol durante 24 hrs, en presencia de 2 µg/mL de cada uno de los compuestos antracénicos analizados. En todas las muestras analizadas no se demostró cambio en la actividad de catalasa con respecto al control negativo, incluyendo los extractos celulares del control positivo.

En 1995, Moreno y cols. reportaron el efecto inhibitorio *in vitro* de antracenas diméricas estructuralmente semejantes, entre ellas las peroxisomicinas A₁ y A₂ y la T-544, sobre la actividad de la catalasa hepática bovina ²⁸. Estudios realizados por el mismo grupo de investigación

demostraron que la peroxisomicina A₁ no es capaz de inhibir la actividad de la catalasa hepática en ratones intoxicados, *in vivo* ²⁹. Esto coincide con los hallazgos descritos por Sepúlveda y cols., los cuales indican que la actividad de catalasa no se modifica en levaduras metilotróficas con daño peroxisomal inducido por la peroxisomicina A₁, *in vivo* ²⁶.

En base a los hallazgos antes mencionados y los resultados del análisis de la actividad de catalasa del presente trabajo, se concluye que los compuestos antracénicos causan inhibición de la actividad de catalasa únicamente en la enzima purificada, *in vitro*. El hecho de que las peroxisomicinas A₁, A₂, la isoperoxisomicina A₁ y la T-544 producen daño peroxisomal, pero no inhiben la actividad de catalasa *in vivo*, sugiere fuertemente que la catalasa no se encuentra directamente involucrada en el efecto selectivo e irreversible sobre peroxisomas producido por los compuestos antracénicos.

Hasta la fecha se desconoce el mecanismo de interacción entre los compuestos antracénicos y la membrana peroxisomal de levaduras. Si el efecto sobre peroxisomas se basara en una interacción entre un componente de la membrana y el compuesto antracénico, es muy probable que un elemento estructural común de las toxinas se encuentre involucrado en la interacción peroxisomal.

Los hallazgos descritos en el presente trabajo servirán de base para estudios posteriores dirigidos a estudiar el mecanismo molecular involucrado en la interacción compuesto antracénico-peroxisoma.

CAPITULO CINCO

CONCLUSIONES

- Se comprueba la hipótesis de trabajo planteada: los compuestos antracénicos analizados producen daño sobre los peroxisomas de *Candida boidinii*.
- De los tres compuestos antracénicos analizados la isoperoxisomicina A₁ causa mayor porcentaje de muerte celular.
- La fuente de carbono influye en el efecto producido por las antracenas sobre la viabilidad de *Candida boidinii*.
- El daño peroxisomal se aprecia más intenso en las células expuestas a la T-544.
- Las antracenas diméricas analizadas no afectan la actividad de catalasa de *Candida boidinii* bajo condiciones *in vivo*.
- En *Candida boidinii* no se demostró relación entre la muerte celular y el daño peroxisomal producidos por los compuestos antracénicos.

APENDICE

1. Soluciones de los compuestos antracénicos.

Para la disolución de los compuestos antracénicos se utilizaron los siguientes solventes: metanol para la peroxisomicina A₁ y A₂ (solubilidad 1 y 9,52 mg/mL, respectivamente) ³⁵, etanol para la isoperoxisomicina A₁ (solubilidad no reportada) y DMSO para la T-544 (solubilidad 100 mg/mL) ³⁵. Una cantidad determinada del compuesto antracénico (5 mg) se disolvió en 50 µL del solvente correspondiente, luego se transfirió a 5 mL de medio mínimo y se agitó en un vortex para su disolución. De esta forma se obtuvieron las soluciones concentradas (1 mg/mL) de cada compuesto antracénico, las cuales fueron preparadas inmediatamente antes de su uso.

2. Medios de cultivo.

2.1. Medio Mínimo Esencial.

Pesar:

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	3,0 g
K ₂ HPO ₄	0,7 g

Disolver en un litro de agua destilada.

Ajustar a un pH de 6,0 con H_2SO_4 ó NaOH .

Agregar:

Trazas Minerales	10,0 mL
Extracto de levadura	0,5 g

Esterilizar a 121°C por 30 min. Dejar enfriar.

Adicionar:

Vitaminas	1,0 mL
-----------	--------

Medio mínimo con glucosa (0,25%)

Adicionar 2,5 g de glucosa (dextrosa) al medio mínimo después de añadir el extracto de levadura y antes de esterilizarlo.

Medio mínimo con metanol (0,5%)

Después de esterilizar y enfriar el medio mínimo a una temperatura menor de 45°C . Agregar 5 mL de metanol (100%).

2.2. Solución de Trazas Minerales

Pesar:

H_3BO_4	50 mg
CuSO_4	4 mg
KI	10 mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	40 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40 mg
NH_4Mo_7	20 mg

Disolver en un litro de agua desionizada.

Esta solución concentrada de trazas minerales se puede almacenar a 4°C durante varios meses.

2.3. Solución de Vitaminas

Pesar:

Biotina	2 mg
Pantotenato de Calcio	400 mg
Acido fólico	2 mg
Inositol	2000 mg
Niacina	400 mg
Acido p-aminobenzóico	200 mg
Piridoxina HCl	400 mg
Riboflavina	200 mg
Tiamina	400 mg

Disolver en un litro de agua desionizada.

Esterilizar con filtro de poro de 0,45 μm de diámetro. La solución de vitaminas se almacena a -20°C .

2.4. Medio líquido enriquecido con glucosa al 2% (YPD)

Pesar:

Extracto de levadura	1,0 g
Peptona	2,0 g
Glucosa	2,0 g

Disolver en 100 mL de agua destilada.

Esterilizar a 121°C por 30 min.

2.5. Placas de Agar

Placas de Agar YPD

Pesar:

Extracto de levadura	10,0 g
Peptona	20,0 g
Glucosa	2,5 g
Agar	20,0 g

Disolver en un litro de agua destilada.

Esterilizar a 121°C por 30 min.

Dejar enfriar hasta 40-45°C
 Vaciar a cajas de petri estériles.

Placas de Agar YPM

Pesar:

Extracto de levadura	10,0 g
Peptona	20,0 g
Agar	20,0 g

Disolver en un litro de agua destilada.

Esterilizar a 121°C por 30 min.

Dejar enfriar entre 40 y 45°C.

Agregar

Metanol (100%)	5,0 mL.
----------------	---------

Vaciar a cajas de petri estériles.

3. Procedimiento para determinación de actividad de catalasa.

En una cubeta de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico colocar:

Amortiguador de fosfato de potasio 50 mM,	950 µL
Muestra	40 µL

Mezclar y tomar el valor de la absorbancia a 240nm.

Este valor corresponde al blanco de reactivos.

Agregar

Peróxido de hidrógeno (6% en amortiguador de fosfatos)	10 µL
---	-------

Mezclar e iniciar la cinética enzimática por seis minutos.

Se utilizó el paquete enzimático del espectrofotómetro Beckman DU 7500 obteniéndose el promedio del cambio de absorbancia del peróxido de hidrógeno por minuto ($\Delta A/\text{min}$). El volumen final de la reacción fue de 1 mL. La actividad de catalasa (U/mL) se obtuvo multiplicando el cambio de absorbancia/min por 692,5.

El origen de este factor se describe a continuación: la actividad enzimática se expresa en unidades internacionales (U) definiéndose una Unidad como la transformación de 1 μmol de sustrato o la formación de 1 μmol de producto por minuto durante la reacción enzimática. Matemáticamente se expresa con la siguiente ecuación:

$$U = \Delta C / t \quad \text{ec'n (1)}$$

En general la actividad enzimática se expresa por unidad de volumen, esto es, en U/mL. Al despejar ΔC se tendrá:

$$\Delta C = (U/\text{mL}) (t) \quad \text{ec'n (1.a)}$$

Las determinaciones espectrofotométricas se basan en la ley de Lambert-Beer. Esta ley establece que el cambio de absorbancia es directamente proporcional tanto a la absorptividad molar y al cambio de concentración del compuesto en problema, como al trayecto óptico del haz. Matemáticamente se expresa por medio de la siguiente ecuación:

$$\Delta A = (\epsilon) (\Delta C) (b) \quad \text{ec'n (2)}$$

Al sustituir la ec'n (1.a) en la ec'n (2) resultará:

$$\Delta A = (\epsilon) (U/\text{mL}) (t) (b) \quad \text{ec'n (3)}$$

Al despejar U/mL se obtendrá:

$$U/\text{mL} = \Delta A / \epsilon b t \quad \text{ec'n (3.a)}$$

donde:

U = Unidades de actividad ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

ΔA = Cambio de absorbancia del compuesto

ϵ = Absortividad molar del H_2O_2 ($0,036 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$)

b = Espesor de la cubeta (cm)

t = tiempo (min)

ΔC = Cambio de concentración del compuesto (μmol)

Entonces:

$$U/mL = \Delta A / (0,036 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}) (1 \text{ cm}) (1 \text{ min})$$

$$U/mL = \Delta A / 0,036 \text{ cm}^3 \text{ min}/\mu\text{mol}$$

$$U/mL = \Delta A (27,7 \mu\text{mol}/\text{min mL})$$

$$U/mL = \Delta A (27,7 \text{ U/mL}) \quad \text{ec'n (3.b)}$$

Para el cálculo de la actividad de catalasa (U/mL) se toman además en cuenta otros parámetros tales como: el volumen total del ensayo en la cubeta y la dilución de la muestra en la cubeta. En este caso en particular se adicionaron 40 μL de la muestra y se tuvo un volumen de reacción de 1 mL, por lo tanto la dilución en la cubeta es 1:25.

Integrando estos nuevos parámetros la ec'n (3.b) quedaría de la siguiente forma:

$$U/mL = (\Delta A) (27,7 \text{ U/mL}) (\text{vol. en cubeta}) (\text{dilución en cubeta})$$

$$U/mL = (\Delta A) (27,7 \text{ U/mL}) (25) (1)$$

$$U/mL = (\Delta A) (692,5 \text{ U/mL})$$

Al multiplicar el cambio de absorbancia del peróxido de hidrógeno/min por el factor 692,5 se obtiene la actividad de catalasa en la cubeta expresada en U/mL. La actividad de catalasa en una muestra biológica se calcula considerando la dilución previa de ésta. Cuando se desea conocer la proporción de una enzima con respecto a la concentración de proteínas de la muestra se determina la actividad específica de la enzima (U/mg). En este caso la actividad específica se calculó dividiendo la actividad de catalasa (U/mL) entre la concentración de proteínas (mg/mL).

3.1. Preparación del amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4

Solución A = 100 mL de KH_2PO_4 1 M

Solución B = 100 mL de K_2HPO_4 1 M

Solución madre = Ajustar el pH de la solución B a 7,4
utilizando la solución A. Almacenar a 4°C.

Solución de Trabajo = Diluir la solución madre 1:20 en agua destilada. La concentración final de esta solución es 50 mM.

4. Amortiguador para la preparación del extracto celular crudo de *Candida boidinii*.

Para la preparación del extracto celular crudo se utilizó como amortiguador una solución de fosfato de potasio (10 mM) pH 7.4 conteniendo DTE (0,5 mM) y PMSF (1 mM). Estos dos últimos compuestos se agregaron inmediatamente antes de su uso. El PMSF se adicionó a partir de una solución madre al 2% en etanol.

5. Curva de calibración de proteínas

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de albúmina sérica bovina conteniendo 2,5 a 20 μg de proteína. Cada uno de los estándares se preparó por triplicado a partir de una solución patrón de albúmina sérica bovina (1 mg/mL) como se describe en la Tabla XI. El volumen final de cada tubo fue de 200 μL . A cada uno de estos se les agregó 1 mL del reactivo de Bradford (diluido 1:5 en agua destilada). Se agitaron en el vortex y se dejaron reposar por 30 min a temperatura ambiente. Se determinó el valor de absorbancia a 595 nm de cada estándar y se trazó la curva de calibración graficando el valor de absorbancia en función de la cantidad de proteína en un volumen total de 200 μL .

El reactivo de Bradford diluido en agua destilada es estable durante varias semanas almacenado a 4°C.

Tabla XI
Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteínas totales

Tubo No.	Proteína (µg)	Solución patrón (µL)	Agua destilada (µL)
1	2,5	2,5	197,5
2	5,0	5,0	195,0
3	7,5	7,5	192,5
4	10,0	10,0	190,0
5	12,5	12,5	187,5
6	15,0	15,0	185,0
7	20,0	20,0	180,0
8	0,0	0,0	200,0

6. Técnica de inclusión en resina epóxica.

Las muestras se lavaron 2 veces con agua destilada, centrifugando 3 min en la microcentrífuga. Se fijaron en permanganato de potasio (1.5% en agua desionizada) durante 20 a 40 min. Se lavaron 2 ó mas veces hasta que el color fue transparente. Posteriormente se contrastaron con acetato de uranilo (1% en agua ultrapura) por lo menos una hora y se deshidrataron de la siguiente forma:

15 min en etanol al 50%;

15 min en etanol al 70%, se rompió el botón con un aplicador;

15 min en etanol al 96%;

15 min en etanol al 100%;

60 min en etanol al 100%.

Se aclararon con óxido de propileno, dos veces durante 15 min.

Se incluyeron en resina epóxica:

60 min en Epón-óxido de propileno (1:1);

3 veces de 60 min en Epón-óxido de propileno (3:1);

2 veces de 30 min en Epón puro;

60 min en Epón puro.

La polimerización se realizó en tubos ependorff a 60°C durante toda la noche. De los bloques resultantes se hicieron cortes finos utilizando el ultramicrotomo Ultratome LKB V. Estos cortes fueron contrastados de la manera siguiente: en una placa de petri se colocó un papel parafilm con gotas de acetato de uranilo al 0,5% en solución alcohólica al 50% durante 5 min. Se lavaron un minuto con agua ultrapura y se secaron. Finalmente se realizó la observación bajo el Microscopio Electrónico de Transmisión Carl-Zeiss, EM 109 a un aumento de 12 000x.

Resina epóxica.

Para la preparación de la resina epóxica se utilizaron reactivos de la compañía Pelco. Debido a que estos reactivos son tóxicos y muy densos se pesaron las siguientes cantidades:

Resina	29,0 g
DDSA	21,5 g
NMA	8,5 g
DMP30	1,0 g

Una vez pesados todos los componentes en un mismo recipiente se mezclaron hasta tener una solución homogénea. Esta solución puede conservarse en a temperaturas por debajo de 0°C durante varios meses.

7. Técnica de lowicryl K4M.

Las muestras se lavaron dos veces con agua destilada, centrifugando por 3 minutos en una microcentrífuga. Se fijaron en glutaraldehído (3% en amortiguador de cacodilatos) durante una hora a 4°C. Se lavaron 2 veces con agua destilada. Las muestras se mantuvieron en amortiguador de cacodilatos hasta continuar el procedimiento. Posteriormente se lavaron 2 veces con agua ultrapura. Se mantuvieron 10 min en peryodato de sodio (0,1% en agua ultrapura). Se lavaron 2 veces con agua ultrapura. Se agregó cloruro de amonio (1% en agua ultrapura) por 10 min. Después se realizó la deshidratación de la siguiente forma:

15 min en etanol al 50%;

10 min en dimetilformamida al 50 % en etanol al 50%;

10 min en dimetilformamida al 75% en etanol 50%;

10 min en dimetilformamida al 100%;

Las muestras se incluyeron en lowicryl K4M:

10 min en solución dimetilformamida : lowicryl K4M (2:1);

15 min en solución dimetilformamida : lowicryl K4M (1:1);

20 min en lowicryl K4M puro;

25 min en lowicryl K4M puro.

La polimerización se efectuó en cápsulas de plástico secas, bajo luz ultravioleta y sobre hielo durante 2 hrs.

7.1. Preparación del amortiguador de cacodilatos.

Preparar:

Solución A

4,28 g	Cacodilato de sodio
100,00 mL	Agua ultrapura

Solución B

0,50 mL	Acido clorhídrico
25,00 mL	Agua ultrapura

Solución de trabajo

100,00 mL	Solución A
5,40 mL	Solución B
Aforar a 2 000 mL con agua ultrapura.	

7.2. Lowicryl

Solución A	1,83 mL
Solución B	12,14 mL
Catalizador	75,00 mg

Una vez preparada la solución puede conservarse a -8°C durante varios meses.

7.3. Soporte para las rejillas

El soporte que se les agregó a las rejillas de níquel se preparó como sigue: en una placa de petri con agua ultrapura a temperatura de 40°C se dejó caer una gota de colodión. Sobre la película que se formó se colocaron las rejillas con el lado opaco hacia abajo. Con la ayuda de papel parafilm se levantaron las rejillas y se dejaron secar durante 24 hrs.

7.4. Preparación del amortiguador PBS-glicina.

Preparar:

Solución A

Glicina	0,4125 gr
Cloruro de sodio	0,3217 gr
Agua ultrapura	55 mL

Solución B

Hidróxido de sodio	0,18 gr
Agua ultrapura	45 mL

Solución de trabajo

Solución A	55 mL
Solución B	45 mL
Aforar a 100 mL con agua ultrapura.	

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Steglich, W. und Töpfer-Petersen, E. Phlegmacin und Anhydrophlegmacin, neuartige Farbstoffe aus dem Anisklumpfuß, *Cortinarius odorifer* (Agaricales) (1972) Zeitschrift für Naturforschung. Band 27b, Heft 10, 1286-1287.
- 2.- Takahashi, S., Kitanaka, S., Takido, M., Sankawa, U. and Shibata S. Phlegmacins and Anhydrophlegmacinquinones: Dimeric hydroanthracenes from seedlings of *Cassia Torosa* (1977) Phytochemistry 16, 999-1002.
- 3.- Dreyer, D., Arai, I., Bachman, C., Anderson, W., Smith, R. and Daves, D. Toxins causing noninflammatory paralytic neuronopathy. Isolation and structure elucidation. (1975) J. Am. Chem. Soc., 97, 4985-4990.
- 4.- Clavijero, F.J. Historia de la Antigua o Baja California. (traducción). México. (1933) Imprenta del Museo Nacional de Arqueología. Historia y Geografía.
- 5.- Fernández, Nava R. Nombres comunes, usos y distribución Geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México. (1992) Anales. Instit. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot. 63 (1), 1-23.
- 6.- Segovia, A. y Zermeño, F. Polirradiculitis tóxica por *Karwinskia humboldtiana*. A propósito de un caso. (1972) Med. Hosp. Infant. Mex. 29, 87.
- 7.- Montoya, M., López, G. and Hernandez, A. Intoxicación por *Karwinskia humboldtiana*. Conceptos actuales. (1982) Rev. med. Inst. Mexicano Seguro Social 6. 707.

- 8.- Padrón Puyou F. Estudio clínico experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana* ("Tullidora"). (1951) *Neuropath. Appl. Neurobiol.* 9, 121.
- 9.- Guerrero, M., Piñeyro, A and Waksman, N. Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). (1987) *Toxicon*, 25, 565-568.
- 10.- Waksman, N., Martínez, L. Chemical and Toxicological screening in genus *Karwinskia* (México). (1989) *Rev. Latinoamer. Quím.* 20/1, 27-29.
- 11.- Waksman, N., Ramírez, R. Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. (1992) *Rev. Latinoamer. Quím.* 23/1 y 22/4, 25-27.
- 12.- Bermúdez, M. V., González Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N. and Piñeyro, A. Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). (1986) *Toxicon* 24, 1096.
- 13.- Garza, L., Hsieh, G. C., Acosta, D., Torres, O. and Piñeyro, A. Toxicity assessment of toxins T-514 and T-544 of Buckthorn (*K. humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures, (1992) *Toxicology* 73, 259-267.
- 14.- Garza, L., Jiang, T., Acosta, D., Torres, O., Waksman N. and Piñeyro, A. Comparison of the hepatotoxicity of toxin T-514 of *Karwinskia humboldtiana* and its diastereoisomer in primary liver cell cultures, (1994) *Toxicon*, vol. 32, No. 10, 1287-1291.
- 15.- Martínez, F. J., Ramírez, R. Waksman, N. and Piñeyro A. Experimental evidence for toxic damage induced by a dimeric anthracenone: diast. T-514 (peroxiomicine A2), (1996) *Toxicology Letters* 90 (1997) 155-162.
- 16.- Piñeyro, A., Martínez, L., González, R. In vitro selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines, (1994) *Toxicology* 92, 217-227.

17.- Piñeyro, A. (1995) *Europaishen Patentblatt* 95/48 (29.11.95)
Patentnummer: 0467407.

18.- Piñeyro, A. (1996) *Bioscience patent* "Pharmaceutically acceptable anthracene compounds" number: 5578646.

19.- *Patente Japonesa* No. 2651758.

20.- Sepúlveda, J. *Comunicación personal*.

21.- Yasmineh, W., Parkin, J., Caspers, J., and Theologides, A. *Tumor Necrosis Factor/Cachectin Decreases Catalase Activity of Rat Liver*, (1991) *Cancer Research* 51, 3990-3995.

22.- Sahn, H., Roggenkamp, R., Wagner, F. and Hinkelman, W. *Microbodies in methanol grown Candida boidinii*, (1975) *J. gen. Microbiol.* 88, 218-222.

23.- Goodman, J. M., *Dihydroxyacetone synthase is an abundant constituent of the methanol-induced peroxisome of Candida boidinii*. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 7108-7113.

24.- Goodman, J. M., Trapp, S., Hwang, H. *Peroxisomes induced in Candida boidinii by methanol, oleic acid and D-alanine vary in metabolic function but share common integral membrane proteins*. (1990) *Journal of Cell Sci.* 97, 193-204.

25.- van Dijken, J. P., Veenhuis, M. and Harder, W. *Peroxisomes of methanol-grown yeasts*. (1982) *Annals New York Academy of Sciences*, 0077 8933/82/0386 0200.

26.- Sepúlveda, J., Van der Klei, I., Keizer, I, Piñeyro, A., Harder W. and Veenhuis, M., *Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts*. (1992) *FEMS Microbiology Letter* 91, 207-212.

- 27.- van Dijken, J. P., Veenhuis, M., Vermeulen C. A. and Harder, W. Cytochemical localization of catalase activity in methanol-grown *Hansenula polymorpha*. (1975). Arch. Microbiol. 105, 261-655.
- 28.- Moreno, M., Vargas, R., Esquivel, D., Waksman, N. and Piñeyro, A. Effect of Peroxisomicine and Related Anthracenones on Catalase Activity, (1995) Planta Med. 61, 337-340.
- 29.- Moreno, M., Vargas, R., Ballesteros, R., Piñeyro, A. and Sepúlveda, J. Studies on the effect of peroxisomicine on catalase activity in albino mice, (1997) Toxicon, Vol. 35, No. 5, pp. 777-783.
- 30.- Rivas, V. Estudio químico de los extractos semipolares de frutos de *K. parvifolia* y *K. johnstonii*. (1995) Tesis de Maestría. Fac. de Med. U.A.N.L.
- 31.- Aebi, H. (1974) in: H.U. Bergmeyer (ed), Methoden der enzymatischen Analyse, 3rd ed Weinheim, 479-480.
- 32.- Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (1976) Analyt. Biochem. 72, 249-255.
- 33.- de Duve, C. and Baudhuin, P. Peroxisomes (microbodies and related particles). (1966) Physiological Reviews, 46, 323-57.
- 34.- Veenhuis, M. and Goodman, J. M. Peroxisomal assembly: membrane proliferation precedes the induction of the abundant matrix proteins in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. (1990) Cell Sci. 96, 583-590.
- 35.- Martínez, L. Estudio de las propiedades fisicoquímicas de toxinas aisladas de *K. humboldtiana*. (1990) Tesis de Maestría Fac. de Med. U.A.N.L.

*Mas que ser,
hacer.*

