

## CAPITULO 1

### INTRODUCCION

El género *Karwinskia* es un taxón perteneciente a la familia Rhamnaceae, constituido básicamente de arbustos y pequeños árboles, que incluye 15 especies cuyo hábitat natural se extiende desde el sur de los Estados Unidos de América a México, Centroamérica, norte de Colombia, Cuba, Haití y República Dominicana. México cuenta con 12 especies distintas, según Fernández Nava<sup>1</sup>, y de éstas *Karwinskia humboldtiana* destaca por su extensión territorial.

El efecto paralítico producido por la ingestión accidental del fruto de la planta, es uno de los primeros datos toxicológicos referidos en la literatura y se remonta hacia fines del siglo XVIII, en la obra de Clavijero "Historia de la Antigua o Baja California"<sup>2</sup>.

De esa fecha a nuestros días, se han realizado múltiples estudios sobre las manifestaciones clínicas que se presentan a consecuencia de la ingestión del fruto de *K. humboldtiana*<sup>3,4,5,6,7</sup>, igualmente estudios enfocados a identificar a los órganos blanco del efecto tóxico de las sustancias de la planta<sup>6,7,8,9</sup>, al aislamiento, purificación y caracterización de las sustancias responsables de dicho efecto, así como a la caracterización morfológica y funcional de la planta mantenida tanto en condiciones de Invernadero como en cultivo *in vitro*<sup>10</sup>. En relación al aislamiento de las sustancias tóxicas, Dreyer y cols.<sup>11</sup> aislaron cuatro antracenas dimericas y las denominaron en

base a su peso molecular como: T 496, T 514, T 516 y T 544. Posteriormente, Waksman y cols.<sup>12,13</sup> han aislado de las especies de *K. parvifolia*, *K. tehuacana* y *K. humboldtiana* otros compuestos antracenónicos como son: un diasteroisómero de la T 514 (Diast T 514), una T 510 y un isómero de la T 514 (iso T 514).

Bermúdez y cols.<sup>14,15</sup> realizaron estudios de toxicidad aguda en ratones, tanto con fruto molido de *K. humboldtiana* como con las toxinas puras T 496, T 514 y T 544. Ellos demostraron que tanto el fruto, como las toxinas purificadas son marcadamente citotóxicos, y que causan daño hepatopulmonar grave. En estos estudios se estableció que la T 514 produce un efecto tóxico más marcado sobre el hígado, pulmón y riñón que la T 544, mientras esta es responsable del daño neurológico periférico. Aquellos animales que recibieron la T 514 purificada, desarrollaron necrosis centrolobulillar y esteatosis hepática, así como lesiones en el riñón y pulmón, sin presentar efectos neurológicos periféricos. Por otra parte con la T 496 solo observaron un marcado efecto catártico.

La determinación de la  $DL_{50}$  para la T 514 en diferentes especies animales, mostró una curva dosis-respuesta con pendiente muy empinada<sup>16</sup>, lo que indica una variación biológica estrecha<sup>17</sup>. Los efectos citotóxicos aunados a lo abrupto de la pendiente de letalidad, permitieron plantear la hipótesis de que de haber toxicidad selectiva entre células de origen benigno y maligno, la T 514 podría tener un potencial efecto antineoplásico. Fue así como Piñeyro y cols.<sup>18</sup> en estudios realizados *in vitro* en diferentes líneas celulares humanas, demostraron que la T 514 posee dicho efecto en células neoplásicas de pulmón, de colon y de hígado. Estos hallazgos han sido confirmados por investigadores de las Universidades de Berlín y Freiburg (Alemania) y recientemente en el Instituto Nacional de Cáncer (E.U.). Por lo anteriormente expuesto, puede considerarse a la T 514 como un potencial fármaco antineoplásico, del cual entre otras cosas, es

necesario obtener más información acerca de su mecanismo de acción.

En este particular, a partir de las observaciones de la infiltración grasa del hígado, se han realizado estudios histopatológicos que establecen que la T 514 causa una disminución marcada del número de peroxisomas en el hígado de ratas (Sepúlveda, S. J. y cols. 1998 Toxicology Letters; en prensa) y monos intoxicados experimentalmente (Piñeyra, A. y Sepúlveda, J. com. pers.). En dichos estudios se demostró que el número de peroxisomas disminuye a los pocos minutos de la administración de la T 514. Esto ha sugerido que el mecanismo de acción de la T 514 podría estar relacionado con la acción peroxisomal, ya que se sabe que algunos tumores malignos tienen un número escaso de este organelo indispensable para la vida celular<sup>19</sup>.

Sepúlveda y cols.<sup>20</sup> en estudios efectuados en levaduras metilotróficas, han demostrado que la T 514 afecta de manera selectiva e irreversible la integridad de la membrana de los peroxisomas de estas células. En cultivos de *Candida boidinii* así como de *Hansenula polymorpha* en presencia de dosis no letales de T 514, se observó una interrupción de la continuidad de la membrana peroxisomal. Observaron también por análisis inmunocitoquímico con anticuerpos específicos contra la enzima alcohol oxidasa (AO), conjugados con oro coloidal, a esta enzima peroxisomal dentro de la vacuola digestiva, lo que indica un proceso de autofagia de los peroxisomas dañados. En este mismo estudio se reportó, en contraste con lo encontrado *In vitro*<sup>21</sup>, que la actividad de dos de las enzimas peroxisomales, la catalasa y la AO no es afectada por la T 514.

Este efecto selectivo sobre la membrana peroxisomal sugiere que el peroxisoma sea el organelo blanco de la T 514, y debido a este hallazgo se renombró como peroxisomicina A1.

Estudios *In vitro* llevados a cabo por Moreno y cols.<sup>21</sup> han establecido que la peroxisomicina A<sub>1</sub> (y otros compuestos antracénicos aislados y purificados de especies del género *Karwinskia*) produce inhibición de tipo no competitivo sobre la catalasa hepática de tres especies diferentes de animales. Posteriormente, Moreno y cols.<sup>22</sup> realizaron estudios *in vivo* en ratones intoxicados con peroxisomicina A<sub>1</sub> y demostraron, tanto por métodos bioquímicos como histoquímicos, que la peroxisomicina A<sub>1</sub> no produce inhibición de la catalasa hepática. Un resultado similar se observó *in situ* al incubar fragmentos de tejido hepático de ratón en presencia de la toxina. Estos resultados demuestran que la peroxisomicina A<sub>1</sub> no inhibe la actividad de la catalasa en tejido hepático del ratón albino.

Hasta el momento, la información disponible acerca del mecanismo de acción de la peroxisomicina A<sub>1</sub> indica que el peroxisoma es el organelo blanco tanto en levaduras como en hígado de ratas y monos.

## 1.1 Peroxisomas

### 1.1.1 Introducción

Los peroxisomas son organelos que fueron descritos por primera vez a principios de los años 50 en células del túbulo contorneado de riñón de ratón por medio de microscopía electrónica, e inicialmente se les llamó microcuerpos, ya que no se les había asociado a ninguna actividad bioquímica<sup>23,24</sup>. Posteriormente, De Duve y cols.<sup>25</sup> los llamaron peroxisomas al demostrar que en estos organelos se produce peróxido de hidrógeno. Esto ocurre al actuar un grupo de oxidasas (que utilizan el oxígeno molecular) sobre diversos substratos (vía respiratoria peroxisomal).

Los peroxisomas están distribuidos ampliamente en células eucariotas, las cuales se caracterizan por la compartimentalización de rutas y procesos bioquímicos<sup>25</sup>.

### 1.1.2 Función

Las diversas funciones de estos organelos incluyen procesos de *fotorespiración en las plantas*<sup>26</sup>, *en el metabolismo del colesterol en mamíferos*<sup>26,27</sup>, *biosíntesis de penicilina en hongos filamentosos*<sup>28</sup>, *metabolismo de compuestos con un átomo de carbono (C1) en levaduras*<sup>29</sup>. El contenido enzimático de los peroxisomas puede variar según la especie y dentro de una misma especie, de tejido a tejido, en donde llevan a cabo tanto procesos oxidativos como biosintéticos. Las funciones más importantes de los peroxisomas en células eucariotas superiores son, entre otras: el metabolismo del peróxido de hidrógeno, la  $\beta$ -oxidación tanto de ácidos grasos de cadena larga (AGCL) como de ácidos grasos de cadena muy larga (AGCML), la biosíntesis de ácidos biliares y plasmalógenos, el catabolismo de purinas y algunas reacciones del metabolismo del colesterol<sup>26</sup>.

### 1.1.3 Morfología

Los peroxisomas son de forma esférica o ligeramente elíptica con diámetro que varía desde 0.1 a 1  $\mu\text{m}$ . Están rodeados por una sola membrana, cuyo grosor es más pequeño (7 nm) comparado con el de las membranas de otros organelos<sup>30</sup>. La membrana rodea a una matriz electrodensa finamente granular. Estudios inmunocitoquímicos han revelado que las enzimas de la matriz no se distribuyen uniformemente, lo que sugiere que la matriz posee algún grado de organización estructural que además depende de la especie<sup>31</sup>. Por ejemplo, en los peroxisomas de hígado de rata los cristaloides consisten de urato oxidasa<sup>32,33</sup>, y los de algunas levaduras metilotróficas consisten de AO<sup>34</sup>. En otras especies, como en el hombre, los peroxisomas no presentan

cristales ya que carecen de esas enzimas. Los peroxisomas de células del túbulo contorneado proximal del riñón de especies como el conejo, contienen una estructura electrodensa, aplanada, localizada en la periferia del organelo adyacente a la membrana, y recibe el nombre de placa marginal; se desconoce su composición bioquímica<sup>35</sup>.

#### 1.1.4 Aislamiento y Propiedades Físicas

El método más utilizado para la obtención de la fracción peroxisomal combina dos tipos de técnicas: la centrifugación diferencial clásica, técnica rápida y sencilla para la separación de diferentes fracciones a partir de un homogeneizado y la sedimentación en equilibrio zonal, que permite la separación más eficiente de partículas de acuerdo a su coeficiente de sedimentación, densidad y forma<sup>36</sup>. Para esta última técnica se utilizan gradientes de un determinado soluto, los más utilizados son: la sacarosa, metrizamida, Nicodenz y el Percoll<sup>37</sup>. Las propiedades físicas de los peroxisomas que han sido establecidas bajo diferentes condiciones son: 1) peso seco promedio de 24 fg ( $24 \times 10^{-15}$  g), 2) densidad (en seco) promedio de 1.32 g/cm<sup>3</sup> y 3) coeficiente de sedimentación (en sacarosa 0.25 M) de 4,400 S<sup>25</sup>.

#### 1.1.5 Biogénesis

Actualmente existe un consenso general de que estos organelos se originan por fisión de peroxisomas preexistentes en la célula (fig. 1). Debido a que estos organelos no contienen su propio ADN, todas las proteínas peroxisomales tanto de matriz como de membrana, son sintetizadas en ribosomas libres del citoplasma y enseguida son incorporadas post-traduccionalmente hacia los peroxisomas ya existentes<sup>38</sup>.

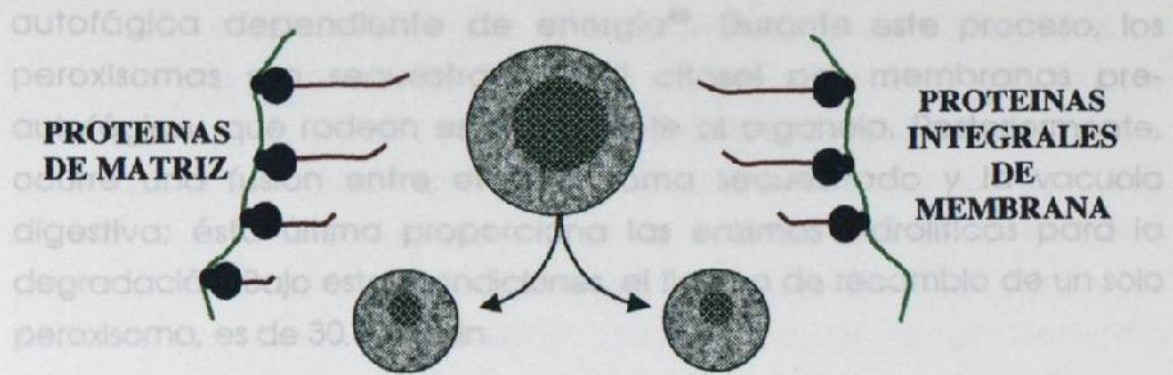


Figura 1. Modelo de Biogénesis Peroxisomal (Lazarow and Fujiki, 1985).

### 1.1.7 Enfermedades Peroxisomales

En el humano, existen enfermedades genéticas que involucran a los peroxisomas. Este grupo de enfermedades hereditarias se denominan

#### 1.1.6 Recambio y Degradación Peroxisomal

La autofagia -como una forma de degradación y recambio de componentes intracelulares- es un fenómeno general en las células eucariotas, bajo condiciones fisiológicas normales, pero es especialmente evidente en células bajo condiciones de estrés<sup>39</sup>. Hasta el momento, se cree que los peroxisomas son destruidos de manera aleatoria por autofagia, ya que han sido observados dentro de autofagosomas, en mamíferos, y en vacuolas autofágicas, en levaduras<sup>35,40</sup>. Los peroxisomas de los hepatocitos tienen una vida media de aproximadamente 4 días<sup>41</sup>, y el tiempo de degradación es aproximadamente de 4 min., lo que es considerablemente más corto, comparado con el tiempo de degradación de las mitocondrias (16 min.).

El síndrome de Zellweger. Los pacientes afectados, generalmente mueren durante las primeras semanas o meses después del nacimiento. Los peroxisomas. El proceso de degradación peroxisomal en levaduras ha sido ampliamente estudiado en *Hansenula polymorpha*. Durante la fase de crecimiento exponencial de este organismo el proceso de autofagia no es común. Sin embargo, al cambiar las células bajo condiciones de inducción de peroxisomas a condiciones no inducidas, los peroxisomas son rápidamente degradados por un proceso de degradación

autofágica dependiente de energía<sup>40</sup>. Durante este proceso, los peroxisomas son secuestrados del citosol por membranas pre-autofágicas que rodean estrechamente al organelo. Posteriormente, ocurre una fusión entre el peroxisoma secuestrado y la vacuola digestiva; ésta última proporciona las enzimas hidrolíticas para la degradación. Bajo estas condiciones, el tiempo de recambio de un solo peroxisoma, es de 30 a 45 min.

### 1.1.7 Enfermedades Peroxisomales

En el humano, existen enfermedades genéticas que involucran a los peroxisomas. Este grupo de enfermedades hereditarias se denominan enfermedades peroxisomales, y dependiendo de los trastornos clínicos y bioquímicos que producen se pueden dividir en desórdenes que se caracterizan por i) defectos en la biogénesis peroxisomal y ii) aquellos en los que los peroxisomas se encuentran presentes e intactos pero son deficientes en una o más funciones peroxisomales<sup>42,43</sup>. El primer grupo está compuesto de varios síndromes cuya característica fundamental es la ausencia total de peroxisomas (Síndrome de Zellweger o síndrome cerebro-hepato-renal y la enfermedad infantil de Refsum, entre otros); o la disminución marcada en el tamaño y número de los peroxisomas en células del hígado y riñón (Adrenoleucodistrofia neonatal). En el segundo grupo se encuentran enfermedades relacionadas con defectos enzimáticos específicos (Adrenoleucodistrofia ligada a X, Acatasemia, entre otras). De todas, la mejor estudiada y caracterizada es el síndrome de Zellweger. Los pacientes afectados, generalmente mueren durante las primeras semanas o meses después del nacimiento. Los peroxisomas no son detectables por microscopía electrónica. Las anomalías bioquímicas que acompañan a la ausencia de peroxisomas incluyen entre otras: acumulación de AGCML, disminución de los niveles de plasmalógenos y aumento en los niveles de ácido piperólico.



A raíz del descubrimiento de las enfermedades peroxisomales, se ha intensificado la búsqueda de un organismo modelo que aporte información valiosa sobre la función y biogénesis peroxisomal. Las células de levadura constituyen tal modelo para dichos estudios debido a que combinan una serie de ventajas, entre las que se incluyen: facilidad para obtener grandes cantidades de biomasa en substratos económicos (metanol), capacidad de inducir la proliferación peroxisomal y composición proteica bajo condiciones de cultivo en substratos específicos<sup>44</sup> y la accesibilidad para desarrollar estudios de genética clásica y molecular<sup>45</sup>.

## **1.2 *Hansenula polymorpha***

### **1.2.1 Inducción Peroxisomal**

*Hansenula polymorpha*, una levadura ascosporogénica metilotrófica (utiliza el metanol como fuente de carbono y energía), es uno de los organismos más utilizados en la actualidad para el estudio de la función y biogénesis peroxisomal.

En base al amplio conocimiento sobre las condiciones de cultivo de *H. polymorpha*, se han logrado establecer en forma precisa las mejores condiciones para la obtención del máximo nivel de inducción peroxisomal, así como la inducción de enzimas específicas<sup>46,47,48</sup>. La tabla 1 muestra el análisis morfométrico de peroxisomas en *H. polymorpha*, bajo diferentes condiciones de cultivo.

TABLA 1

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO (NÚMERO Y FRACCIÓN DE VOLUMEN) DE PEROXISOMAS EN *Hansenula polymorpha* EN RELACION A LAS CONDICIONES DE CULTIVO.

Cultivos líquidos				
Fuente de C	Fuente de N	Número de peroxisomas promedio	Fracción de volumen peroxisomal	
glucosa	sulfato de amonio	0.05	0.10	
etanol	sulfato de amonio	0.20	1.00	
glicerol	sulfato de amonio	0.70	8.10	
metanol	sulfato de amonio	0.90	19.90	
glucosa	metilamina	0.40	2.30	
Cultivo Quimioestático				
Fuente de C	Fuente de N	D	Número de peroxisomas promedio	Fracción de volumen peroxisomal
metanol	sulfato de amonio	0.16	2.56	34.10
metanol	sulfato de amonio	0.10	2.78	37.00
metanol	sulfato de amonio	0.03	2.61	48.40

El análisis morfométrico se lleva a cabo en cortes ultrafinos de células fijadas con  $\text{KMnO}_4$ . El número de peroxisomas se expresa como el número de peroxisomas promedio por corte. Veenhuis y cols., 1990.

Para llevar a cabo estos estudios, las células se pre-cultivaron en medio con glucosa y posteriormente se incubaron en medios con diferentes fuentes de carbono y/o energía. Para los cultivos bajo condiciones quimioestáticas (metanol como sustrato limitante), las células previamente pre-cultivadas, se incubaron en 2 litros de medio con glucosa y se cultivaron hasta la fase estacionaria. Después se adicionó medio con metanol a diferentes velocidades de dilución (D): 320 mL/hr., 200 mL/hr. y 60 mL/hr.. La fracción de volumen o densidad de volumen peroxisomal (porcentaje del área peroxisomal en los cortes en relación al área total del citoplasma), se estimó por la técnica de conteo de puntos e intersecciones de Weibel y Bolender<sup>46</sup>. Se demostró que bajo condiciones quimioestáticas, los peroxisomas pueden ocupar hasta el 80 % del volumen citoplasmático<sup>46</sup>.

Otros sustratos que inducen proliferación peroxisomal en este organismo son el etanol, aminas primarias, D-aminoácidos y purinas<sup>44,47</sup>.

Los peroxisomas juegan un papel fundamental durante el cultivo de las células bajo estas condiciones debido a que contienen las enzimas clave del metabolismo de esos sustratos. En la tabla 2 se muestran los diferentes sustratos de crecimiento que inducen la proliferación de peroxisomas y las enzimas inducidas.

**TABLA 2**

**SUBSTRATOS QUE INDUCEN LA PROLIFERACION DE PEROXISOMAS Y ENZIMAS INDUCIDAS EN *Hansenula polymorpha*.**

Substrato	Enzimas peroxisomales
Fuente de carbono	
etanol	isocitrato liasa malato sintasa
metanol	alcohol oxidasa dihidroxiacetona sintasa catalasa
Fuente de nitrógeno	
ácido úrico	urato oxidasa catalasa
(m)etilamina/colina	amina oxidasa catalasa
D-alanina/D-metionina	D-aminoácido oxidasa catalasa

Veenhuis, M. Yeast microbodies (1988). Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Holanda.

### 1.2.2 Análisis Molecular y Genético

Aunado a los estudios fisiológicos, bioquímicos y ultraestructurales, los estudios de genética clásica y molecular, han permitido la obtención de mucha información sobre la función y biogénesis peroxisomal en *H. polymorpha*. Algunas de las técnicas que han sido estandarizadas para este organismo incluyen: técnicas de transformación<sup>45,51</sup>, técnicas para el aislamiento e identificación de mutantes; técnicas para el apareamiento, esporulación, análisis de esporas al azar, disección de tétradas y análisis de complementación<sup>52</sup>.

La disponibilidad de estas técnicas, además del amplio conocimiento sobre las características fisiológicas, bioquímicas y morfológicas de *H. polymorpha*, han contribuido a que se utilice esta levadura como modelo para el presente trabajo.

### 1.3 Antecedentes Experimentales

Sepúlveda y cols<sup>20</sup> demostraron que la peroxisomicina A1 afecta de manera selectiva e irreversible la integridad de la membrana peroxisomal de células de levadura. Después de Incubar las células en presencia de una dosis no letal de peroxisomicina A1, las células mostraron deficiencias en las funciones específicas peroxisomales, ya que el crecimiento en metanol cesó casi inmediatamente. A los 30 min., se observó daño sobre los peroxisomas, caracterizado por interrupción en la continuidad de su membrana; como consecuencia las proteínas de matriz se fugaron hacia el citosol. Estos resultados son de particular interés, debido a que, i) no se tienen reportes, hasta el momento, de compuestos que inducen efecto parecido, ii) el daño sobre la membrana peroxisomal, podría explicar la toxicidad selectiva *in vitro* de la peroxisomicina A1, sobre células neoplásicas<sup>17</sup> ya que existen varios reportes de que algunas células malignas contienen menor número de peroxisomas<sup>19</sup> y iii) los defectos en la función peroxisomal inducidos específicamente por la peroxisomicina A1, en células de levadura, representan un atractivo modelo experimental para el estudio de la biogénesis y función peroxisomal. En relación a esto último, es importante mencionar que existen varios grupos de investigación que han estado estudiando el impacto que pudiera tener el conocimiento de las deficiencias en la función peroxisomal en células de levadura, en analogía con las enfermedades peroxisomales, descritas anteriormente. Estos grupos de investigadores han combinado esfuerzos para aislar y caracterizar células de diferentes especies de levaduras (*S. cerevisiae*<sup>53</sup>, *H. polymorpha*<sup>54</sup>, *P. pastoris*<sup>55</sup>), deficientes en peroxisomas, por medio de procedimientos de mutagénesis con *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-

nitrosoguanidina<sup>55</sup>. Las cepas mutantes de *H. polymorpha* han sido obtenidas en base a la incapacidad que presentan las células para utilizar el metanol (células mutantes Mut<sup>-</sup>) como única fuente de carbono. Van der Klei y cols.<sup>56</sup> han establecido que la incapacidad de estas células para crecer en metanol se debe, principalmente, a la ausencia de la membrana peroxisomal intacta. Es decir, la presencia de peroxisomas intactos es esencial para el metabolismo eficiente del metanol.

La información disponible hasta este momento acerca del mecanismo de acción de la peroxisomicina A1 indica que el peroxisoma es el organelo blanco tanto en levaduras como en hígado de ratas y monos.

## **1.4 Hipótesis de Trabajo y Objetivos**

### **1.4.1 Hipótesis de Trabajo**

“Si el daño producido por la peroxisomicina A<sub>1</sub> sobre la integridad peroxisomal a una dosis no letal fuera irreversible, sería posible obtener células con disfunción peroxisomal”.

### **1.4.2 Objetivos Generales**

1. Establecer las condiciones óptimas de cultivo para determinar la fase de crecimiento en la cual las células de levadura contengan un solo peroxisoma, para evaluar el efecto de la peroxisomicina A<sub>1</sub>.
2. Incubar células con una dosis no letal de peroxisomicina A<sub>1</sub> y aislar las células incapaces de crecer en metanol.
3. Evaluar la función de los peroxisomas de las células aisladas.

### **1.4.3 Objetivos Específicos**

1. Estudiar la cinética de crecimiento celular en medio de cultivo con metanol.
2. Analizar ultraestructuralmente a las células a diferentes tiempos de cultivo, para establecer el tiempo de inducción peroxisomal de interés para el estudio.
3. Incubar células con una dosis no letal de peroxisomicina A<sub>1</sub> en la fase de inducción establecida.
4. Aislar las células incapaces de crecer en metanol.
5. Evaluar la integridad de los peroxisomas de las células por microscopía electrónica y ensayos bioquímicos.

## CAPITULO 2

### MATERIAL Y METODOS

#### 2.1 Material Biológico

Se utilizaron las siguientes cepas de levadura:

*Hansenula polymorpha* cepa CBS 4732

*Hansenula polymorpha* cepa NCYC *leu 1-1*

*Hansenula polymorpha* cepa NCYC *ade11met6*

La peroxisomicina A<sub>1</sub> de *K. parvifolia* se aisló y purificó en el laboratorio de extracción del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

#### 2.2 Equipo y Reactivos

Las sustancias se pesaron en balanzas analíticas Mettler P1200 y Mettler PJ360 DeltaRange. El pH de las soluciones y medios de cultivo se determinó en un pHmetro Hanna Instruments 8417. Los electrodos y las soluciones de calibración se obtuvieron de Beckman.

Los cultivos se realizaron en una incubadora New Brunswick Scientific con temperatura y agitación controlada, a 37°C y a 200 r.p.m., respectivamente. Las placas de agar se incubaron en una incubadora estática a 37°C.

La densidad óptica de los cultivos se determinó en un fotómetro Meyvis Vitatron MCP, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm ( $DO_{660}$ ). La concentración de metanol en el medio de cultivo se determinó por cromatografía de gases en un Cromatógrafo Hewlett Packard modelo 437.

Para la obtención de extracto libre de células, se utilizó una centrifuga Eppendorf 5415C. La actividad enzimática de AO (EC 1.1.3.13) y la de catalasa (EC 1.11.1.6) se determinó en un espectrofotómetro Hitachi modelo 100-60. Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz y de 3 mL de volumen.

Las soluciones para procesar las muestras para microscopía electrónica de transmisión (MET) se prepararon dentro de una campana de extracción. Las muestras se deshidrataron en un horno de microondas Bio-rad H2500. Los cortes finos se obtuvieron en un ultramicrotomo LKB Ultratome III tipo 8802A, con cuchilla de diamante (DIATOME). Los cortes se montaron en rejillas de cobre y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión (ME) Phillips EM300.

La resina epóxica se obtuvo de Serva Boehringer y la resina acrílica (Lowicryl-K4M) de Polysciences Ltd. Los anticuerpos policlonales anti-AO se obtuvieron de conejos inmunizados en el laboratorio de Inmunología de la Universidad de Groningen y los conjugados de oro coloidal de Amersham.

## **2.3 Método de Cultivo**

### **2.3.1 Cultivo Primario y Pre-cultivo**

Para el cultivo primario, se tomó una colonia de células de *Hansenula polymorpha* cepa CBS 4732 aislada de una placa de agar YPD (ver apéndice A), se inoculó en 200 mL de YPD líquido, y se cultivó



durante 16 hrs. El pre-cultivo se realizó de la manera siguiente: se transfirió una alícuota del cultivo primario a un matraz con 100 mL de YND y se determinó la  $DO_{660}$  para iniciar el cultivo con una masa celular inicial equivalente a 0.1  $DO_{660}$ /mL de cultivo. Después de 6 hrs. de cultivo ( $DO_{660}$  de 1.0/mL, que corresponde a la fase de crecimiento exponencial media), se transfirió una alícuota de este cultivo con una  $DO_{660}$  de 0.1/mL a un matraz con 100 mL de YND y se incubó hasta la fase de crecimiento exponencial. Este procedimiento se repitió una vez más para obtener el pre-cultivo. Independientemente de los sustratos utilizados, todos los cultivos líquidos (no quimioestáticos), se iniciaron con una  $DO_{660}$  de 0.1/mL.

### **2.3.2 Cultivos bajo Condiciones de Inducción de la Proliferación de Peroxisomas**

Para la inducción de la proliferación de peroxisomas, las células previamente pre-cultivadas en glucosa se transfirieron a uno de los siguientes medios inductores: YNM, YNMe, YNE, para realizar cultivos líquidos.

Debido a que el crecimiento de las células en cultivos líquidos no se encuentra completamente en condiciones de equilibrio, se realizaron cultivos quimioestáticos.

En el cultivo quimioestático la energía y la materia son transformadas continuamente y todos los parámetros físicos, químicos y matemáticos que definen el contenido del fermentador se mantienen constantes durante cada estado de equilibrio. Entre estos parámetros se incluyen la energía y entropía, la concentración de sustratos en el medio y la biomasa, la composición y concentración de biomasa, el número, tamaño y edad de las células, así como el tiempo de generación celular. El estado de equilibrio puede perderse al cambiar la composición del medio, la velocidad de dilución (D) o la temperatura. Cualquier cambio en las condiciones de cultivo provoca la pérdida del

estado de equilibrio. En respuesta, las células tienden a adaptarse a esos cambios y establecen un nuevo estado de equilibrio. Este último se alcanza después de un tiempo durante el cual las células se encuentran en una etapa denominada estado de transición.

En el cultivo quimiostático, se puede mantener a las células en condiciones lo más parecido a su hábitat natural y se puede evaluar su comportamiento bajo condiciones en las cuales el substrato se administra en forma continua y limitada, obteniéndose la máxima inducción de proliferación de peroxisomas. En estas condiciones los peroxisomas pueden ocupar hasta un 80 % del volumen citoplasmático.

Para realizar el cultivo quimiostático, una alícuota de células pre-cultivadas en YND se transfirió al reservorio del fermentador con 2 litros de MM. Se adicionó YND (con glucosa al 0.25 %, como substrato limitante), a una velocidad de dilución de 200 mL/min. ( $D= 0.1 \text{ hrs.}^{-1}$ ). Las células se incubaron hasta el estado de equilibrio y enseguida se adicionó una mezcla de YND/YNM (YND con glucosa al 0.25 % y YNM con metanol al 0.30 %; el metanol se utilizó como un segundo substrato).

### **2.3.3 Determinación de la Fase de Crecimiento Óptima de *H. polymorpha* para el Estudio del Efecto de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>**

Para estudiar el efecto de la peroxisomicina A<sub>1</sub>, se determinó la fase de crecimiento en la cual las células presentaron solamente un peroxisoma. Se tomaron alícuotas de células previamente pre-cultivadas y se incubaron en varios matraces con 100 mL de YNM. Los cultivos se agitaron y se obtuvieron muestras de estos cultivos a las 2, 4, 6 y 8 hrs. para el análisis ultraestructural por MET y hasta las 24 hrs. para el análisis de la cinética de crecimiento celular.

### 2.3.3.1 Evaluación de la Fase de Crecimiento Óptima.

2.3.3.1.1 Análisis Ultraestructural. Las muestras para MET se fijaron en  $\text{KMnO}_4$  al 1.5 %, se contrastaron en bloque con acetato de uranilo al 1 % por 1 hr. y se deshidrataron en una serie graduada de etanol al 50, 70, 96 y 100 % en un horno de microondas. Las muestras deshidratadas se procesaron hasta su inclusión en resinas epóxicas (ver apéndice B). Se obtuvieron cortes finos y se observaron en el ME para evaluar la ultraestructura de las células.

2.3.3.1.2 Análisis de la Cinética de Crecimiento Celular. Para analizar la cinética de crecimiento celular, se midió la  $\text{DO}_{660}$  de las muestras obtenidas a diferentes tiempos de cultivo. Los valores de  $\text{DO}_{660}$  y tiempo se almacenaron en el programa de computadora Microsoft Excel 5.0 para Macintosh. Se elaboraron curvas para evaluar la cinética de crecimiento de las células en medio de cultivo con metanol (ver apéndice A).

### 2.3.4 Estudio del Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre Células de *H. polymorpha*

#### 2.3.4.1 Cultivos con una Dosis no letal de Peroxisomicina A1

Para realizar estos experimentos se tomó como referencia el trabajo publicado por Sepúlveda y cols.<sup>19</sup> en el que se demostró que la supervivencia de las células de levadura es afectada de manera drástica, al incubar las células en presencia de una dosis de peroxisomicina A1 de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y mayores (20 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Con dosis menores, se observó una supervivencia del 60 al 90 %. Por lo anterior, en el presente trabajo se utilizó una dosis de peroxisomicina A1 de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Se inoculó una alícuota de células pre-cultivadas de *H. polymorpha* en 100 mL de YNM a una  $\text{DO}_{660}$  inicial de 0.1/mL y se cultivaron durante 6-7 hrs. Después de este tiempo las células se

centrifugaron, se eliminó el sobrenadante, se lavaron con MM sin sustrato y se resuspendieron en el mismo medio a una  $DO_{660}$  1.0/mL. Se obtuvo una muestra del cultivo como control (sin peroxisomicina A1) y el resto de las células se incubaron en presencia de 5  $\mu$ g/mL de peroxisomicina A1 (cultivo problema). Se obtuvieron dos muestras del cultivo problema a los 60 y 120 min.

#### 2.3.4.2 Evaluación del Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre los Peroxisomas de *Hansenula polymorpha*.

Se obtuvieron muestras del cultivo control sin toxina y del cultivo problema y se procesaron para MET. Se analizó la ultraestructura de las células para evaluar el efecto producido por la toxina sobre los peroxisomas.

Simultáneamente, las muestras del cultivo control y cultivo problema se diluyeron en MM y se sembraron en 10 placas de agar con metanol (agar YNM) y 10 placas de agar con glucosa (agar YND). Las placas se incubaron a 37°C durante 3-5 días. Transcurrido ese tiempo, se analizó la capacidad de las células que estuvieron en presencia de peroxisomicina A1, para crecer en esos sustratos (glucosa o metanol).

#### 2.3.5 Aislamiento de Células con Disfunción Peroxisomal.

Para aislar células con disfunción peroxisomal, se tomaron como referencia los hallazgos obtenidos por van der Klei y cols.<sup>56</sup>. En ellos se establece que la presencia de peroxisomas intactos son esenciales para el metabolismo eficiente del metanol. Lo anterior sugiere que si se dañara al único peroxisoma presente en la célula, podría tener severas consecuencias sobre la capacidad de las células para crecer en metanol.

Las células incapaces de crecer en metanol se aislaron por medio de la técnica de replicación en placas de agar. Esta consiste en la

transferencia de colonias perfectamente separadas unas de otras de una placa de agar a otra por medio de una felpa que se coloca sobre un soporte. Esta técnica permite evaluar simultáneamente el crecimiento de las mismas colonias en diferentes substratos ya que se conoce la posición exacta de cada una de ellas.

Las muestras control sin toxina y las muestras de los cultivos problema obtenidas a los 60 y 120 min. se diluyeron para obtener entre 100-500 colonias por placa. Las diluciones se realizaron de acuerdo al siguiente cálculo: una alícuota de un cultivo de *H polymorpha* con una  $DO_{660}$  de 0.1/mL contiene aproximadamente  $1.4 \times 10^7$  células/mL. Se realizaron tres diluciones diferentes y de cada dilución se sembró 0.1 mL por placa de agar. Se sembraron 20 placas de agar YND y 20 de agar YNM.

Las placas se incubaron durante 2-3 días a 37°C y las colonias formadas en las placas YND se replicaron en agar YNM. Estas últimas placas se incubaron junto con las placas YND originales. Después de 3 a 5 días de cultivo, se revisaron las colonias en las placas de agar YND y se cotejaron con las colonias en las placas de agar YNM para identificar colonias incapaces para crecer en metanol. Estas colonias se seleccionaron de las colonias correspondientes en las placas con glucosa y se aislaron para evaluar si efectivamente presentaban incapacidad para crecer en metanol. Las colonias incapaces para crecer en metanol se seleccionaron y se aislaron para su caracterización.

EL procedimiento descrito anteriormente se realizó con la finalidad de aislar células incapaces de crecer eficientemente en metanol, comparadas con las células control sin toxina y se consideró que podrían representar células con probable disfunción peroxisomal. Para una identificación adecuada, estas células se denominaron como células experimentales tipo I (células CEI).

## 2.4 Evaluación de la Función Peroxisomal en las Células CEI

Para evaluar la función de los peroxisomas de las células CEI, se realizaron los siguientes análisis:

- Ultraestructural
- Fisiológico
- Bioquímico
- Citoquímico e Inmunocitoquímico
- Ultraestructural, Bioquímico e Inmunocitoquímico bajo Condiciones Quimiostáticas.

En todos los casos, las células se pre-cultivaron y posteriormente se transfirieron a medios de cultivo bajo condiciones de inducción peroxisomal. En algunos casos las células se cultivaron en medio YND (no inductor peroxisomal).

### 2.4.1 Análisis Ultraestructural

Se analizaron por microscopía electrónica las diferencias ultraestructurales de los peroxisomas de las células CEI y las células control durante la adaptación al cambio de un medio no inductor de peroxisomas a un medio inductor. Principalmente se hizo énfasis en la morfología (tamaño, forma, e integridad de la membrana) y número de peroxisomas.

Se pre-cultivaron células control y células CEI en YND y posteriormente se transfirió una alícuota de estas células a medio YNM líquido. Los cultivos se iniciaron con una  $DO_{660}$  de 0.1/mL. Se obtuvieron muestras de ambos cultivos a las 4, 8, 12, 24 y 48 hrs. y se procesaron para MET.

## 2.4.2 Análisis Fisiológico

Para el análisis fisiológico se realizaron cultivos líquidos en medios selectivos para evaluar la capacidad de las células para utilizar sustratos que requieren la presencia de enzimas peroxisomales.

### 2.4.2.1 Análisis de la Capacidad de Utilización de Metanol.

Se transfirieron células control y células CEI pre-cultivadas, a un medio YNM líquido, se obtuvieron muestras a diferentes tiempos de cultivo y se midió la  $DO_{660}$ . Simultáneamente, se determinó la concentración de metanol en el medio de cultivo por cromatografía de gases. Se obtuvo una alícuota de 2 mL, se colocó en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 5 min. Se tomó del sobrenadante un volumen de 1.8 a 1.5 mL y se sometió a centrifugación durante 15 min. a 10,000 r.p.m.. Posteriormente se tomó del sobrenadante de 1.4 a 1.5 mL y se mantuvo a 4°C hasta su análisis. Para la cuantificación de la concentración de metanol se utilizaron las siguientes soluciones estándar de metanol (v/v): 0.50 %, (125 mM), 0.40 % (100 mM), 0.30 % (75 mM), 0.20 % (50 mM), 0.10 % (25.00 mM) y 0.05 % (12.50 mM).

Se graficaron los valores de  $DO_{660}$ , tiempo de cultivo y concentración de metanol para la obtención de curvas. Por medio de las curvas se evaluó la cinética de crecimiento celular y la capacidad de las células para utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía.

### 2.4.2.2 Análisis de la Capacidad de Utilización de Glucosa, Etanol, Metilamina y Glicerol.

Se efectuaron los procedimientos ya descritos en la sección 2.4.2.1, excepto que las células pre-cultivadas se incubaron en los siguientes medios de cultivo: YND, YNE, YNMe y YNG.

### 2.4.3 Análisis Bioquímico

Para evaluar parcialmente la función bioquímica peroxisomal se determinó, en extracto libre de células, la actividad enzimática de dos enzimas peroxisomales: AO y catalasa.

Para la obtención del extracto libre de células, se realizaron cultivos de células control y células CEI, bajo condiciones de inducción peroxisomal (en medio YNM líquido). Se obtuvo un volumen de cultivo con una densidad equivalente a 75 unidades de  $DO_{600}/mL$ , se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 mL de amortiguador de fosfatos 40 mM, pH 7.0, se colocó en un tubo Eppendorf y las células se sometieron a lisis con perlas de vidrio (de 0.5 mm diámetro, prelavadas con ácido), por agitación en un vortex a máxima velocidad por 7 veces durante 45 seg. La suspensión se mantuvo a 4°C durante 1 min. entre cada agitación. Para separar los restos celulares se centrifugó por 20 min. a 15,000g. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford<sup>57</sup>. La actividad de AO se determinó por el método de Verduyn y cols.<sup>58</sup> y la actividad de catalasa por el método de Lück<sup>59</sup>.

### 2.4.4 Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico

Para evaluar la actividad y localización sub-celular de la enzima AO, en las células CEI se obtuvieron esferoplastos y se analizaron por métodos citoquímicos e inmunocitoquímicos.

#### 2.4.4.1 Obtención de Esferoplastos.

La obtención de esferoplastos se llevó a cabo a partir de una alícuota del cultivo con una densidad equivalente a 20 unidades de  $DO_{600}/mL$ . Las células se incubaron con  $\beta$ -mercaptoetanol 0.2 M en sorbitol 3 M (amortiguador A; ver apéndice B) durante 10 min. a temperatura ambiente y se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron en amortiguador de sorbitol 3 M, se centrifugaron,



el botón celular se resuspendió en amortiguador de sorbitol 3 M adicionado con 1 mg/mL de zimoliasa (amortiguador B) y las células se incubaron a 37°C durante 30 a 60 min. Se observó al microscopio de luz la formación de esferoplastos y el proceso se detuvo al colocar la suspensión en hielo.

#### 2.4.4.2 Análisis Citoquímico: Método del Tricloruro de Cesio (Veenhuis y cols 1976).

Para el análisis citoquímico los esferoplastos se fijaron en glutaraldehído al 0.1 % en solución de cacodillato de sodio 0.1M (solución C; ver apéndice B), se lavaron con amortiguador de sorbitol 3 M y se resuspendieron en glutaraldehído al 6 % en solución C, se lavaron con amortiguador Tris-HCl a pH 8, y se incubaron con tricloruro de cesio ( $\text{CeCl}_3$ ) 5 mM en presencia de 50 mM de aminotriazol. Posteriormente se lavaron y se incubaron en un volumen de la misma solución adicionada con 50 mM de metanol, a 37°C durante 2 hrs. Se cambió el medio cada hora y la solución se oxigenó. Los esferoplastos se lavaron con solución C a pH 6, y se fijaron en glutaraldehído al 6 % en solución D. Se post-fijaron con mezclas de tetraóxido de osmio al 0.5 % y dicromato de potasio al 2.5 % en solución D y se deshidrataron e incluyeron por el método descrito para MET.

#### 2.4.4.3 Análisis Inmunocitoquímico: Método de la Proteína A-oro Coloidal (Slot y Geuze 1984).

Los esferoplastos se fijaron en glutaraldehído al 3 % en solución C, se lavaron con  $\text{NaIO}_4$  al 0.1 % y en seguida con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 1 %, se resuspendieron en alcohol al 50 % y se centrifugaron por 15 min.. Para la pre-inclusión las muestras se colocaron en soluciones de N,N dimetilformamida (DMF) al 50, 75 y 100 % en etanol al 50 %, y luego en mezclas de DMF:Lowcryl-K4M y la inclusión se realizó en Lowcryl-K4M. La polimerización de la resina se efectuó bajo luz ultravioleta. Se obtuvieron cortes finos y se montaron en rejillas de níquel con soporte de Formvar. Se bloquearon los sitios de unión inespecífica con albúmina sérica

bovina (BSA) y los cortes se incubaron con anticuerpos específicos anti-AO, se lavaron en amortiguador PBS-glicina, después se incubaron con la proteína A-conjugada con partículas de oro coloidal de 15 nm de diámetro, se lavaron y se contrastaron con acetato de uranilo al 1 %.

#### **2.4.5 Análisis Ultraestructural, Bioquímico y Citoquímico e Inmunocitoquímico bajo Condiciones Quimiostáticas.**

Para caracterizar a las células CEI bajo condiciones de máxima inducción peroxisomal, se incubaron en un cultivo quimiostático (ver sección 2.3.2)

Se obtuvieron muestras de este cultivo para realizar los siguientes análisis :

- Ultraestructural de las células completas y de esferoplastos
- Citoquímico e inmunocitoquímico de esferoplastos

Simultáneamente se realizó la determinación de la actividad de las enzimas AO y catalasa en extracto libre de células y la determinación de la concentración de glucosa y de metanol residual en el medio de cultivo.

#### **2.5 Aislamiento y Caracterización de Células de *H. polymorpha leu1-1* con Disfunción Peroxisomal.**

Para contar con un modelo biológico eucariote que presente disfunción peroxisomal inducida por la peroxisomicina A<sub>1</sub> y que permita caracterizar a nivel molecular el mecanismo de la interacción toxina-peroxisoma, se realizó la misma estrategia experimental establecida en las secciones de la 2.3.4 a la 2.5, excepto que se utilizaron células de *H. polymorpha* con un marcador auxotrófico (*leu 1-1*). Las células que presentaron disfunción peroxisomal después de la evaluación morfológica, bioquímica y funcional, se denominaron células experimentales tipo II (células CEII) para diferenciarlas de las células CEI.

## 2.5.1 Análisis Genético

Para valorar si la disfunción peroxisomal que presentaban las células CEI y las células CEII se debía a un defecto genético, se realizaron experimentos de apareamiento, complementación y análisis de esporas al azar.

Para identificar a las diferentes cepas de *H. polymorpha* que se utilizaron en estos ensayos, se estableció la siguiente nomenclatura:

WT = células silvestres, normales prototróficas (no requieren la presencia de aminoácidos específicos).

*leu1-1* = células mutantes con marcador auxotrófico *leu1-1* (requieren la presencia de L-leucina).

*ade11met6* = células mutantes con doble marcador auxotrófico (requieren de adenina y L-metionina).

*ura<sup>-</sup>* = células mutantes que requieren de uracilo.

Mut<sup>-</sup> = células deficientes en la utilización del metanol

### 2.5.1.1 Obtención de Células CEI con Marcador Auxotrófico *ura<sup>-</sup>*.

Para llevar a cabo los experimentos de complementación, en un principio se intentó introducir un marcador auxotrófico a las células CEI por medio de cruas entre estas células y células de *H. polymorpha* con marcadores auxotróficos (*ade11met6*). Sin embargo, no se obtuvieron híbridos después de varios intentos. Por lo tanto, se decidió introducir un marcador auxotrófico (*ura<sup>-</sup>*) a las células CEI por medio de la selección de colonias resistentes al ácido 5-fluoro urótico<sup>62</sup> (5-FOA: análogo de pirimidina), por medio del siguiente procedimiento: una colonia de células CEI se incubó durante 16 hrs. en YPD líquido. Se obtuvo un volumen de 10 mL del cultivo con una densidad equivalente a 2 unidades de DO<sub>660</sub>/mL (equivalente a una población de 10<sup>8</sup> células/mL), las células se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante, el botón celular

se resuspendió en 1 mL de YPD líquido y las células se sembraron por extensión en agar YND adicionado con 500  $\mu\text{g/mL}$  de 5-FOA y 50  $\mu\text{g/mL}$  de uracilo. Las placas se incubaron a 37°C. Una vez que las colonias se formaron, se replicaron en placas de agar YND con y sin uracilo (medio selectivo) y se seleccionó a las colonias que presentaron el fenotipo deseado; colonias *ura<sup>-</sup>* y además deficientes en el crecimiento en metanol, es decir *Mut<sup>-</sup>ura<sup>-</sup>*.

#### 2.5.1.2 Ensayos de Complementación.

Las células CEI *Mut<sup>-</sup>ura<sup>-</sup>* y las células CEII *Mut<sup>-</sup>leu1-1* se cruzaron entre sí y a su vez con sus respectivas cepas isogénicas que contenían los marcadores complementarios, es decir *ura<sup>-</sup>* y *leu1-1*. Para la obtención de células diploides (CEI:CEII), se sembraron 5 colonias de células CEI en forma de estrías sobre una placa de agar YPD y ésta se replicó sobre una placa de agar EM que contenía colonias de células CEII. Esta placa se incubó por 3 días y después se replicó sobre una placa de agar YND sin marcadores (no se adicionó uracilo ni leucina). Esta última placa se incubó por 3 días y enseguida se replicó sobre una placa de agar YNM sin marcadores. Después de la obtención de células diploides CEI:CEII, se analizó la capacidad de las mismas para crecer en metanol y se sometieron a un análisis de esporas al azar.

#### 2.5.1.3 Análisis de Esporas al Azar.

Para establecer el ligamiento entre los probables genes afectados de ambas cepas, las células diploides CEI:CEII se sembraron en agar EM en forma de estrías, se incubaron por 3 días, se suspendieron en 10 mL de agua, se obtuvo un volumen de 0.9 mL de esta suspensión y se agregó 0.1 mL de dietil éter. La suspensión de células se incubó por 20 min. a temperatura ambiente bajo agitación, se realizaron tres diluciones diferentes para obtener 10, 100 y 500 colonias por placa. Las diluciones se sembraron en placas de agar YPD y se incubaron durante 4 días a

40°C. Estas placas se replicaron en placas de agar YNM y placas de agar YND (con y sin marcadores) y se incubaron por 3 días. Para el análisis del fenotipo de la progenie se contaron 100 colonias y se determinó su naturaleza prototrófica o auxotrófica y la capacidad de crecimiento en metanol o glucosa, tanto en presencia como en ausencia de marcadores selectivos.

## 2.6 Análisis Estadístico

En los experimentos que por su naturaleza, fue posible que se realizaran por triplicado, la significancia estadística de los datos se estimó por medio de la prueba t de Student. Los valores en las gráficas representan la media de tres determinaciones y la barra representa  $\pm$  la desviación estándar (DS).

## CAPITULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Evaluación de las Condiciones Optimas de Cultivo

##### 3.1.1 Análisis Ultraestructural

La figura 2 muestra los cambios ultraestructurales que presentaron las células de *Hansenula polymorpha*, después de transferirlas de un medio con glucosa a un medio con metanol como única fuente de carbono.

Durante la fase de crecimiento media exponencial en glucosa, las células contenían generalmente un sólo peroxisoma pequeño de forma irregular, con matriz homogénea sin inclusiones cristalinas y localizado muy cerca de la pared celular. Con frecuencia el peroxisoma se observó muy próximo a cisternas del retículo endoplásmico (figura 2A). Durante la fase de crecimiento estacionaria, la forma del peroxisoma cambió de esférica a cúbica

Las células en la fase de crecimiento media exponencial en glucosa, se incubaron en medio con metanol y se observó aumento en el tamaño y número de peroxisomas con respecto al tiempo de cultivo (figura 2B-E). Después de 2 hrs. de cultivo en metanol, el tamaño del peroxisoma incrementó gradualmente. Se observaron dos estados subsecuentes de crecimiento del peroxisoma a las 6 y a las 8 hrs. Además del crecimiento del peroxisoma, ocasionalmente se observó más de un peroxisoma por célula, generalmente de 2 a 3. La figura 2F muestra el arreglo cristalolde de la AO 2 hrs. después de la transferencia de las células al medio con metanol.

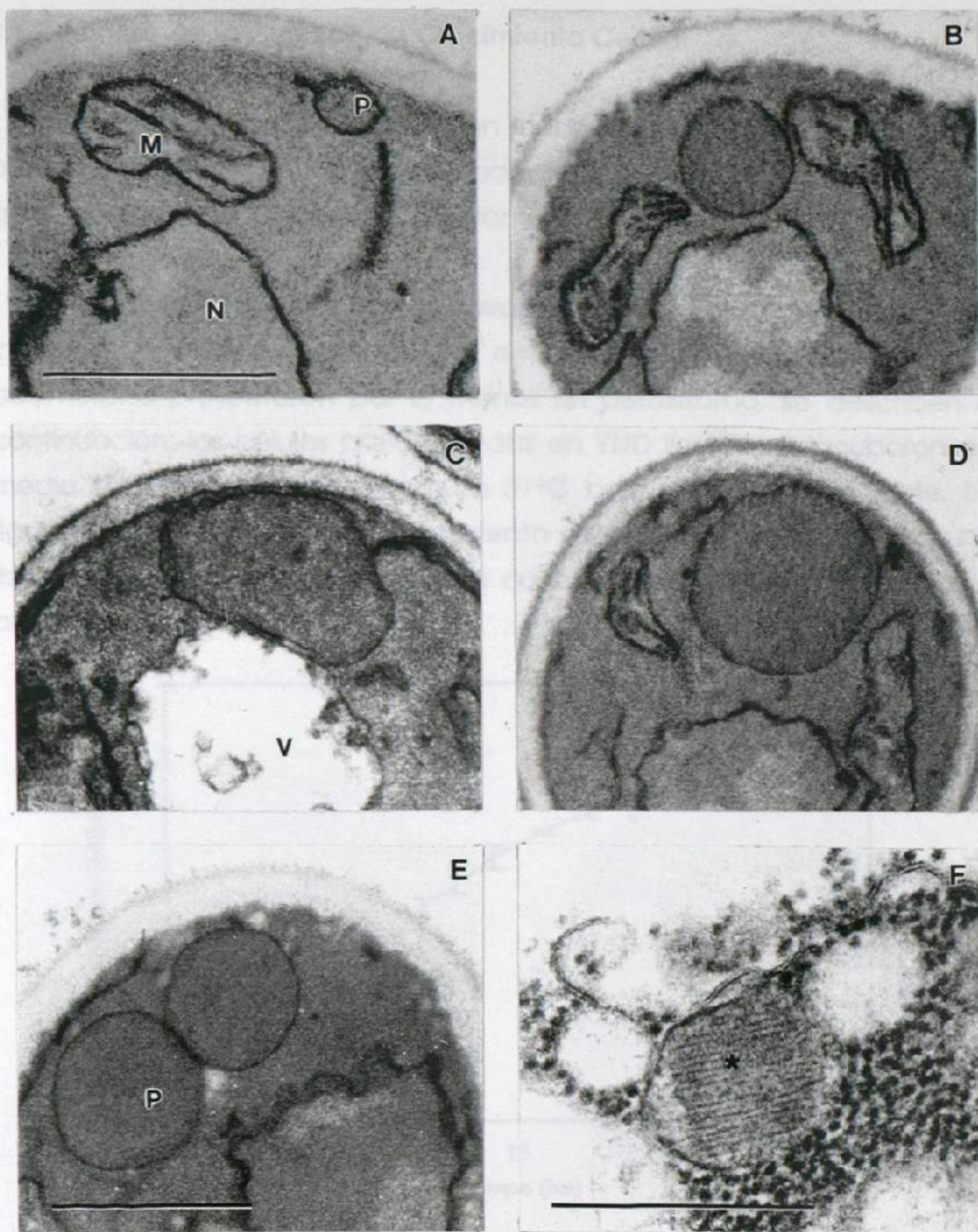


Figura 2. Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células de *H. polymorpha* Durante el Crecimiento en Diferentes Condiciones. A) célula obtenida de la fase de crecimiento exponencial en glucosa 0.5 %. B, C, D, E y F) células obtenidas a las 2, 4, 6 y 8 hrs. de cultivo en metanol 0.5 %. F) esferoplastos preparados de células obtenidas a las 2 hrs. en metanol, que muestran el arreglo cristalóide (\*), de la AO dentro de un peroxisoma. Abreviaturas: N, núcleo; M, mitocondria; P, peroxisoma; V, vacuola. La barra representa 0.5  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.2 Análisis de la Cinética de Crecimiento Celular

El crecimiento de las células en medio con metanol, generalmente comenzó después de una fase de adaptación de 4 a 6 hrs. El tiempo de generación fue de 4 hrs., aproximadamente.

Los procedimientos que se llevaron a cabo para la obtención de las condiciones óptimas de cultivo, en las que las células de *Hansenula polymorpha* presentaron por lo menos un peroxisoma, se describen a continuación: las células pre-cultivadas en YND líquido se incubaron en medio YNM líquido por 6 a 7 hrs. a 37°C bajo agitación constante. La figura 3 muestra la curva de crecimiento en metanol y se indica con una flecha la fase de crecimiento a la cual se obtuvieron las condiciones antes mencionadas.

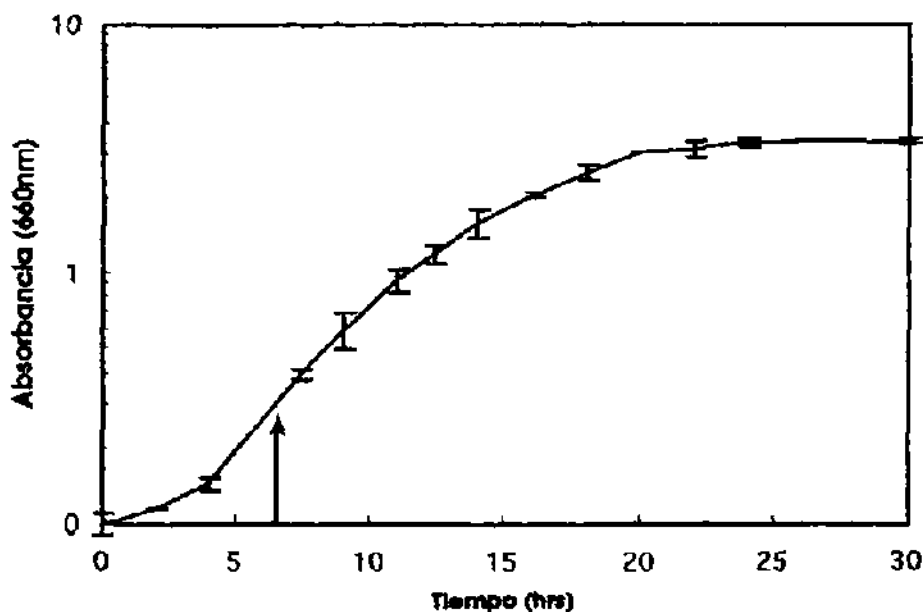


Figura 3. Cinética de Crecimiento Celular en Metanol de *Hansenula polymorpha*. Los valores representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  DS.



### 3.2 Evaluación del Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre los Peroxisomas de *Hansenula polymorpha*.

Por medio de la técnica de replicación en placa se detectó una coloración. Las muestras de células obtenidas después de 60 y 120 min. en presencia de 5  $\mu\text{g/mL}$  de peroxisomicina A1, se evaluaron por microscopía electrónica de transmisión; se observó una interrupción en la continuidad de la membrana peroxisomal. No se observó daño en las membranas del resto de los organelos, bajo las mismas condiciones. En las muestras correspondientes a los 60 min., se observaron células que contenían un sólo peroxisoma, que generalmente presentaba fragmentación de la membrana (figura 4A); mientras que en las muestras de 120 min., ocasionalmente se observaron células con más de un peroxisoma, algunas de las cuales presentaban fragmentación de la membrana peroxisomal, y en otras no se observaron alteraciones morfológicas (figura 4B).

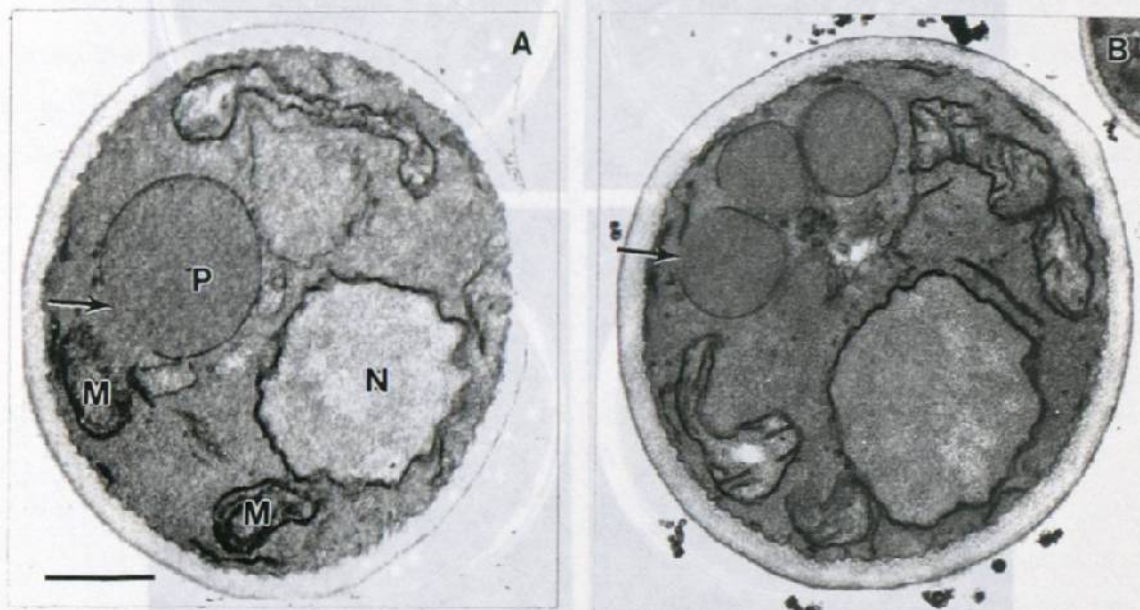


Figura 4. Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células de *Hansenula polymorpha* Incubadas en Presencia de 5  $\mu\text{g/mL}$  de Peroxisomicina A1, Obtenidas Después de 60 (A) y 120 Minutos (B): A) muestra el daño sobre un peroxisoma, caracterizado por interrupción en la continuidad de la membrana peroxisomal (flecha); B) muestra el daño sobre la membrana de dos de los peroxisomas presentes en la célula (flechas). N, núcleo; M, mitocondria; P, peroxisoma; V, vacuola. La barra representa 0.5  $\mu\text{m}$ .



### 3.3 Aislamiento de Células con Disfunción Peroxisomal.

Por medio de la técnica de replicación en placa se detectó una colonia de células que no creció eficientemente en metanol, comparada con las células control sin toxina. Esta colonia se sembró por extensión sobre agar con glucosa. Después de que se formaron colonias se replicaron sobre agar con metanol y no se observó crecimiento en este substrato (figura 5). Estas células que comenzaron a crecer lentamente hasta después de 8 a 10 días, representan la progenie de las células que estuvieron incubadas con la peroxisomicina A<sub>1</sub>, y se denominaron células experimentales tipo I (células CEI).

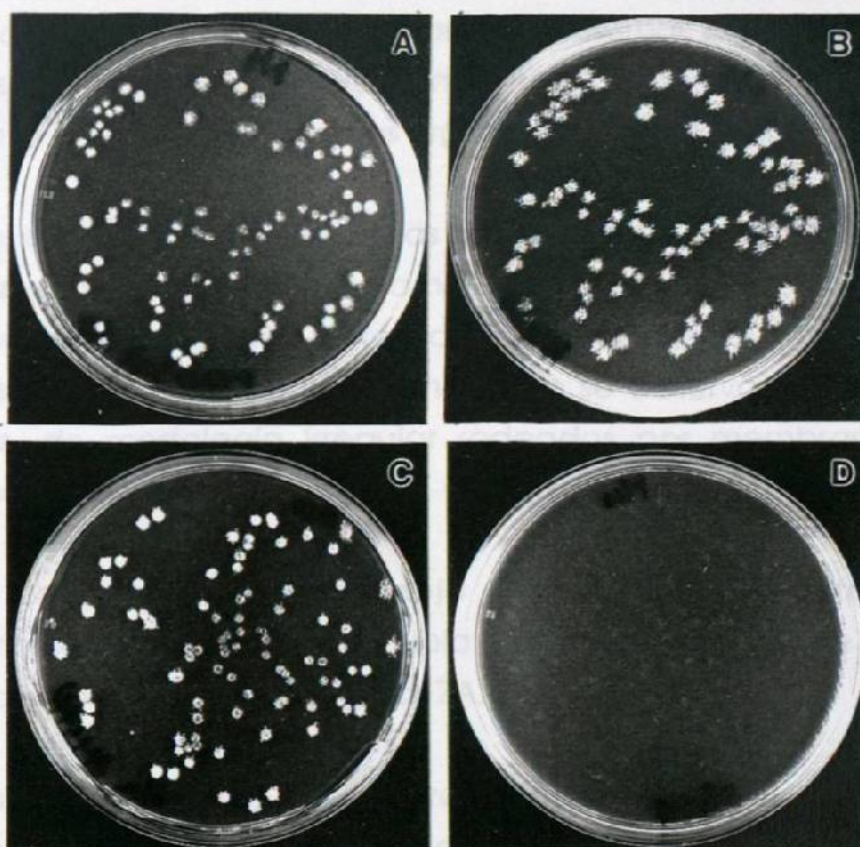


Figura 5. Técnica de Replicación en Placa. Las células control sin peroxisomicina A<sub>1</sub> y las células incubadas en presencia de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de peroxisomicina A<sub>1</sub> se diluyeron, se sembraron en placas de agar con glucosa al 0.5 % y posteriormente se replicaron sobre placas de agar con metanol al 0.5 %. Panel superior: Células control; A) glucosa, B) metanol. Panel inferior: C) muestra la progenie de la colonia de células deficientes en el crecimiento en metanol que se seleccionó (células CEI) y se sembró en glucosa; D) las colonias formadas en glucosa se replicaron en placas de agar con metanol; no se observa crecimiento en este substrato.

### 3.4 Evaluación de la Función Peroxisomal en las Células Experimentales

#### 3.4.1 Análisis Ultraestructural

La figura 6 muestra las diferencias ultraestructurales existentes entre las células control y las células CEI durante el cultivo en medio con metanol. A las 4 hrs. en las células control generalmente se observó un solo peroxisoma con morfología normal, así como el resto de los organelos celulares (figura 6A); mientras que en las células CEI se observó un solo peroxisoma pequeño de forma irregular, rodeado estrechamente por membranas pre-autofágicas (figura 6B). Estas membranas que rodean a la membrana peroxisomal, sólo se observaron en células que presentaron peroxisomas en proceso de autofagia que condujo a la degradación de estos organelos en la vacuola digestiva.

A las 8 y 12 hrs. se observó en las células control la presencia de dos o más peroxisomas con morfología normal (figuras 6C y 6E). Las figuras 6D y 6F presentan muestras correspondientes al cultivo de células CEI obtenidas a los mismos tiempos, en donde se observan peroxisomas pequeños, de morfología irregular rodeados por membranas pre-autofágicas (flechas).

Posteriormente, el complejo membrana pre-autofágica-peroxisoma se fusionó con la vacuola digestiva en donde se observó degradación del peroxisoma (figuras 7A, 7B y 7C).

Después de 24 hrs. de cultivo se observó en las células CEI, desorganización celular general y a las 48 hrs. imágenes típicas de muerte celular (figuras 8A y 8B).



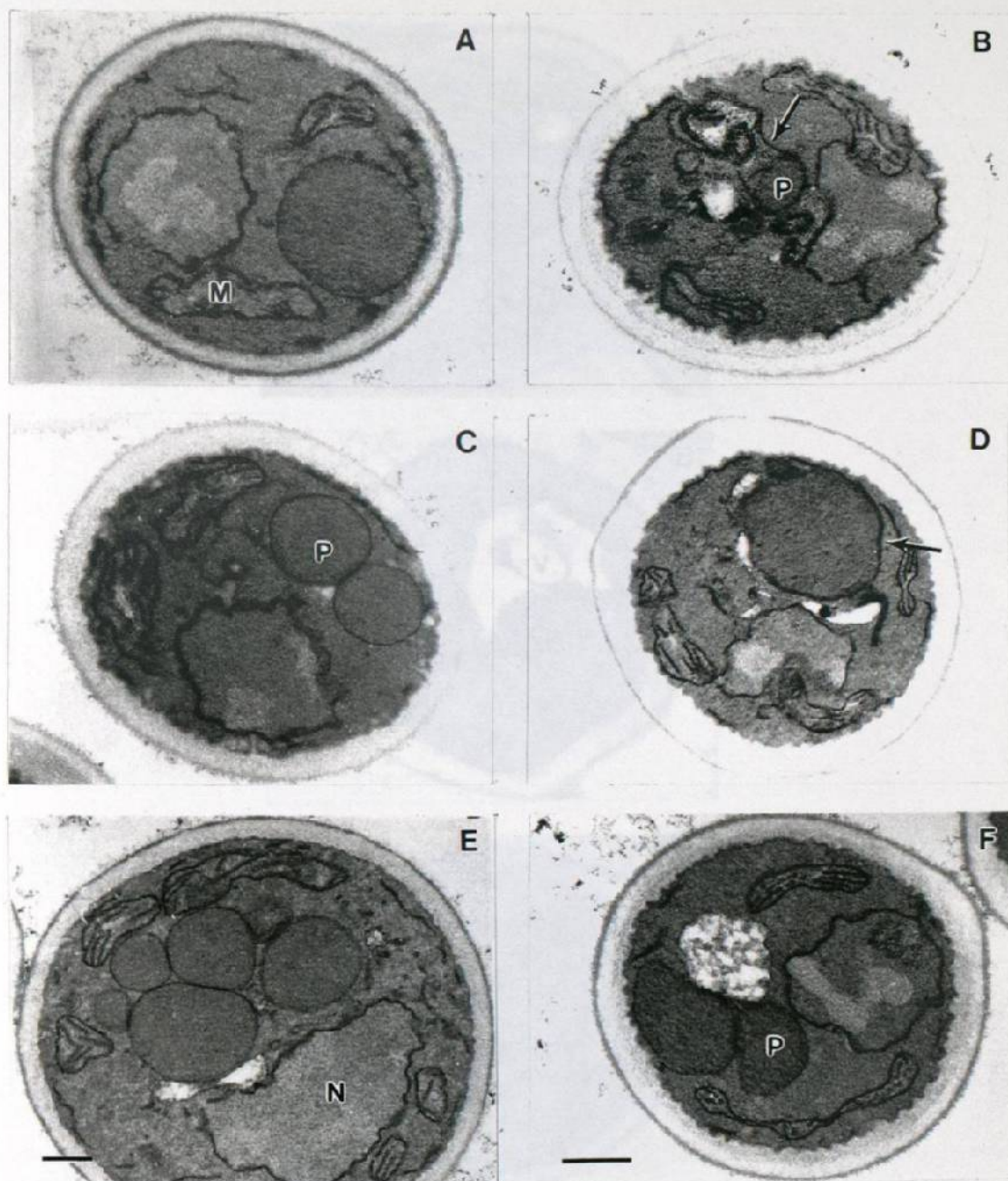


Figura 6. Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células Control y Células CEI durante el Crecimiento en Metanol. El panel izquierdo muestra la ultraestructura de las células control a las 4, 8 y 12 hrs. (A, C y E, respectivamente). El panel derecho corresponde a las células CEI a los mismos tiempos de cultivo (B, D y F). Se observa la irregularidad en la morfología y número de los peroxisomas. Las flechas señalan la presencia de membranas pre-autofágicas. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria; V, vacuola. La barra representa 0.5  $\mu\text{m}$ .



Figura 7. Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células CEI. A) muestra la asociación entre la membrana pre-autofágica y el peroxisoma (flecha). B) se observa un peroxisoma en el interior de la vacuola digestiva. C) muestra la degradación proteolítica del peroxisoma. N, núcleo; P, peroxisoma, M, mitocondria; V, vacuola. La barra representa 0.5  $\mu\text{m}$ .



### 3.4.2 Análisis de la función Peroxisomal

En la figura 9 se muestra la gráfica de la cinética de crecimiento celular versus la concentración de metanol para las células control y las células CEI.

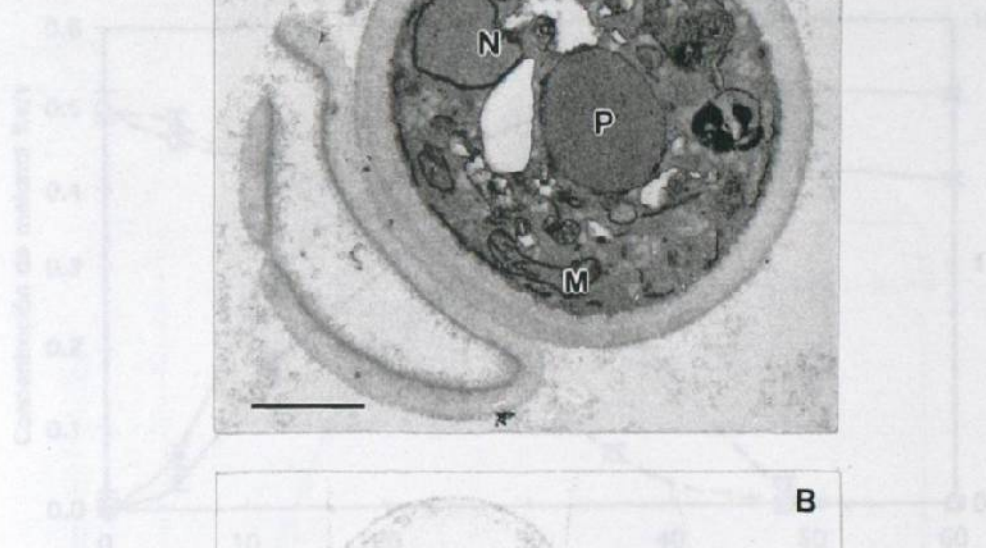


Figura 9. Cinética de crecimiento de las células control y utilización de metanol por las células control (▲) y células CEI (●). Cada vector representa la media de tres determinaciones.

Se observó que las células CEI crecieron más lentamente que las células control en este sustrato. En los cultivos de estos cultivos siempre mostró un crecimiento más lento que las células control. El tiempo de latencia ( $t_0$ ) calculado para las CEI fue de 6 hrs., mientras que el calculado para las células control fue de  $t_0 = 4$  hrs. La tasa de utilización del metanol por las células CEI se encontró disminuida, ya que se detectó un consumo de metanol menor que el de las células control.

Figura 8. Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células CEI. A) muestra la desorganización celular generalizada que presentan estas células después de 24 hrs. de cultivo en metanol. B) muestra células muertas después de 48 hrs. de cultivo. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria, V, vacuola. La barra representa 0.5  $\mu$ m.

### 3.4.2 Análisis de la Función Peroxisomal

En la figura 9 se muestra la gráfica de la cinética de crecimiento celular versus la capacidad de utilización del metanol, por las células control y las células CEI.

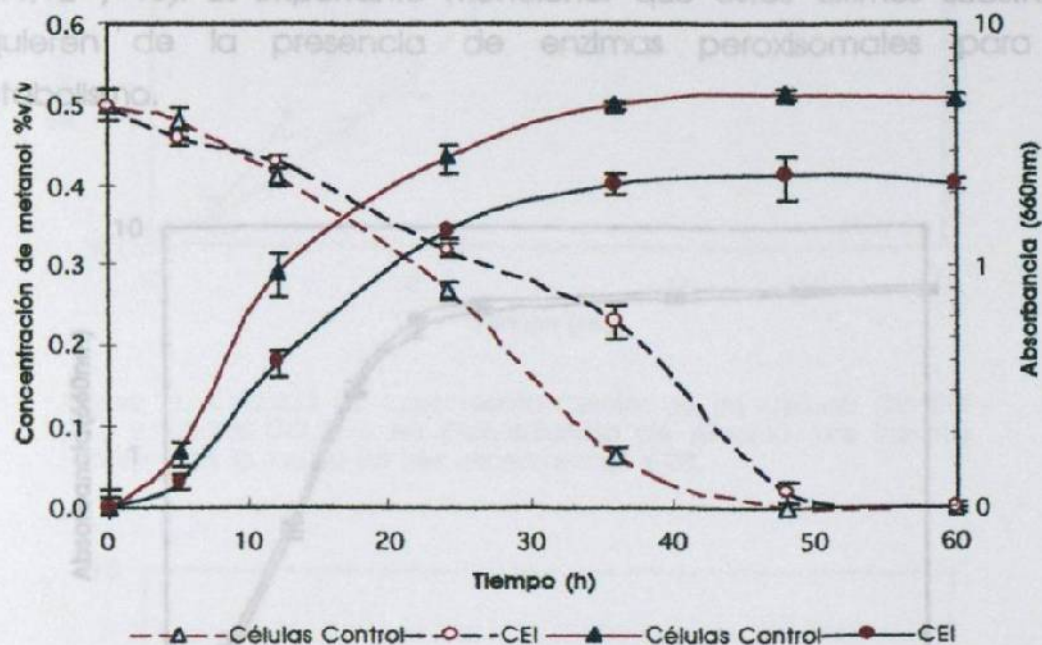


Figura 9. Cinética de Crecimiento Celular y Utilización de Metanol por las Células Control (▲,△) y Células CEI (●,○). Cada valor representa la media de tres determinaciones  $\pm$  DS.

Se observó que las células CEI son incapaces de crecer eficientemente en este sustrato ya que la densidad de estos cultivos siempre mostró valores por debajo de los obtenidos en los cultivos control. El tiempo de generación ( $t_g$ ) calculado para las CEI fue de 6 hrs., mientras que el calculado para las células control fue de  $t_g = 4$  hrs.. La tasa de utilización del metanol por las células CEI se encontró disminuída, ya que se detectó una concentración excedente de metanol del 18 % (13 mM) en la fase de crecimiento exponencial media (24 hrs.). A las 36 hrs. se detectó 3.6 veces más metanol (42 mM) que en los cultivos control



(16 mM), aunque las células CEI utilizaron todo el sustrato en un intervalo de tiempo similar al del control (60 hrs.).

Por otro lado, se observó que las células CEI crecieron en todas las fuentes de carbono y nitrógeno seleccionadas, sin embargo en etanol, metilamina y glicerol el crecimiento fue relativamente lento (figuras 10,11,12 y 13). Es importante mencionar que estos últimos sustratos requieren de la presencia de enzimas peroxisomales para su metabolismo.

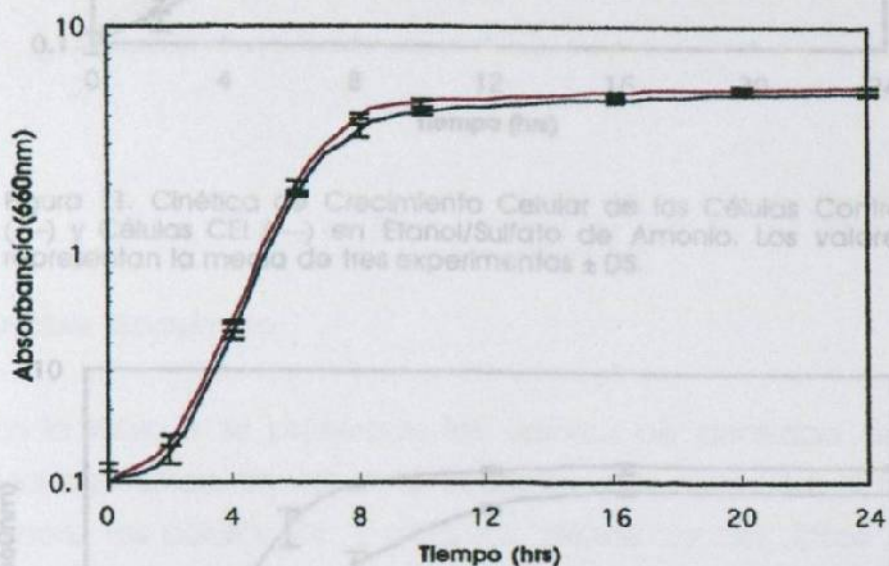


Figura 10. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEI (—) en Glucosa/Sulfato de Amonio. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  DS.

Figura 12. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEI (—) en Glucosa/Metilamina. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  DS.



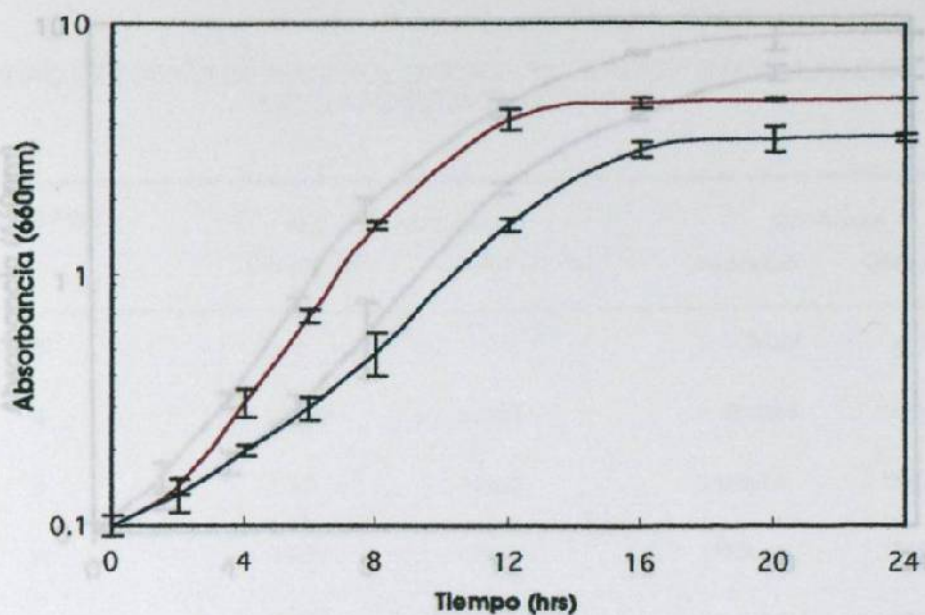


Figura 11. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEI (---) en Etanol/Sulfato de Amonio. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  DS.

### 3.4.3 Análisis Bioquímico

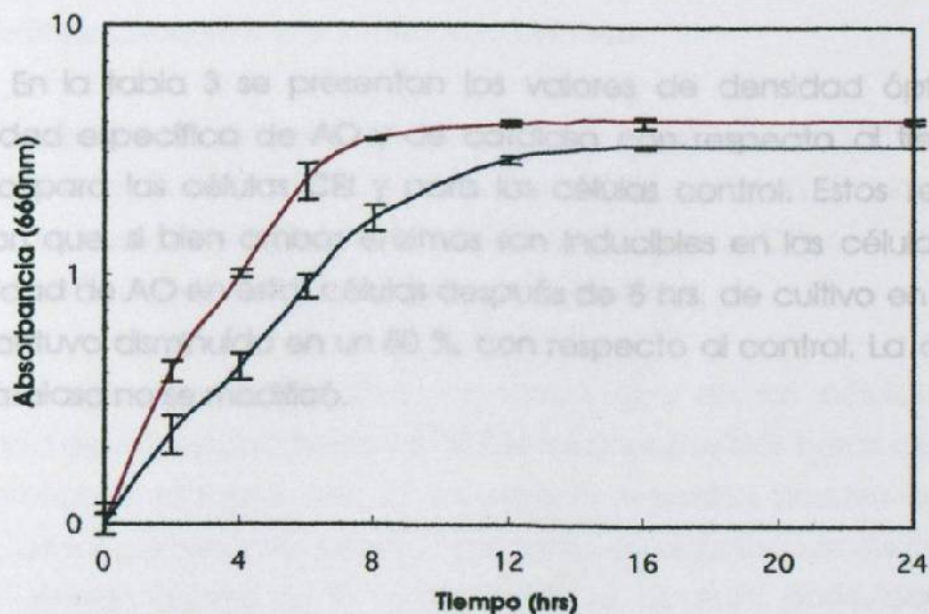


Figura 12. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEI (---) en Glucosa/Metilamina. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  DS.

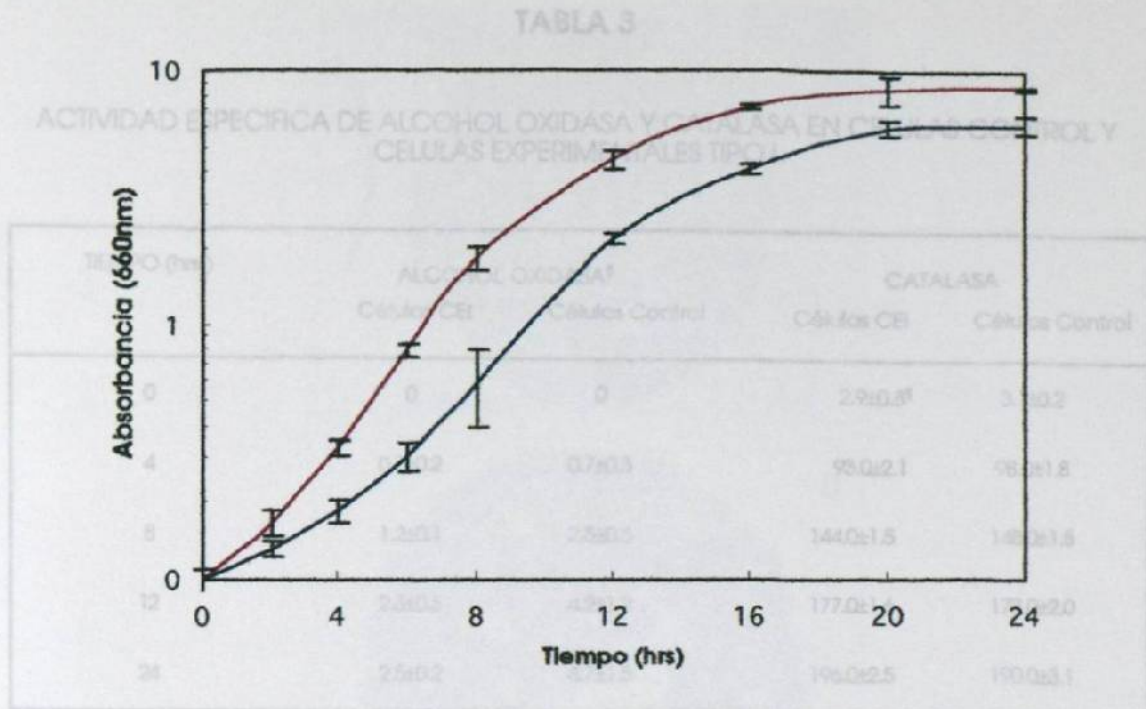


Figura 13. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEI (—) en Glicerol/Sulfato de amonio. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  DS.

### 3.4.3 Análisis Bioquímico

#### 3.4.4 Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico

En la tabla 3 se presentan los valores de densidad óptica y la actividad específica de AO y de catalasa con respecto al tiempo de cultivo para las células CEI y para las células control. Estos resultados indican que, si bien ambas enzimas son inducibles en las células CEI, la actividad de AO en estas células después de 8 hrs. de cultivo en metanol se mantuvo disminuída en un 50 %, con respecto al control. La actividad de catalasa no se modificó.

Los resultados mostraron que en las células CEI la actividad de AO estaba presente desde las primeras dos horas de cultivo en metanol. En la figura 14A, se muestra la reacción positiva para AO dentro de los peroxisomas intactos, así como en algunos peroxisomas que se encuentran dentro de la vacuola. No se observa positividad de la reacción en ningún otro sitio de la célula.

TABLA 3

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ALCOHOL OXIDASA Y CATALASA EN CELULAS CONTROL Y CELULAS EXPERIMENTALES TIPO I

TIEMPO (hrs.)	ALCOHOL OXIDASA <sup>§</sup>		CATALASA	
	Células CEI	Células Control	Células CEI	Células Control
0	0	0	2.9±0.8 <sup>¶</sup>	3.1±0.2
4	0.7±0.2	0.7±0.3	93.0±2.1	98.0±1.8
8	1.2±0.1	2.5±0.3	144.0±1.5	148.0±1.8
12	2.3±0.5	4.2±1.2	177.0±1.6	173.0±2.0
24	2.5±0.2	4.7±1.5	196.0±2.5	190.0±3.1

<sup>§</sup>La actividad de alcohol oxidasa se expresa como Unidades • mg proteína<sup>-1</sup> y la de catalasa como  $\Delta A_{240} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ .

<sup>¶</sup>Cada valor representa la media de tres determinaciones  $\pm$  DS.

#### 3.4.4 Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico

Se realizaron estudios de citoquímica e inmunocitoquímica para identificar una probable relación existente entre los valores disminuidos de la actividad específica de AO obtenidos en las células CEI, con el posible importe deficiente de la AO hacia los peroxisomas.

Los estudios citoquímicos mostraron que en las células CEI la actividad de AO estaba presente desde las primeras dos horas de cultivo en metanol. En la figura 14A, se muestra la reacción positiva para AO dentro de los peroxisomas intactos, así como en algunos peroxisomas que se encuentran dentro de la vacuola. No se observa positividad de la reacción en ningún otro sitio de la célula.



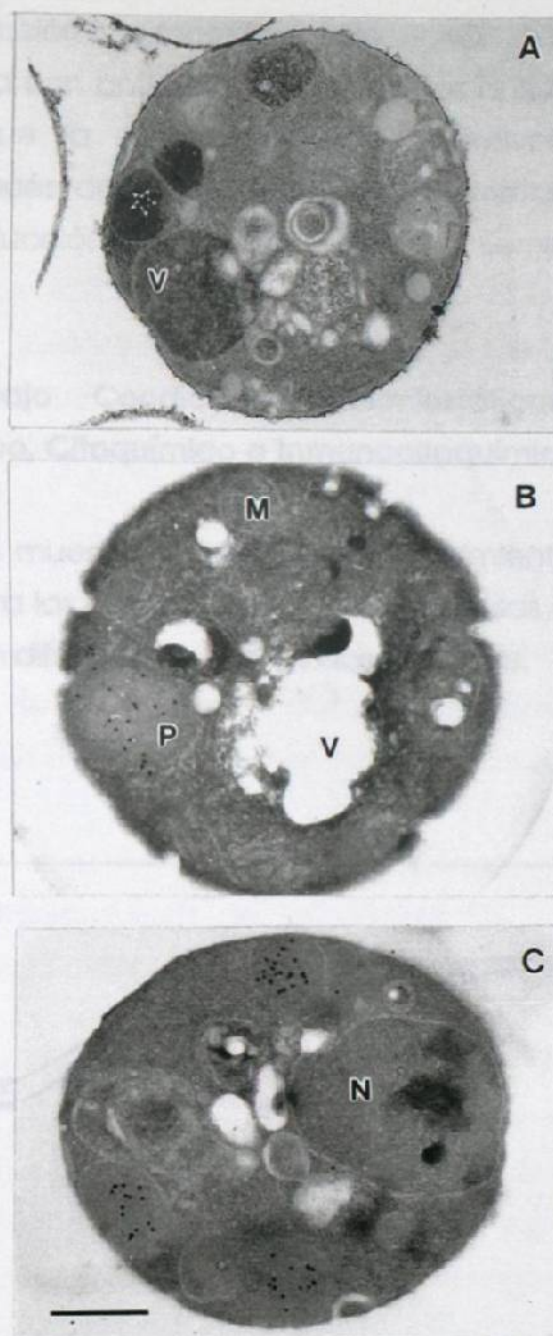


Figura 14. Micrograffas Electrónicas de Transmisión del Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico para la Localización Subcelular de AO en las Células CEI. Las células se pre-cultivaron en glucosa al 0.5 % y posteriormente se transfirieron a medio con metanol al 0.5 %. A) muestra obtenida a las 2 hrs. de cultivo; se observa que la actividad de AO (\*) se localiza dentro de los peroxisomas intactos así como en un peroxisoma que se encuentra dentro la vacuola digestiva. B) se observan las partículas de oro coloidal dentro de los peroxisomas, lo que indica la localización de la AO dentro de estos organelos. C) muestra obtenida después de 4 hrs. de cultivo, que muestra la inducción de la AO con respecto al tiempo. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria, V, vacuola. La barra representa 0.5  $\mu\text{m}$ .

La localización subcelular de AO se confirmó por inmunocitoquímica con anticuerpos específicos anti-AO. En la figura 14B se demuestra que la AO se localiza exclusivamente dentro del peroxisoma. Después de 4 hrs. de cultivo en metanol, se observó un aumento en la inducción de AO con respecto al tiempo de cultivo (figura 14C).

### 3.4.5 Análisis bajo Condiciones Quimiostáticas (Ultraestructural, Bioquímico, Citoquímico e Inmunocitoquímico)

La figura 15 muestra la cinética de crecimiento bajo condiciones quimiostáticas para las células CEI y para las células control. Se observa que no existe gran diferencia entre las dos cinéticas.

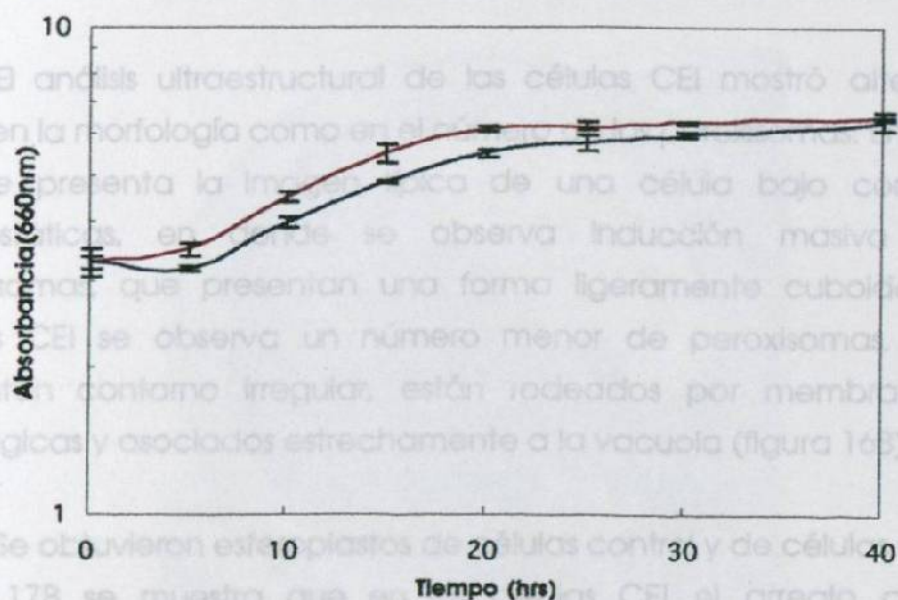


Figura 15. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEI (—) bajo Condiciones Quimiostáticas (glucosa 0.25 %/Metanol 0.30 %). Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  DS.

En ambos casos, durante el cultivo en glucosa se obtuvo una  $DO_{660}$  de 3.3 unidades. En el cultivo de células CEI la  $DO_{660}$  aumentó paulatinamente hasta 6.6 unidades después de la adición de la mezcla glucosa/metanol, ésta  $DO_{660}$  permaneció constante durante todo el cultivo; mientras que en el cultivo de células control se obtuvo una  $DO_{660}$  ligeramente mayor (7.0 unidades de  $DO_{660}/mL$ ). Se determinó la concentración de glucosa y de metanol en el medio de cultivo para ambos cultivos en la fase de crecimiento en equilibrio, y no se detectó la presencia de estos sustratos, lo que indicó que las células los utilizaron por completo.

Se determinó la actividad específica de AO y la de catalasa en extracto libre de células. En las células CEI se obtuvo una actividad específica de AO de  $2.2 U(mg.proteína)^{-1}$ , valor significativamente más bajo que el obtenido en los cultivos control (8.0). La actividad de catalasa no se modificó.

El análisis ultraestructural de las células CEI mostró alteraciones tanto en la morfología como en el número de los peroxisomas. En la figura 16A se presenta la imagen típica de una célula bajo condiciones quimiostáticas, en donde se observa inducción masiva de los peroxisomas, que presentan una forma ligeramente cuboide. En las células CEI se observa un número menor de peroxisomas, los que presentan contorno irregular, están rodeados por membranas pre-autofágicas y asociados estrechamente a la vacuola (figura 16B).

Se obtuvieron esferoplastos de células control y de células CEI. En la figura 17B se muestra que en las células CEI el arreglo cristaloides característico de la AO se encuentra dentro de los peroxisomas y en el interior de la vacuola digestiva, lo que indica degradación peroxisomal. En la figura 17A se muestra que en las células control, el arreglo cristaloides de la AO se encuentra únicamente en los peroxisomas.



La degradación de peroxisomas en las células CEI se confirmó por inmunocitoquímica con anticuerpos específicos anti-AO y marcaje con oro coloidal-proteína A. En la figura 17C se observa que la marca se encuentra localizada en un peroxisoma en proceso de degradación en el interior de la vacuola autofágica.

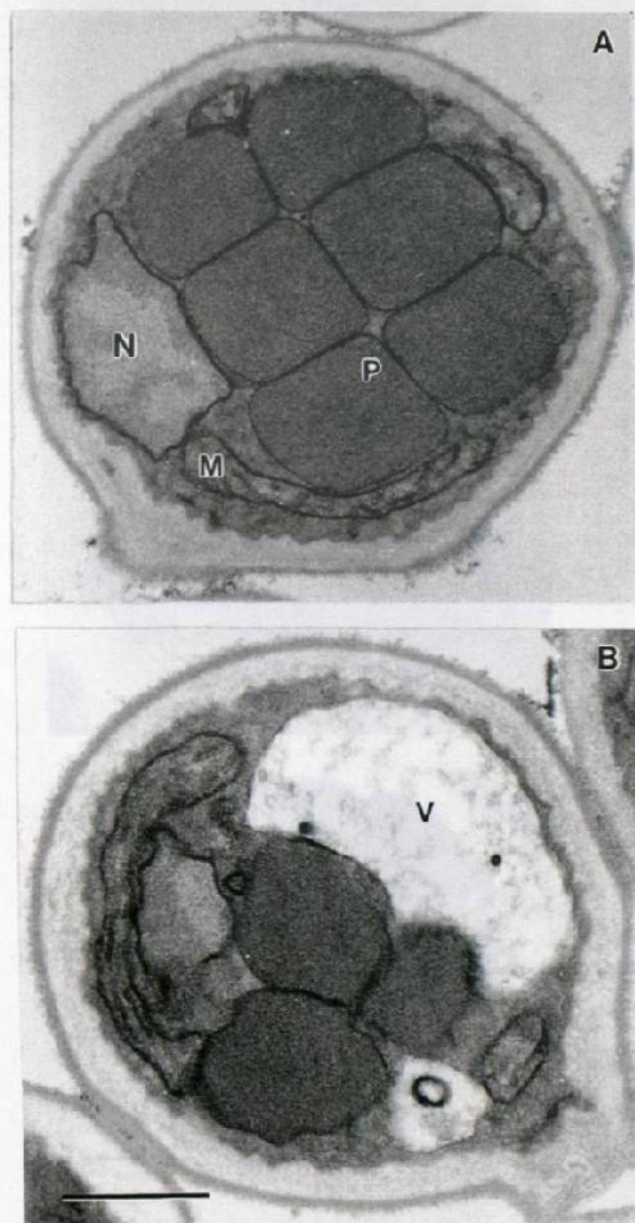


Figura 16. Micrográficas Electrónicas de Transmisión de las Células Control y de las Células CEI bajo Condiciones Quimiostáticas. A) muestra la inducción peroxisomal característica de células control bajo estas condiciones. B) se observa en las células CEI un menor número de peroxisomas con morfología anormal y rodeados por la vacuola autofágica. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria, V, vacuola. La barra representa 0.5  $\mu\text{m}$ .

### 3.5 Aislamiento y Caracterización de Células de *H. polymorpha leu1-1* con Disfunción Peroxisomal



Figura 17. Micrográficas Electrónicas de Transmisión de esferoplastos de las Células Control y de las Células CEI bajo Condiciones Quimiostáticas. A) Células control: muestra el arreglo cristalolide de la AO (\*) dentro del peroxisoma. Células CEI: B) muestra la estructura cristalolide dentro de la vacuola; C) muestra la localización de la AO dentro de un peroxisoma en proceso de degradación. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria, V, vacuola. La barra representa 0.5  $\mu\text{m}$ .



### 3.5 Aislamiento y Caracterización de Células de *H. polymorpha leu1-1* con Disfunción Peroxisomal.

De acuerdo con los datos ultraestructurales, bioquímicos fisiológicos, citoquímicos e inmunocitoquímicos obtenidos, las células CEI presentaron disfunción peroxisomal, sin embargo esta disfunción no se caracterizaba por la ausencia total de peroxisomas, sino por la presencia de peroxisomas con características morfológicas y funcionales deficientes. Debido a esto se procedió a realizar experimentos para aislar células de una cepa de *H. polymorpha* con un marcador auxotrófico, que presentara las mismas características de disfunción peroxisomal que las células CEI. Estas células serían utilizadas para caracterizar a nivel molecular el daño producido por la peroxisomicina A<sub>1</sub>.

Después de incubar células de *H. polymorpha leu1-1* en presencia de 5 µg/mL de peroxisomicina A<sub>1</sub> y de analizar las muestras por MET, se observó que las células contenían peroxisomas cuya membrana se encontraba fragmentada (figura 18). De esta forma se reprodujo el mismo efecto de la peroxisomicina A<sub>1</sub> obtenido en la sección 3.2, en esta ocasión sobre una cepa de levaduras con un marcador auxotrófico.

Se utilizó la técnica de replicación en placa y se aisló una colonia de células que presentó dificultad para crecer en metanol en medio sólido (figura 19). Estas células se denominaron células experimentales tipo II (células CEII) para diferenciarlas de las células de la cepa prototrófica aislada inicialmente (células CEI).

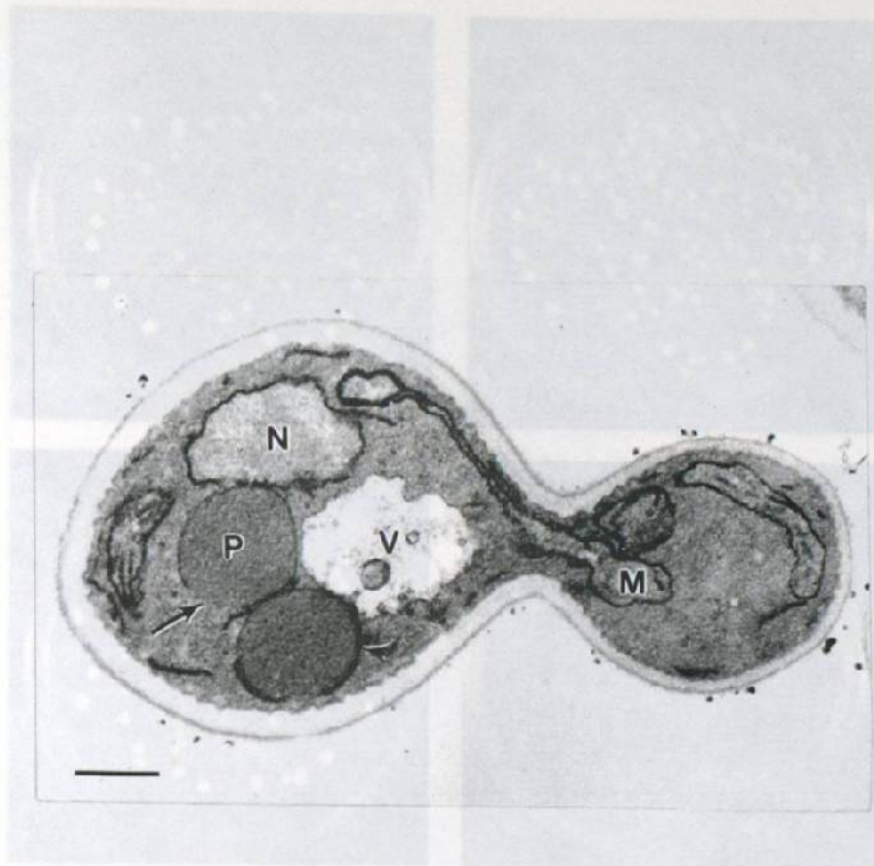


Figura 18. Micrografía Electrónica de Transmisión de Células de *Hansenula polymorpha leu1-1* Incubadas en Presencia de  $5 \mu\text{g/mL}$  de Peroxisomicina  $A_1$ , Obtenidas Después de 60 Minutos. Se muestra el daño sobre un peroxisoma observándose una interrupción de la continuidad de la membrana peroxisomal (flecha), mientras que el otro peroxisoma se encuentra rodeado por una membrana pre-autofágica (punta de flecha). N, núcleo; M, mitocondria; P, peroxisoma; V, vacuola. La barra representa  $0.5 \mu\text{m}$ .

Las células CEII se cultivaron en metanol y se analizaron ultraestructuralmente. Se observó que las células CEII presentaron características muy similares a las células CEI. En la figura 20A se muestra que las células CEII presentan peroxisomas de forma irregular, rodeados por membranas pre-autofágicas. A tiempos de cultivo prolongados (12 hrs) se observó que las células contenían un menor número de peroxisomas y que estos eran de tamaño pequeño (figura 20B); algunos peroxisomas se encontraban en diferentes estados de degradación (figura 20C).

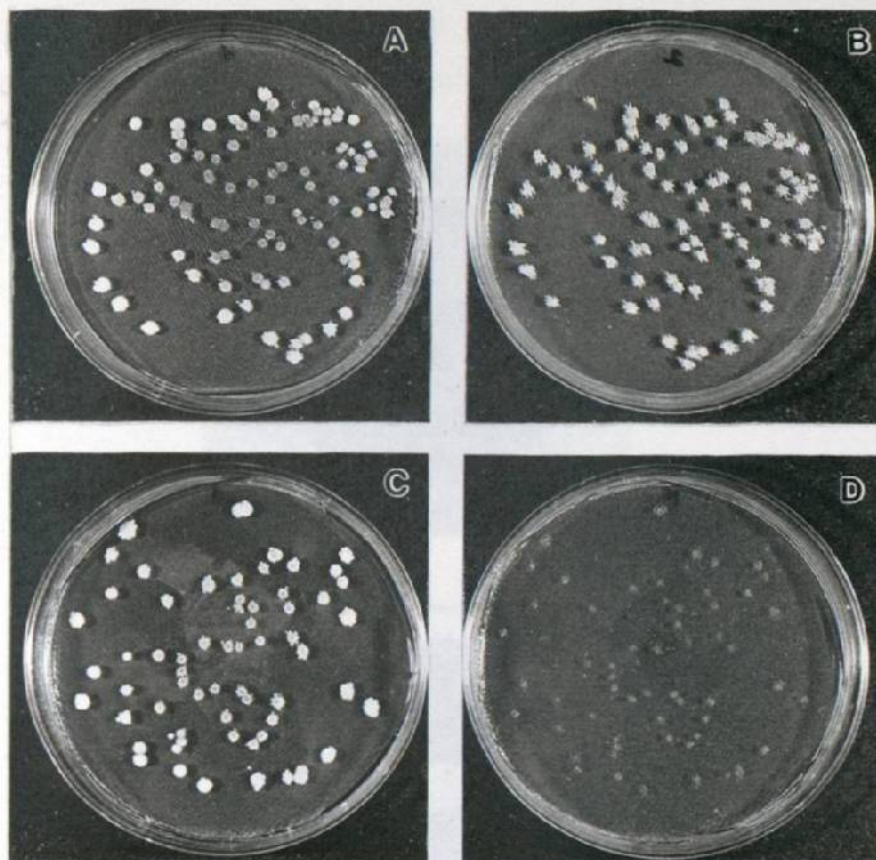


Figura 19. Técnica de Replicación en Placa. Las células control sin peroxisomicina A<sub>1</sub> y las células incubadas en presencia de 5 µg/mL de peroxisomicina A<sub>1</sub> se diluyeron, se sembraron en placas de agar con glucosa al 0.5 % y posteriormente se replicaron sobre placas de agar con metanol al 0.5 %. Panel superior: Células control; A) glucosa, B) metanol. Panel inferior: C) muestra la progenie de la colonia deficiente en el crecimiento en metanol (células CEII) que se seleccionó y se sembró en glucosa; D) las colonias formadas en glucosa se replicaron en placas de agar con metanol; no se observa crecimiento en este sustrato.

Las células CEII se cultivaron en metanol y se analizaron ultraestructuralmente. Se observó que las células CEII presentaron características muy similares a las células CEI. En la figura 20A se muestra que las células CEII presentan peroxisomas de forma irregular, rodeados por membranas pre-autofágicas. A tiempos de cultivo prolongados (12 hrs.) se observó que las células contenían un menor número de peroxisomas, y que estos eran de tamaño pequeño (figura 20B); algunos peroxisomas se encontraban en diferentes estadios de degradación (figura 20C).