

En la fase estacionaria de crecimiento se observó que las células CEII degeneraron con mayor rapidez que las células CEI bajo las mismas condiciones de cultivo, como consecuencia en el cultivo de células CEII cesó el crecimiento y en el cultivo de células CEI se observó desorden en el cultivo de células CEII (figura 21A y 21B).

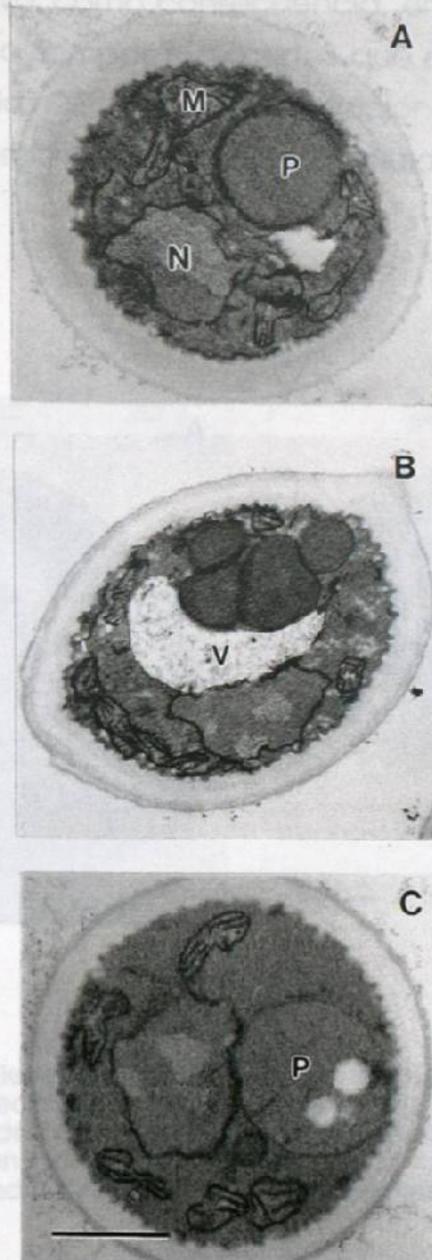


Figura 20. Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células CEII. Las células se pre-cultivaron en glucosa al 0.5 % y posteriormente se transfirieron a medio con metanol al 0.5 %. A) muestra obtenida después de 4 hrs. de cultivo en donde se observa la asociación entre la membrana pre-autofágica y el peroxisoma de las células CEII. B) muestra obtenida a las 12 hrs. de cultivo en donde se observa anomalía en el número y tamaño de los peroxisomas presentes en las células CEII C) muestra un peroxisoma en proceso de degradación. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria; V, vacuola. La barra representa 0.5 μm .

En la fase estacionaria de crecimiento se observó que las células CEII degeneraron con mayor rapidez que las células CEI bajo las mismas condiciones de cultivo; como consecuencia, en el cultivo de células CEII cesó el crecimiento a tiempos más cortos que en el cultivo control y que en el cultivo de células CEI. Bajo estas condiciones, en el cultivo de células CEII se observó desorganización y muerte celular (figura 21A y 21B).

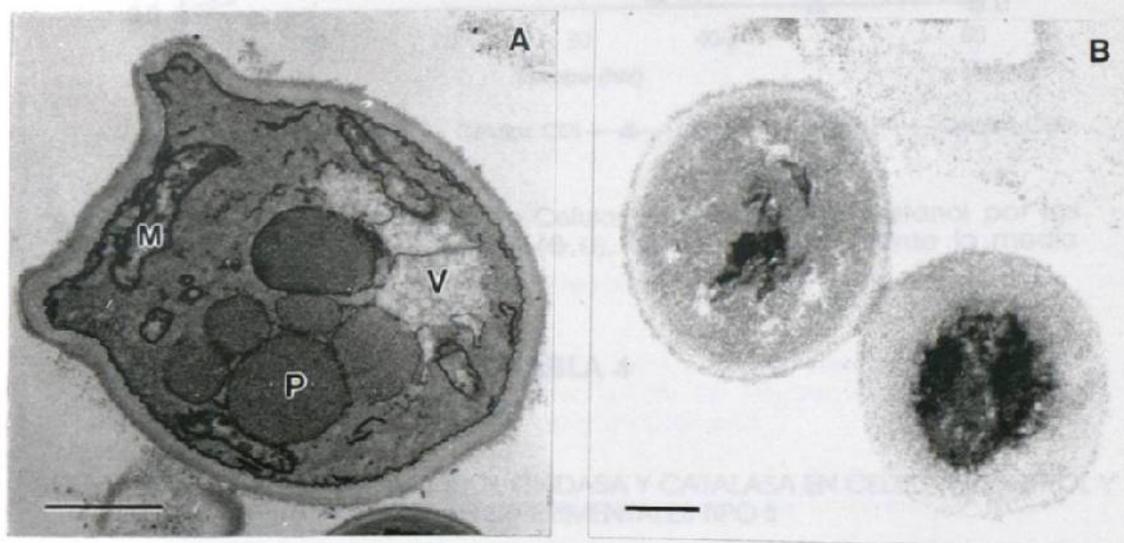


Figura 21. Micrográficas Electrónicas de Transmisión de las Células CEII Obtenidas en la Fase Estacionaria de Crecimiento. A) muestra obtenida después de 24 hrs. de cultivo en donde se observa desorganización celular generalizada. B) muestra obtenida a las 48 hrs. de cultivo en donde se observan varias células muertas. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria; V, vacuola. La barra representa 0.5 μm .

Se analizó la cinética de crecimiento celular en metanol, la capacidad de utilización del metanol y se determinó la actividad específica de AO y la de catalasa. Se obtuvieron resultados muy similares a los obtenidos para las células CEI (figura 22 y tabla 4).

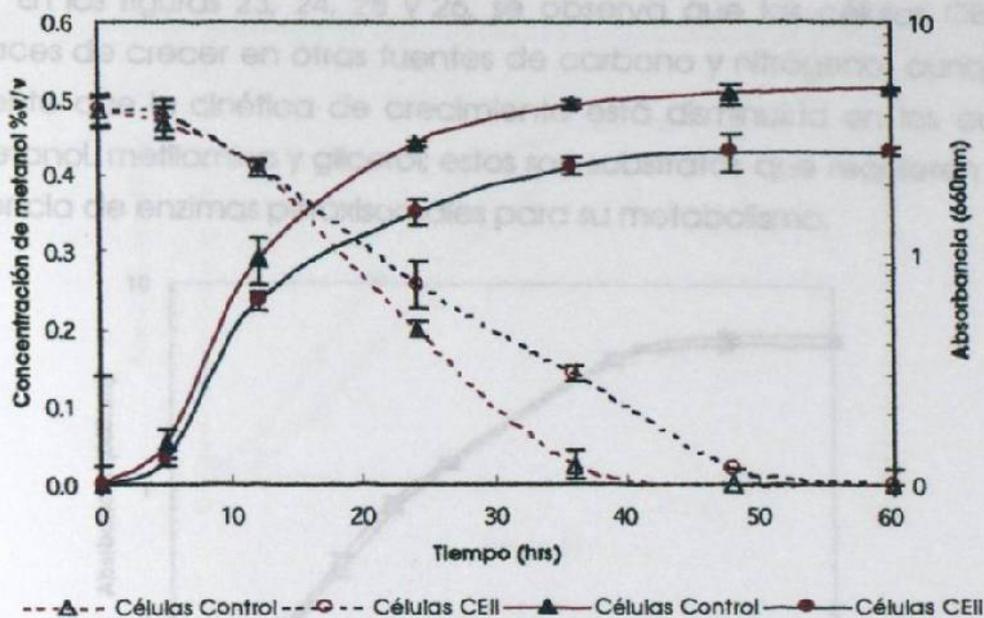


Figura 22. Cinética de Crecimiento Celular y Utilización de Metanol por las Células Control ($\blacktriangle, \triangle$) y Células CEII (\bullet, \circ). Cada valor representa la media de tres determinaciones \pm DS.

Figura 23. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEII (---) en Glucosa/Sulfato de Amonio. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

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

TIEMPO (hrs.)	ALCOHOL OXIDASA [§]		CATALASA	
	Células CEII	Células Control	Células CEII	Células Control
0	0	0	2.60 \pm 0.20 [¶]	3.00 \pm 0.10
4	0.65 \pm 0.10	0.72 \pm 0.20	98.00 \pm 2.20	102.00 \pm 1.50
8	1.60 \pm 0.20	2.80 \pm 0.10	156.00 \pm 1.20	158.00 \pm 1.40
12	2.70 \pm 0.30	4.60 \pm 0.80	182.00 \pm 1.40	178.00 \pm 2.10
24	2.80 \pm 0.20	5.00 \pm 1.20	193.00 \pm 2.20	186.00 \pm 3.50

[§]La actividad de alcohol oxidasa se expresa como Unidades \cdot mg proteína⁻¹ y la de catalasa como $\Delta A_{240} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

[¶]Cada valor representa la media de tres determinaciones \pm DS.

En las figuras 23, 24, 25 y 26, se observa que las células CEII son capaces de crecer en otras fuentes de carbono y nitrógeno, aunque es evidente que la cinética de crecimiento está disminuída en los cultivos con etanol, metilamina y glicerol; estos son sustratos que requieren de la presencia de enzimas peroxisomales para su metabolismo.

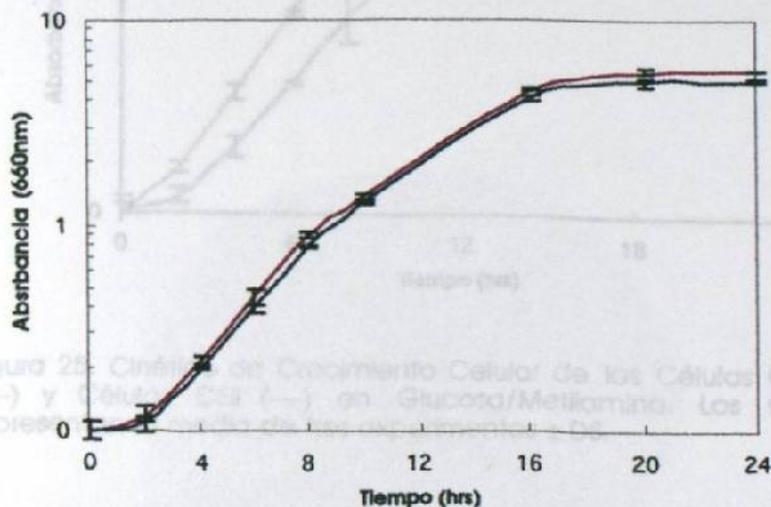


Figura 22. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEII (—) en Glucosa/Metilamina. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

Figura 23. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEII (—) en Glucosa/Sulfato de Amonio. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

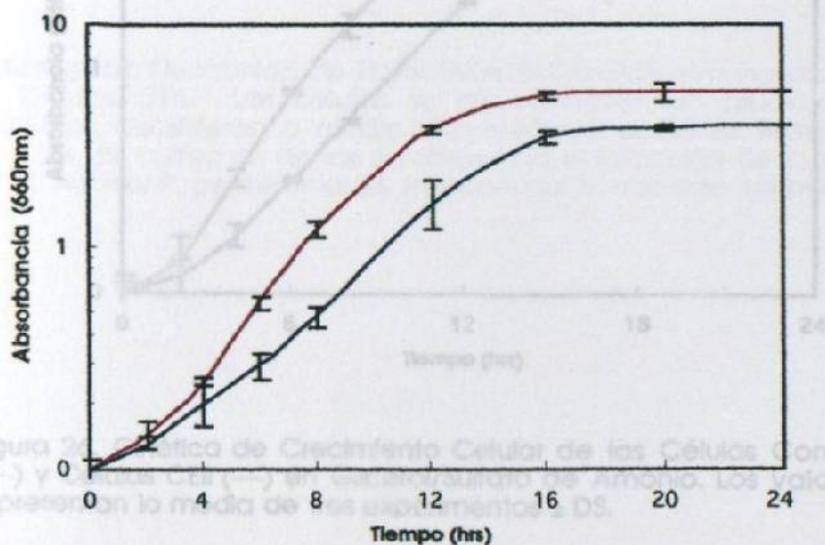


Figura 24. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEII (—) en Etanol/Sulfato de Amonio. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

Figura 24. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEII (—) en Etanol/Sulfato de Amonio. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

La figura 27 muestra el efecto de la adición de metilamina a la AQ, en donde se observa un aumento en la absorbancia a 660nm, lo que indica que el tiempo de crecimiento celular es mayor.

Con estos resultados se puede concluir que las células control presentaron un crecimiento celular mayor que las células CEII.

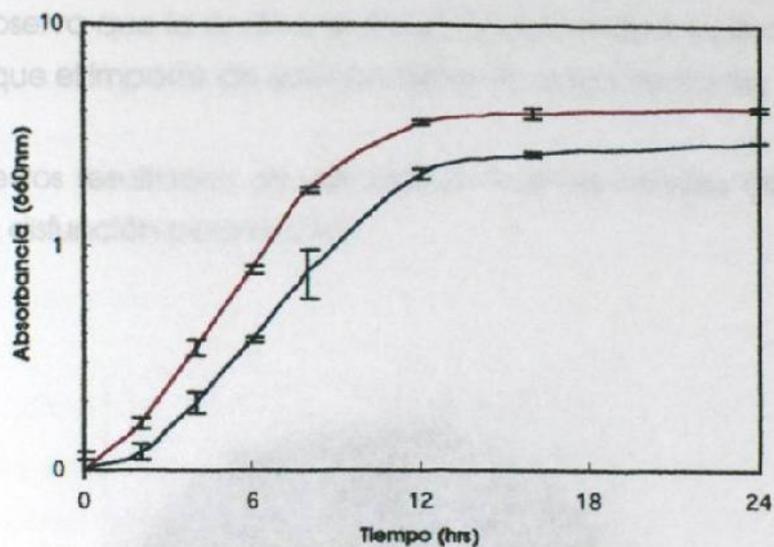


Figura 25. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEII (—) en Glucosa/Metilamina. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

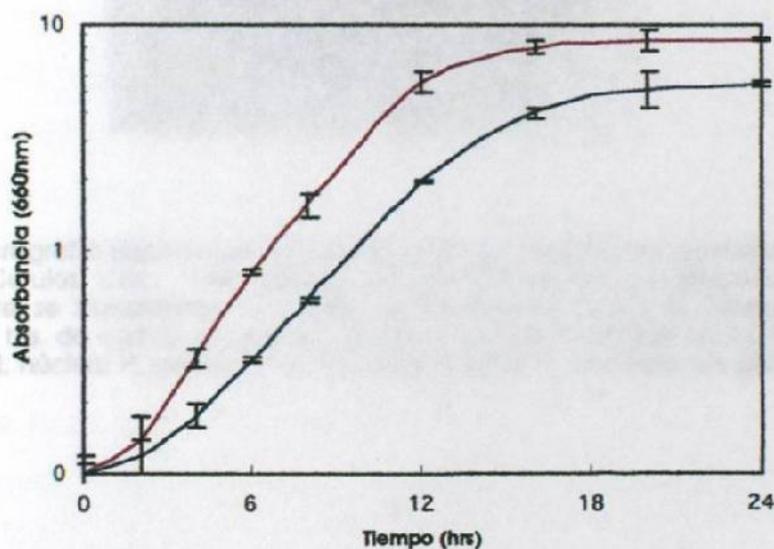


Figura 26. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEII (—) en Glicerol/Sulfato de Amonio. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

La figura 27 muestra el análisis inmunocitoquímico para la AO, en donde se observa que la enzima se localiza dentro de los peroxisomas, lo que indica que el importe de esta proteína no está afectado.

Con estos resultados, se estableció que las células CEII también presentaron disfunción peroxisomal.

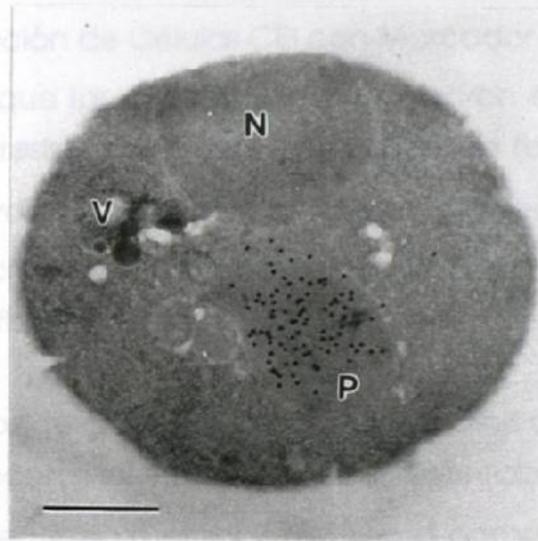


Figura 27. Micrografía Electrónica de Transmisión del Análisis Inmunocitoquímico para AO en las Células CEII. Las células se pre-cultivaron en glucosa al 0.5 % y posteriormente se transfirieron a medio con metanol al 0.5 %. Muestra obtenida después de 4 hrs. de cultivo en donde se observa la localización de la AO dentro del peroxisoma. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria; V, vacuola. La barra representa 0.5 μ m.

3.5.1 Análisis Genético

Para establecer 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 tal efecto, se obtuvo una cepa de células CEI con marcador auxotrófico.

3.5.1.1 Obtención de Células CEI con Marcador Auxotrófico *ura⁻*.

Después de que las células CEI se incubaron en presencia de 5-FOA y las colonias resistentes a este compuesto se replicaron en medio selectivo, se obtuvo una colonia que mostró un fenotipo *Mut⁻ura⁻*, es decir incapaz de crecer en metanol e incapaz de crecer en ausencia de uracilo (auxotrófica para uracilo).

3.5.1.2 Ensayos de Complementación y Análisis de Esporas al Azar.

Para establecer si el defecto que presentaban las células CEI (crecimiento deficiente en metanol; *Mut⁻*) era complementado por las células CEII, se realizaron experimentos de complementación genética. Las células diploides que se obtuvieron de la cruce entre las cepas CEI *Mut⁻ura⁻* y CEII *Mut⁻leu1-1* crecieron normalmente en metanol a la misma velocidad que las células control; así mismo, las células diploides obtenidas de la cruce entre las cepas CEI *Mut⁻ura⁻* y CEII *Mut⁻leu1-1* con sus respectivas cepas isogénicas que contenían marcadores complementarios, crecieron normalmente en metanol (sin marcadores; uracilo o leucina). Estos resultados indicaron que no hubo complementación entre ambas cepas CEI y CEII.

Por otro lado el análisis de esporas al azar, mostró que el 74 % de la progenie creció normalmente en metanol, lo que indicó que el defecto en ambas cepas es de carácter recesivo y además confirmó que no se

complementan entre ellas. La tabla 5 muestra el número de casos con respecto al fenotipo observado.

TABLA 5

ANALISIS DE ESPORAS AL AZAR

FENOTIPO	CASOS
<i>leu Mut⁻</i>	6
<i>leu Mut⁺</i>	35
<i>ura Mut⁻</i>	8
<i>ura Mut⁺</i>	7
<i>uraleu Mut⁻</i>	10
<i>uraleu Mut⁺</i>	34
TOTAL	100

CAPITULO 4

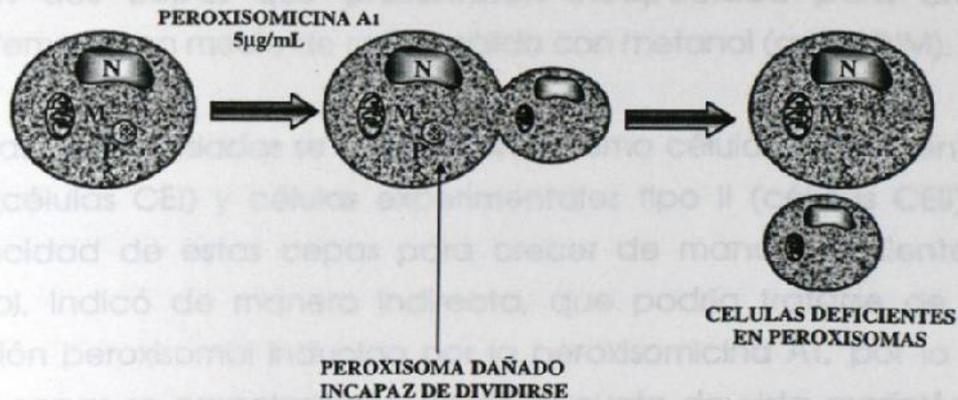
DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten aceptar la hipótesis de trabajo propuesta, ya que se aislaron dos cepas de la levadura *H. polymorpha* con disfunción peroxisomal, después de realizar cultivos en presencia de una dosis no letal (5 µg/mL) de peroxisomicina A1.

En la presente investigación no se consideró el establecer la capacidad mutagénica de la peroxisomicina A1. Sin embargo, es una duda que hasta el momento permanece y obliga a cuestionar: ¿es la peroxisomicina A1 un agente mutágeno?. Por lo anterior, es importante señalar los posibles mecanismos por los cuales la peroxisomicina A1 podría causar disfunción peroxisomal en células de *Hansenula polymorpha* (figura 28).

1. La peroxisomicina A1 podría dañar directamente a la membrana del peroxisoma, el cual sería incapaz de dividirse. Las células con peroxisomas dañados, darían lugar a células con deficiencia peroxisomal.
2. La peroxisomicina A1 podría afectar a la información genética relacionada con la maquinaria encargada de la síntesis de proteínas peroxisomales. Este daño podría causar ausencia total o parcial, o disfunción total o parcial de alguna(s) proteína(s) necesaria(s) para la adecuada formación de nuevos peroxisomas (por fisión de peroxisomas preexistentes). El daño podría traducirse en la producción de i) células deficientes en peroxisomas o ii) células con peroxisomas anormales debido a la incorporación de proteínas alteradas a los nuevos peroxisomas.

**POSIBLE MECANISMO I
EFECTO DIRECTO SOBRE LA MEMBRANA
PEROXISOMAL**



**POSIBLE MECANISMO I I
EFECTO SOBRE EL GENOMA NUCLEAR**

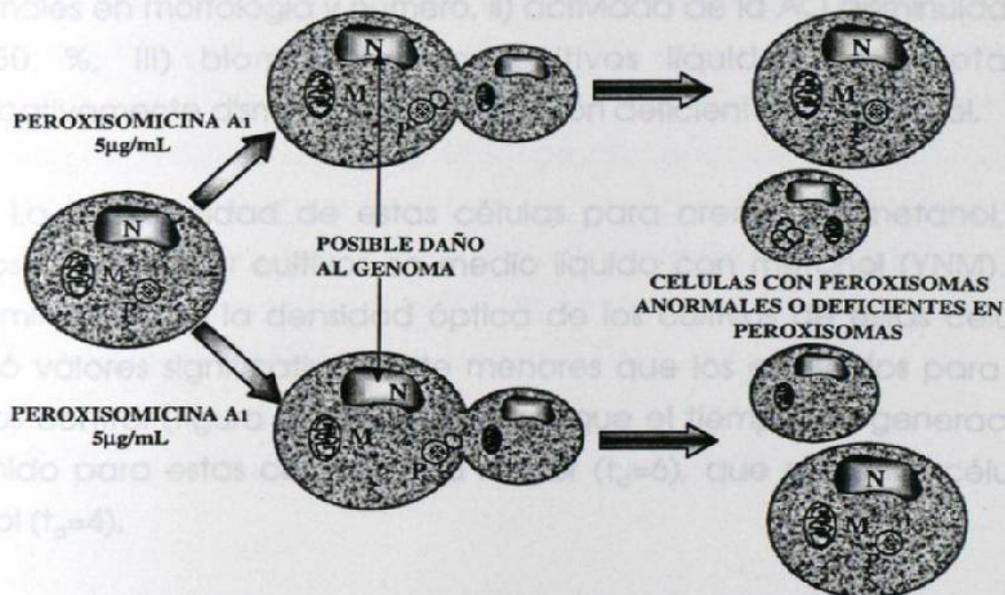


Figura 28. Esquema de los Mecanismos Posibles de Disfunción Peroxisomal Inducida por Peroxisomicina A1 sobre Células de *Hansenula polymorpha*. Se infiere que los experimentos deberán ser realizados bajo condiciones de cultivo en las cuales las células deberán presentar solo un peroxisoma. M, mitocondria; P, peroxisoma; N, núcleo.

Con base al esquema anteriormente expuesto, se realizaron cultivos de dos cepas de la levadura *Hansenula polymorpha* (CBS 4732 y NCYC *leu1-1*), en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de peroxisomicina A1 y se aislaron dos cepas que presentaron incapacidad para crecer eficientemente en medio de cultivo sólido con metanol (agar YNM).

Las cepas aisladas se denominaron como células experimentales tipo I (células CEI) y células experimentales tipo II (células CEII). La incapacidad de estas cepas para crecer de manera eficiente en metanol, indicó de manera indirecta, que podría tratarse de una disfunción peroxisomal inducida por la peroxisomicina A1, por lo que ambas cepas se caracterizaron desde el punto de vista morfológico, fisiológico y bioquímico.

Las células CEI y las células CEII se cultivaron en medio con metanol y presentaron las siguientes características: i) peroxisomas anormales en morfología y número, ii) actividad de la AO disminuida en un 50 %, iii) biomasa en los cultivos líquidos con metanol significativamente disminuida y iv) utilización deficiente del metanol.

La incapacidad de estas células para crecer en metanol, se demostró al realizar cultivos en medio líquido con metanol (YNM). La determinación de la densidad óptica de los cultivos de estas células mostró valores significativamente menores que los obtenidos para las células control (figura 9), lo que explica que el tiempo de generación obtenido para estas células fuera mayor ($t_g=6$), que el de las células control ($t_g=4$).

Se observó que durante los cultivos líquidos, las células CEI y las células CEII se caracterizaron por la incapacidad para utilizar eficientemente el metanol (figura 9), sin embargo al cultivar las células bajo condiciones quimiostáticas (en mezcla glucosa/metanol), se demostró que estas células utilizaron ambos sustratos, ya que se

observó un incremento en la biomasa comparable a la del cultivo control (figura 15).

Estos resultados indican, muy probablemente, que los dos tipos de células utilizaron la glucosa como fuente de carbono y el metanol como una fuente adicional de energía. Lo anterior sugiere que: i) en estas células se lleva a cabo de manera eficiente la vía de desasimilación citosólica del formaldehído (figura 29), y que ii) el crecimiento de ambas cepas en cultivos líquidos con metanol como única fuente de carbono y energía, experimenta desventajas energéticas específicas, en particular en el catabolismo del metanol. Esas desventajas podrían estar más relacionadas con una disfunción peroxisomal que con otras fallas en el metabolismo intermediario del metanol.

Una probable explicación a estos resultados, podría estar relacionada con el papel de los peroxisomas en el metabolismo del metanol, que bajo condiciones normales está representado principalmente por tres eventos (figura 29): i) la oxidación inicial del metanol por la AO con la subsecuente producción de formaldehído y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ii) la descomposición del H_2O_2 por la catalasa y de manera muy importante, iii) la propiedad de la membrana peroxisomal en la regulación del flujo del formaldehído hacia la vía de la desasimilación, para la producción de energía, o hacia la asimilación, para la producción de biomasa.

posibilidades: 1). Una posibilidad sería aquella en la que si los niveles de ATP citosólico fueran adecuados, se mantendría una fuerza motriz de protones a través de la membrana peroxisomal, lo que permitiría la eficiente producción y transporte de xu-5-P, con la consecuente asimilación del formaldehído para la producción de biomasa (figura 29). En el caso contrario, si las condiciones fisiológicas de la célula fueran tales que el nivel energético estuviera muy por debajo del normal, esto causaría una disminución de xu-5-P y su transporte hacia el peroxisoma no sería posible. Esta reducción en la fijación del formaldehído peroxisomal causaría un aumento en la velocidad de difusión del formaldehído desde el peroxisoma hacia el citosol, en donde éste se acoplaría con el glutatión (GSH) citosólico para la vía desasimilatoria, lo que causaría un aumento en los niveles de ATP en la célula, sin embargo, esto provocaría una baja producción de biomasa.

Además, la membrana peroxisomal desempeña un papel importante como barrera para el GSH citosólico. La presencia de GSH es esencial para mantener el crecimiento de las células en metanol debido a que el formaldehído, en su forma libre, no es sustrato para la formaldehído deshidrogenasa, sino su hemimercaptal, el S-hidroxi metilglutatión^{66,67} (GS-CH₂OH), y en esta forma no es accesible para la vía asimilatoria (reacción catalizada por la dihidroxiacetona sintasa)⁶⁸.

Es importante también precisar que, en condiciones normales, la degradación del H₂O₂ por la catalasa se debe realizar dentro del peroxisoma, de esta forma se previene que la degradación se lleve a cabo por medio de otros procesos (citocromo c peroxidasa o glutatión peroxidasa) que consumen más energía, lo que provoca una reducción de la biomasa⁵⁶.

La caracterización de las células CEII y células CEII durante los cultivos con metanol sugirió que la disfunción peroxisomal podría

estar relacionada en parte, con una posible alteración en la membrana peroxisomal. Lo anterior se fundamenta en la aberración morfológica de los peroxisomas que se observó en estas células, y resultó más convincente al observar alrededor de los peroxisomas membranas pre-autofágicas, que posteriormente se fusionaron con la vacuola, en donde ocurrió la degradación de los organelos. La degradación de peroxisomas se observó después de 8 hrs. de cultivo en metanol, tiempo en el que los peroxisomas se multiplicaron y también aumentaron de tamaño, sin embargo, se demostró que en particular los peroxisomas grandes y maduros fueron sujetos a degradación, observándose con frecuencia células que contenían algunos peroxisomas relativamente pequeños en conjunto con uno o pocos peroxisomas grandes en diferentes estados de degradación. La degradación peroxisomal se observó con mayor frecuencia después de 12 hrs. de cultivo en metanol, lo que ocasionó a mayores tiempos de cultivo una desorganización celular generalizada que finalmente provocó la muerte celular.

Estas observaciones permitieron apoyar la hipótesis de la disfunción peroxisomal, ya que si la membrana peroxisomal es anormal será incapaz de balancear de manera adecuada el flujo del formaldehído, y en coincidencia con las observaciones mencionadas anteriormente, el formaldehído se acoplaría al glutatión (GSH) para formar S-formilglutatión. Este último, como ya se expuso, no es sustrato para la DHAS, por consiguiente, si existiera una pequeña cantidad de formaldehído libre, éste se utilizaría para la vía de la asimilación (producción de biomasa). Por el contrario, el S-formilglutatión es sustrato para la vía de la desasimilación, lo que resultaría en la generación de NADH y este se utilizaría para la producción de ATP por la vía mitocondrial. Esto podría explicar en parte la capacidad disminuida de las células CEI y de las células CEII para utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía.

En el cultivo quimiostático para células CEI y células CEII, también se observó una elevada tasa de recambio peroxisomal, por consecuencia, las células contenían un número menor de peroxisomas, lo que coincidió con la disminución en la actividad específica de AO ($2.2 \text{ U/mg} \cdot \text{proteína}^{-1}$) que se determinó en los extractos (ELC). Estos hallazgos, coinciden con los obtenidos por Titorenko y cols.^{69,70} en estudios realizados en células mutantes deficientes en la utilización de metanol (Mut⁻), en particular en células mutantes *pss⁻*. Estas células se caracterizan por presentar anomalías en la morfología peroxisomal, lo que causa que en los cultivos con metanol se observe una elevada tasa de recambio de los peroxisomas en estas células mutantes. Titorenko y cols. sugieren que la disfunción peroxisomal de las células mutantes *pss⁻* muy probablemente se debe a un defecto en las propiedades de transporte de la membrana peroxisomal, en particular, a la pérdida de la fuerza motriz de protones a través de la membrana, ya que se demostró que todas las enzimas involucradas en el metabolismo del metanol estaban presentes y activas en su sitio correcto, es decir dentro del peroxisoma, sin embargo se observó una elevada tasa de recambio peroxisomal.

Van der Klei y cols.⁷¹ obtuvieron una respuesta similar después de que cultivaron células de *H. polymorpha* en metanol y posteriormente se incubaron en presencia de iones cianuro, en donde se observó degradación de peroxisomas. Los autores sugieren que los iones cianuro provocan la inactivación irreversible de la AO, ya que al transferir las células que estuvieron en presencia de cianuro, a medio con metanol en ausencia de cianuro, se observó degradación de los peroxisomas que contenían AO inactiva, observándose de manera simultánea desarrollo de nuevos peroxisomas (por fisión de los peroxisomas no afectados).

Las observaciones anteriores sugieren que la degradación de peroxisomas es un proceso que requiere de un control muy preciso⁷² y que las señales que inician el proceso de recambio de peroxisomas, no están dirigidas contra las proteínas de matriz, sino hacia la membrana peroxisomal⁵⁶. Los autores suponen que este sistema de traducción de señales provee a las células la capacidad para identificar a los peroxisomas que deben ser degradados.

Lo anterior sugiere que la elevada tasa de recambio peroxisomal observada en las células experimentales podría atribuirse a la morfología aberrante que estos organelos presentan, y podría explicar los valores disminuidos en la actividad de la AO obtenidos en los cultivos. Además, estos hallazgos coinciden con los descritos por van der Klei y cols., lo que sugiere que probablemente en las células experimentales la degradación no está dirigida en contra de la AO, ya que se demostró por citoquímica, que los peroxisomas tanto intactos como aquellos en proceso de degradación contenían AO activa.

Por otro lado, el análisis genético reveló que ambas cepas afectadas, no se complementan entre ellas. Esto no necesariamente significa que el defecto en ambas cepas es recesivo y en diferentes genes, aunque es la explicación más adecuada a los resultados obtenidos, los que coinciden con los obtenidos por Titorenko y cols.^{69,70}. Estos investigadores observaron que las mutaciones en diferentes alelos de los mismos genes en células mutantes deficientes de peroxisomas, no se complementaban entre ellas, y concluyeron que se debía a que las células mutantes presentaban diferentes frecuencias de recombinación.

Debido a que en el presente trabajo solamente se obtuvieron dos colonias Mut⁻ (deficientes en la utilización del metanol) después de la exposición a la peroxisomicina A₁, esta baja frecuencia podría interpretarse como un evento que representa mutaciones espontáneas.

A este respecto, el genoma de las cepas de *Hansenula polymorpha* que se utilizaron, tienen la característica de ser muy estables, y la probabilidad de que se presenten mutaciones es muy escasa, bajo condiciones normales de laboratorio.

Por otro lado, es importante mencionar que existe en la literatura por lo menos un reporte en el que se demuestra que un medicamento con estructura que presenta ciertas semejanzas con la estructura de la peroxisomicina A₁, es capaz de afectar la proliferación peroxisomal en células de levadura⁷³. La adriamicina (*clorhidrato de doxorubicina*; ADRIAMYCIN, RUBREX) es un antibiótico antraciclínico que se cuenta entre los agentes antitumorales más importantes. Este medicamento posee una estructura anular tetraciclínica con fracciones de quinona e hidroxiantraquinona en anillos vecinos, lo que la hace tener cierta semejanza estructural con la peroxisomicina A₁. Keyani y cols. sugieren que la adriamicina causa una mutación en la maquinaria de proliferación peroxisomal. Por lo tanto, no se puede descartar la posibilidad de que la peroxisomicina A₁ tenga la capacidad de causar un efecto mutagénico sobre células de levadura. En este sentido, solamente se puede especular que el crecimiento lento irreversible que presentaron las células CEI y CEII durante los cultivos en metanol podría atribuirse a que la peroxisomicina A₁ probablemente causó una mutación. Esta mutación podría inducir la sobreexpresión (o represión) de un gen específico que tendría la capacidad de causar que las células experimentales presenten una alta resistencia a la peroxisomicina A₁. El fenotipo de resistencia a multidroga debido a la sobreexpresión de ciertos genes ha sido ampliamente documentado⁷⁴. Se ha descrito una amplia red de genes de levaduras involucrados en este fenómeno. Esta red de genes pertenecen a la superfamilia del cassette de unión a ATP que funcionan como una bomba de flujo de medicamentos. Uno de estos genes, el PAL1, codifica para una proteína esencial para la función peroxisomal⁷⁵.

Con base al esquema que se presenta en la figura 28, la información obtenida en este trabajo, permite sugerir que la disfunción peroxisomal de las células experimentales, no es producto de un daño directo a la membrana peroxisomal (mecanismo I), ya que no se obtuvieron células con deficiencia total de peroxisomas. Es importante señalar que los experimentos se llevaron a cabo bajo estrictas condiciones de cultivo en las cuales las células presentaron un solo peroxisoma. Con lo anterior no se descarta totalmente el primer mecanismo, debido a que al incubar células en presencia de peroxisomicina A₁, se observó en algunas células fragmentación de la membrana peroxisomal (figura 4 y figura 18) similar a la reportada por Sepúlveda y cols.²⁰. Este hallazgo, sugiere 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.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES

5.1 CONCLUSIONES

1. Se acepta la hipótesis de trabajo propuesta:
"Si el daño producido por la peroxisomicina A1 sobre la integridad peroxisomal a una dosis no letal fuera irreversible, sería posible obtener células con disfunción peroxisomal."
2. El daño selectivo e irreversible sobre la membrana peroxisomal en levaduras inducido por la peroxisomicina A1, es un evento reproducible y confirma que el peroxisoma es el organelo blanco de la peroxisomicina A1 en células de levadura.
3. Se aislaron dos cepas de *Hansenula polymorpha* con disfunción peroxisomal después de incubar células en presencia de una dosis de peroxisomicina A1 de 5 µg/mL de cultivo.
4. Los datos obtenidos en este trabajo indican que la disfunción peroxisomal probablemente fue producto de un daño al genoma de las células, sin embargo:
5. No se descarta la posibilidad de que la peroxisomicina A1 cause disfunción peroxisomal por daño directo a la membrana peroxisomal.

5.2 PERSPECTIVAS

Las cepas aisladas en este trabajo representan un organismo modelo para realizar los siguientes estudios:

1. Obtención de información sobre el mecanismo de acción de la peroxisomicina A₁ sobre los peroxisomas.
2. Caracterización molecular de la disfunción peroxisomal de las células CEI y CEII.
3. Análisis del efecto de compuestos relacionados estructuralmente con la peroxisomicina A₁ sobre las células CEI y CEII.
4. Investigación sobre la capacidad mutagénica de la peroxisomicina A₁ en levaduras.

5.3 CONTRIBUCIONES

Las cepas aisladas en este trabajo se utilizaron para realizar estudios en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Groningen, Holanda. En estos estudios se aisló un fragmento genómico que es capaz de complementar la incapacidad de las células CEII para crecer en metanol, devolviéndole la capacidad de formar peroxisomas normales tanto en número como en morfología (Vargas, Z. R. y cols. 1998, *Toxicon*, en prensa).

BIBLIOGRAFIA

1. Fernández, Nava R. (1989). El género *Karwinskia* Zucc. (Rhamnaceae) en México. Tesis de M. en C. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México., D.F. 89 p.
2. Clavijero, F. X. (1982). Plantas Nocivas y Extravagantes. En: Manuel León Portilla (Ed.), Historia de la Antigua o Baja California, Editorial Porrúa 3er ed., pp 31-33
3. Castillo, Nájera F. (1920). Contribución al estudio de la parálisis tóxica. Un envenenamiento colectivo con tullidora. en: F. Castillo-Nájera (De), Memorias del V Congreso Médico Mexicano. Dirección de Talleres Gráficos 1, pp. 240-244.
4. Padrón, Puyou F. (1951). Estudio Clínico experimental por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) en niños. Gac . Méd. Méx. 81, 299-311.
5. Del Poza, E. (1965). Los efectos paralizantes de la Tullidora. Estudios clínicos y Experimentales. Gac. Méd. Méx. 95, 179-182.
6. Escobar, A., and Nieto, D. (1965). Aspectos Neuropatológicos de la Intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio Experimental. Gac . Méd. Méx. 95, 163-177.
7. Puertolas, M., Nava, O., Medina, H., López, F. and Oyervides, J. (1984). Poliradiculoneurosis por *Karwinskia humboldtiana* Rev. Méd. I.M.S.S. (México), 22, 25-31.
8. Dewan, N.L., Henson, J.B., Dollahit, J.W. and Bridges, C.H. (1964). Toxic myo-degeneration in goats produced by feeding mature fruits from the coyotillo plant (*Karwinskia humboldtiana*) Pathol. Vet. 46, 215-226.
9. Charlton, K. and Pierce, K. (1970). Neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) I Poison. Pathol. Vet. 7, 385-407.
10. Usková, D., Ruiz, O.J., Lux, A. and Piñeyro, L.A. (1994). Tissue culture of *Karwinskia humboldtiana* -a plant producing toxins with antitumoural effects. Plant cell, Tissue and Organ Culture 36. 339-343.
11. Dreyer, D., Aral, I., Bachman, C., Anderson, W. R., Smith, R., Daves, G.D. (1975). Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. J. Am. Chem. Soc. 97, 4895-4990
12. Waksman, N. and Ramírez, R. (1992). Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia humboldtiana*. Rev. Latinoamer. Quím. 23/1 y 22/24, pp. 25-27.

13. Rivas, V., Torres, R. and Waksman, N., (1990). Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species. *Planta Medica*, 56, pp 562
14. Bermúdez, M. V., González -Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N., and Piñeyro, A. (1986). Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon* 24, pp 1091-1097
15. Bermúdez, M., Martínez, F., Salazar, M., Waksman, N. and Piñeyro, A. (1992). Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) in rat, guinea-pig, hamster and dog. *Toxicon* 30, pp. 1493
16. Piñeyro, L.A. (1990). Toxicidad selectiva in vitro de la toxina T514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. UANL. Monterrey, N.L. México.
17. Loomis, T. (1978). Numbers in Toxicology. In: T. Loomis, (De), *Essentials of Toxicology*, Lea and Febiger, Philadelphia, 2, pp. 13-28.
18. Piñeyro, A., Martínez de Villarreal, L. and González, R. (1994). In vitro selective toxicity of toxin T 514 from *K. humboldtiana* (Buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology*, 92, 227-227.
19. Lazarow, P. B. (1988). Peroxisomes. In: *The Liver: Biology and Pathology*. 2nd. edn. I.M. Arias, W.B. Jakovy, H. Popper, D. Schachter and D.A. Shafritz (Eds.). Raven Press Ltd., New York. pp 241-254.
20. Sepúlveda, J. S., van der Klei, I. J., Keizer, I., López, A. P., Harder, W. and Veenhuis, M. (1992). Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *FEMS. Microbiol. Lett.* 91, 207-212.
21. Moreno, S.M., Vargas, Z.R., Esquivel, E.D., Waksman, N., and Piñeyro, L.A. (1995). Effect of peroxisomcine and related anthracenones on catalase activity. *Planta Med.* 61 (4), pp. 337-340.
22. Moreno, S.M., Vargas, Z.R., Ballesteros, E.R., Piñeyro, L.A. and Sepúlveda, S.J. (1997). Studies on the effect of peroxisomcine on catalase activity in albino mice. *Toxicon* 35 (4), pp 777-783.
23. Rhodin, J. (1954). Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Tubule Cells of the Mouse Kidney. Thesis, Karolinska Institutet.
24. Rouiller, C., and Bernhard, W. (1965). "Microbodies" and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2 (Suppl.), pp. 355-359.
25. De Duve, C., and Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.*, 46, pp. 323-357.
26. Fahimi, H.D. and Sies, H. (1987). In: *Peroxisomes In Biology and Medicine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
27. van den Bosch, H., Schutgens, R.B.H., Wanders, R.J.A. and Tager, J.M. (1992). Biochemistry of peroxisomes *Annu. Rev. Biochem.* 61, pp. 157-197.
28. Müller, W.M., van der Krift, T.P., Krouwer, A.J.J., Wösten, H.A.B., van der Voort, L.H.M., Smaal, E.B. and Verkleij, A.J. (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.* 10, pp. 489-495.

29. Harder, W. and Veenhuis, M. (1989). Metabolism of one-carbon compounds, p.289-316 In: A.H. Rose and J.S. Harrison (Ed.), *The Yeasts*, volumen3 (segunda edición). Academic Press London.
30. Lazarow, P.B. (1984). The peroxisomal membrane. In: Bittar EE (ed) *Membrane structure and function*, vol 5. John Wiley and Sons Inc., pp 1-31.
31. Usuda, N., Yokota, S., Ichikawa, R., Hasimoto, T. and Nagata, T.(1991). Immunoelectron microscopic study of a new D-amino acid oxidase-immunoreactive subcompartment in rat liver peroxisomes. *J Histochem Cytochem*, 39, pp. 95-102.
32. Baudhuin, P., Beaufay, H. and de Duve, C.(1965). Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver, *J Cell Biol*, 26, 219-243.
33. Völkl, A., Baumgart, E. and Fahimi, H. D. (1988). Localization of urate oxidase in the crystalline cores of rat liver peroxisomes by immunocytochemistry and immunoblotting. *J Histochem Cytochem*. 36, 329-336.
34. Veenhuis, M., van Dijken, J.P., and Harder, W. (1983). The significance of peroxisomes in the metabolism of one carbon compounds in yeasts. *Adv. Micro. Biol. Physiol.* 24, 1-82.
35. Hruban, Z., and Rechcigl, M. (1969). *Microbodies and Related Particles*. Academic Press, New York.
36. Brewer, J.M., Pesce, A.J. and Spencer, T.E. (1974). Ultracentrifugación. In: *Experimental Techniques in Biochemistry* (Brewer, Pesce, and Ashworth). Prentice-Hall, Inc. London. pp 161.
37. Rickwood, D. (1984). Isolation of Subcellular Organelles and Membranes. En: *Centrifugation-2nd Edition- a practical approach*. IRL Press Limited, Oxford, England. pp 161.
38. Lazarow, P. B. and Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 1, 489-530.
39. Glaumann, H., Ericsson, J.L.E., Mazarella, L. (1980). Mechanisms of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles. *Int Rev. Cytobiol*, 73, 149-182.
40. Veenhuis, M., Douma, A.C., Harder, W., and Osumi, M. (1983). Degradation and turnover of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes. *Arch Microbiol*. 134, 193-203.
41. Poole, B., Higashi, T., and de Duve, C. (1970). The synthesis and turnover of rat liver peroxisomes. III. The size distribution of peroxisomes and the incorporation of new catalase. *J. Cell Biol*, 45, 408-415.
42. Wanders, R. J. A., H. S. A. Heymans, R. B. H. Schutgens, PG. Barth, H. van den Bosch, J. M. Tager (1988). Peroxisomal disorders in neurology. *J. Neurol. Sci.* 88, 1-39.
43. Moser, H.W., and Goldfischer. S.L. (1985). The peroxisomal disorders. *Hasp. Pract.* 20, 408-415.
44. Veenhuis, M. (1992). Peroxisome biogenesis and function in *Hansenula polymorpha*. *Cell Biochem and Function*. 109, 175-184.42.

45. Faber, K., Swaving, G., Faber, F., A.B., G., Harder, W., Veenhuis, M. and Haima, P. (1992). Chromosomal targeting of replicating plasmids in the yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2405-2416.
46. Veenhuis, M., van Dijken, J.P., Pilon, S.A.F. and Harder, W. (1978). Development of crystalline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast *Hansenula polymorpha* and its relation to environmental conditions. *Arch. Microbiol.* 117, 153-163.
47. Veenhuis, M., and Harder, W. (1989). Occurrence, proliferation and metabolic function of yeast microbodies. *Yeast* 5, 517-524.
48. Veenhuis, M., and Harder, W. (1990). Yeast microbodies: their substructure, biogenesis and turnover in relation to environmental conditions. In: A.H. Rose and J. S. Harrison eds. *Yeast*, 2nd Edition vol IV(2)p 601-653, Academic Press Ltd., London, New York, San Diego.
49. Weibel, E. R. and Bolender, P. (1976). Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In: Principles and techniques of electron microscopy (M. A. Hayat, ed.) London: Van Nostrand Reinhold.
50. Veenhuis, M. (1988). Yeast microbodies PhD Thesis, University of Groningen, The Netherlands.
51. Tikhomirova, L.P., Ikonomova, R.N. and Kuznetsova, E.N. (1986). Evidence for autonomous replication and stabilization of recombinant plasmids in the transformants of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr. Genet.* 10, 741-747.
52. Gleson, M.A, and Soudbery, P.E. (1988). Genetic Analysis in the Methylophilic Yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast.* 4, 293-303.
53. Erdmann, R., Veenhuis, M., Mertens, D. and Kunau, W.-H. (1989). Isolation of peroxisome-deficient mutants of *Sacharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 5419-5423.
54. Cregg, J. M., van der Klei, I. J., Sulter, G. J., Veenhuis, M. and Harder, W. (1990). Peroxisome deficient mutants of *Hansenula polymorpha* *YEAST.* 6, 87-97.
55. Liu, H., Tan, X., Veenhuis, M., McCollum, D. and Cregg, J. M. (1992). An efficient screen for peroxisome-deficient mutants of *Pichia pastoris*. *J. Bacteriol.* 174, 4943-4951.
56. van der Klei, I.J., Harder, W. and Veenhuis, M. (1991). Methanol metabolism in a peroxisome-deficient mutant of *Hansenula polymorpha*: a physiological study. *Arch. Microbiol.* 156, 15-24.
57. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
58. Verduyn, C., Gulseppin, M. L. F., Scheffers, W. A. and van Dijken, J. P. (1988). Hydrogen peroxide metabolism in yeasts *Appl. Environm. Microbiol* 54, 2086-2090.
59. Lück, H. (1963). Catalase. In: "Methods of enzymatic analysis" (Bergmeijer, H. U., ed.), pp. 885-894, Acad. Press, London/New York.

60. Veenhuis, M., van Dijken, L.P. and Harder, W. (1976). Cytochemical studies on the localization of methanol oxidase and other oxidases in peroxisomes of methanol grown *Hansenula polymorpha*. Arch. Microbiol. 111, 123-135.
61. Slot, J.W. and Geuze, H.J. (1984). Gold markers for single and double immunolabeling of ultrathin cryosections. In: "Immunolabeling for electron microscopy: (Polak, J.M., Vamdeell, J.M. eds.), pp. 129-142, Elsevier Sci. Public., Amsterdam.
62. Boeke, J.D., LaCroute, F. and Fink, G.R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. Mol. Gen. Genet. 197, 345-346.
63. Harder, W., Trotsenko, Y. A., Bystrykh, L. V. and Engli, T. (1987). Metabolic regulation in methylotrophic yeasts. In: van Verseveld, H. W. and Duine, J. A. (eds.) Microbial growth on C₂ compounds. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp 139-149.
64. Nicolay, K., Veenhuis, M., Douma, A.C. and Harder, W. (1987). A ³¹P NMR study of the internal pH of yeast peroxisomes. Arch. Microbiol. 147, 37-41.
65. Waterham, H. R., Keizer-Gunnink, I., Goodman, J. M., Harder, W. and Veenhuis, M. (1990). Immunocytochemical evidence for the acidic nature of peroxisomes in methylotrophic yeasts. FEBS Lett. 262, 17-19.
66. Schütte, H., Flossdorf, J., Sahm, H. and Kula, M.R. (1976). Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. Eur. J. Biochem. 62, 151-160.
67. Allais, J. J., Louktibi, A. and Baratti, J. (1983). Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*, purification and properties of formaldehyde dehydrogenase. Agric. Biol. Chem. 47, 1509-1516.
68. Bystrykh, L. V., de Koning, W. and Harder, W. (1990). Dihydroxyacetone synthase from *Candida boidinii* KD 1. In: Lindstrom, M. E. (ed.) Meth. In Enzymol., Acad. Press Inc. Orlando Florida. vol. 188.
69. Titorenko, V. I., Waterham, H. R., Halma, P., Harder, W. and Veenhuis, M. (1992). Peroxisome biogenesis in *Hansenula polymorpha* : different mutations in genes essential for peroxisome biogenesis, cause different peroxisomal mutant phenotypes. FEMS. Microbiol. Lett. 95, 143, 148.
70. Titorenko, V. I., Waterham, H. R., Cregg, J. M., Harder, W. and Veenhuis, M. (1993). A complex set of interacting genes controls peroxisome biogenesis in *Hansenula polymorpha* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7470-7474.
71. van der Klei, I. J., Veenhuis, M., Nicolay, K. and Harder, W. (1989). In vivo inactivation of peroxisomal alcohol oxidase in *Hansenula polymorpha* by KCN is an irreversible process. Arch. Microbiol 151, 26-33.
72. Titorenko, V. I., Harder, W. and Veenhuis, M. (1995). Isolation of peroxisome-degradation-deficient mutants of *Hansenula polymorpha*. J. Bacteriol. 177, 357-363.

73. Keyhani, E. and Keyani, J. (1980). Peroxisome proliferation in adriamycin treated yeast during the recovery phase. In: Electron Microscopy, pp. 86-87. (Brederoo, P. and Priester, W., Eds.). Volume 2.
74. Balzi, E. and Goffeau, A. (1995). Yeast multidrug resistance: the PDR network. *J. Biol. Membr.* 27 (1), 71-76.
75. Swartzman, E. E., Viswanathan, N. and Thorner, J. (1996). The PAL1 gene product is a peroxisomal ATP-binding-cassette transporter in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 134 (4), 549-563.
80. van Uden, N.. (1971). In: Kinetics and Energetics of Yeast Growth: The Yeast. Physiology and Biochemistry of Yeasts. Vol 2. Ed. Antony H. Rose y J.S. Harrison. Academic Press.London and New York.