

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



OBTENCION Y CARACTERIZACION DE CELULAS DE
LEVADURA CON DISFUNCION PEROXISOMAL
INDUCIDA POR LA PEROXISOMICINA A1

Por:

Q.C.B. RIGOBERTO VARGAS ZAPATA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Morfología

Diciembre, 1998

TD
QK495
.R45
V3
c.1



1080082467

9618

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



OBTENCION Y CARACTERIZACION DE CELULAS DE
LEVADURA CON DISFUNCION PEROXISOMAL
INDUCIDA POR LA PEROXISOMICINA A1

Por:

Q.C.B. RIGOBERTO VARGAS ZAPATA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Morfología

Diciembre, 1998

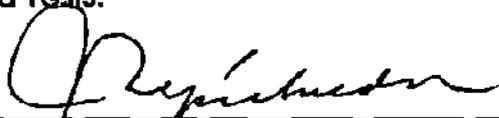


. 45⁵
v3

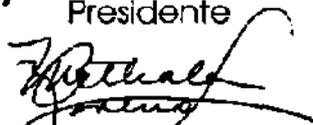


**OBTENCION Y CARACTERIZACION DE CELULAS DE
LEVADURA CON DISFUNCION PEROXISOMAL
INDUCIDA POR LA PEROXISOMICINA A1**

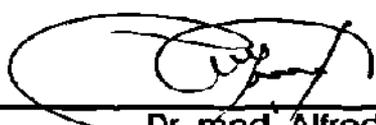
Aprobación de la Tesis:



M.C.P. y Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra
Presidente



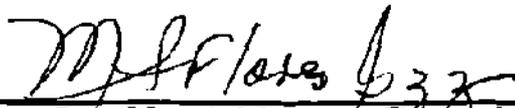
Dr. ren. nat. Myrthala Moreno
Secretario



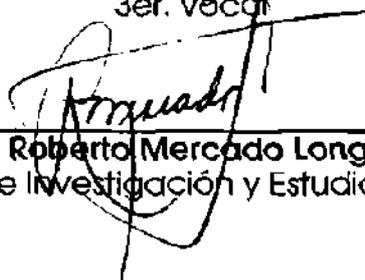
Dr. med. Alfredo Piñeyro López
1er. vocal



Dra. Noemí Waksman de Torres
2do. vocal



Dra. Ma. del Socorro Flores de Castañeda
3er. vocal

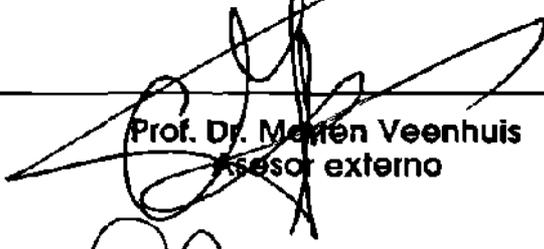


Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado

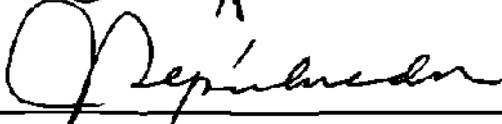
**OBTENCION Y CARACTERIZACION DE CELULAS DE
LEVADURA CON DISFUNCION PEROXISOMAL
INDUCIDA POR LA PEROXISOMICINA A1**

Presentado por Q.C.B. Rigoberto Vargas Zapata

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Centro Biológico de la Universidad de Groningen, Holanda, bajo la asesoría externa del Prof. Dr. Marten Veenhuis, y del asesor interno M.C.P. y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y co-asesor la Dr. ren. nat. Myrthala Moreno Sepúlveda del Departamento de Farmacología y Toxicología de la U.A.N.L.



Prof. Dr. Marten Veenhuis
Asesor externo



M.C.P. y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra
Asesor Interno



Dr. ren. nat. Myrthala Moreno Sepúlveda
Co-Asesor

DEDICATORIA

A mi familia "Nutria" con todo mi cariño

Vlady, la Nutria mayor

Cristy, la Nutrita y

Edgar, el Nutrito

los amo....

...el *Nutrito*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por el amor que me brinda, y por que solo él puede soportar, comprender y perdonar la inmadurez de mis actos.

A mi padres, el "Profe Vargas" y mi "cándida" madre, por el amor que siempre me han demostrado, nunca podré retribuirles todo lo que me han brindado.

A mis hermanos, por que a lado de sus conyuges e hijos siempre me han apoyado en todas y cada una de las empresas que he iniciado.

I would like to thank to Dr. Marten Veenhuis for giving me the opportunity to work in his laboratory, for kind hospitality and for his contributions on this thesis.

I am grateful to the people from the "Yeasts group" whose assisted me during my stay in the "molen country": Ineke, Zagers, Klass, Jan, Hans, Faber, Ida, Grietje, Engel, Robert, Melchior, and Vladimir, bedank voor hun, kritiek, suggesties en altijd vriendelijke conversaties.

A la Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda, por brindarme la primera fuente de trabajo en la Universidad, por aceptarme en su grupo de trabajo y por motivarme a desempeñar mis quehaceres con disciplina y responsabilidad.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, por su paciencia y calidad profesional, por brindarme la oportunidad de iniciarme en la docencia de la Histología, por aceptarme como estudiante de pos-grado en la especialidad de Morfología y por su significativa asesoría.

Al Dr. Alfredo Piñeyro López, por brindarme la oportunidad de formar parte del personal del Departamento de Farmacología y Toxicología, por la excepcional confianza que siempre me ha ofrecido y por su paciencia para revisar esta tesis.

A la comisión de tesis por sus valiosas observaciones a la presente.

A mis maestros, por sus invaluable enseñanzas.

A mi comadre Magda, por su amistad, cariño y profesionalismo ejemplar.

A mis amigos, por soportar mi particular forma de ser, que según ellos, "ni volviendo a nacer" cambiaría, en especial a Laura Mónica y Adriana por su ayuda altruista durante mi estancia en "el país de los molinos".

A Marco Flores, por su amistad y gentil colaboración siempre necesaria en el área de la computación.

A todo el personal del Departamento de Farmacología y Toxicología que de una manera u otra han contribuido a hacer mas placentera mi existencia.

A Víctor, del Departamento de Histología, por su generosa ayuda en la impresión del material fotográfico presentado en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca #85658 otorgada para realizar este doctorado.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Peroxisomas.....	4
1.1.1 Introducción.....	4
1.1.2 Función.....	5
1.1.3 Morfología.....	5
1.1.4 Aislamiento y Propiedades Físicas.....	6
1.1.5 Biogénesis.....	6
1.1.6 Recambio y Degradación Peroxisomal.....	7
1.1.7 Enfermedades Peroxisomales.....	8
1.2 <i>Hansenula polymorpha</i>	9
1.2.1 Inducción Peroxisomal.....	9
1.2.2 Análisis Molecular y Genético.....	11
1.3 Antecedentes Experimentales.....	12
1.4 Hipótesis de Trabajo y Objetivos.....	14
2. MATERIAL Y METODOS.....	15
2.1 Material Biológico.....	15
2.2 Equipo y Reactivos.....	15
2.3 Método de Cultivo.....	16
2.3.1 Cultivo Primario y Pre-cultivo.....	16
2.3.2 Cultivos bajo Condiciones de Inducción de la Proliferación de Peroxisomas.....	17
2.3.3 Determinación de la Fase de Crecimiento Óptima de <i>H. polymorpha</i> para el Estudio del Efecto de la Peroxisomicina A1.....	18
2.3.3.1 Evaluación de la Fase de Crecimiento Óptima.....	19
2.3.3.1.1 Análisis Ultraestructural.....	19
2.3.3.1.2 Análisis de la Cinética de Crecimiento Celular.....	19

2.3.4 Estudio del Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre Células de <i>H. polymorpha</i>	19
2.3.4.1 Cultivos con una Dosis no letal de Peroxisomicina A1	19
2.3.4.2 Evaluación del Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre los Peroxisomas de <i>Hansenula polymorpha</i>	20
2.3.5 Aislamiento de Células con Disfunción Peroxisomal ..	20
2.4 Evaluación de la Función Peroxisomal en las Células CEI ..	22
2.4.1 Análisis Ultraestructural	22
2.4.2 Análisis Fisiológico.....	23
2.4.2.1 Análisis de la Capacidad de Utilización de Metanol	23
2.4.2.2 Análisis de la Capacidad de Utilización de Glucosa, Etanol, Metilamina y Glicerol.....	23
2.4.3 Análisis Bloquímico	24
2.4.4 Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico	24
2.4.5 Análisis Ultraestructural, Bioquímico y Citoquímico e Inmunocitoquímico bajo Condiciones Quimiostáticas	26
2.5 Aislamiento y Caracterización de Células de <i>H. polymorpha leu1-1</i> con Disfunción Peroxisomal	26
2.5.1 Análisis Genético.....	27
2.5.1.1 Obtención de Células CEI con Marcador Auxotrófico <i>ura⁻</i>	27
2.5.1.2 Ensayos de Complementación.....	28
2.5.1.3 Análisis de Esporas al Azar	28
2.6 Análisis Estadístico.....	29
3. RESULTADOS.....	30
3.1 Evaluación de las Condiciones Óptimas de Cultivo	30
3.1.1 Análisis Ultraestructural	30
3.1.2 Análisis de la Cinética de Crecimiento Celular.....	32
3.2 Evaluación del Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre los Peroxisomas de <i>Hansenula polymorpha</i>	33
3.3 Aislamiento de Células con Disfunción Peroxisomal	34
3.4 Evaluación de la Función Peroxisomal en las Células Experimentales	35

3.4.1	Análisis Ultraestructural	35
3.4.2	Análisis de la Función Peroxisomal	39
3.4.3	Análisis Bioquímico	42
3.4.4	Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico	43
3.4.5	Análisis bajo Condiciones Quimiostáticas (Ultraestructural, Bioquímico, Citoquímico e Inmunocitoquímico)	45
3.5	Aislamiento y Caracterización de Células de <i>H. polymorpha leu1-1</i> con Disfunción Peroxisomal	49
3.5.1	Análisis Genético	58
3.5.1.1	Obtención de Células CEI con Marcador Auxotrófico <i>ura⁻</i>	58
3.5.1.2	Ensayos de Complementación y Análisis de Esporas al Azar	58
4.	DISCUSION	60
5	CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES	71
BIBLIOGRAFIA		73
APENDICES		
APENDICE A.- Métodos de Cultivo de Levaduras		
	Composición de los Medios de Cultivo	80
	Condiciones de Esterilización de los Medios de Cultivo	82
	Determinación del Crecimiento Exponencial	82
	Control de Calidad de los Cultivos	84
APENDICE B.- Técnicas de Inclusión en Resina Epóxica para Microscopía Electrónica de Transmisión		
	Obtención de Esferoplastos y Técnica de Inclusión para Microscopía Electrónica	85
	Obtención de Esferoplastos y Técnica de Inclusión para Microscopía Electrónica	86
APENDICE C.- Carta de aceptación para publicar parte de esta tesis doctoral en la revista <i>Toxicon</i>		
	de esta tesis doctoral en la revista <i>Toxicon</i>	88

LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
TABLA 1. Análisis Morfométrico de Peroxisomas en <i>Hansenula polymorpha</i> en Relación a las Condiciones de Cultivo.....	10
TABLA 2 Substratos que Inducen Peroxisomas y Enzimas Peroxisomales en <i>Hansenula polymorpha</i>	11
TABLA 3. Actividad Específica de Alcohol Oxidasa y Catalasa en Células Control y Células Experimentales Tipo I.....	43
TABLA 4. Actividad Específica de Alcohol Oxidasa y Catalasa en Células Control y Células Experimentales Tipo II.....	54
TABLA 5. Análisis de Esporas al Azar	59

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Modelo de Biogénesis Peroxisomal.....	7
2. Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células de <i>H. polymorpha</i> Durante el Crecimiento en Glucosa y Metanol	31
3. Cinética de Crecimiento Celular en Metanol de <i>Hansenula polymorpha</i>	32
4. Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células de <i>Hansenula polymorpha</i> Incubadas en Presencia de 5 µg/mL de Peroxisomicina A1	33
5. Técnica de Replicación en Placa para el Aislamiento de Células con Disfunción Peroxisomal	34
6. Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células Control y Células CEI durante el Crecimiento en Metanol.....	36
7. Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células CEI. Asociación Membrana pre-autofágica-peroxisoma	37
8. Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células CEI. Desorganización y Muerte Celular	38
9. Cinética de Crecimiento Celular y Utilización de Metanol por las Células Control y Células CEI.....	39
10. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEI en Glucosa/Sulfato de Amonio	40
11. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEI en Etanol/Sulfato de Amonio.....	41
12. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEI en Glucosa/Metilamina.....	41
13. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEI en Glicerol/Sulfato de Amonio	42
14. Micrografías Electrónicas de Transmisión del Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico para la Localización Subcelular de AO en las Células CEI.....	44
15. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEI Bajo Condiciones Quimiostáticas.....	45
16.- Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células Control y de las Células CEI bajo Condiciones Quimiostáticas	47
17. Micrografías Electrónicas de Transmisión de esferoplastos de las Células Control y de las Células CEI bajo Condiciones Quimiostáticas	48

18.	Micrografía Electrónica de Transmisión de Células de <i>Hansenula polymorpha leu1-1</i> Incubadas en Presencia de 5 µg/mL de Peroxisomicina A ₁	50
19.	Técnica de Replicación en Placa para el Aislamiento de Células de <i>Hansenula polymorpha leu1-1</i> con Disfunción Peroxisomal	51
20.	Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células CEII Obtenidas a las 4 y 12 hrs. de Cultivo en Metanol	52
21.	Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células CEII Obtenidas de la Fase Estacionaria de Crecimiento en Metanol	53
22.	Cinética de Crecimiento Celular y Utilización de Metanol por las Células Control y Células CEII.	54
23.	Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEII en Glucosa/Sulfato de Amonio	55
24.	Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEII en Etanol/Sulfato de Amonio	55
25.	Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEII en Glucosa/Metilamina	56
26.	Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEII en Glicerol/ Sulfato de Amonio	56
27.	Micrografía Electrónica de Transmisión del Análisis Inmunocitoquímico para AO en las Células CEII	57
28.	Esquema de los Mecanismos Posibles de Disfunción Peroxisomal Inducida por Peroxisomicina A ₁ sobre Células de <i>Hansenula polymorpha</i>	61
29.	Esquema de la Compartimentalización y la Función de los Peroxisomas en el Metabolismo del Metanol en <i>Hansenula polymorpha</i>	64

Abreviaturas

5-FOA	Acido 5-fluoro orótico
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina sérica bovina
AO	Alcohol oxidasa
PBS-glicina	Amortiguador de fosfatos glicina-salina
g	Aceleración de la gravedad aplicada para sedimentar una partícula dada
atm	Atmósfera
ΔA_{240}	Cambio de Absorbancia a 240 nm
CEI	Células experimentales tipo I
CEII	Células experimentales tipo II
Mut ⁻	Células deficientes en la utilización de metanol
WT	Células silvestres
CBS	Central Bureau voor Schimmelculturen
cm ³	Centímetro cúbico
colab.	Colaboradores
com.pers.	Comunicación personal
C	Carbono
CI	Compuestos con un átomo de carbono
DO ₆₆₀	Densidad óptica determinada a 660 nm
DHAS	Dihidroxiacetona sintasa
DL ₅₀	Dosis letal media
fg	Fentogramos
Fig.	Figura
GSH	Glutatión reducido
°C	Grados celsius
g	Gramo
hr.	Hora
hrs.	Horas
YPD	Medio con extracto de levadura, peptona y dextrosa
YND	Medio mineral, base nitrogenada y dextrosa
YNM	Medio mineral, base nitrogenada y metanol
YNMe	Medio mineral, base nitrogenada y metilamina
YNE	Medio mineral, base nitrogenada y etanol
µm	Micrómetro
µg	Microgramo
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
ME	Microscopio Electrónico
mg	Miligramo
mL	Millilitro

mm	Milímetro
mM	Millimolar
min.	Minutos
M	Molar
nm	Nanómetros
N	Nitrógeno
NADH	Dinucleótido de nicotina adenina reducido
NCYC	National Collection of Yeast Cultures Catalogue
p/v	Peso/volumen
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno (hidronio)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
seg.	Segundo
t_d	Tiempo de generación
U	Unidad
D	Velocidad de dilución (hrs. ⁻¹)
v/v	Volumen/volumen

RESUMEN

Rigoberto Vargas Zapata

Fecha de graduación: Diciembre, 1998

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio:

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE CELULAS DE
LEVADURA CON DISFUNCION PEROXISOMAL
INDUCIDA POR LA PEROXISOMICINA A1

Número de páginas: 88

Candidato para el grado de Doctor
en Ciencias con especialidad en
Morfología

Area de Estudio: Morfología

Propósito y Método del Estudio: La peroxisomicina A1 es una antracenoína dimérica aislada de las plantas del género *Karwinskia*. Este compuesto es considerado como un potencial medicamento antineoplásico debido a que presenta toxicidad selectiva sobre células neoplásicas de origen humano derivadas de hígado, pulmón y colon. Los estudios encaminados a elucidar el mecanismo de acción de este compuesto, establecen que el peroxisoma es el organelo blanco de la peroxisomicina A1 en levaduras y en hígado de ratas y monos intoxicados experimentalmente. En este trabajo se presentan los métodos para aislar células de *Hansenula polymorpha* con disfunción peroxisomal, inducida por la peroxisomicina A1, con el propósito de contar con un modelo que permita obtener información sobre el mecanismo de la interacción peroxisomicina A1-peroxisoma. Se describen las características ultraestructurales, bioquímicas y fisiológicas de dos cepas con disfunción peroxisomal.

Conclusiones y Contribuciones: Las células aisladas presentaron las siguientes características: peroxisomas anormales en morfología y número, observándose una elevada tasa de recambio peroxisomal; actividad de alcohol oxidasa disminuida en un 50 %; biomasa en los cultivos líquidos con metanol significativamente disminuida y utilización deficiente del metanol. Estos resultados sugieren que la disfunción peroxisomal podría estar relacionada, en parte, con una posible alteración en la membrana peroxisomal caracterizada por la incapacidad para balancear de manera adecuada el flujo del formaldehído. Los resultados obtenidos demuestran que el daño selectivo e irreversible sobre la membrana peroxisomal, es un evento reproducible y además confirma que el peroxisoma es el organelo blanco de la peroxisomicina A1 en células de levadura. Las cepas con disfunción peroxisomal inducida por la peroxisomicina A1, aisladas y caracterizadas en este trabajo constituyen un organismo modelo para realizar diferentes estudios relacionados con la biogénesis y la función peroxisomal.

FIRMA DEL ASESOR INTERNO


M.C.P. y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra