

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



EFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE DOS  
ESPECIES DE LEVADURAS:  
*Candida boidinii* y *Saccharomyces cerevisiae*

Por

M.C. Ricardo Salazar Aranda

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

Mayo, 2001

TD  
QP981  
.K37  
S3  
c.1





1080092882

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE DOS  
ESPECIES DE LEVADURAS:**

*Candida boiðinii* y *Saccharomyces cerevisiae*

Por

M.C. Ricardo Salazar Aranda

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS** con Especialidad en  
Química Biomédica

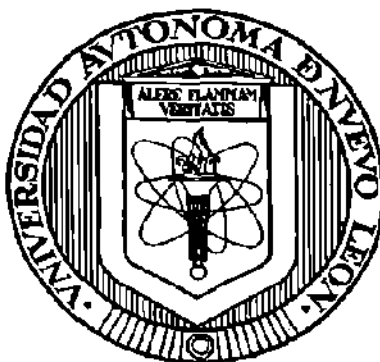
Mayo, 2001

TD  
Q P 981  
.K 37  
S 33  
C 1



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE DOS ESPECIES DE  
LEVADURAS: *Candida boidinii* y *Saccharomyces cerevisiae***

**Por**

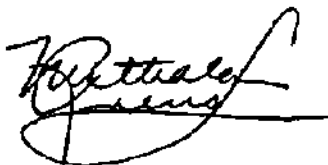
**M. C. Ricardo Salazar Aranda**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en  
Química Biomédica**

**Mayo, 2001**

**EFFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE DOS ESPECIES DE LEVADURAS:**  
*Candida boidinii* y *Saccharomyces cerevisiae*

**Aprobación de la Tesis:**



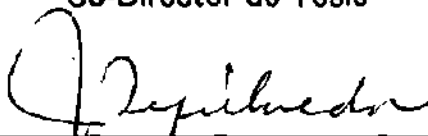
---

**DRA. MYRTHALA MORENO SEPULVEDA**  
Director de Tesis



---

**DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES**  
Co-Director de Tesis



---

**DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA**  
Co-Director de Tesis



---

**DR. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ**  
Comisión de Tesis



---

**DRA. LOURDES GARZA OCAÑAS**  
Comisión de Tesis



---

**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado

**“EFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE DOS ESPECIES DE  
LEVADURAS: *Candida boidinii* y *Saccharomyces cerevisiae*”**

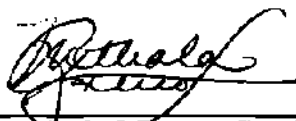
**Presentado por:**

**M. C. Ricardo Salazar Aranda**

**Este trabajo se realizó en los Departamentos de Farmacología y Toxicología y de Histología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Doctora Myrthala Moreno Sepúlveda y la coasesoría de los Doctores Julio Sepúlveda Saavedra y Noemí Waksman de Torres.**

**FIRMAS**

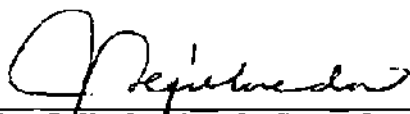
**Asesor**



---

**DRA. Myrthala Moreno Sepúlveda**

**Coasesores**



---

**Dr. Julio Sepúlveda Saavedra**



---

**Dra. Noemí Waksman de Torres.**



## RESUMEN

Ricardo Salazar Aranda

Fecha de Graduación: Abril del 2001

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Título del Estudio

E F E C T O        D E        L A  
P E R O X I S O M I C I N A   A 1   S O B R E  
D O S   E S P E C I E S   D E   L E V A D U R A S :  
*Candida boidinii* Y *Saccharomyces cerevisiae*.

Número de Páginas: 110

Candidato para el grado de Doctor  
en Ciencias con especialidad en  
Química Biomédica

Area de Estudio: Química Biomédica

**Propósito y Método de Estudio:** La toxina T-514, recientemente renombrada como Peroxisomicina A1 (PA1), es una antracenona dimérica la cual constituye uno de los principios tóxicos de las plantas del género *Karwinskia*. El énfasis en el estudio de la T-514 se debe a su potencial uso terapéutico, ya que se ha demostrado su toxicidad selectiva *in vitro* sobre diversas líneas celulares humanas de origen neoplásico. Por lo cual se ha propuesto el uso de este compuesto como un agente antineoplásico. Los datos obtenidos hasta el momento acerca del mecanismo de acción de la PA1 sugieren que el peroxisoma es el organelo blanco en levaduras y en hígado de monos, ratas y ratones. El propósito del presente estudio fue analizar el efecto de PA1 sobre los principales compartimentos celulares de *C. boidinii*, así como evaluar la acción de PA1 sobre *S. cerevisiae*. Para esto se realizaron cultivos de *C. boidinii* en ausencia y presencia de PA1. A partir de estos cultivos se evaluó la ultraestructura celular, se determinó la actividad de enzimas marcadoras de las fracciones celulares aisladas de esta levadura, se analizaron también los principales componentes de la fracción nuclear y se investigó la presencia de PA1 en las fracciones celulares aisladas por medio de CLAR. Por otro lado, en *S. cerevisiae* se investigó el efecto de PA1 sobre la viabilidad y la ultraestructura celular de esta levadura.

**Conclusiones y Contribuciones:** La PA1, a una dosis no letal, afecta la actividad de enzimas específicas de los compartimentos celulares y el contenido de los componentes nucleares de *C. boidinii*. Los resultados obtenidos después de 30 min. de exposición sugieren inducción de las síntesis de proteínas en *C. boidinii*. La PA1 fue detectada (por CLAR) en la fracción nuclear en los primeros tiempos de exposición. En *S. cerevisiae*, levadura no metilotrófica, la PA1 a una dosis no letal, causa daño sobre la membrana peroxisomal. El daño sobre la membrana peroxisomal causado por la PA1 no parece estar relacionado con la actividad metabólica de las levaduras. Los resultados de este trabajo contribuyen al aumento del conocimiento sobre el mecanismo de acción de PA1.

FIRMA DEL ASESOR

  
DRA. Myrthala Moreno Sepúlveda

## **DEDICATORIA**

**A todos y cada uno de los seres que han estado junto a mí.**

**A mi familia.**

**Ricardo Salazar Aranda**

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi mas profundo agradecimiento a cada uno de los 27 miembros de mi familia, por aceptar mis ideas.

Toda mi gratitud para mis amigos, mis compañeros y conocidos, tantos que no podría numerarlos, por estar conmigo en el momento justo y enriquecerme con sus palabras.

Agradezco a todas las instituciones que participaron en mi formación: A la Facultad de Medicina, UANL; Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su proyecto 25240-M; Al Programa de Apoyo a la Investigación de Ciencia y Tecnología por su proyecto SA274-99.

Agradezco a todas y cada una de las personas que se involucraron en el desarrollo de este trabajo: Al personal técnico, administrativo y de intendencia de los Departamentos de Farmacología y Toxicología, Histología y Microbiología.

Lucy, Martha Laura, Ruth, Laura Mónica, José, Vero, Normita, Amalia, Sra. Isabel, Jaime, Javier.

Muy especialmente a Ivonne, Blanquita, Rossy, Magaly y Toño por auxiliarme durante toda la investigación.

Lupita, Alicia, Don Emilio.

Muy especialmente a Rossy, Nora y Victor por su ayuda en todo lo correspondiente a microscopía electrónica.

A mis compañeros de Posgrado

Vero, Adolfo, Yareli, Alejandro, Gloria B., Gloria M., Olga, Aurora, Adrián, Marta O., Gil, Martha S., Jaime, Diana.

Muy especialmente al M. C. Amador Osorio y la M. C. Ma. de la Luz Salazar. Gracias por su disposición y colaboración en HPLC.

A los recién graduados

Dra. Rosalba Ramírez, Dra. Paula Cordero, Dra. Teresa Zanatta, Dra. Leticia Moreno, Dr. Rigoberto Vargas, Dra. Magdalena Gómez, Dra. Raquel Ballesteros.

**A Marco Flores, Martha Salazar y muy especialmente a Rosario Torres, por toda su ayuda y disposición.**

**Al Dr. Oscar Torres por permitirme utilizar diversos equipos de su laboratorio.**

**Al Ingeniero Alcorta por su ayuda en la parte estadística.**

**A la Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado especialmente a la Dra. Herminia Martínez, Secretaria Académica del Area Básica. A sus ayudantes Normita y Patty, por su atención desde el primer momento y por compartir parte de su tiempo conmigo.**

**Al Dr. Rolando Tijerina Jefe del Departamento de Microbiología y a la Dra. Socorro Flores Responsable del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, por facilitarme el uso de la ultracentrífuga, parte fundamental de este trabajo.**

**A la Dra. Lourdes Garza Ocañas, Responsable del Laboratorio de Cultivo de Células, Coordinador del Doctorado en Ciencias con especialidad en Farmacología y Toxicología. Por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por sus consejos y apoyo.**

**Al Dr. Alfredo Piñeyro López, Jefe del Departamento de Farmacología y Toxicología, mi más sincero agradecimiento por permitirme colaborar en su línea de investigación, por sus comentarios.**

**A la Dra. Noemí Waksman de Torres, Jefe del Departamento de Química Analítica, Coordinador del Doctorado en Ciencias con especialidad en Química Biomédica, Coasesor de esta Tesis Doctoral. Gracias por sus enseñanzas, su paciencia, sus consejos, recomendaciones y comentarios.**

**Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, Jefe del Departamento de Histología, Coordinador del Doctorado en Ciencias con especialidad en Morfología, Coasesor de esta Tesis Doctoral. Mi más profundo agradecimiento por compartir sus conocimientos conmigo, por su paciencia, por todas las ideas sugeridas.**

**A la Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda, Asesor de esta Tesis Doctoral. Gracias por su empeño, su dedicación, su paciencia, por su tiempo invertido en mi. Todo mi agradecimiento por cada una de sus palabras.**

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. Introducción . . . . .	1
2. Material y Métodos . . . . .	20
2.1. Material . . . . .	20
2.1.1. Reactivos . . . . .	20
2.1.2. Material Biológico . . . . .	20
2.1.3. Equipo . . . . .	20
2.2. Métodos . . . . .	21
2.2.1. Preparación de Solución Concentrada de PA1 . . . . .	21
2.2.2. Métodos de cultivo . . . . .	21
2.2.2.1. Métodos de cultivo de <i>C. boidinii</i> . . . . .	21
2.2.2.2. Métodos de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	22
2.2.3. Conteo de Colonias de <i>S. cerevisiae</i> en placas de agar . . . . .	22
2.2.4. Aislamiento de organelos celulares . . . . .	23
2.2.4.1. Formación y lisis de esferoplastos . . . . .	23
2.2.4.2. Separación de organelos celulares por medio de ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. . . . .	24
2.2.4.3. Aislamiento de la fracción microsomal . . . . .	24
2.2.4.4. Aislamiento del núcleo celular . . . . .	24
2.2.5. Métodos analíticos . . . . .	24
2.2.5.1. Determinación de Turbidez de cultivos de levaduras . . . . .	24
2.2.5.2. Determinación de actividad enzimática . . . . .	26
2.2.5.2.1. Lactado deshidrogenasa . . . . .	26
2.2.5.2.2. Fumarasa . . . . .	26
2.2.5.2.3. NADPH cit. c reductasa . . . . .	26
2.2.5.2.4. Catalasa . . . . .	27
2.2.5.2.5. Alcohol oxidasa . . . . .	27
2.2.5.3. Determinación de componentes del núcleo celular . . . . .	28



2.2.5.4. Determinación de proteínas totales	28
2.2.6. Métodos cromatográficos	28
2.2.6.1. Pretratamiento de la muestra	28
2.2.6.2. Determinación de PA1 por CLAR	29
2.2.7. Microscopía electrónica de transmisión	29
2.2.7.1. Técnica de fijación con permangano de potasio	29
2.2.7.2. Técnica de fijación con glutaraldehído y postfijación con tetraóxido de osmio	30
2.2.8. Análisis estadístico.	30
3. Resultados	31
3.1. Análisis ultraestructural de <i>C. boidinii</i> por microscopía electrónica de transmisión. Fijación con permanganato de potasio	31
3.2. Análisis ultraestructural de <i>C. boidinii</i> por microscopía electrónica de transmisión. Fijación con glutaraldehído y postfijación con tetraóxido de osmio.	33
3.3. Determinación de la actividad de enzimas marcadoras en las fracciones celulares aisladas de <i>C. boidinii</i> .	35
3.3.1. Identificación de las diferentes fracciones de organelos celulares.	35
3.3.2. Evaluación del efecto de PA1 sobre la localización de los organelos en las fracciones celulares aisladas de <i>C. boidinii</i> .	38
3.3.3. Evaluación del efecto de PA1 sobre la actividad específica total de enzimas marcadoras en la levadura <i>C. boidinii</i> .	38
3.4. Evaluación del efecto de PA1 sobre los principales componentes de la fracción nuclear de <i>C. boidinii</i> .	46
3.4.1. Evaluación del efecto de PA1 sobre el contenido de DNA, RNA y proteínas en la fracción nuclear de <i>C. boidinii</i> .	46
3.4.2. Evaluación del efecto de PA1 sobre la proporción de RNA/DNA y proteínas/DNA en la fracción nuclear de <i>C. boidinii</i> .	46
3.5. Identificación de PA1 en las fracciones celulares aisladas de <i>C. boidinii</i> por medio de CLAR.	53
3.6. Viabilidad celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en presencia de PA1.	53

3.7. Análisis ultraestructural de <i>S. cerevisiae</i> por microscopía electrónica de transmisión. Fijación con permanganato de potasio.	59
3.8. Análisis ultraestructural de <i>S. cerevisiae</i> por microscopía electrónica de transmisión. Fijación con glutaraldehído y postfijación con tetraóxido de osmio.	65
4. Discusión.	67
5. Conclusiones y perspectivas	81
5.1. Conclusiones	81
5.2. Perspectivas	82
Apéndice	83
Preparación de medios de cultivo	83
Medio líquido enriquecido con glucosa al 2% (YPD)	83
Medio líquido con metanol al 0.5 % (MMM).	83
Solución de trazas minerales	84
Solución de vitaminas	84
Medio líquido enriquecido con glucosa al 0.1% (YPGG).	85
Medio líquido enriquecido con ácido oleico (YPGOT)	85
Placas de agar.	85
Aislamiento de organelos celulares	86
Preparación de amortiguador Tris-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	86
Preparación de gradientes de densidad discontinuos de sacarosa.	87
Aislamiento de organelos celulares.	87
Aislamiento del núcleo celular	87
Determinación de actividad enzimática	88
Lactato deshidrogenasa	88
Fumarasa	88
NADPH citocromo c reductasa	89
Preparación de la mezcla de ensayo para NADPH citocromo c reductasa	89
Solución de NADPH (1.29 mM)	90
Catalasa	90
Preparación de amortiguador de fosfato de potasio 1 M	91
Alcohol oxidasa	91
Preparación de la mezcla de ensayo para AO	92
Cálculo de factores para la determinación de actividad enzimática	92
Curva de calibración de proteínas	94

Microscopía electrónica de transmisión . . . . .	95
Técnica de fijación con permanganto de potasio . . . . .	95
Técnica de fijación con glutaraldehido y postfijación con tetraóxido de osmio . . . . .	96
Resina epóxica . . . . .	97
Amortiguador de cacodilatos . . . . .	98
Bibliografía . . . . .	99

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras determinados en el gradiente de densidad de sacarosa . . .	36
II. Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras de <i>C. boidinii</i> cultivada en presencia de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PA1 durante 30 min . . . . .	39
III. Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras de <i>C. boidinii</i> incubada con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PA1 durante 60 min . . . . .	40
IV. Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras de <i>C. boidinii</i> expuesta a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PA1 durante 120 min . . . . .	41
V. Porcentajes de actividad específica total de enzimas marcadoras de <i>C. boidinii</i> cultivada en presencia de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PA1 . . . . .	47
VI. Porcentajes de RNA, DNA y proteínas en la fracción nuclear de <i>C. boidinii</i> cultivada en presencia de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PA1 . . . . .	49
VII. Proporción de RNA/DNA y proteínas/DNA en la fracción nuclear de <i>C. boidinii</i> expuesta a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PA1 . . . . .	51
VIII. Porcentajes de supervivencia celular de <i>S. cerevisiae</i> cultivada en presencia de PA1. Cultivos líquidos en medios con glucosa . . . . .	60
IX. Porcentajes de supervivencia celular de <i>S. cerevisiae</i> expuesta a PA1. Cultivos líquidos en medios con ácido oleico . . . . .	62
X. Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteínas totales . . . . .	95

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Efecto de la T 514 sobre la membrana peroxisomal de levaduras metilotróficas . . . . .	6
2. Peroxisomicina A1 ó T 514 . . . . .	7
3. Inducción de la Proliferación peroxisomal en levaduras metilotróficas . . . . .	12
4. Inducción de la proliferación peroxisomal en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cultivada en medio con ácido oleico . . . . .	14
5. Obtención de las fracciones celulares de <i>C. boidinii</i> por medio de ultracentrifugación en gradiente de densidad discontinuo de sacarosa . . . . .	25
6. Micrografías electrónicas de <i>C. boidinii</i> cultivada en presencia de 2 µg/mL de PA1. Fijación con permanganato de potasio e inclusión en resina epóxica . . . . .	32
7. Micrografías electrónicas de <i>C. boidinii</i> expuesta a 2 µg/ml de PA1. Fijación con glutaraldehído y postfijación con tetraóxido de osmio . . . . .	34
8. Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras determinados en el gradiente de densidad de sacarosa . . . . .	37
9. Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras de <i>C. boidinii</i> cultivada en presencia de 2 µg/mL de PA1 durante 30 min. . . . .	42
10. Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras de <i>C. boidinii</i> expuesta a 2 µg/mL de PA1 durante 60 min . . . . .	43
11. Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras de <i>C. boidinii</i> incubada con 2 µg/mL de PA1 durante 120 min . . . . .	44
12. Porcentajes de actividad específica de NADPH cit. c reductasa de <i>C. boidinii</i> cultivada en presencia de 2 µg/mL de PA1 . . . . .	45
13. Porcentajes de actividad específica total de enzimas marcadoras de <i>C. boidinii</i> expuesta a 2 µg/mL de PA1 . . . . .	48



14.	Porcentajes de RNA, DNA y proteínas en la fracción nuclear de <i>C. boidinii</i> cultivada en presencia de 2 µg/mL de PA1 . . . . .	50
15.	Proporciones de RNA/DNA y proteínas/DNA en la fracción nuclear de <i>C. boidinii</i> incubada con 2 µg/mL de PA1 . . . . .	52
16.	Cromatografía de Líquidos de Alta resolución. Estandar de PA1 . . . . .	54
17.	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Fracciones celulares obtenidas de la levadura <i>C. boidinii</i> (Control) . . . . .	55
18.	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Fracciones de organelos celulares obtenidas de la levadura <i>C. boidinii</i> expuesta a 2 µg/mL de PA1 durante 30 min . . . . .	56
19.	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Fracciones celulares obtenidas de la levadura <i>C. boidinii</i> cultivada en presencia de 2 µg/mL de PA1 durante 60 min. . . . .	57
20.	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Fracciones de organelos celulares obtenidas de la levadura <i>C. boidinii</i> expuesta a 2 µg/mL de PA1 durante 120 min . . . . .	58
21.	Porcentajes de supervivencia celular de <i>S. cerevisiae</i> cultivada en presencia de PA1. Cultivos líquidos en medios con glucosa . . . . .	61
22.	Porcentajes de supervivencia celular de <i>S. cerevisiae</i> expuesta a PA1. Cultivos líquidos en medios con ácido oleico . . . . .	63
23.	Micrografías electrónicas de <i>S. cerevisiae</i> cultivada en presencia de 2 µg/ml de PA1. Fijación con permanganato de potasio e inclusión en resina epóxica . . . . .	64
24.	Micrografías electrónicas de <i>S. cerevisiae</i> expuesta a 2 µg/mL de PA1. Fijación con glutaraldehído y postfijación con tetraóxido de osmio . . . . .	66
25.	Degradación peroxisomal . . . . .	79
26.	Modelo integral de biogénesis peroxisomal . . . . .	80

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABTS	2,2'-Azinobis(3-etilbenzotioazolina-6-ácido sulfónico)
Ác.	Ácido
Act.	Actividad
Amb.	Ambiente
AO	Alcohol oxidasa
ATCC	American Type Collection Culture
C.	<i>Candida</i>
Cit.	citocromo
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
cm <sup>3</sup>	Centímetro cúbico
CoA	Coenzima A
Cols.	Colaboradores
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
DTE	Ditioeritrol
esp.	Específica
EUA	Estados Unidos de Norteamérica
g	Gramos
hr	Hora
hrs	Horas
HRP	Peroxidasa de castor
IsoPA1	Isoperoxisomicina A1
K.	<i>Karwinskia</i>
L	Litro
LDH	Lactato deshidrogenasa
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
MMM	Medio mínimo con metanol

mM	Milimolar
n	Tamaño de la muestra
nm	Nanómetro
p	Peso
PA1	Peroxisomicina A1
PA2	Peroxisomicina A2
PAG	Placas de agar con glucosa
PAO	Placas de agar con ác. oleico
pH	Potencial de hidrógeno
PMSF	Fosfil-metil-sulfonil-fluoruro
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
S.	<i>Saccharomyces</i>
seg	Segundo
sp	<i>Especie</i>
SW	Rotor de Balanceo
T	Temperatura
Ti	Rotor Titanio
U	Unidades
YPD	Medio con extracto de levadura, peptona y dextrosa
YPGG	Medio con extracto de levadura, peptona, glicerol y glucosa
YPGOT	Medio con extracto de levadura, peptona, glicerol, ác. oleico y Tween 40
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μmol	Micromol
β	Beta
ε	Coefficiente de absortividad molar
°C	Grados celsius
λ	Longitud de onda
±	Más menos
≤	Menor que
%	Porciento

## CAPITULO 1

### INTRODUCCIÓN

Compuestos tóxicos han sido aislados de un gran número de plantas de diversos géneros<sup>1</sup>. Entre estos compuestos tóxicos se encuentran los de tipo antracénico los cuales han sido aislados del género *Karwinskia*<sup>2-7</sup>. Este género *Karwinskia* perteneciente a la familia Rhamnaceae, incluye arbustos y árboles pequeños que crecen en zonas tropicales y áreas desérticas. Se han descrito 15 especies diferentes del género *Karwinskia*, de las cuales 11 se encuentran en México<sup>8</sup>, siendo la más común por su extensión territorial la *Karwinskia humboldtiana*. Según reportes clínicos<sup>9-14</sup>, aproximadamente a los 15 días posteriores a la ingestión del fruto de estas plantas, se presentan manifestaciones clínicas como polineuropatía progresiva, caracterizada por parálisis simétrica ascendente, que puede terminar en muerte por paro respiratorio. Algunos de los síndromes paralíticos, como el de Guillian-Barre, la poliomieltis y otras neuropatías periféricas presentan un cuadro clínico similar al causado por estas plantas.

Clavijero describió por primera vez a la *K. humboldtiana* dentro de las plantas nocivas y extravagantes encontradas por los jesuitas en Baja California a finales del siglo XVIII<sup>15</sup>. Esta planta se encuentra distribuída prácticamente en todo el territorio mexicano, en el Suroeste de los Estados Unidos de Norteamérica y en parte de Centro América. Su fruto es del tamaño de un garbanzo, verde en sus inicios y de un color negro en la madurez, cuyo mesocarpio dulce e inocuo protege a una semilla de alta capacidad tóxica para mamíferos, incluido el humano<sup>8, 12, 16, 17</sup>.

En 1975 Dreyer y cols.<sup>2</sup>, aislaron por primera vez del fruto seco de *K. humboldtiana*, cuatro compuestos responsables de las propiedades tóxicas de dicha planta, los cuales fueron identificados como antracenas diméricas. Estas toxinas fueron denominadas de acuerdo a su peso molecular como: T 496, T 514, T 516 y T 544.

Posteriormente Guerrero y cols.<sup>3</sup> reportaron una modificación al método utilizado por Dreyer y cols.<sup>2</sup> para el aislamiento de estas toxinas. Waksman y cols. han aislado y caracterizado otros compuestos antracenónicos a partir de *K. parvifolia*: dos diastereoisómeros de T-514<sup>6,7</sup>, un isómero de posición de T-514<sup>7</sup> y T 510<sup>5</sup>.

En 1981, surgió en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, una línea de investigación dirigida tanto al estudio de la actividad biológica de los compuestos antracenónicos aislados de diferentes especies del género *Karwinskia*, así como también a la caracterización morfológica y funcional de la planta mantenida tanto en condiciones de invernadero como en cultivo *in vitro*<sup>18</sup>.

Waksman y cols.<sup>4</sup> efectuaron el análisis químico y toxicológico de extractos clorofórmicos obtenidos de los frutos de 10 especies de plantas de este género. Estos estudios demostraron que todas las plantas examinadas son tóxicas y su toxicidad se asemeja cualitativamente a la intoxicación aguda producida con *K. humboldtiana*. Todas las plantas se caracterizan por la presencia de compuestos antracenónicos, sin embargo se encontró diferente contenido de las toxinas, así la T 544 está presente en mayor cantidad en *Karwinskia humboldtiana*, la T 496 se produce más en *Karwinskia calderonii* y la T 514 se recupera en mayor cantidad de *Karwinskia parvifolia*.

En los estudios de Bermúdez y cols.<sup>19</sup> en animales intoxicados con T 514 se estableció que los órganos blanco de esta toxina son: hígado, riñón y pulmón. La evidencia de la mayoría de los daños causados a estos órganos, tanto clínica como histopatológicamente, fue demostrada en varias especies de animales de experimentación como en algunos roedores<sup>19, 20</sup>, y en primates como el *Macaco*<sup>21, 22</sup>. Por otro lado, en el humano<sup>23</sup> solo se obtuvo evidencia clínica del daño causado a estos tres órganos. Con respecto a la actividad biológica de otras toxinas de *K. humboldtiana* se comprobó que: T 544 es responsable del efecto neurológico periférico y por lo tanto de la parálisis y T 496 produce diarrea cuando se administra por vía oral<sup>12, 19, 20</sup>. Estudios efectuados para determinar la dosis letal media de estos compuestos demostraron que T 514 es la más tóxica de todos los compuestos.



Estudios realizados por Garza-Ocañas y cols.<sup>24</sup> en cultivos de células de piel y de hepatocitos para comparar la citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* de la T 514 y la T 544, demostraron que T 514 causa mayor toxicidad hepática que la T 544 *in vitro*. Por otra parte, se analizó el efecto del diastereoisómero de T 514 en células hepáticas, demostrándose que la toxicidad *in vitro* de este compuesto en células hepáticas es muy similar a la de T 514<sup>25</sup>. En contraste, Martínez y cols.<sup>26</sup>, demostraron que en condiciones *in vivo*, la toxicidad hepática causada por T 514 es mucho mayor que la producida por el diastereoisómero de T 514.

Piñeyro y cols.<sup>27</sup> describieron por primera vez la toxicidad selectiva de la T 514 sobre algunas líneas celulares tumorales humanas de hígado, pulmón y colon, ya que su curva de letalidad dosis-respuesta presentó una forma particularmente empinada, lo cual se traduce como una variación biológica estrecha<sup>27-29</sup>. Este hallazgo ha sido confirmado por investigadores de las Universidades de Berlín y Freiburg (Alemania) y recientemente en el Instituto Nacional de Cáncer (EUA). Lo anterior ha motivado que en los últimos años se intensifiquen los estudios encaminados a establecer a la T 514 como un posible agente antineoplásico, y se ha obtenido una patente para su utilización, la cual fue otorgada primero por la Comunidad Económica Europea<sup>30</sup>, y posteriormente por los EUA<sup>31</sup> y Japón<sup>32</sup>.

Debido a que el mecanismo de acción de la T 514 aún se desconoce, en los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios bioquímicos y morfológicos encaminados a obtener información acerca de éste.

Estudios bioquímicos realizados por Moreno y cols.<sup>33</sup> demostraron que la T 514 es un inhibidor no competitivo de la catalasa hepática de tres fuentes animales (res, perro y ratón), bajo condiciones *in vitro*. Se analizó el efecto tanto de T 514 como de otros compuestos antracénicos aislados y purificados de especies del género *Karwinskia*. En este estudio se encontró una relación estrecha entre la estructura química de los compuestos antracénicos y el grado de inhibición de catalasa. Los compuestos más activos fueron aquellos que contienen dos grupos antracénicos, correspondientes a la T 514 y su diastereoisómero, las cuales produjeron el mayor grado de inhibición y no hubo diferencia significativa entre ellas. Por otro lado, el resto de las toxinas mostraron un menor grado de inhibición, correspondiendo a los dímeros que contienen una unidad antrona o antraquinona. En este estudio se utilizó como control positivo de inhibición

el aminotriazol el cual es un potente inhibidor de la actividad de catalasa *in vivo*, pero menos potente *in vitro*. Todos los compuestos antracénicos analizados son inhibidores de la catalasa *in vitro* más potentes que el aminotriazol.

El efecto de T 514 sobre la actividad de catalasa hepática del ratón albino también ha sido investigado en cortes de tejido hepático incubados con toxina (*in situ*) y en fracciones hepáticas de ratones intoxicados con T 514 (*in vivo*)<sup>34</sup>. En este estudio se demostró por medio de procedimientos histoquímicos y bioquímicos que no existe inhibición de la catalasa. Este hallazgo indica que la T 514 únicamente inhibe la actividad de catalasa *in vitro*, cuando se utiliza enzima purificada. Esto sugiere que la catalasa no está involucrada en el daño peroxisomal causado por la T 514, bajo condiciones *in vivo*.

Estudios morfológicos realizados por Sepúlveda y cols.<sup>35</sup> demostraron una disminución marcada del número de peroxisomas en hepatocitos de ratas Wistar y de monos *Macaca fascicularis* intoxicados experimentalmente con T 514. Recientemente, se ha demostrado que la disminución del número de peroxisomas en el hígado de *Macaca fascicularis* intoxicados con T 514, se debe a la degradación de los organelos afectados por medio de la vía autofágica lisosomal<sup>36</sup>.

Numerosos estudios de biogénesis y función peroxisomal han sido realizados en levaduras, ya que en estas células eucariotas se puede inducir la proliferación peroxisomal en medios de cultivo específicos<sup>37</sup>.

Las levaduras metilotróficas pueden utilizar el metanol como única fuente de carbono y en ellas se induce la proliferación peroxisomal debido a que la matriz peroxisomal contiene las enzimas que catalizan las reacciones iniciales del catabolismo del metanol. Estas enzimas son: alcohol oxidasa<sup>38</sup>, dihidroxiacetona sintasa<sup>39</sup> y catalasa<sup>40</sup>.

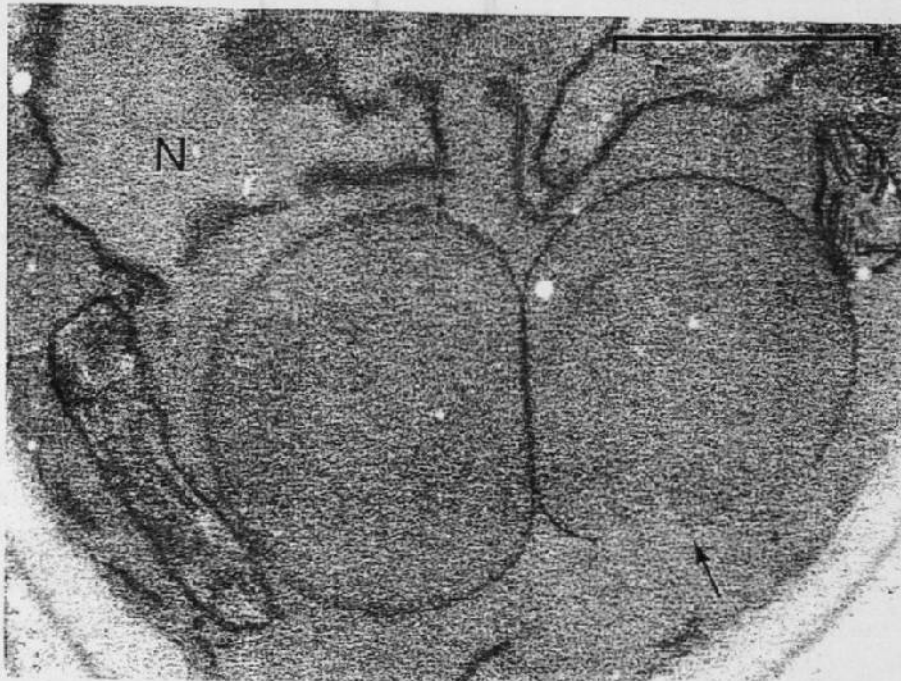
Estudios realizados por Sepúlveda y cols.<sup>41</sup> en cultivos de dos especies de levaduras metilotróficas: *Candida boidinii* y *Hansenula polymorpha*, utilizando medio mínimo con metanol como única fuente de carbono, demostraron el efecto de la T 514 sobre los peroxisomas *in vivo*. Con respecto a la supervivencia celular de *Candida boidinii* cultivada en medios específicos, con glucosa o metanol como única fuente de carbono

respectivamente, y en presencia de T 514 a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ , se produjo un efecto drástico sobre la viabilidad de esta levadura, muriendo el 100 % de las células después de 60 min de exposición a la toxina. Además, en las células cultivadas en metanol, se observó un efecto inmediato sobre la organización total de los peroxisomas después de la adición del compuesto. A los diez minutos de exposición muchos de los grupos de peroxisomas en las células migraron hacia dentro de la vacuola, ocurriendo después la desintegración del citoplasma. Efectos comparables fueron observados en cultivos de *Hansenula polymorpha* utilizando medio con metanol como única fuente de carbono.

En presencia de una dosis no letal de T 514 (2  $\mu\text{g/mL}$ ) se obtuvo un efecto dosis-respuesta: el crecimiento cesó inicialmente, reiniciándose después de un periodo de 4 h. Desde los 30 min de incubación, a nivel subcelular, se encontró un efecto específico sobre la integridad peroxisomal (Figura 1). Ultraestructuralmente este daño sobre los peroxisomas se observó como la fragmentación de la membrana peroxisomal. Cuando ocurrió este efecto sobre los peroxisomas, se observaron agregados citosólicos de las proteínas de matriz peroxisomal, sugiriendo que el importe de proteínas recién sintetizadas está bloqueado. El daño peroxisomal fue irreversible ya que los organelos afectados fueron degradados en la vacuola autofágica. Además, utilizando la técnica de inmunocitoquímica se demostró la presencia de alcohol oxidasa peroxisomal dentro de la vacuola autofágica. Lo anterior sugiere la degradación de los peroxisomas dañados por medio de autofagia. Bajo las condiciones experimentales no se observó daño sobre otras estructuras celulares. En estos estudios la actividad de las enzimas alcohol oxidasa y catalasa no fue modificada por la T 514.

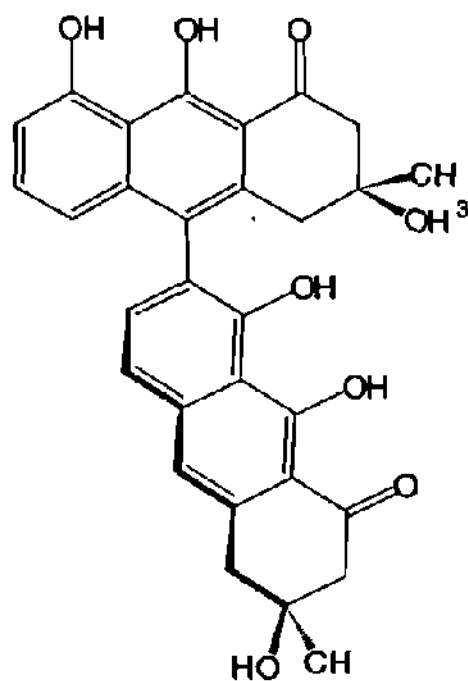
Debido a estos hallazgos que demostraron, a través de métodos morfológicos, el efecto selectivo e irreversible sobre los peroxisomas de levaduras metilotróficas, se ha renombrado al compuesto antracénico T 514 como Peroxisomicina A1 (PA1, Figura 2).

Los isómeros espaciales de este compuesto se renombraron con números progresivos. En el caso de los isómeros de posición se antepone el prefijo iso- al nombre de Peroxisomicina A1. La letra A y el número 1 que complementan el nombre de Peroxisomicina, provienen de la nomenclatura para estereoisómeros de esta naturaleza establecida por Steglich y Gill<sup>42</sup>.



**Figura 1.** Efecto de la T 514 sobre la membrana peroxisomal de levaduras metilotróficas. Sepúlveda y cols. 1992.

Figura 2. Peroxisomicina A1 o T 514



**Figura 2.** Peroxisomicina A1 o T 514

De acuerdo a esta nomenclatura los atropoisómeros de tipo A, son aquellos que en las curvas de Dicroísmo Circular presentan efecto Cotton negativo a  $\lambda$  larga y efecto Cotton positivo a  $\lambda$  corta; asimismo los atropoisómeros de tipo B son aquellos que presentan efectos Cotton de signo contrario al tipo A. El número corresponde al orden de purificación e identificación del compuesto.

Con el propósito de investigar si el efecto sobre peroxisomas es exclusivo de PA1, se analizó el efecto de diferentes antracenonas diméricas estructuralmente semejantes a PA1 sobre los peroxisomas de *Candida boidinii*, bajo condiciones *in vivo*<sup>43</sup>. En este trabajo se demostró que todos los compuestos analizados: PA2, IsoPA1 y T 544 afectan la viabilidad de *C. boidinii* y además causan el daño sobre la membrana peroxisomal descrito por Sepúlveda y cols.<sup>41</sup> en levaduras metilotróficas. El daño peroxisomal fue más intenso en las células cultivadas en presencia de T 544. Además se demostró que los compuestos antracénónicos analizados no afectaron la actividad de catalasa bajo condiciones *in vivo*<sup>43</sup>.

Por otro lado, utilizando este sistema de levaduras metilotróficas, se han logrado aislar cepas con disfunción peroxisomal a partir de células de *Hansenula polymorpha* incubadas con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PA1. Los resultados de este trabajo sugieren que el efecto de PA1 probablemente ocurra sobre el genoma de esta levadura, sin descartar un daño directo sobre la membrana peroxisomal<sup>44</sup>.

En base a los hallazgos obtenidos sobre el mecanismo de acción de la PA1, se considera al peroxisoma como organelo blanco de este compuesto, tanto en levaduras como en hepatocitos de monos y ratas.

## LEVADURAS.

Las células eucariotes poseen una compleja compartimentalización bioquímica basada en sus organelos funcional y morfológicamente especializados. Cada organelo celular tiene su propio conjunto de proteínas<sup>45</sup>.

Las levaduras son organismos eucariotes unicelulares, cuya reproducción es por gemación o fisión. De acuerdo al tipo de ciclo de vida se distinguen tres grupos principales de levaduras: Ascomicetos, Basidomicetos y Hongos imperfectos; cada uno de ellos incluye una amplia variedad de géneros y especies<sup>46</sup>. En general sus estructuras subcelulares son las mismas que las de organismos eucariotes superiores<sup>45</sup>.

La pared celular de las levaduras es fina cuando las células son jóvenes y se engrosa con la edad. Su composición química es de glucano (unidades de D-glucosa) y manano (unidades de D-manosa), además de proteínas y lípidos. La membrana citoplásmica se observa como una estructura trilaminar la cual funciona como barrera osmótica y está constituida de lípidos, proteínas y polisacáridos<sup>45</sup>.

La célula de levadura contiene citoplasma en estado semilíquido compuesto por materiales granulares finos, ribosomas ricos en RNA y organelos limitados por membranas. El sistema de membranas en este compartimento son vesículas hidrolíticas, endosomas, microcuerpos, aparato de Golgi y retículo endoplásmico. Este último está conectado a la membrana nuclear externa o en contacto con la membrana citoplásmica. En el citoplasma se encuentran numerosas enzimas responsables de diversas reacciones metabólicas, tal como la lactato deshidrogenasa que cataliza la reacción reversible de lactato a piruvato (producto de la glicólisis)<sup>45</sup>.

Estudios ultraestructurales han demostrado que el núcleo de las levaduras es un organelo bien definido por una envoltura nuclear semipermeable. Sus componentes principales son DNA, RNA y proteínas. No se ha demostrado la presencia de cromosomas condensados en su interior<sup>45</sup>.

Así como en otros organismos eucarióticos, en levaduras las mitocondrias se observan como organelos rodeados de dos membranas, la membrana interna forma algunas crestas hacia adentro (invaginaciones). Las mitocondrias están constituidas de lipoproteína y una pequeña cantidad de RNA y DNA (diferente al DNA nuclear). En la matriz mitocondrial se localizan muchas enzimas e intermediarios químicos involucrados en la producción de energía. Las mitocondrias contienen los componentes de la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa, así como las enzimas del ciclo de Krebs<sup>45</sup>.

Cada célula de levadura contiene una o más vacuolas transparentes a los electrones que están limitadas por una membrana. En las células que se encuentran en la fase exponencial, el interior de este organelo no presenta elementos estructurales. Se ha demostrado la presencia de diversas enzimas hidrolíticas como proteasas, ribonucleasas y esterasas. La existencia de hidrolasas en las vacuolas demuestra que este organelo corresponde a los lisosomas de eucariotes superiores<sup>45</sup>.

Durante el proceso de aislamiento de organelos celulares, el retículo endoplásmico se obtiene como una multitud de pequeñas vesículas con un diámetro aproximado de 100 nm, que se conocen como microsomas. Los microsomas constituyen un modelo adecuado para el estudio de la función del retículo endoplásmico. Este organelo celular contiene sistemas enzimáticos responsables de la síntesis de esteroides, triacilglicéridos y fosfolípidos, así como sistemas encargados de la detoxificación de drogas a través de reacciones de metilación o hidroxilación. En el retículo endoplásmico se localiza el citocromo P-450 que está asociado a los procesos de detoxificación de drogas.

La familia de organelos conocida como microcuerpos incluye a los peroxisomas, glioxisomas y glicosomas, siendo los peroxisomas los más importantes. El peroxisoma fue definido por de Duve como el microcuerpo que contiene al menos una oxidasa productora de peróxido de hidrógeno y catalasa que degrada este compuesto<sup>47</sup>. Además de esta función respiratoria en los peroxisomas se efectúa la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, la cual se conserva en animales, plantas y hongos. Se ha demostrado que existe también la  $\beta$ -oxidación mitocondrial en animales no así en plantas ni en hongos, incluyendo levaduras<sup>48</sup>. En los peroxisomas de plantas y hongos se encuentran también las enzimas que participan en el ciclo del glioxilato, en el cual se convierten los compuestos de dos carbonos (como el acetyl-CoA provenientes de la degradación de ácidos grasos por la  $\beta$ -oxidación) a carbohidratos<sup>49</sup>.

El glioxisoma es el microcuerpo que contiene las enzimas del ciclo del glioxilato<sup>50</sup>. En este organelo también se lleva a cabo la formación y degradación del peróxido de hidrógeno y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. El glicosoma generalmente carece de catalasa, pero contiene las enzimas de la glicólisis<sup>51</sup> y otras proteínas comunes de los peroxisomas<sup>52</sup>.



El estudio de los peroxisomas se ha incrementado en los últimos años por varias razones: a) El hallazgo de que peroxisomas de mamíferos están involucrados en el metabolismo de lípidos<sup>53</sup>, b) Diferentes compuestos carcinogénicos inducen la proliferación peroxisomal en roedores<sup>54</sup> y c) Diversas enfermedades humanas hereditarias que se consideran letales son causadas por defectos en la función y/o ensamble de los peroxisomas<sup>49</sup>.

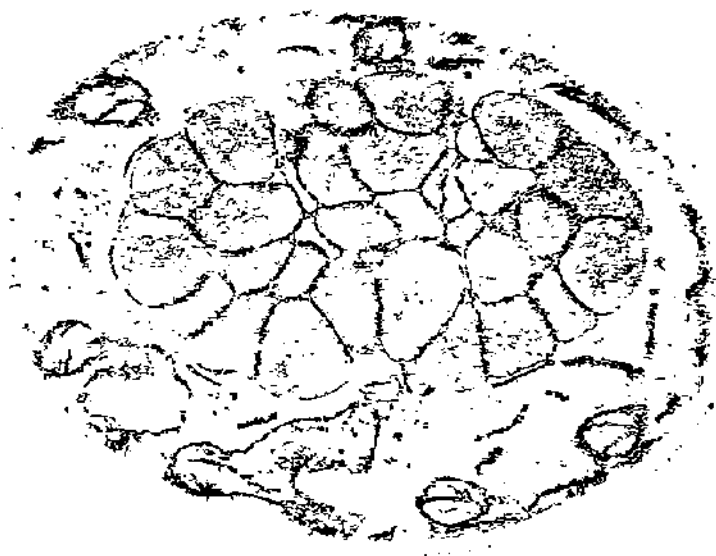
El estudio de la biogénesis y función peroxisomal en levaduras se ha facilitado debido al descubrimiento de levaduras que son capaces de crecer en medios con metanol como única fuente de carbono y de energía. A este grupo de levaduras se les denomina metilotróficas.

Es evidente que la utilización del metanol entre levaduras no es tan común como en bacterias. Estudios efectuados en extensas colecciones de levaduras han mostrado únicamente 15 especies de levaduras capaces de crecer en metanol, incluidas en los géneros *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* y *Torulopsis*<sup>55,56</sup>.

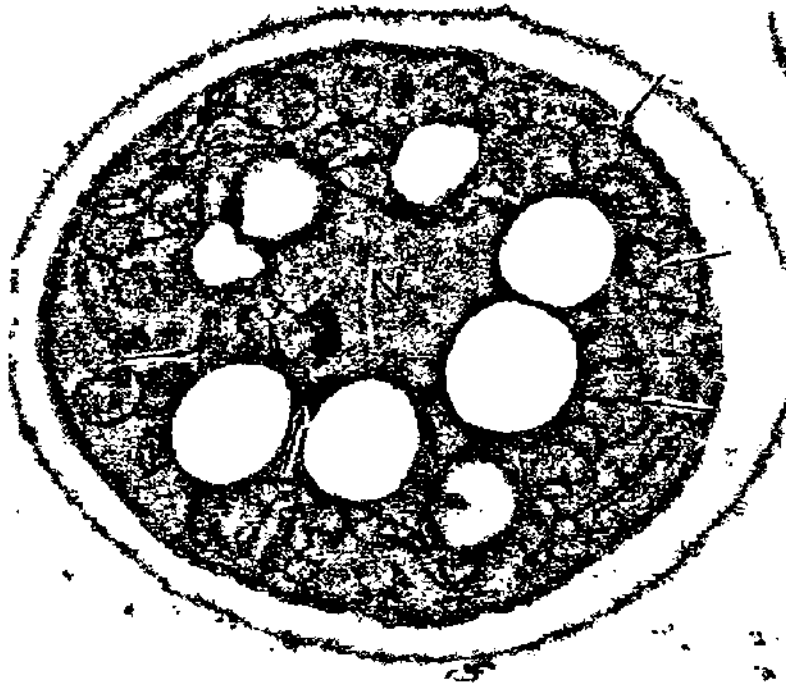
Ogata y cols.<sup>57</sup> (1969) reportaron por primera vez el aislamiento de una levadura cultivada en un medio con metanol: *Kloeckera* sp. 2201 (la cual se conoce actualmente como *Candida boidinii*).

El paso inicial del metabolismo del metanol consiste en la oxidación del metanol a formaldehído, el cual es catalizado por la enzima alcohol oxidasa (AO). En esta reacción se forma como producto secundario el peróxido de hidrógeno que es degradado por la catalasa. Se ha propuesto que esta enzima juega un papel importante en la oxidación del metanol<sup>58</sup>. Ambas enzimas son exclusivas del peroxisoma cuando la levadura se cultiva en medio con metanol como única fuente de carbono<sup>59</sup>.

Debido a que la AO y la catalasa se encuentran en los peroxisomas, la inducción de la síntesis de estas enzimas en la célula esta asociada con la proliferación de dichos organelos (Figura 3). La inducción de la proliferación de peroxisomas se observa como la formación de grupos de organelos que llegan a ocupar hasta el 80% del volumen citoplásmico de la célula<sup>60,61</sup>.



**Figura 3.** Inducción de la proliferación peroxisomal en levaduras metilotróficas.



**Figura 4.** Inducción de la proliferación peroxisomal en *Saccharomyces cerevisiae* cultivada en medio con ácido oleico.

En levaduras metilotróficas la proliferación peroxisomal puede ser inducida también por otros sustratos diferentes al metanol, tales como el ácido oleico y D-alanina<sup>112</sup>. Cuando se utiliza el ácido oleico<sup>62</sup> en el medio de cultivo como única fuente de carbono y energía, se induce la síntesis del sistema de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, ciertas enzimas del ciclo del glioxilato y catalasa. Se ha reportado que el uso de D-alanina<sup>63</sup> induce la síntesis de catalasa, D-aminoácido oxidasa y glutamato-oxalacetato aminotransferasa. En ambos casos se induce la proliferación del peroxisoma, sin embargo el grado de proliferación es mucho mayor cuando estas levaduras se cultivan en medios con metanol como única fuente de carbono.

Existen levaduras no metilotróficas en las cuales también se puede inducir la proliferación peroxisomal utilizando sustratos específicos. Tal es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada en medio con ácido oleico como única fuente de carbono<sup>48</sup>.

Bajo condiciones basales, en medio con glucosa como única fuente de carbono, las células de *S. cerevisiae* contienen uno o pocos peroxisomas pequeños. Cuando la levadura se cultiva en fuentes de carbono no fermentables como glicerol o etanol sus peroxisomas se observan en ocasiones un poco más grandes. Los peroxisomas son aún mas grandes y abundantes cuando las células se cultivan en medio con ácido oleico como única fuente de carbono (Figura 4).

En los peroxisomas de *S. cerevisiae* se ha demostrado además de la catalasa, la presencia de enzimas del ciclo del glioxilato (malato sintasa, isocitrato liasa y citrato sintasa) y las enzimas del sistema de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (acil-CoA sintetasa, acil-CoA oxidasa, enoil-CoA hidratasa, 3-hidroxi acil-CoA deshidrogenasa, 3-ceto acil-CoA tiolasa y carnitin-acetil-CoA acil transferasa). Durante la proliferación de peroxisomas en medios con ácido oleico se induce también la síntesis de las enzimas antes mencionadas. En comparación con levaduras metilotróficas el grado de proliferación y el tamaño de los peroxisomas en *S. cerevisiae* es considerablemente menor<sup>64, 65</sup>.

## ANTECEDENTES DIRECTOS

Los estudios realizados por Sepúlveda y cols.<sup>41</sup> demostraron por primera vez que una dosis no letal (2 µg/mL) de PA1 produjo un daño selectivo e irreversible sobre los peroxisomas de levaduras metilotróficas *Candida boidinii* y *Hansenula polymorpha*. El daño sobre los peroxisomas se observó como la fragmentación de la membrana peroxisomal, bajo estas condiciones experimentales no se observó daño sobre otras estructuras celulares, lo cual sugirió que el efecto de PA1 fuese selectivo sobre los peroxisomas. El daño peroxisomal fue irreversible ya que los organelos afectados fueron degradados en la vacuola autofágica. Este hallazgo ha sido confirmado por Vargas y cols.<sup>44</sup> en *H. polymorpha* y por Salazar y cols.<sup>43</sup> en *C. boidinii*.

Por otro lado, estudios realizados en células de túbulos contorneados proximales aislados, incubados con PA1, demostraron que este compuesto además de producir una disminución del número de peroxisomas, también causa cambios morfológicos en las mitocondrias de estas células<sup>66</sup>. Recientemente, en la levadura metilotrófica *C. boidinii* se encontró un hallazgo similar: el compuesto T 544, una antracenona dimérica estructuralmente relacionada a PA1, produjo efecto sobre las mitocondrias. Este daño se observó como un agrandamiento del organelo<sup>67</sup>.

El efecto de PA1 sobre los peroxisomas de levaduras metilotróficas se ha demostrado a través de métodos morfológicos. Sin embargo no se han realizado estudios bioquímicos, por lo cual se desconoce si la PA1 produce efecto sobre la función de los diferentes compartimentos celulares. En este estudio se investigó, por medio de métodos bioquímicos y morfológicos, el posible efecto de la PA1 sobre los principales compartimentos celulares de la levadura *Candida boidinii*, tales como citosol, retículo endoplásmico, mitocondrias, peroxisomas y núcleo.

Por otro lado, el efecto de PA1 sobre la membrana peroxisomal ha sido demostrado únicamente en dos especies de las levaduras metilotróficas: *Hansenula polymorpha* y *Candida boidinii*, cultivadas en medios con metanol como única fuente de carbono. Con el propósito de investigar si el efecto de PA1 está relacionado con la actividad metabólica de levaduras, en el presente trabajo se analizó el efecto de PA1 sobre los

peroxisomas de una levadura no metilotrónica como lo es *Saccharomyces cerevisiae* cultivada en medio con ácido oleico como única fuente de carbono y sustrato inductor de proliferación peroxisomal.

## **HIPOTESIS**

**La Peroxisomicina A1, a una dosis no letal produce daño selectivo sobre los peroxisomas de *C. boidinii* y *S. cerevisiae*.**

### **OBJETIVO GENERAL.**

Analizar el efecto de la Peroxisomicina A1 sobre los principales compartimentos celulares de *C. bodinii*, así como evaluar su acción sobre *S. cerevisiae*.



## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar la ultraestructura celular de *C. boidinii* cultivada en ausencia y presencia de una dosis no letal de peroxisomicina A1.
- 2.- Determinar la actividad de enzimas marcadoras de las fracciones celulares aisladas de *C. boidinii* cultivada en ausencia y presencia de una dosis no letal de peroxisomicina A1.
- 3.- Analizar los principales componentes de la fracción nuclear de *C. boidinii* cultivada en ausencia y presencia de una dosis no letal de peroxisomicina A1.
- 4.- Investigar la presencia de peroxisomicina A1 en las fracciones celulares aisladas de *C. boidinii* cultivada en presencia de una dosis no letal de peroxisomicina A1, por medio de CLAR.
- 5.- Investigar el efecto de la peroxisomicina A1 sobre la viabilidad de *S. cerevisiae*.
- 6.- Evaluar la ultraestructura celular de *S. cerevisiae* cultivada en ausencia y presencia de una dosis no letal de peroxisomicina A1.

## CAPITULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Material

##### 2.1.1. Reactivos

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

##### 2.1.2. Material biológico

*Candida boidinii* cepa ATCC 32195.

*Saccharomyces cerevisiae* cepa MMYO 11 $\alpha$ .

Peroxisomicina A1 extraída de *Karwinskia parvifolia*. Este compuesto fue aislado y purificado en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

##### 2.1.3. Equipo

Incubadora estática Riossa.

Incubadora Lab-line con agitador mecánico.

Espectrofotómetro Beckman DU 7500 con arreglo de diodos.

Centrífuga Beckman Avanti 30.

Ultramicrotomo Ultratome LKB V.

Microscopio Electrónico de Transmisión Carl-Zeiss EM 109.

Ultracentrífuga Beckman L8-M.

Rotores Beckman SW28 y Ti60.  
Cámara para Extracción en Fase Sólida Waters.  
Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución HP 1090 con arreglo de diodos.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Preparación de solución concentrada de PA1

La peroxisomicina A1 se disolvió en metanol (solubilidad 1 mg/mL) para obtener una solución concentrada del compuesto. Las soluciones de PA1 se prepararon inmediatamente antes de su uso.

### 2.2.2. Métodos de cultivo

Las células de *C. boidinii* y *S. cerevisiae* se mantuvieron viables a través de su resiembra cada dos meses en placas de agar YPD al 2 % (ver Apéndice). Las placas de cultivo se almacenan a 4 °C.

#### 2.2.2.1. Métodos de cultivo de *Candida boidinii*.

Los cultivos líquidos de *C. boidinii* se realizaron de la siguiente forma: se inoculó una colonia de la levadura en medio enriquecido con glucosa al 2% (YPD 2%, ver Apéndice). Los cultivos se incubaron por 24 horas a 30 °C bajo agitación constante (250 rpm). Células de *C. boidinii* de los cultivos en YPD (2%) se transfirieron a Medios Mínimos con Metanol (MMM 0,5 %, ver Apéndice). El metanol se utilizó como única fuente de carbono y como sustrato inductor de la proliferación peroxisomal. Los cultivos se iniciaron en todos los casos con una turbidez del medio de cultivo de 0,1 D.O./mL determinado a 600 nm. Dichos cultivos se revisaron periódicamente bajo el microscopio de luz para evaluar su pureza y descartar su contaminación.

### **2.2.2.2. Métodos de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Los cultivos líquidos de *S. cerevisiae* se realizaron de la siguiente forma: se inoculó una colonia de la levadura en medio enriquecido con glucosa al 2% (YPD 2%, ver Apéndice). Los cultivos se incubaron por 24 horas a 30 °C bajo agitación constante (250 rpm). Células de *S. cerevisiae* de los cultivos en YPD (2%) se transfirieron a Medios con Glucosa (YPGG, ver Apéndice) o con Acido oleico (YPGOT, ver Apéndice). El ácido oleico se utilizó como única fuente de carbono y como sustrato inductor de la proliferación peroxisomal. Los cultivos se iniciaron en todos los casos con una turbidez del medio de cultivo de 0,1 D.O./mL determinado a 600 nm. Todos los cultivos se incubaron a 30 °C bajo agitación constante (250 rpm). Los cultivos se revisaron periódicamente bajo el microscopio de luz para evaluar su pureza y descartar su contaminación.

### **2.2.3. Conteo de colonias de *Saccharomyces cerevisiae* en placas de agar**

Se realizaron cultivos líquidos de *S. cerevisiae* en medios con glucosa o con ácido oleico como única fuente de carbono. En la fase exponencial media de los cultivos se adicionó PA1 a una concentración final de 0,5; 2; 10; 20 y 50 µg/mL. Como control se utilizaron cultivos sin PA1. Después de la adición de PA1, los cultivos se incubaron a 30 °C bajo agitación constante durante 2 hrs. Se realizaron diluciones seriadas de los cultivos de *S. cerevisiae* hasta tener una dilución final de  $1:1 \times 10^6$ . Un volumen de 0,1 mL de la última dilución se sembró por extensión, tanto en placas de agar YPGG como en placas de agar YPGOT (Ver Apéndice). Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 hrs. Posteriormente se realizó el conteo de las colonias en las placas de agar.

## 2.2.4. Aislamiento de organelos celulares

### 2.2.4.1. Formación y lisis de esferoplastos<sup>66</sup>

Se realizaron cultivos líquidos de *C. boidinii* en Medios con Metanol (MMM; 0,5%). En la fase exponencial media de los cultivos se adicionó a cada uno de ellos PA1 a una concentración final de 2 µg/mL. Como control se utilizaron cultivos sin PA1. Después de la adición de PA1, los cultivos se incubaron a 30 °C bajo agitación constante durante 0,5; 1 y 2 hrs.

Se cosecharon las células y se obtuvo el paquete celular. Después de lavar con agua destilada el paquete celular se resuspendió en amortiguador Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 9.3; ver Apéndice), la suspensión se incubó durante 15 min a 30 °C y 250 rpm. Las células se lavaron con sorbitol 1 M.

Para la formación de esferoplastos se efectuó la digestión de la pared celular utilizando una solución de sorbitol (1 M; Amortiguador de fosfato de potasio 200 mM; pH 7,5). Se agregaron 25 mg de liticasa a la solución. La liticasa que se utilizó fue de *Arthrobacter luteus* con actividad de 81 000 U/mg y se adquirió comercialmente de Laboratorios ICN Biomedicals, Inc. Las células se suspendieron en esta solución y se incubaron por 65 min a 30 °C y 250 rpm.

Se realizó lisis osmótica de los esferoplastos utilizando sorbitol (MES-NaOH 5 mM; pH 5,5; PMSF 1 mM). Primero los esferoplastos se resuspendieron en sorbitol 1 M y posteriormente se agregó una solución de sorbitol 0,25 M. Después de realizar una agitación vigorosa para la lisis de los esferoplastos, se adicionó a la suspensión sorbitol 1,75 M. La suspensión de organelos se sometió a centrifugación diferencial: 5 000 x g, 20 min (Rotor JA16, 8 000 rpm).

La formación de esferoplastos se evaluó bajo el microscopio de luz: se colocó una muestra de esferoplastos sobre un portaobjetos y se cubrió, los esferoplastos se observaron con una membrana refringente. Posteriormente se adicionó una gota de agua destilada y se observó bajo el microscopio de luz, al contacto con el agua se produce la lisis de los esferoplastos y se liberan los organelos.

#### **2.2.4.2. Separación de organelos celulares por medio de ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa<sup>60</sup>**

El sobrenadante obtenido después de la centrifugación a 5 000 x g, se centrifugó a 15 000 x g, 20 min (Rotor Ti60, 12 000 rpm), obteniéndose el sedimento enriquecido con citosol, mitocondrias y peroxisomas. Posteriormente este sedimento se sometió a ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (ver Apéndice) a 140 000 x g, 5.5 h (Rotor Sw28, 27 000 rpm) (Figura 5).

#### **2.2.4.3. Aislamiento de la fracción microsomal**

El sobrenadante obtenido después de la centrifugación a 5 000 x g, se centrifugó a 15 000 x g, 20 min (Rotor Ti60, 12 000 rpm). En el sobrenadante se obtuvo parte del citosol y los microsomas. La fracción microsomal se obtuvo después de un paso ultracentrifugación a 120 000 x g, 4 min (Rotor Ti60, 35 500 rpm).

#### **2.2.4.4. Aislamiento del núcleo celular<sup>68</sup>**

El paquete de esferoplastos se sometió a homogenización en presencia de Triton X-100 (ver Apéndice). El homogenizado se centrifugó a 3 000 x g, 7 min. El sedimento se sometió a ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (ver Apéndice) a 115 000 x g, 1 h (Rotor Sw 28, 25 000 rpm). La fracción nuclear se obtuvo en la fase de sacarosa 2 M.

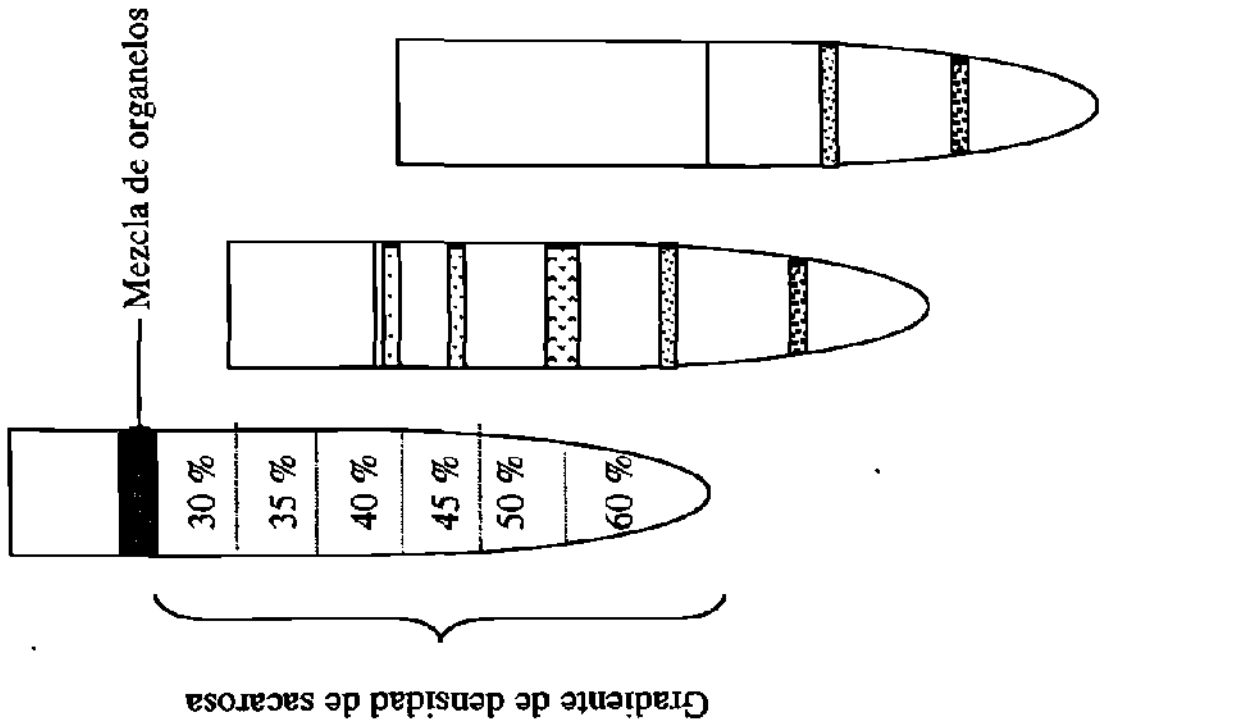
### **2.2.5. Métodos analíticos**

#### **2.2.5.1. Determinación de turbidez de cultivos de levaduras**

La turbidez es una medida del crecimiento de las células de levadura.

**Figura 5.** Obtención de las fracciones celulares de *C. boidinii* por medio de ultracentrifugación en gradiente de densidad discontinuo de sacarosa.

En este procedimiento el gradiente de densidad consiste en soluciones de diferente concentración de sacarosa (30 - 60 %), la solución mas concentrada se encuentra en el fondo del tubo. La mezcla de organelos se coloca en la parte superior del gradiente y se centrifuga a 27 000 rpm, 5.5 h (rotor SW28). Los organelos celulares sedimentan en forma de bandas en la fase del gradiente que corresponde a su propia densidad. Al termino de la ultracentrifugación cada banda correspondiente a cada uno de los compartimentos celulares se recolecta individualmente.



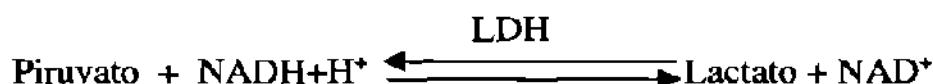
El crecimiento celular de los cultivos se determinó midiendo la turbidez de éstos a través del valor de su densidad óptica (D.O./mL) a 600 nm.

Para medir la densidad óptica se colectaron alícuotas de los cultivos y se realizaron diluciones seriadas en agua destilada hasta tener una dilución 1:1000. Se determinó la densidad óptica de la última dilución (1:1000) en el espectrofotómetro Beckman, DU-7500 a una longitud de onda de 600 nm.

## 2.2.5.2. Determinación de Actividad Enzimática.

### 2.2.5.2.1. Lactato Deshidrogenasa

Se determinó la actividad de LDH en las fracciones de organelos celulares<sup>69</sup>. Este es un método espectrofotométrico basado en la medición de la disminución de NADH a 340 nm, pH de 7.0 y 25 °C (ver Apéndice).



### 2.2.5.2.2. Fumarasa

La actividad de fumarasa se determinó en las fracciones celulares de organelos<sup>69</sup>. Este método se basa en la medición de la formación de fumarato a 240 nm, pH de 7.4 y 25 °C (ver Apéndice).

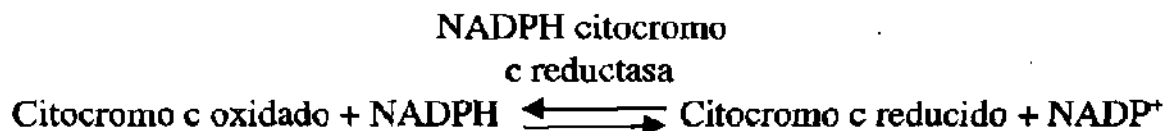


### 2.2.5.2.3. NADPH citocromo c reductasa

Se determinó la actividad de NADPH citocromo c reductasa en las fracciones de organelos celulares según el método de Schatz y Klima<sup>70</sup>. En

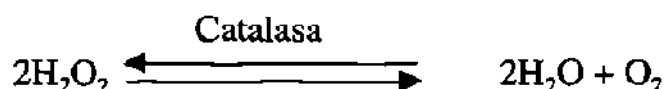


este método espectrofotométrico se mide la formación de citocromo c reducido a 550 nm, pH de 7.4 y 25 °C (ver Apéndice).



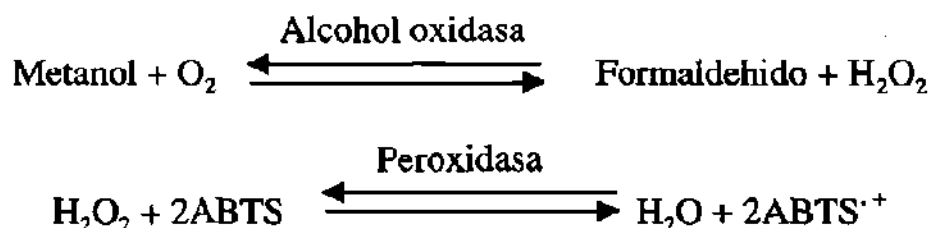
#### 2.2.5.2.4. Catalasa

Se determinó la actividad de catalasa en las fracciones celulares según el método descrito por Aebi<sup>71</sup>. Este es un método espectrofotométrico basado en la medición de la disminución de peróxido de hidrógeno a 240 nm, pH de 7.4 y 25 °C (ver Apéndice).



#### 2.2.5.2.5. Alcohol oxidasa

La actividad de alcohol oxidasa se determinó en las fracciones de organelos celulares según el método de Tani y cols.<sup>72</sup> En este método espectrofotométrico acoplado se mide la formación del radical cationico ABTS<sup>73</sup> a 420 nm, pH de 7.5 y 25 °C (ver Apéndice).



### **2.2.5.3. Determinación de componentes del núcleo celular**

La fracción nuclear se lavó con ácido perclórico y se centrifugó a 5 000 x g, 3 min (Rotor JA16, 8000 rpm). Posteriormente se sometió a digestión alcalina a 30 °C durante 1 hr<sup>74</sup>. A partir del digerido se tomó una alícuota para la determinación de proteínas totales. El resto de la muestra se acidificó con ácido perclórico, la presencia de ácido produjo un precipitado blanco, después de centrifugar se colectó una muestra para determinar el contenido de RNA. El sedimento se resuspendió en medio alcalino y se determinó la cantidad de DNA. La determinación de RNA y DNA se realizó a través de la medición de absorbancia a 260 nm.

### **2.2.5.4. Determinación de proteínas totales**

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford<sup>75</sup>, el cual se basa en la unión del colorante azul de Coomassie brillante G-250 a las proteínas causando un cambio del pico máximo de absorción del colorante de 465 nm a 595 nm. El incremento de absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteínas (ver Apéndice).

## **2.2.6. Métodos cromatográficos**

### **2.2.6.1. Pretratamiento de la muestra**

Las fracciones celulares de *C. boidinii* aisladas se resuspendieron en amortiguador de fosfato de potasio con Triton X-100 (0,1%) pH 5.0 y se mezclaron con 3.5 g de perlas de vidrio. Los organelos se trituraron mecánicamente por agitación en vortex 5 veces durante 30 seg. Las perlas de vidrio se separaron utilizando una jeringa con cartucho de algodón al fondo y centrifugando a 6 000 rpm por 3 min. El sobrenadante obtenido se sometió a Extracción en Fase Sólida. Para la Extracción en Fase Sólida se utilizaron cartuchos sep pak C18, los cuales se preacondicionaron con

metanol y agua. Después de pasar la muestra se lavó el cartucho con agua desionizada y se eluyó con metanol (5% de ác. Acético).

### **2.2.6.2. Determinación de Peroxisomicina A1 por CLAR**

Se inyectó un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de las muestras al Cromatografo de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: Columna Lichrospher, 5 $\mu\text{m}$ , 4.6 x 100 mm, flujo 0,8 mL/min, Volumen de inyección 5  $\mu\text{L}$ , gradiente de elución A: metanol, B: agua-acetonitrilo-ác. Acético (70:30:1.6), longitud de onda 410 nm.

### **2.2.7. Microscopía electrónica de transmisión**

Se prepararon cultivos tanto de *C. boidinii* en medio con metanol como de *S. cerevisiae* en medio con ácido oleico como única fuente de carbono, respectivamente. Al alcanzar la fase exponencial media se les adicionó PA1 a una concentración final de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Como controles se utilizaron cultivos sin PA1. Los cultivos se incubaron a 30 °C bajo agitación constante (250 rpm). Después de 2 hrs. de exposición a PA1, se tomaron dos alícuotas de 5 mL de cultivo cada una. Las muestras se procesaron para microscopía electrónica de transmisión hasta su inclusión en resina epóxica. Se utilizaron dos técnicas de fijación: la primera con Permanganato de Potasio<sup>76</sup> y la segunda con Glutaraldehido y postfijación con tetraóxido de osmio<sup>76</sup>.

#### **2.2.7.1. Técnica de fijación con permanganato de potasio**

Las muestras se lavaron 2 veces con agua destilada y se fijaron en permanganato de potasio (1,5 % en agua desionizada). Se lavaron 2 ó mas veces hasta que el color fue transparente, posteriormente se contrastaron con acetato de uranilo (1 % en agua ultrapura) y se deshidrataron en series crecientes de etanol. Las muestras se aclararon con óxido de propileno y se incluyeron en resina epóxica (ver Apéndice). La polimerización se realizó

en tubos Ependorff a 60°C durante toda la noche. A partir de los bloques resultantes se prepararon cortes finos los cuales se contrastaron con acetato de uranilo al 0,5 % en solución alcohólica al 50 %. Se realizó la observación bajo el microscopio electrónico de transmisión.

#### **2.2.7.2. Técnica de fijación con glutaraldehído y post fijación con tetraóxido de osmio**

Las muestras se lavaron 3 veces con agua destilada y se fijaron en glutaraldehído (2,5 % en agua desionizada). Para *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó glutaraldehído al 3,0 %. Posteriormente se lavaron 3 veces con amortiguador de cacodilatos 0,1 M (ver Apéndice) pH 7,4. Las muestras se posfijaron con tetraóxido de osmio (2 % en agua ultrapura) y se lavaron 3 veces con amortiguador de cacodilatos, después se trataron con nitrato de uranilo (1 %). Se lavaron 3 veces con amortiguador de cacodilatos y se deshidrataron en series crecientes de acetona. Las muestras se incluyeron en resina epóxica. La polimerización se realizó en tubos ependorff a 60 °C durante toda la noche. A partir de los bloques resultantes se prepararon cortes finos. Los de *C. boidinii* se contrastaron con acetato de uranilo al 0,5 % en solución alcohólica al 50 %. Los cortes de *S. cerevisiae* no se contrastaron. Se realizó la observación bajo el microscopio electrónico de transmisión.

#### **2.2.8. Análisis estadístico**

Cada una de las determinaciones analíticas así como el conteo de colonias de *S. cerevisiae* en placas de agar se realizaron por triplicado y se sometieron a la prueba de hipótesis de la diferencia entre las proporciones de dos poblaciones para muestras pequeñas. De esta forma se determinó la posible diferencia estadística significativa con respecto al control.

Para el análisis estadístico se utilizó un valor de  $n = 3$ , con un grado de significancia de  $p \leq 0,005$ . El valor crítico de la prueba fue de  $\pm 2,896$ .

## CAPITULO 3

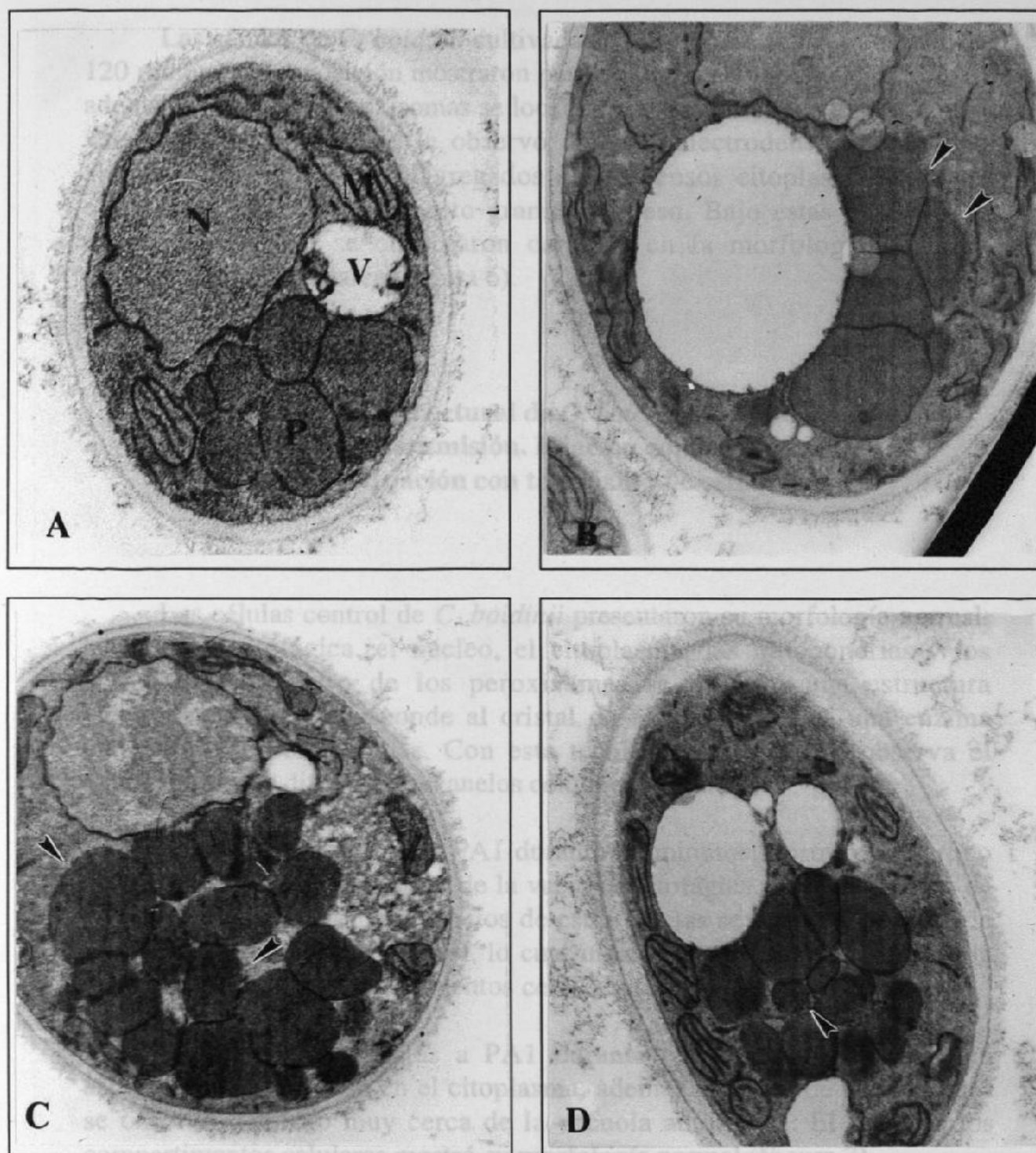
### RESULTADOS

#### **3.1. Análisis ultraestructural de *C. boidinii* por microscopía electrónica de transmisión. Fijación con permanganato de potasio**

Las células control (sin toxina) de *C. boidinii* presentaron la morfología normal, es decir, se observaron con sus diferentes compartimentos celulares, bajo las condiciones de cultivo descritas: el núcleo, las mitocondrias, los peroxisomas, la vacuola autofágica, el retículo endoplásmico y el citoplasma. Con esta técnica de fijación se observan las membranas subcelulares con mayor nitidez (Figura 6).

Las células expuestas a PA1 durante 30 minutos mostraron fragmentación de la membrana peroxisomal así como depósitos citoplasmáticos electrodensos cerca de los peroxisomas. Se observaron también membranas preautofágicas y peroxisomas pequeños. No se observó alteración de otros organelos celulares bajo estas condiciones experimentales (Figura 6).

Las células expuestas a PA1 durante 60 minutos mostraron discontinuidad de la membrana peroxisomal, se observaron peroxisomas rodeados de membranas preautofágicas, el citoplasma se observó con un aspecto granular grueso en algunas células. Dentro de la vacuola autofágica se apreció escasa cantidad de material electrodenso. No se observó alteración en otros organelos celulares bajo estas condiciones experimentales (Figura 6).



**Figura 6.** Micrografías electrónicas (7 000x) de *C. boidinii* cultivada en medio mínimo con metanol (0.5%) en presencia de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PA1. Fijación con permanganato de potasio e inclusión en resina epóxica. Las células expuestas a PA1 mostraron fragmentación de la membrana peroxisomal ( $\blacktriangleright$ ). (A) Control. (B) 30 min. (C) 60 min. (D) 120 min. V = Vacuola; P = Peroxisoma; N = Núcleo; M = Mitocondrias; RE = Retículo endoplásmico.

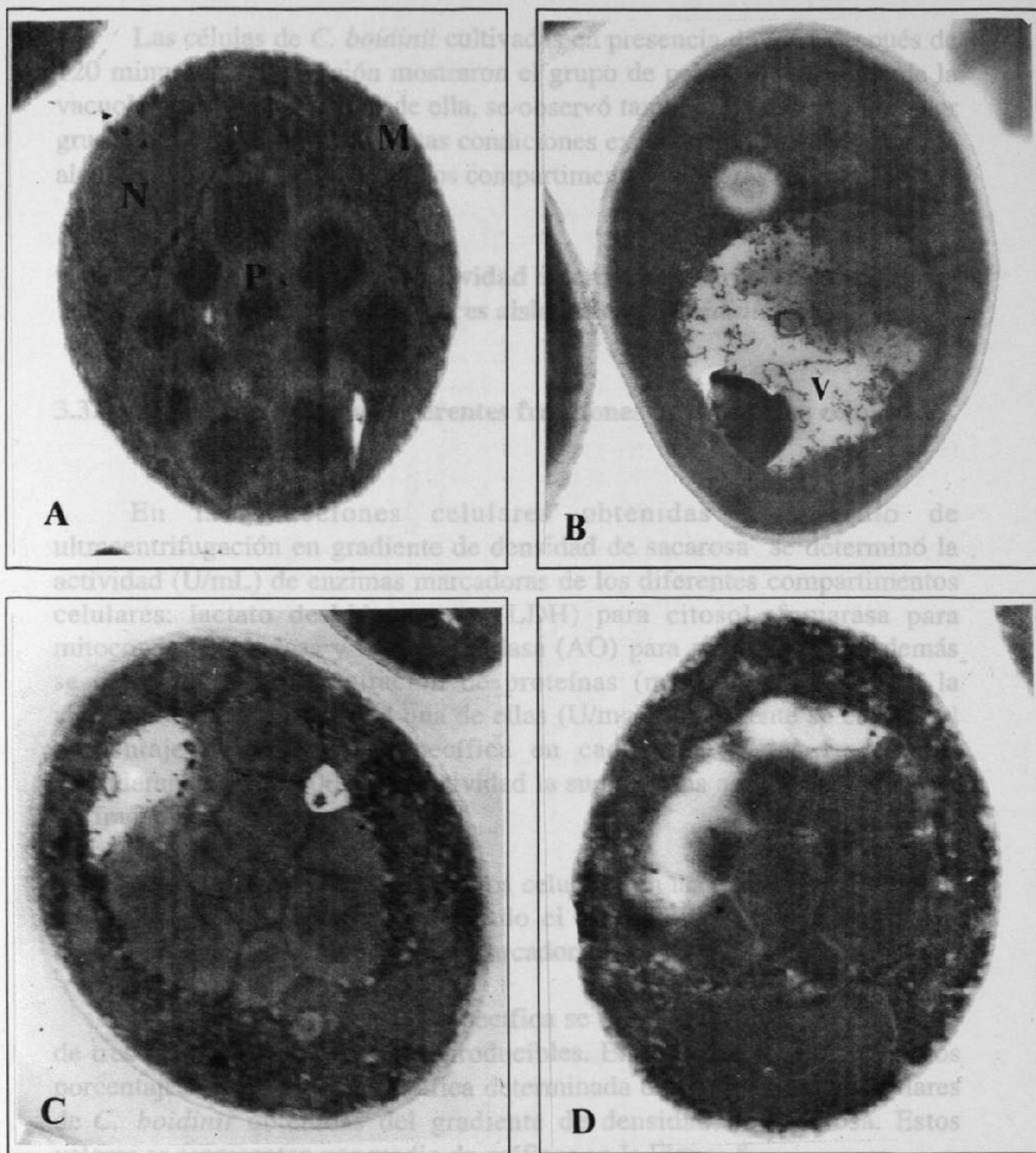
Las células de *C. boidinii* cultivadas en presencia de PA1 después de 120 minutos de exposición mostraron pérdida de la membrana peroxisomal; además el grupo de peroxisomas se localizó íntimamente relacionado con la vacuola y dentro de ésta se observó material electrodensito en cantidad abundante. Se observaron agregados electrodensos citoplasmáticos y el citoplasma presentó un aspecto granular grueso. Bajo estas condiciones experimentales no se observaron cambios en la morfología de otros compartimentos celulares (Figura 6).

### **3.2. Análisis ultraestructural de *C. boidinii* por microscopía electrónica de transmisión. Fijación con glutaraldehído y postfijación con tetraóxido de osmio**

Las células control de *C. boidinii* presentaron su morfología normal: la vacuola autofágica, el núcleo, el citoplasma, las mitocondrias y los peroxisomas. Dentro de los peroxisomas se observó una estructura electrodensa que corresponde al cristal de alcohol oxidasa, una enzima marcadora de peroxisomas. Con esta técnica de fijación se observa el contenido de los diferentes organelos celulares (Figura 7).

Las células expuestas a PA1 durante 30 minutos mostraron el grupo de peroxisomas cerca o dentro de la vacuola autofágica. La constitución de la matriz del resto de los organelos de estas células se observó similar a la observada en las células control, lo cual indicó que no hubo cambios en la morfología de otros compartimentos celulares (Figura 7).

Las células expuestas a PA1 durante 60 minutos mostraron un aspecto granular grueso en el citoplasma, además el grupo de peroxisomas se observó dentro o muy cerca de la vacuola autofágica. El resto de los compartimentos celulares mostró su morfología normal (Figura 7).



**Figura 7.** Micrografías electrónicas (7 000x) de *C. boidinii* cultivada en medio mínimo con metanol (0.5%) en presencia de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PA1. Fijación con glutaraldehído y postfijación con tetraóxido de osmio. (A) Control. (B) 30 min. (C) 60 min. (D) 120 min. V = Vacuola; P = Peroxisoma; N = Núcleo; M = Mitocondrias.



Las células de *C. boidinii* cultivadas en presencia de PA1 después de 120 minutos de exposición mostraron el grupo de peroxisomas cerca de la vacuola autofágica o dentro de ella, se observó también un aspecto granular grueso del citoplasma. Bajo estas condiciones experimentales no se observó alteración morfológica sobre otros compartimentos celulares (Figura 7).

### **3.3. Determinación de la actividad de enzimas marcadoras en las fracciones celulares aisladas de *C. boidinii***

#### **3.3.1. Identificación de las diferentes fracciones de organelos celulares**

En las fracciones celulares obtenidas por medio de ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa se determinó la actividad (U/mL) de enzimas marcadoras de los diferentes compartimentos celulares: lactato deshidrogenasa (LDH) para citosol, fumarasa para mitocondrias, catalasa y alcohol oxidasa (AO) para peroxisomas. Además se determinó la concentración de proteínas (mg/mL) y se calculó la actividad específica de cada una de ellas (U/mg). Finalmente se calculó el porcentaje de actividad específica en cada una de las fracciones, considerando como 100 % de actividad la suma de las actividades en todas las fracciones del gradiente.

La localización de los organelos celulares en las diferentes fracciones del gradiente se efectuó considerando el mayor porcentaje de actividad específica de su respectiva enzima marcadora.

Los valores de actividad específica se obtuvieron como el promedio de tres resultados que fueron reproducibles. En la Tabla I se incluyen los porcentajes de actividad específica determinada en las fracciones celulares de *C. boidinii* obtenidas del gradiente de densidad de sacarosa. Estos valores se representan por medio de gráficas en la Figura 8.

Se localizaron las fracciones de citosol, mitocondrias y peroxisomas en las fracciones 2, 3 y 5 del gradiente de densidad de sacarosa, respectivamente (Figura 8).

**Tabla I.** Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras determinados en el gradiente de densidad de sacarosa. n = 3 (p ≤ 0,005).

Fracción celular	LDH (%)	Fumarasa (%)	Catalasa (%)	AO (%)
1	15.30 ± 5.66	5.00 ± 0.34	18.31 ± 9.38	2.96 ± 1.57
2	<b>41.55 ± 11.37</b>	20.43 ± 9.19	2.43 ± 1.03	0.17 ± 0.23
3	25.38 ± 4.44	<b>45.76 ± 18.56</b>	6.49 ± 5.02	1.54 ± 1.53
4	14.96 ± 9.19	28.76 ± 22.37	21.22 ± 13.06	9.90 ± 6.55
5	4.56 ± 2.82	0.05 ± 0.08	<b>51.58 ± 18.90</b>	<b>85.42 ± 7.68</b>

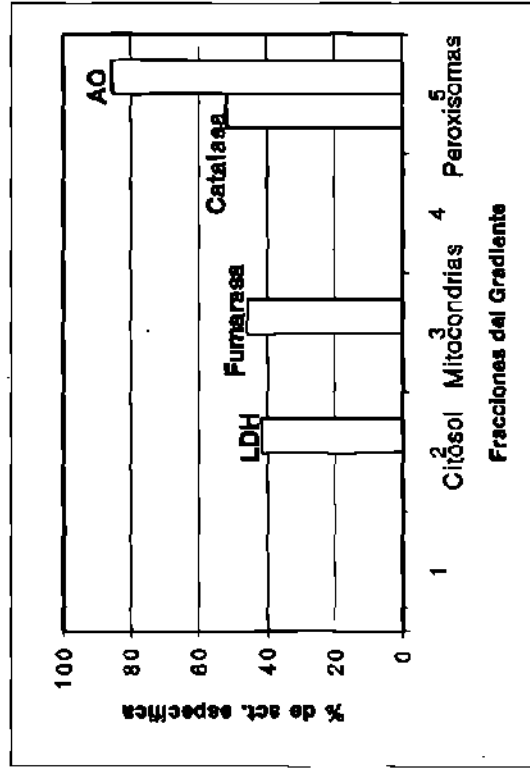
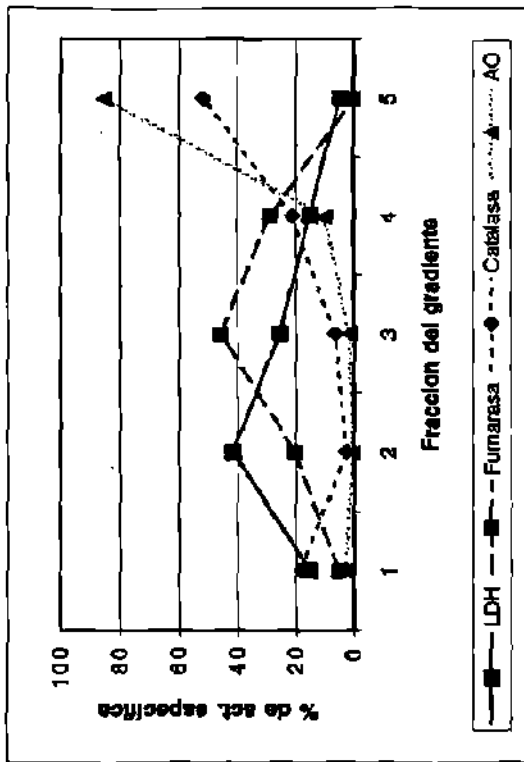


Figura 8. Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras determinados en el gradiente de densidad de sacarosa

### **3.3.2. Evaluación del efecto de PA1 sobre la localización de los organelos en las fracciones celulares aisladas de *C. boidinii***

Se realizaron cultivos de *C. boidinii* en medio con metanol como única fuente de carbono. Los cultivos se incubaron en ausencia y presencia de una dosis no letal (2 µg/mL) de PA1, durante diferentes tiempos (30, 60 y 120 minutos). Posteriormente se obtuvieron las fracciones de organelos celulares de esta levadura. En las fracciones celulares se determinó la actividad (U/mL) de enzimas marcadoras de los diferentes compartimentos celulares: lactato deshidrogenasa (LDH) para citosol, fumarasa para mitocondrias, NADPH citocromo c reductasa para microsomas, catalasa y alcohol oxidasa (AO) para peroxisomas. Además se determinó la concentración de proteínas (mg/mL) y la actividad específica de cada una de las enzimas (U/mg). Finalmente se calculó el porcentaje de actividad específica en cada una de las fracciones, considerando como 100 % de actividad la suma de las actividades de todas las fracciones.

Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de la prueba t con una  $p \leq 0,005$ . El valor crítico de la prueba fue de 2,896.

Se efectuaron varios experimentos tomándose el promedio de tres resultados que fueron reproducibles. En las Tablas II, III y IV se incluyen los porcentajes de actividad específica determinados en las fracciones celulares de *C. boidinii* expuesta a PA1 durante 30, 60 y 120 minutos, respectivamente. Estos resultados con su desviación estándar se representan en las Figuras 9, 10, 11 y 12.

### **3.3.3. Evaluación del efecto de PA1 sobre la actividad específica total de enzimas marcadoras en la levadura *C. boidinii***

Se determinó la actividad específica total de las enzimas marcadoras: LDH, fumarasa, catalasa y alcohol oxidasa en las fracciones del gradiente de densidad de sacarosa. Para la NADPH citocromo c reductasa también se determinó la actividad específica total en la fracción microsomal. Se calculó el porcentaje de actividad específica total considerando como 100 % el promedio determinado en los cultivos control.

**Tabla II.** Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras de *C. bovidinii* cultivada en presencia de 2 µg/mL de PAI durante 30 min. n = 3 (p ≤ 0,005).

Control					
Fracción celular	LDH (%)	Fumarasa (%)	Catalasa (%)	AO (%)	
1	15.30 ± 5.66	5.00 ± 0.34	18.31 ± 9.38	2.96 ± 1.57	
2	41.55 ± 11.37	20.43 ± 9.19	2.43 ± 1.03	0.17 ± 0.23	
3	25.38 ± 4.44	45.76 ± 18.56	6.49 ± 5.02	1.54 ± 1.53	
4	14.96 ± 9.19	28.76 ± 22.37	21.22 ± 13.06	9.90 ± 6.55	
5	4.56 ± 2.82	0.05 ± 0.08	51.58 ± 18.90	85.42 ± 7.68	

Problema					
Fracción celular	LDH (%)	Fumarasa (%)	Catalasa (%)	AO (%)	
1	4.34 ± 0.52	6.55 ± 3.12	20.02 ± 7.40	3.91 ± 2.71	
2	51.63 ± 6.51	28.81 ± 7.42	2.91 ± 1.72	0.22 ± 0.24	
3	33.20 ± 5.65	42.21 ± 9.73	5.34 ± 4.61	3.06 ± 3.61	
4	8.88 ± 5.82	22.30 ± 13.23	22.81 ± 10.45	10.67 ± 5.56	
5	1.97 ± 0.92	0.07 ± 0.12	47.96 ± 11.80	82.13 ± 7.78	

NADPH citocromo c reductasa		
Fracción celular recuperada	Control (%)	Problema (%)
Sobrenadante	6.65 ± 9.39	18.17 ± 30.12
Sedimento	93.29 ± 9.35	81.77 ± 30.07

**Tabla III.** Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras de *C. boidinii* incubada con 2 µg/mL de PAI durante 60 min. n = 3 (p ≤ 0,005).

<b>Control</b>					
Fracción celular	LDH (%)	Fumarasa (%)	Catalasa (%)	AO (%)	
<b>1</b>	16.02 ± 7.80	8.55 ± 4.10	13.78 ± 3.75	2.61 ± 0.97	
<b>2</b>	32.42 ± 4.95	17.67 ± 3.14	3.23 ± 0.60	0.20 ± 0.09	
<b>3</b>	39.52 ± 7.39	57.96 ± 3.86	5.61 ± 2.36	1.63 ± 0.50	
<b>4</b>	8.08 ± 0.70	16.52 ± 3.56	14.81 ± 3.41	7.94 ± 1.74	
<b>5</b>	3.94 ± 1.34	0.00 ± 0.00	63.57 ± 7.21	87.61 ± 1.74	

<b>Problema</b>					
Fracción celular	LDH (%)	Fumarasa (%)	Catalasa (%)	AO (%)	
<b>1</b>	14.09 ± 3.07	8.77 ± 2.03	11.88 ± 3.85	1.40 ± 0.18	
<b>2</b>	46.14 ± 1.74	24.11 ± 3.95	3.59 ± 2.04	0.16 ± 0.12	
<b>3</b>	30.86 ± 10.55	53.99 ± 6.21	5.73 ± 1.92	1.35 ± 0.42	
<b>4</b>	7.00 ± 5.05	13.13 ± 9.12	17.06 ± 2.51	7.79 ± 3.64	
<b>5</b>	1.90 ± 0.86	0.00 ± 0.00	61.72 ± 9.17	89.29 ± 3.98	

<b>NADPH citocromo c reductasa</b>		
Fracción celular recuperada	Control (%)	Problema (%)
Sobrenadante	10.54 ± 3.44	9.78 ± 3.58
Sedimento	89.46 ± 3.44	90.22 ± 3.58

**Tabla IV.** Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras de *C. boidinii* expuesta a 2 µg/mL de PAI durante 120 min. n = 3 (p ≤ 0,005).

Control					
Fracción celular	LDH (%)	Fumarasa (%)	Catalasa (%)	AO (%)	
1	19.47 ± 13.97	10.28 ± 6.37	7.96 ± 4.45	1.11 ± 0.72	
2	44.98 ± 8.75	20.00 ± 2.80	1.76 ± 0.33	0.29 ± 0.43	
3	22.79 ± 6.19	39.95 ± 4.35	3.63 ± 0.43	1.60 ± 2.37	
4	10.69 ± 4.67	28.57 ± 6.28	18.45 ± 4.55	10.31 ± 9.01	
5	20.60 ± 0.32	1.18 ± 2.04	68.20 ± 6.46	86.67 ± 12.50	

Problema					
Fracción celular	LDH (%)	Fumarasa (%)	Catalasa (%)	AO (%)	
1	15.02 ± 3.69	10.83 ± 0.11	10.70 ± 4.14	1.90 ± 1.15	
2	42.84 ± 2.40	23.45 ± 2.98	1.14 ± 0.01	0.07 ± 0.05	
3	28.83 ± 6.16	49.50 ± 4.49	2.88 ± 0.26	1.21 ± 0.72	
4	5.95 ± 2.81	16.22 ± 1.69	16.26 ± 5.46	8.91 ± 5.33	
5	2.19 ± 1.52	0.00 ± 0.00	69.02 ± 7.37	87.92 ± 6.99	

NADPH citocromo c reductasa		
Fracción celular recuperada	Control (%)	Problema (%)
Sobrenadante	19.50 ± 0.66	20.05 ± 0.55
Sedimento	80.50 ± 0.66	79.95 ± 0.55

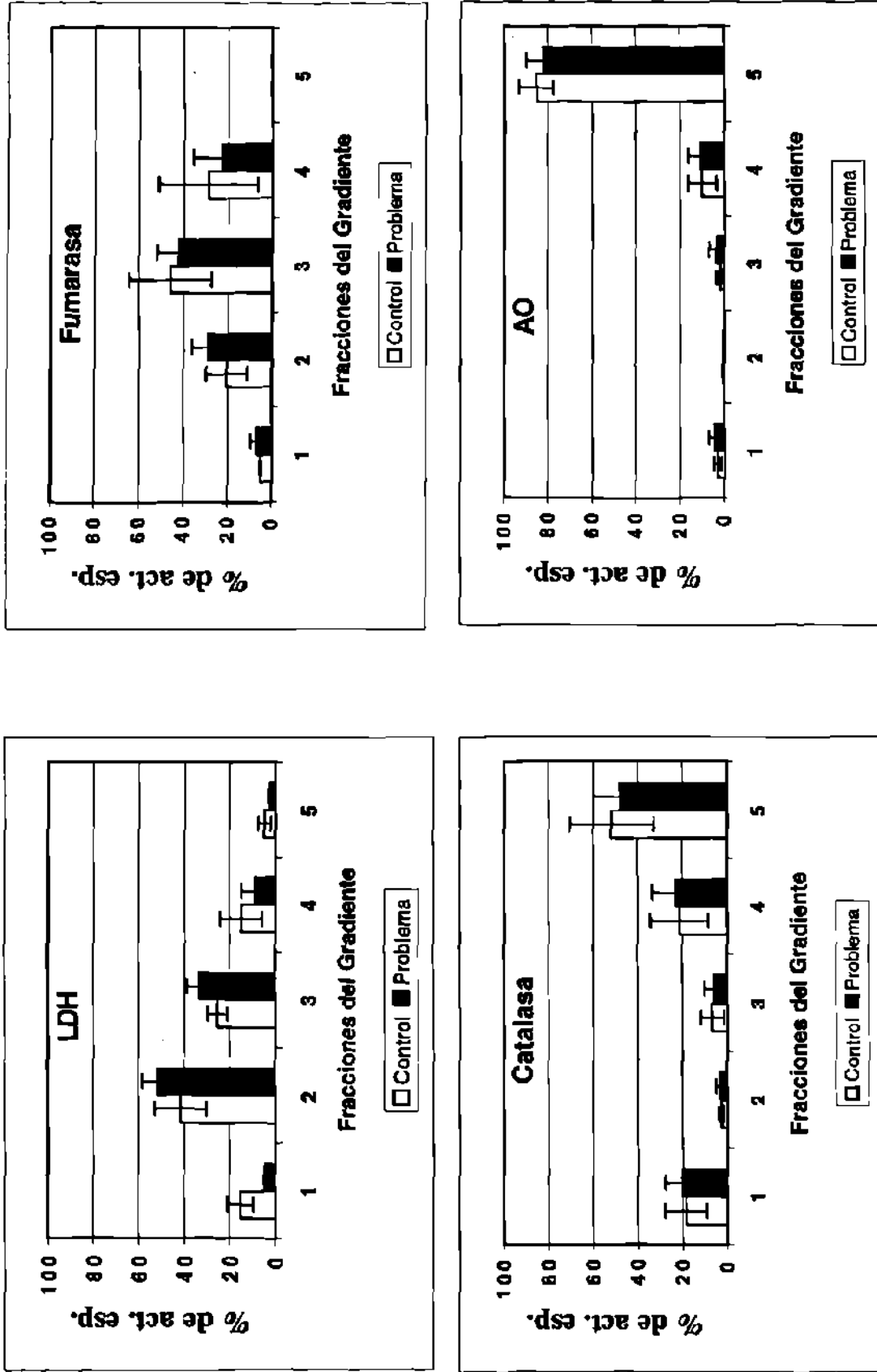


Figura 9. Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras de *C. boiðinji* cultivada en presencia de 2 µg/mL de PA1 durante 30 min.



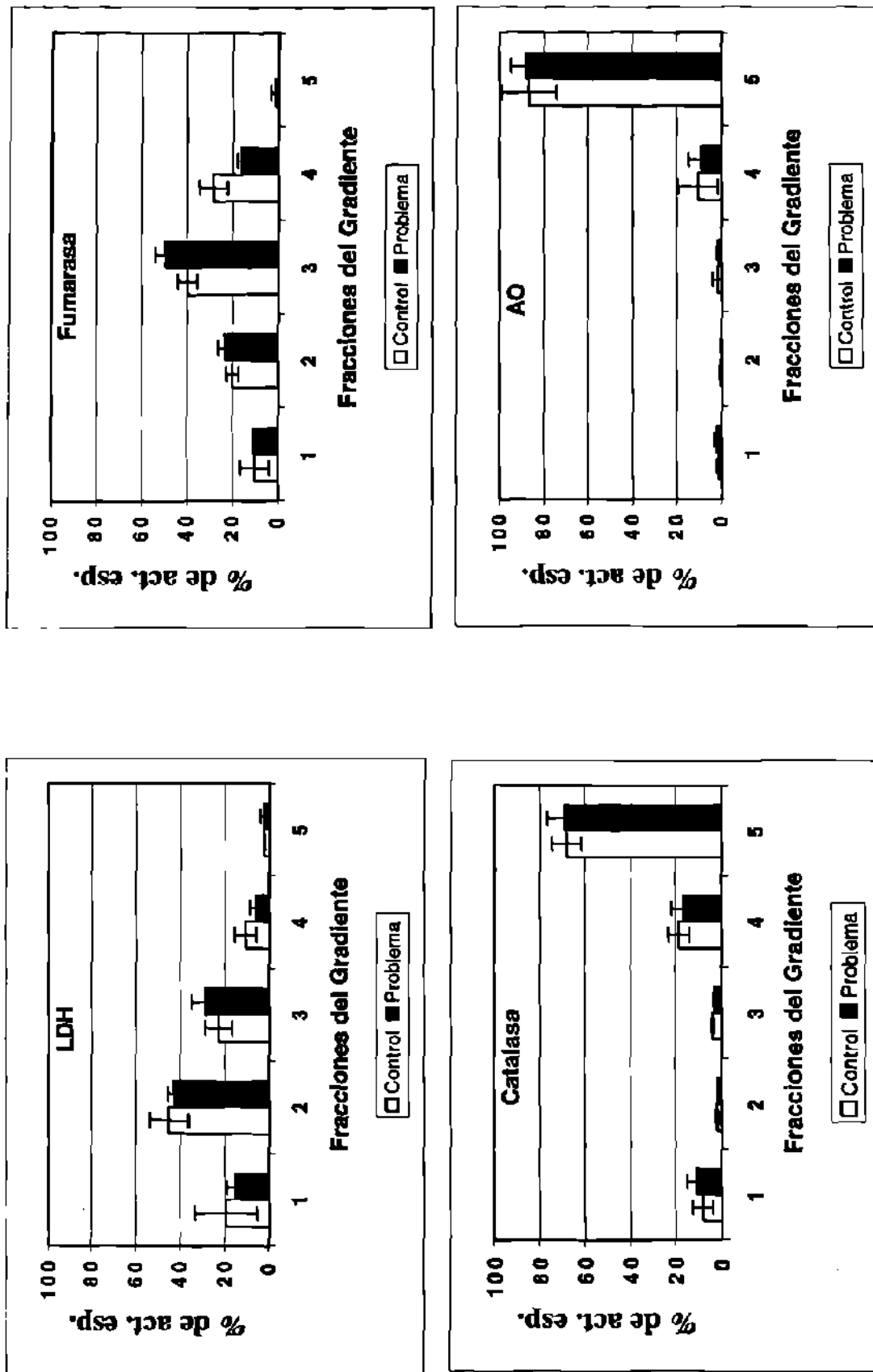


Figura 10. Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras de *C. boidinii* cultivada en presencia de 2 µg/mL de PA1 durante 60 min.

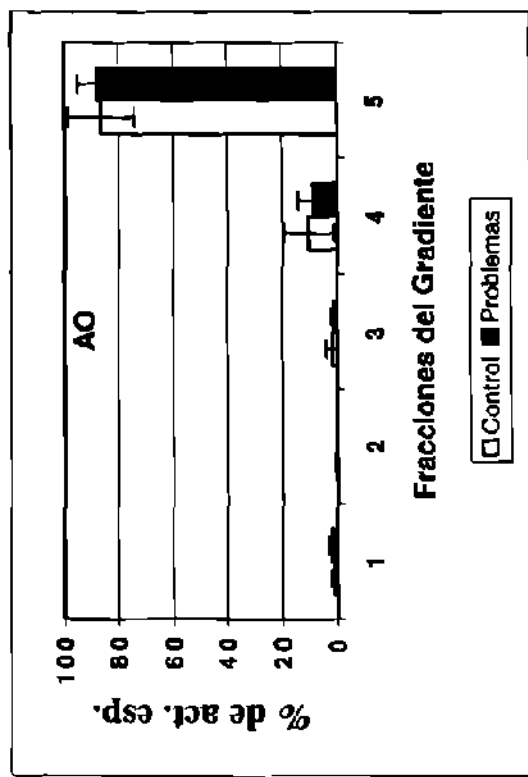
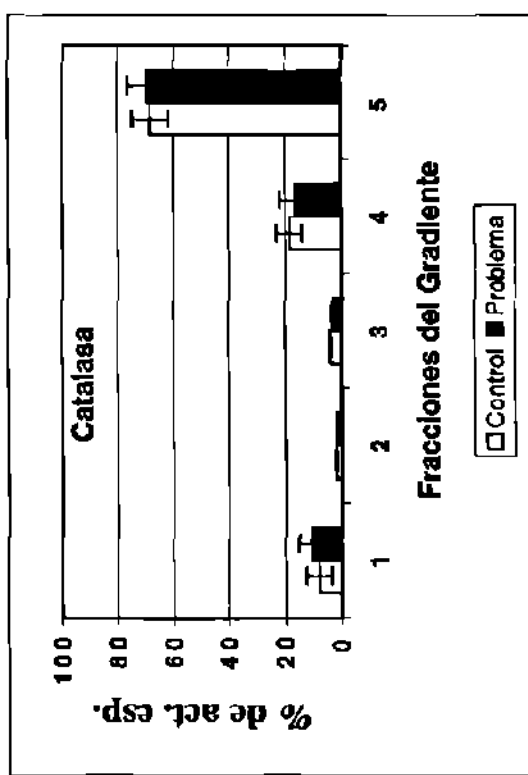
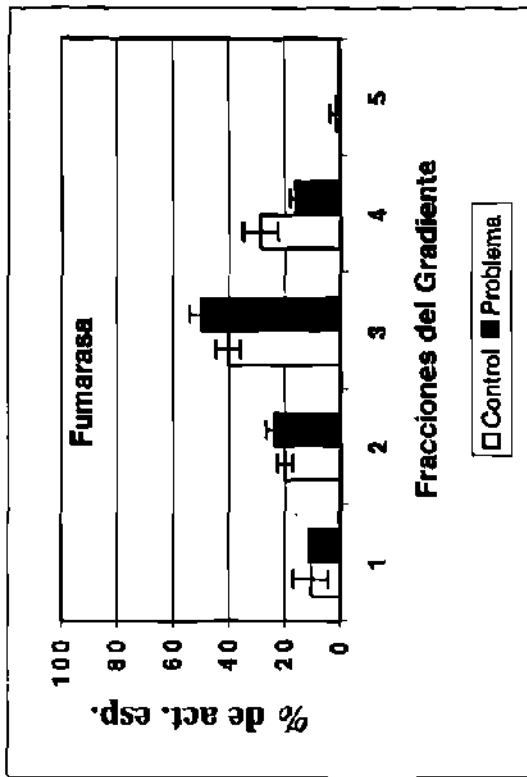
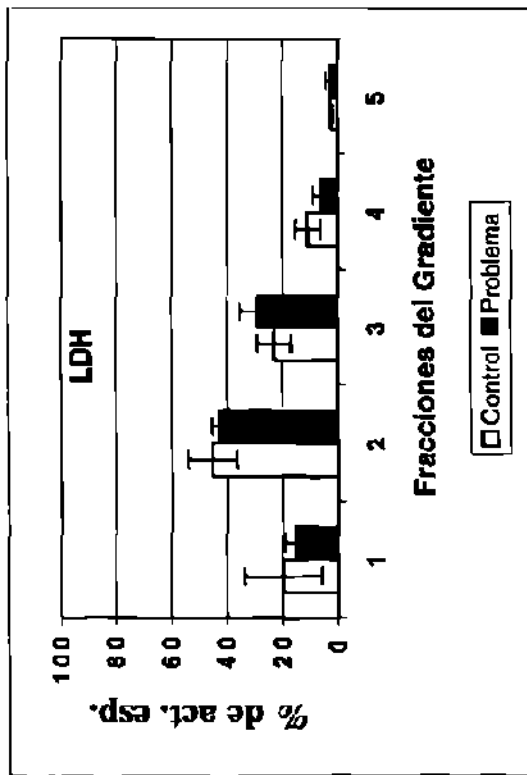


Figura 11. Porcentajes de actividad específica de enzimas marcadoras de *C. boltonii* cultivada en presencia de 2 µg/mL de PA1 durante 120 min.

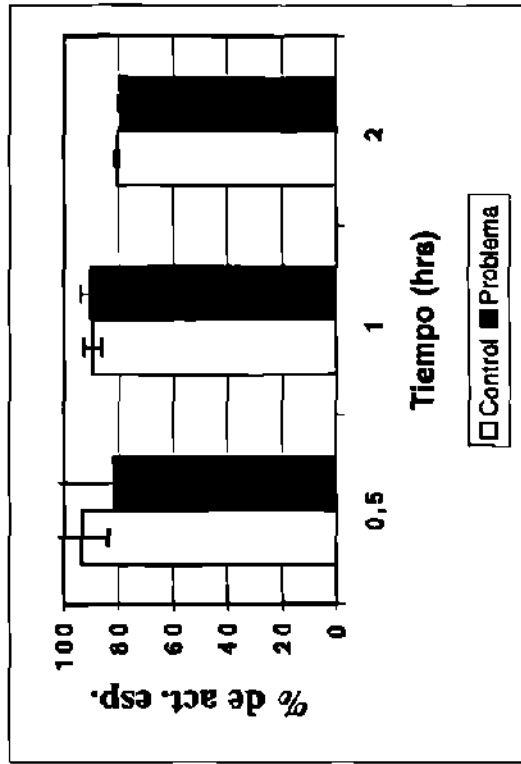


Figura 12. Porcentajes de actividad específica de NADPH cit. c reductasa de *C. bovidini* cultivada en presencia de 2 µg/mL de PA1.

Los porcentajes de actividad específica total se incluyen en la Tabla V y se grafican en la Figura 13.

### **3.4. Evaluación del efecto de PA1 sobre los principales componentes de la fracción nuclear de *C. boidinii***

#### **3.4.1. Evaluación del efecto de PA1 sobre el contenido de DNA, RNA y proteínas en la fracción nuclear de *C. boidinii***

Se realizaron cultivos de *C. boidinii* en medios con metanol en ausencia y presencia de una dosis no letal de PA1. A diferentes tiempos de exposición (30, 60 y 120 minutos) se obtuvo la fracción nuclear de esta levadura. En la fracción nuclear se determinó el contenido de RNA, DNA y proteínas. Se calculó el porcentaje de cada uno de los principales componentes de la fracción considerando como el 100 % la suma de los valores determinados individualmente.

Los valores obtenidos fueron el promedio de tres resultados reproducibles. En la Tabla VI se incluyen los porcentajes obtenidos. Estos valores se representan en la Figura 14.

#### **3.4.2. Evaluación del efecto de PA1 sobre la proporción RNA/DNA y proteínas/DNA en la fracción nuclear de *C. boidinii***

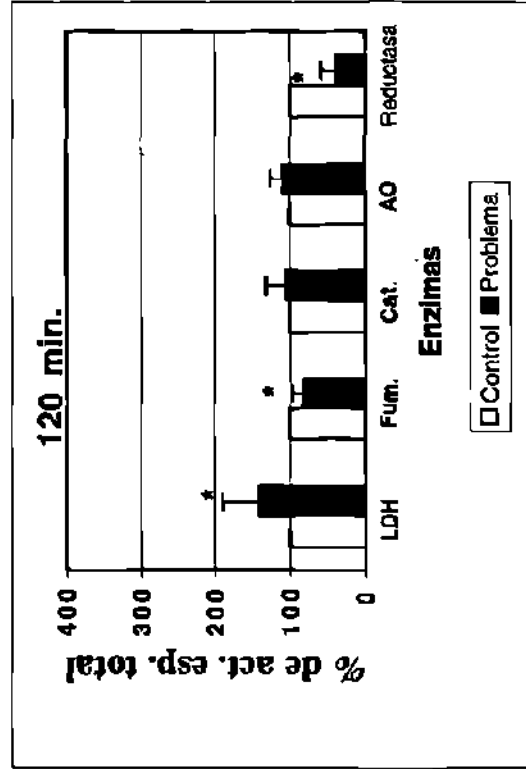
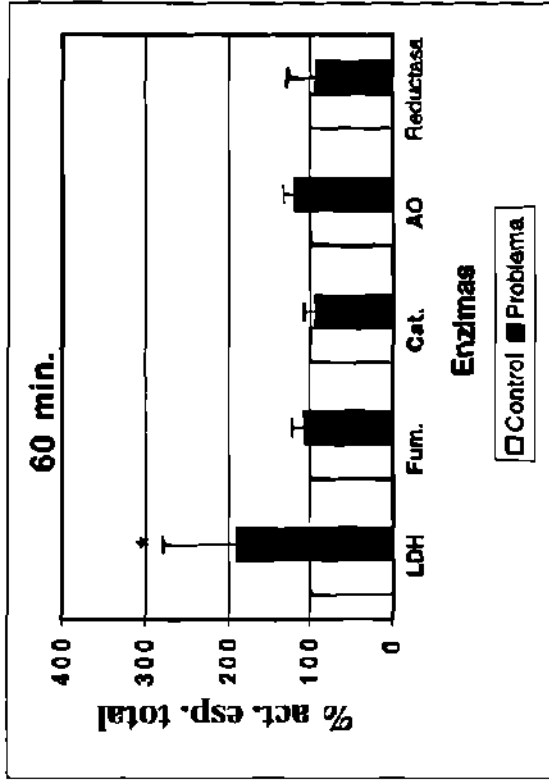
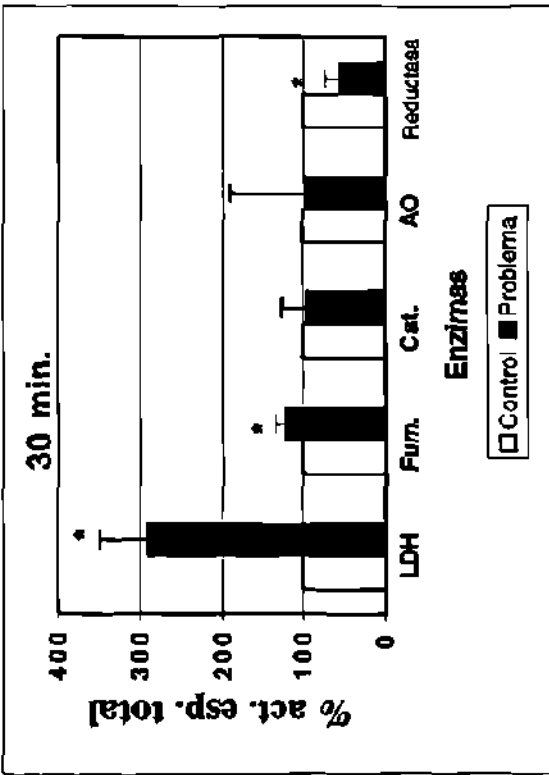
Se realizaron cultivos de *C. boidinii* en medios con metanol como única fuente de carbono, en ausencia y presencia de una dosis no letal de PA1. Los cultivos se incubaron durante diferentes tiempos (30, 60 y 120 minutos) y se obtuvo la fracción nuclear de esta levadura. En la fracción nuclear se determinaron los porcentajes de RNA, DNA y proteínas. A partir de estos porcentajes se calculó la proporción RNA/DNA y proteínas/DNA, a cada tiempo de exposición. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla VII y en la Figura 15.

**Tabla V.** Porcentajes de actividad específica total de enzimas marcadoras de *C. bovidinii* cultivada en presencia de 2 µg/mL de PAI. n = 3 (p ≤ 0,005).

Tiempo de incubación	LDH (%)	Fumarasa (%)	Catalasa (%)	AO (%)
30 min	291.02 ± 57.16	122.65 ± 10.69	95.42 ± 31.37	98.84 ± 92.06
60 min	190.28 ± 88.05	106.38 ± 15.30	93.79 ± 14.60	118.58 ± 13.60
120 min	141.56 ± 47.98	83.07 ± 12.97	105.35 ± 25.93	109.17 ± 16.33

Tiempo de incubación	NADPH cit. c reductasa
30 min	54.75 ± 18.68
60 min	92.18 ± 35.60
120 min	37.08 ± 21.10

En todos los casos el control se consideró como el 100% de actividad específica total.



\*  $p \leq 0,005$

Figura 13. Pocentajes de actividad especifica total de enzimas marcadoras de *C. baileyi* expuesta a 2  $\mu\text{g/mL}$  de PA1.

**Tabla VI. Porcentajes de RNA, DNA y Proteínas en la fracción nuclear de *C. bovidinii* cultivada en presencia de 2 µg/mL de PA1. n = 3 (p ≤ 0,005).**

<b>30 min.</b>		<b>Control</b>	<b>Problema</b>
	RNA	7.5 ± 2.8	6.8 ± 2.3
	DNA	2.7 ± 0.9	2.1 ± 0.1
	Proteínas	89.4 ± 1.9	90.8 ± 2.4
<b>60 min.</b>			
	RNA	2.7 ± 1.1	2.8 ± 0.7
	DNA	2.3 ± 1.1	2.4 ± 1.3
	Proteínas	94.3 ± 0.8	94.3 ± 0.6
<b>120 min.</b>			
	RNA	3.2 ± 0.1	3.1 ± 0.3
	DNA	2.7 ± 0.3	2.7 ± 0.5
	Proteínas	94.1 ± 0.3	94.2 ± 0.8

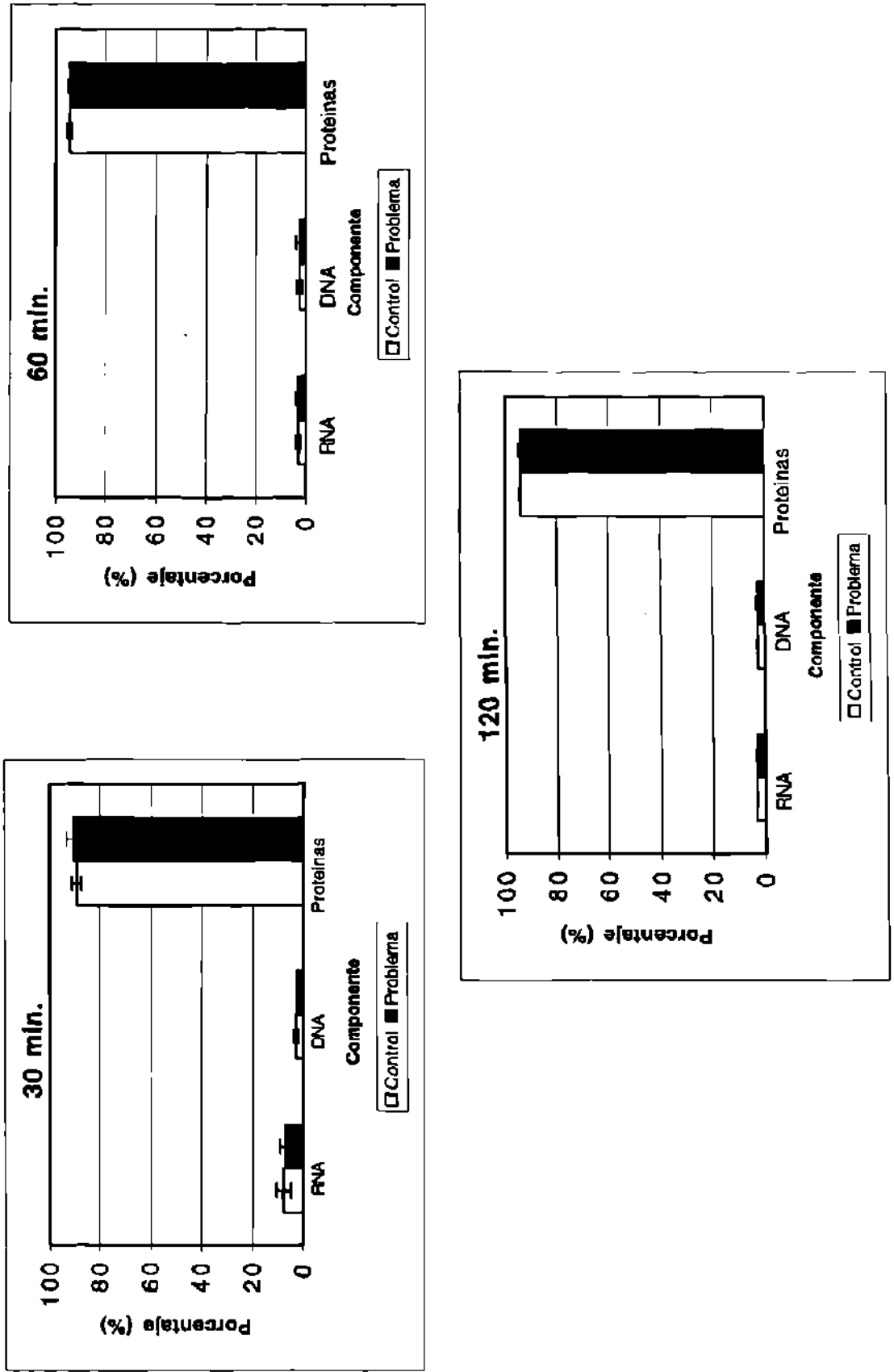


Figura 14. Porcentajes de RNA, DNA y Proteinas en la fracción nuclear de *C. bovidini* expuesta a 2  $\mu$ g/mL de PA1.



**Tabla VII.** Proporción RNA/DNA y Proteínas/DNA en la fracción nuclear de *C. bovis* expuesta a 2 µg/mL de PAI ( $p \leq 0,005$ ).

	Proporción RNA: DNA		Proporción Proteínas: DNA	
	Control	Problema	Control	Problema
<b>30 min.</b>	2.8 : 1	3.3 : 1	31.9 : 1	<b>43.6 : 1</b>
<b>60 min.</b>	1.1 : 1	1.1 : 1	38.0 : 1	34.9 : 1
<b>120 min.</b>	1.2 : 1	1.1 : 1	34.8 : 1	34.8 : 1

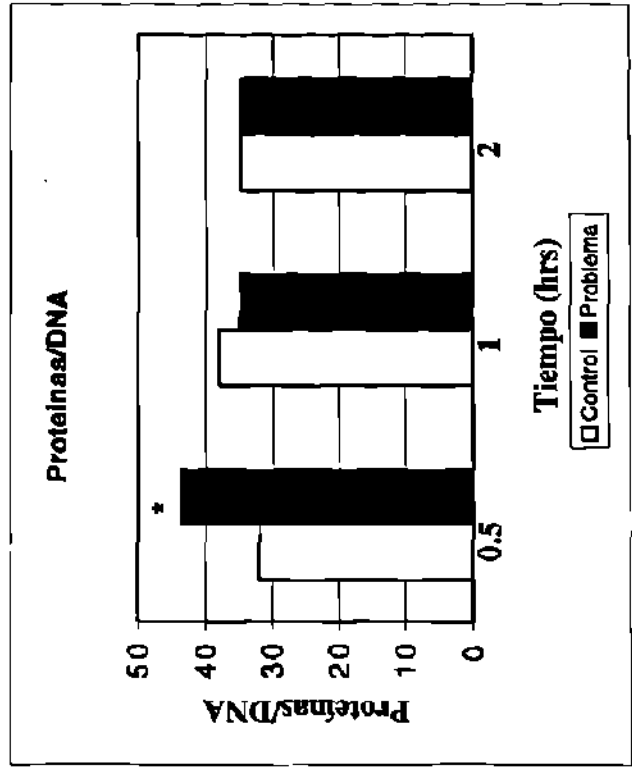
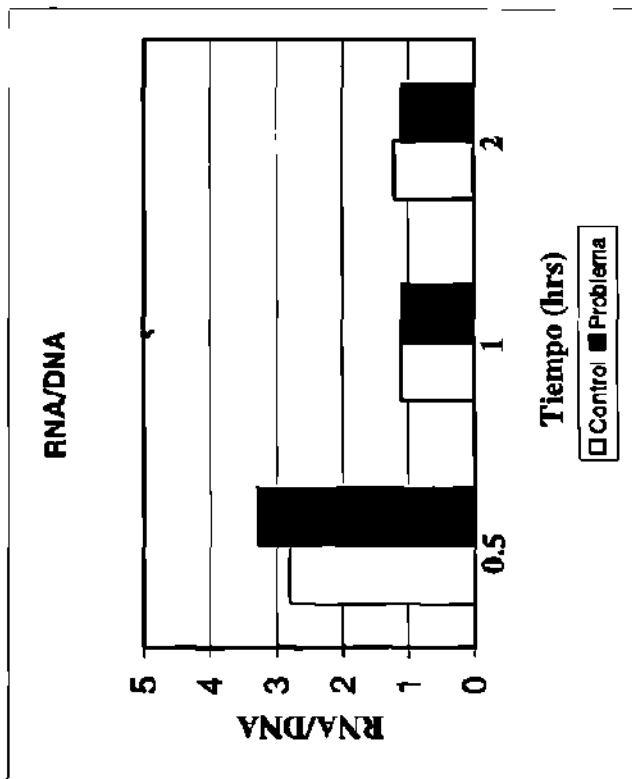


Figura 15. Proporciones de RNA/DNA y Proteinas/DNA en la fracción nuclear de *C. bovidini* expuesta a 2 µg/mL de PA1.

### **3.5. Identificación de PA1 en las fracciones celulares aisladas de *C. boidinii* por medio de CLAR**

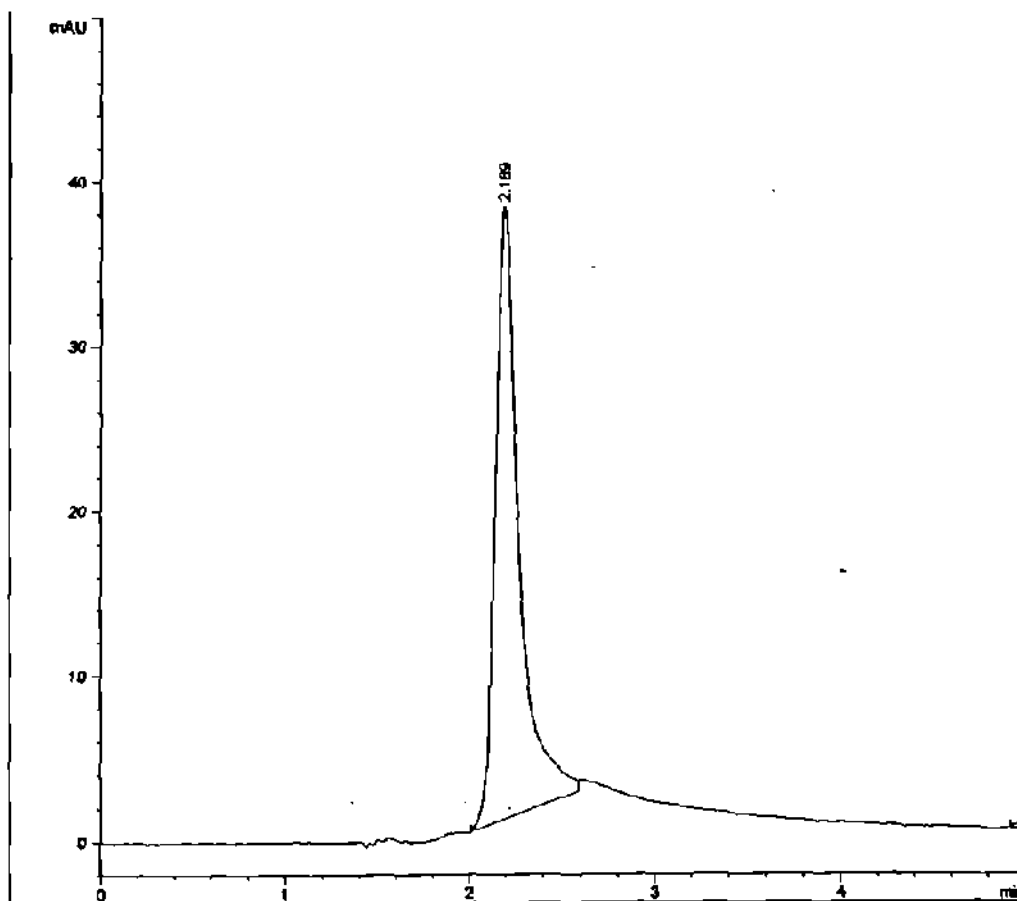
Se realizaron cultivos de *C. boidinii* en medios con metanol como única fuente de carbono hasta su fase exponencial media. A este tiempo se les adicionó una dosis no letal (2 µg/mL) de PA1 y se incubaron durante diferentes tiempos: 30, 60 y 120 minutos. En todos los casos se realizó un cultivo sin PA1 como control. Se obtuvieron las fracciones celulares de la levadura: citosol, mitocondrias, peroxisomas, microsomas y núcleo. Después de un pretratamiento de la fracción que incluyó Extracción en Fase Sólida, se determinó la presencia de PA1 utilizando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

Los cromatogramas obtenidos del control y problemas, a los diferentes tiempos de exposición de 30, 60 y 120 minutos, se presentan en las Figuras 16-20 respectivamente.

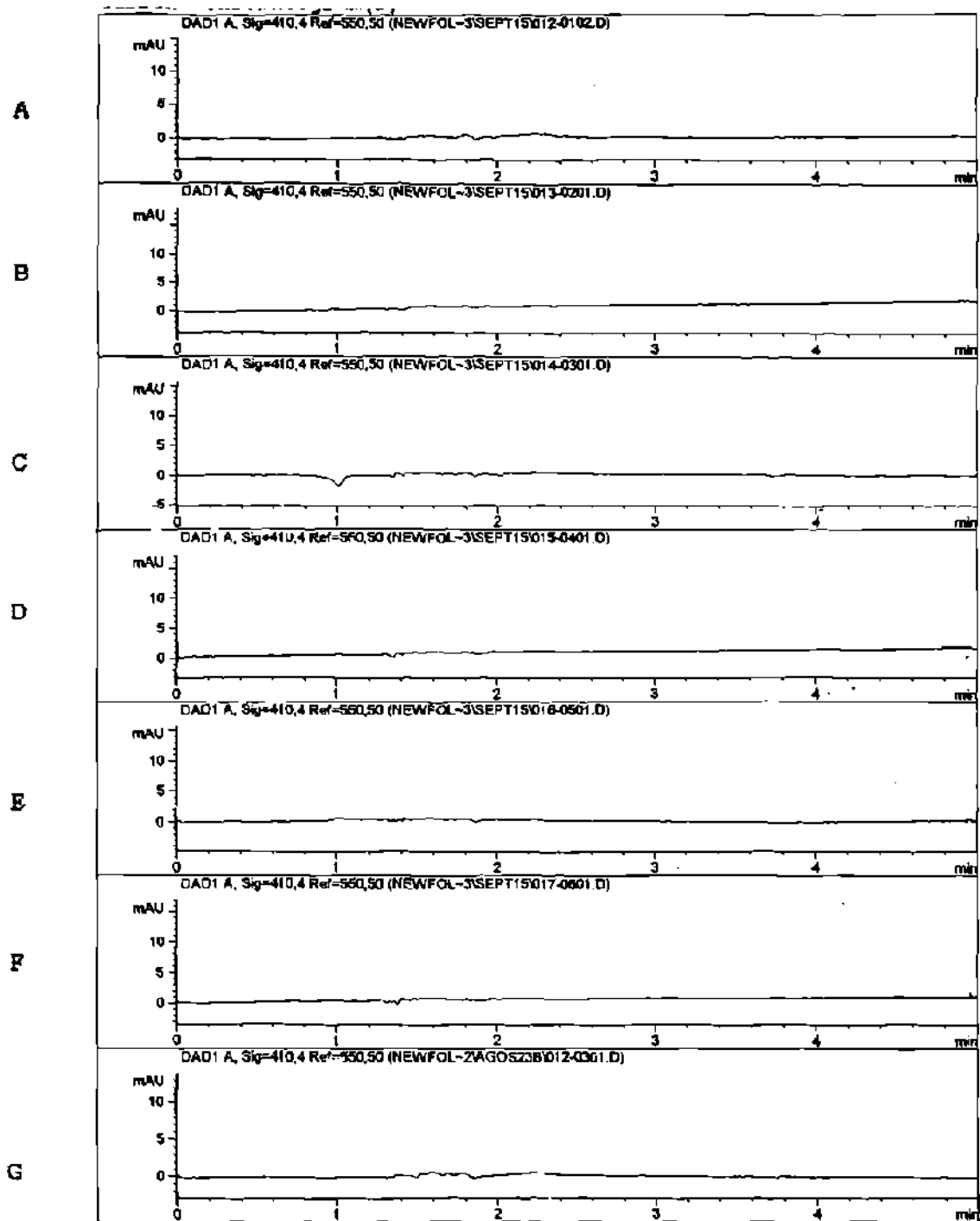
### **3.6. Viabilidad celular de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de PA1**

La determinación de la supervivencia celular de *S. cerevisiae* se realizó en medios de cultivo conteniendo cada uno de ellos como fuente de carbono glucosa (YPGG) o ácido oleico (YPGOT). En la fase exponencial media de crecimiento de *S. cerevisiae* las células fueron expuestas a diferentes concentraciones (0,5, 2, 10, 20 y 50 µg/mL) de PA1 durante dos horas. En todos los casos se realizó un cultivo sin PA1 como control. La supervivencia celular se determinó a través del conteo de colonias en placas de agar.

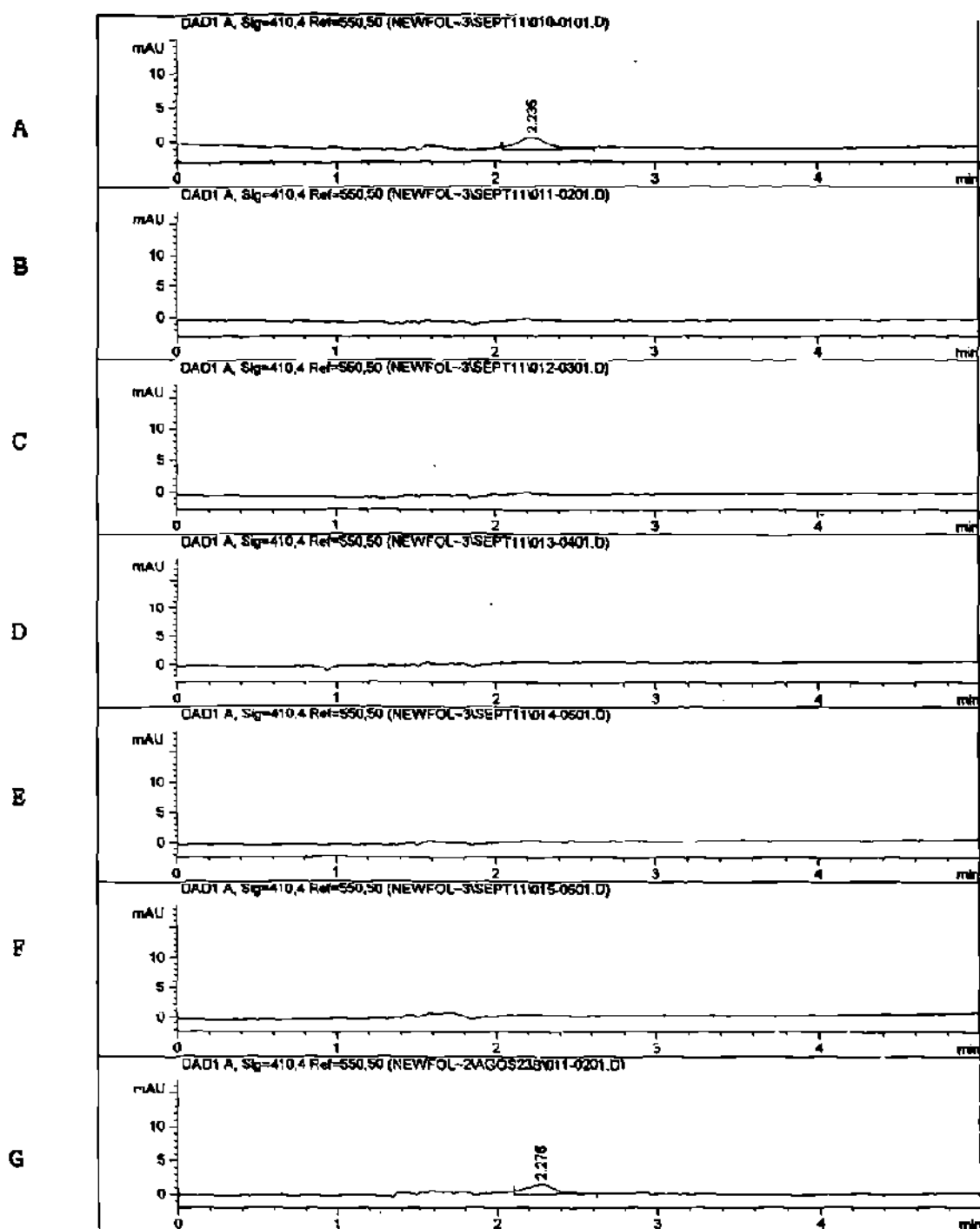
Se tomaron alícuotas de los cultivos líquidos de *S. cerevisiae* (en medios con glucosa y con ácido oleico) expuestos a PA1 y se sembraron en placas de agar con glucosa (YPGG) y placas de agar con ácido oleico (YPGOT). Después de 48 horas de incubación se realizó el conteo de colonias y se determinó el porcentaje de supervivencia con respecto al control.



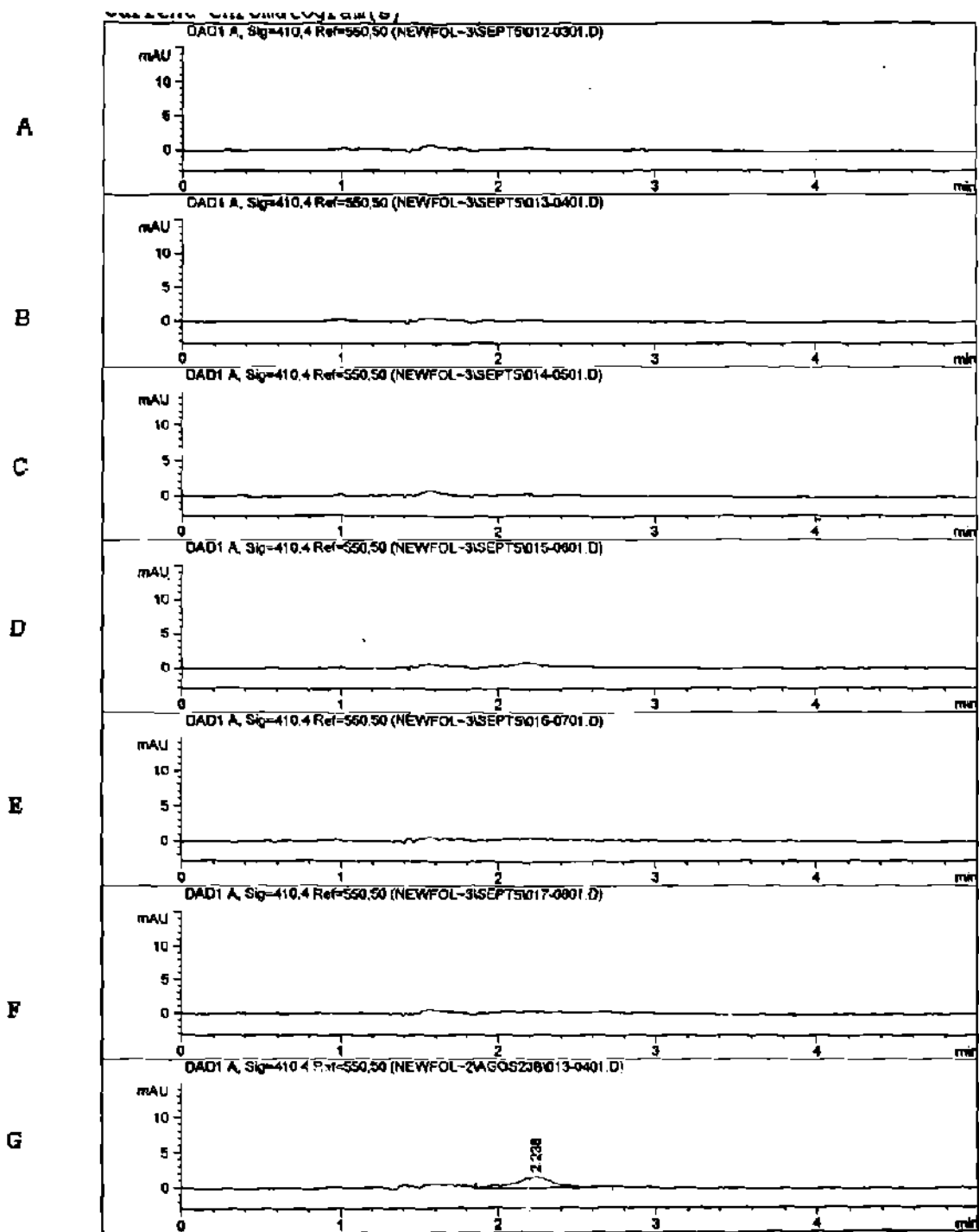
**Figura 16.** Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Estándar de PA1.



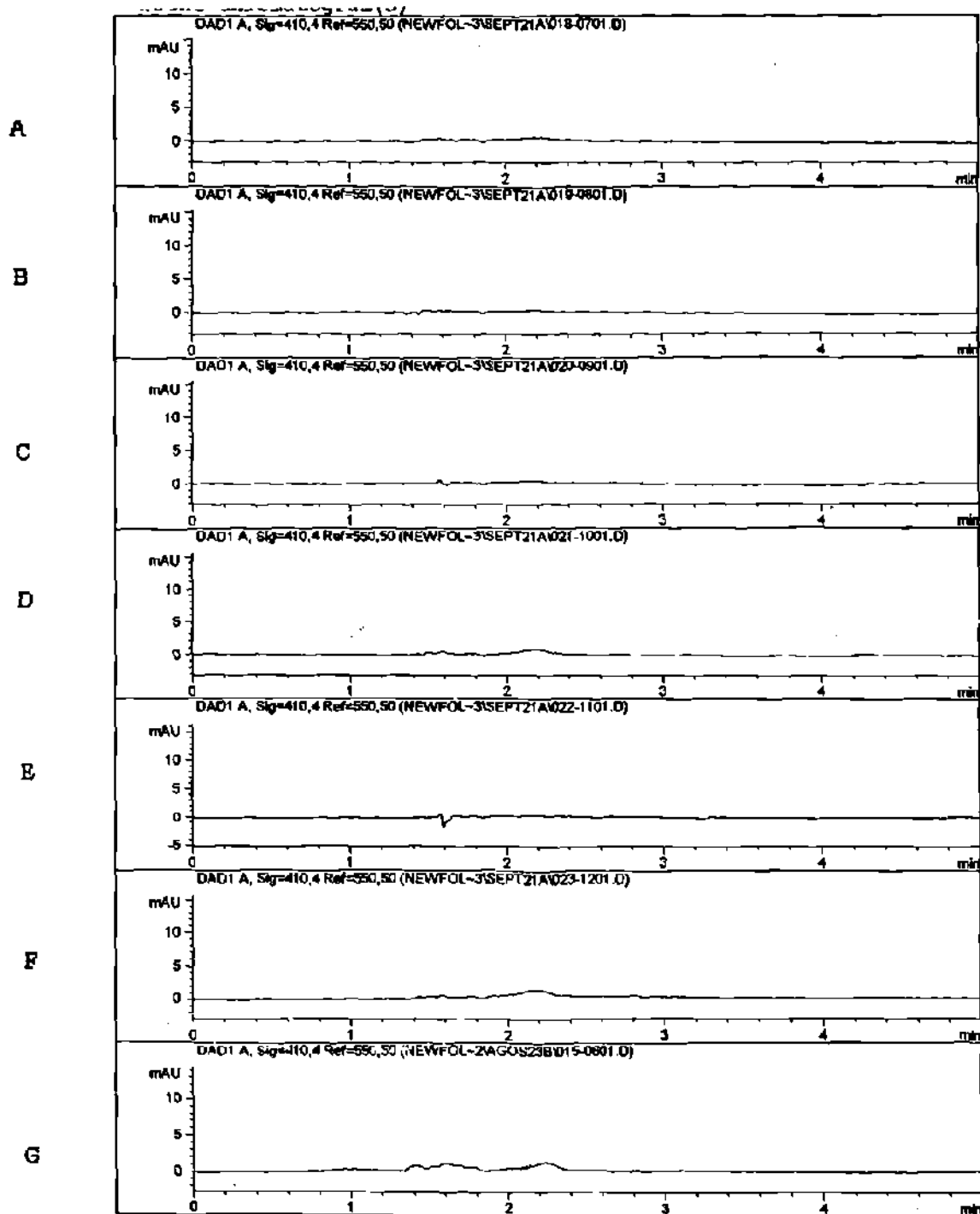
**Figura 17.** Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Fracciones celulares obtenidas de la levadura *C. boidinii* (Control), tanto las del gradiente de densidad de sacarosa como las fracciones microsomal y nuclear. (A) Fracción 1. (B) Fracción 2: citosólica. (C) Fracción 3: mitocondrial. (D) Fracción 4. (E) Fracción 5: peroxisomal. (F) Fracción microsomal. (G) Fracción nuclear.



**Figura 18.** Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Fracciones de organelos celulares obtenidas de la levadura *C. boidinii* expuesta a 2  $\mu\text{g/mL}$  de PA1 durante 30 min. (A) Fracción 1. (B) Fracción 2: citosólica. (C) Fracción 3: mitocondrial. (D) Fracción 4. (E) Fracción 5: peroxisomal. (F) Fracción 6: microsomal. (G) Fracción 7: nuclear.



**Figura 19.** Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Fracciones celulares obtenidas de la levadura *C. boidinii* cultivada en presencia de  $2 \mu\text{g/mL}$  de PA1 durante 60 min. Las fracciones incluyen tanto las del gradiente de densidad de sacarosa como las fracciones microsomal y nuclear. (A) Fracción 1. (B) Fracción 2: citosólica. (C) Fracción 3: mitocondrial. (D) Fracción 4. (E) Fracción 5: peroxisomal. (F) Fracción microsomal. (G) Fracción nuclear.



**Figura 20.** Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Fracciones de organelos celulares obtenidas de la levadura *C. boidinii* expuesta a 2  $\mu\text{g/mL}$  de PAI durante 120 min. (A) Fracción 1. (B) Fracción 2: citosólica. (C) Fracción 3: mitocondrial. (D) Fracción 4. (E) Fracción 5: peroxisomal. (F) Fracción microsomal. (G) Fracción nuclear.



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

Se realizaron varios experimentos y se tomó el promedio de tres resultados que fueron reproducibles, es decir que no mostraron diferencia significativa entre sí.

En las Tablas VIII y IX se incluyen las cuentas de colonias y el correspondiente porcentaje de supervivencia de *S. cerevisiae* en los cultivos con glucosa y con ácido oleico respectivamente. En las Figuras 21 y 22 se muestran los porcentajes de supervivencia de *S. cerevisiae* cultivada en medio con glucosa y con ácido oleico, respectivamente. Estos porcentajes de supervivencia fueron obtenidos por el conteo de colonias tanto en placas de agar con glucosa (YPGG) como en placas de agar con ácido oleico (YPGOT).

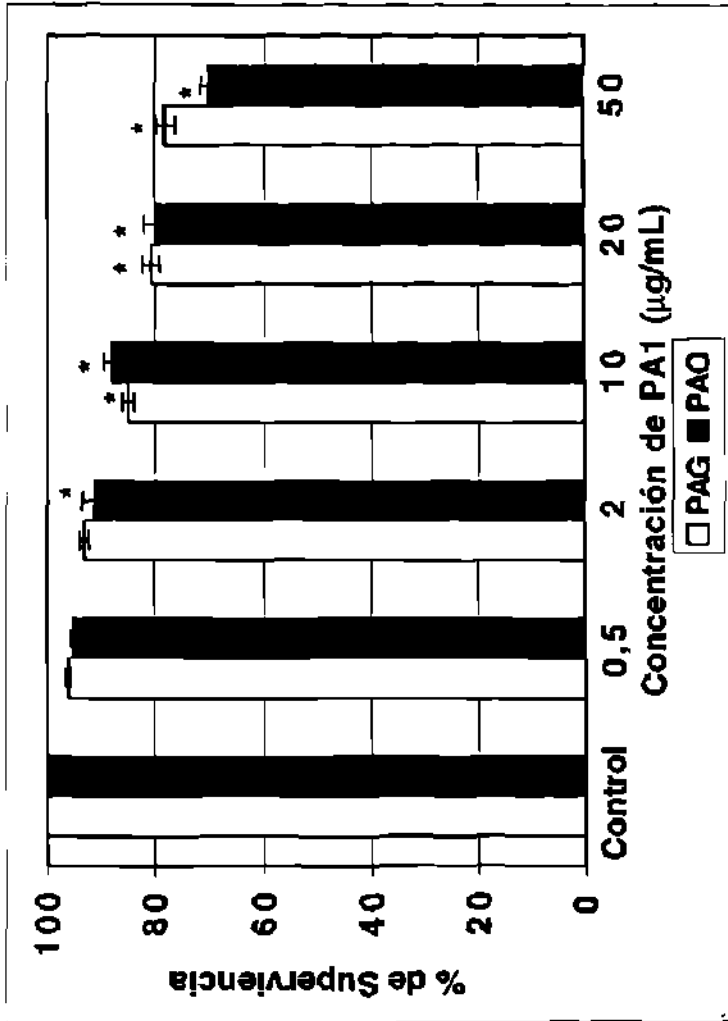
### **3.7. Análisis ultraestructural de *S. cerevisiae* por microscopía electrónica de transmisión. Fijación con permanganato de potasio**

Las células control mostraron la morfología normal: la envoltura nuclear bien definida, las mitocondrias, gotas de lípidos, el retículo endoplásmico, el citoplasma, los peroxisomas. En *S. cerevisiae*, bajo estas condiciones de cultivo los peroxisomas se observan mas pequeños y en menor cantidad en comparación a *C. boidinii* cultivada en medio con metanol (Figura 23).

El análisis ultraestructural de *S. cerevisiae* incubada a los diferentes tiempos de exposición (30, 60 y 120 minutos) demostró que la PA1 causó ruptura y pérdida completa de la membrana peroxisomal. Se observaron membranas preautofágicas alrededor de los peroxisomas afectados. No se observó efecto de PA1 sobre otros compartimentos celulares de *S. cerevisiae* a los diferentes tiempos de exposición (Figura 23).

**Tabla VIII.** Porcentajes de supervivencia celular de *S. cerevisiae* cultivada en presencia de PA1. Cultivos líquidos en medios con glucosa. n = 3 ( $p \leq 0,005$ ).

PA1 ( $\mu\text{g/mL}$ )	YPG con Glucosa	YPG con ác. Oléico
	% de supervivencia	% de supervivencia
Control	100 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00
0.5	96.0 $\pm$ 0.42	95.2 $\pm$ 0.47
2.0	93.0 $\pm$ 0.86	91.3 $\pm$ 2.05
10	85.1 $\pm$ 1.03	88.1 $\pm$ 1.46
20	80.7 $\pm$ 1.66	79.6 $\pm$ 2.33
50	78.1 $\pm$ 1.76	70.3 $\pm$ 1.38

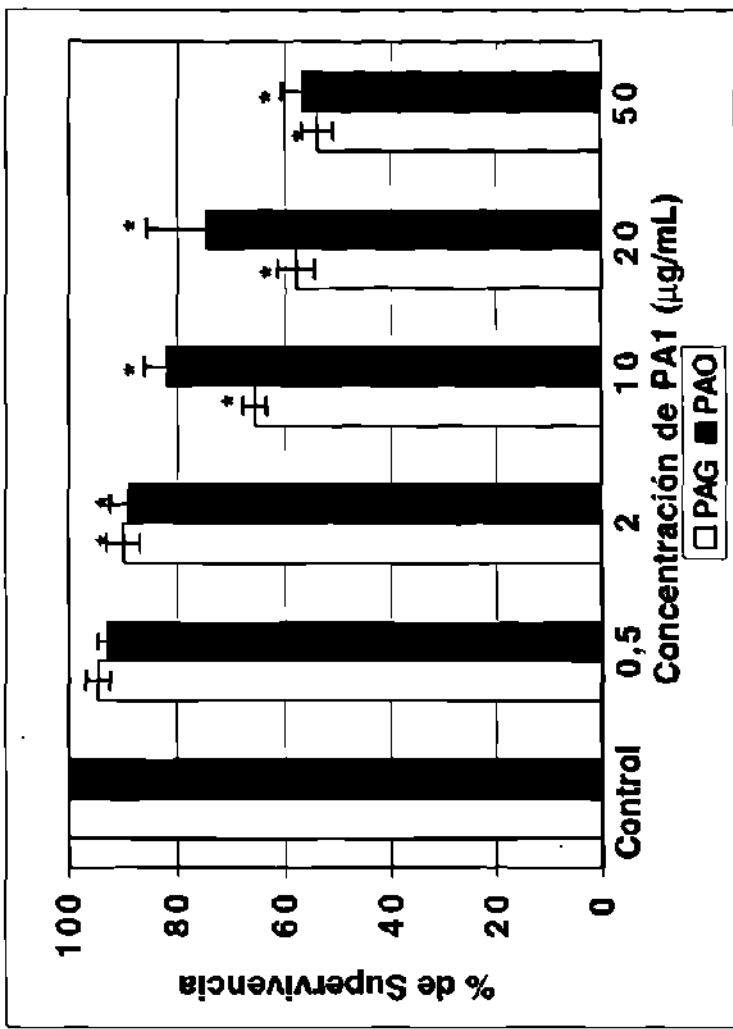


\* Diferencia significativa con respecto al control. Valor  $p \leq 0,005$

Figura 21. Porcentajes de supervivencia celular de *S. cerevisiae* cultivada en medio líquido con glucosa.

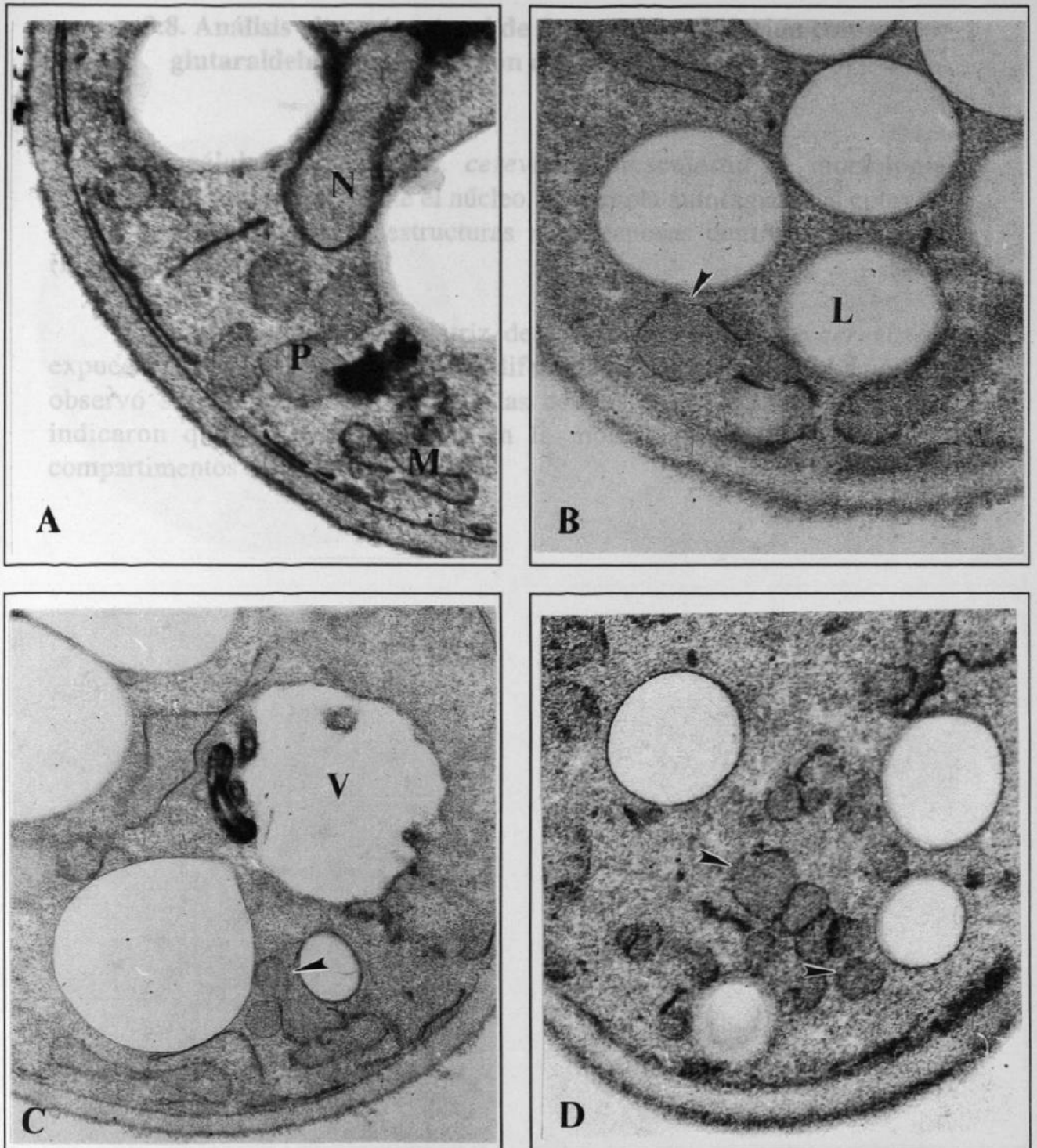
**Tabla IX. Porcentajes de supervivencia celular de *S. cerevisiae* cultivada en presencia de PA1. Cultivos líquidos en medios con ácido oleico. n = 3 (p ≤ 0,005).**

PA1 (µg/mL)	YPG con Glucosa % de supervivencia	YPG con ác. Oléico % de supervivencia
Control	100 ± 0.00	100 ± 0.00
0.5	94.6 ± 2.30	92.8 ± 1.85
2.0	89.8 ± 3.05	88.9 ± 3.27
10	65.7 ± 2.18	81.7 ± 4.31
20	58.0 ± 3.44	74.4 ± 11.34
50	53.8 ± 2.89	56.6 ± 4.05



\* Diferencia significativa con respecto al control. Valor  $p \leq 0,005$

Figura 22. Porcentajes de supervivencia celular de *S. cerevisiae* cultivada en medio líquido con ácido oleico.

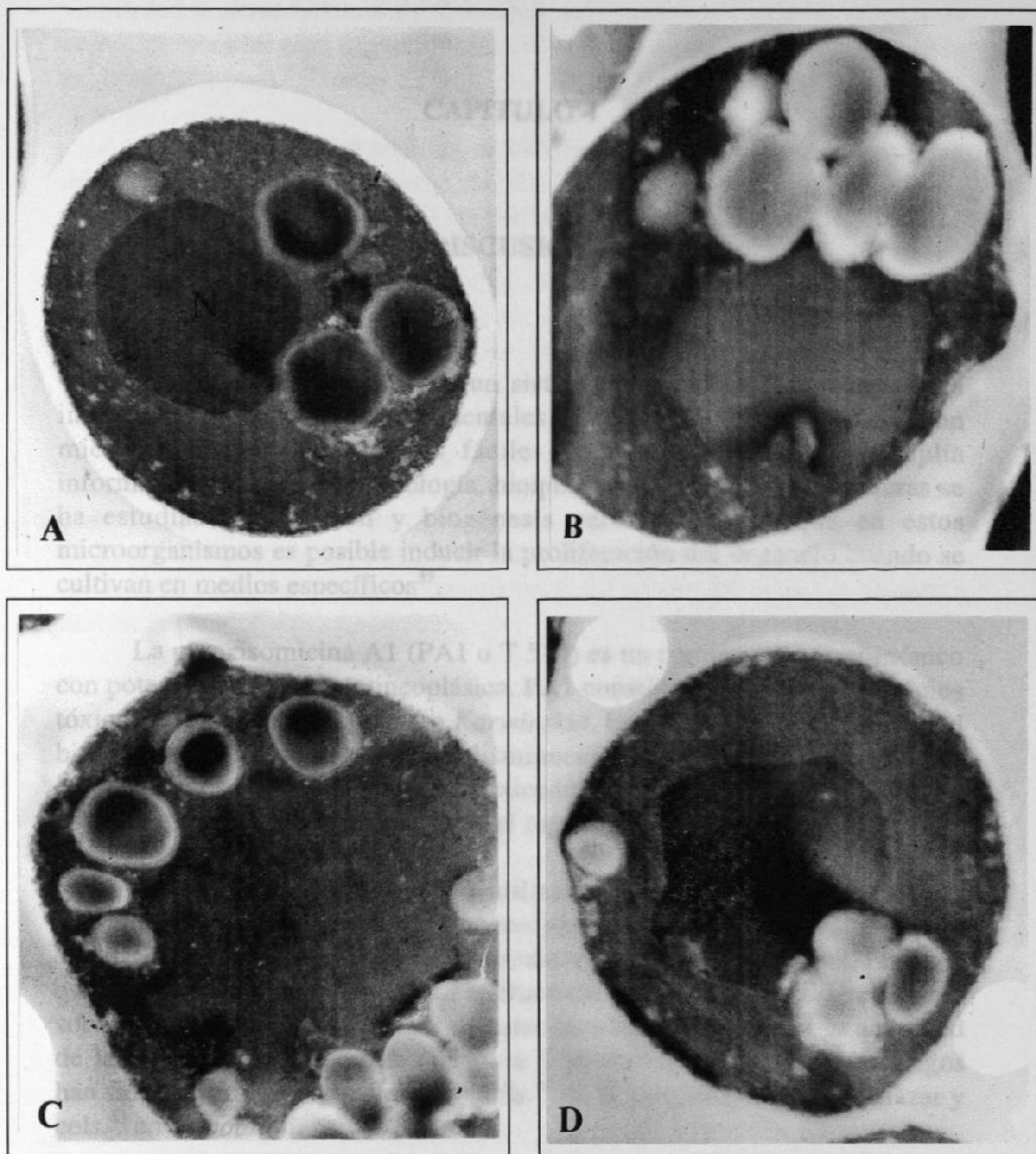


**Figura 23.** Micrografías electrónicas (12 000x) de *S. cerevisiae* cultivada en medio con ácido oleico (0.1 %) en presencia de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PA1. Fijación con permanganato de potasio e inclusión en resina epóxica. Las células expuestas a PA1 mostraron fragmentación de la membrana peroxisomal ( $\blacktriangleright$ ). (A) Control. (B) 30 min. (C) 60 min. (D) 120 min. V = Vacuola; P = peroxisoma; N = Núcleo; M = Mitochondrias; L = Gotas de lípidos.

### **3.8. Análisis ultraestructural de *S. cerevisiae*. Fijación con glutaraldehído y postfijación con tetraóxido de osmio**

Las células control de *S. cerevisiae* presentaron su morfología normal. Se observó claramente el núcleo, la vacuola autofágica, las gotas de lípidos. No se observaron estructuras membranosas dentro de la célula (Figura 24).

La constitución de la matriz de los organelos de *S. cerevisiae* expuesta a 2  $\mu\text{g/mL}$  de PA1 a los diferentes tiempos de incubación se observó similar a la observada en las células control. Estos hallazgos indicaron que no hubo cambios en la morfología de los diferentes compartimentos celulares (Figura 24).



**Figura 24.** Micrografías electrónicas (12 000x) de *S. cerevisiae* cultivada en medio con ácido oleico (0.1 %) en presencia de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PA1. Fijación glutaraldehído y postfijación con tetraóxido de osmio. (A) Control. (B) 30 min. (C) 60 min. (D) 120 min. V = Vacuola; N = Núcleo; L = Gotas de lípidos.



## CAPITULO 4

### DISCUSIÓN

Las levaduras constituyen un sistema modelo muy adecuado para investigar interrogantes fundamentales de biología celular ya que son microorganismos eucarióticos fáciles de manipular y existe amplia información acerca de su fisiología, bioquímica y genética. En levaduras se ha estudiado la función y biogénesis peroxisomal, porque en estos microorganismos es posible inducir la proliferación del organelo cuando se cultivan en medios específicos<sup>37</sup>.

La peroxisomicina A1 (PA1 o T 514) es un compuesto antracénico con potencial actividad antineoplásica. PA1 constituye uno de los principios tóxicos de las plantas del género *Karwinskia*. En estudios sobre la actividad biológica de PA1 se demostró la disminución del número de peroxisomas en hepatocitos de monos y ratas, intoxicados experimentalmente con PA1<sup>38</sup>. Esto sugirió que el peroxisoma fuera el organelo blanco de la PA1.

Sepúlveda y cols.<sup>41</sup> en 1992 utilizaron dos levaduras metilotróficas (*Candida boidinii* y *Hansenula polymorpha*) como sistema de estudio para evaluar el efecto de PA1 sobre los peroxisomas de estas levaduras. En estos estudios se demostró a nivel ultraestructural daño selectivo e irreversible sobre la membrana peroxisomal de estas levaduras; sin afectar la actividad de las enzimas peroxisomales catalasa y alcohol oxidasa. Estos hallazgos han sido confirmados por Vargas y cols.<sup>44</sup> en *H. polymorpha* y por Salazar y cols.<sup>43</sup> en *C. boidinii*.

Con el propósito de investigar si el efecto de PA1 es selectivo sobre peroxisomas, en el presente trabajo se analizó el efecto de PA1 sobre los principales compartimentos celulares de *C. boidinii* utilizando métodos morfológicos y bioquímicos. Además se evaluó el efecto de PA1 sobre la

viabilidad y ultraestructura de *S. cerevisiae*. En ambos casos las células de levadura se cultivaron en medios de cultivo con sustratos inductores de la proliferación peroxisomal.

Los resultados del análisis ultraestructural de *C. boidinii* expuesta a una dosis no letal (2  $\mu\text{g/mL}$ ) de PA1 durante diferentes tiempos de incubación (30, 60 y 120 min) coinciden con lo descrito por Sepúlveda y cols.<sup>41</sup>: se observó fragmentación de la membrana peroxisomal, presencia de membranas autofágicas alrededor de peroxisomas dañados, agregados citoplasmáticos y material electrodensito en la vacuola. Bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, no se observaron cambios en la morfología de otros compartimentos celulares (Figura 6). Estos hallazgos confirman a nivel morfológico el efecto selectivo de PA1 sobre los peroxisomas de levaduras metilotróficas. Por otro lado, en mamíferos el efecto de PA1 no parece ser selectivo, ya que en células de túbulos contorneados proximales de riñón de conejo, además del daño peroxisomal la PA1 causa también efecto sobre las mitocondrias. Las observaciones ultraestructurales mostraron cambios tanto en el tamaño como en la forma de este organelo<sup>87</sup>.

Recientemente se ha demostrado el efecto de T 544 (Figura 25), un compuesto antracénico estructuralmente relacionado a PA1 sobre las mitocondrias de *C. boidinii*<sup>87</sup>. Ultraestructuralmente este efecto se observó como un aumento de tamaño y cambio en la forma del organelo. En contraste, tanto en estos estudios como en el presente trabajo no se demostró efecto de PA1 sobre las mitocondrias de *C. boidinii* (Figura 6). Las diferencias observadas en el efecto de la T 544 y la PA1 sobre los organelos de levaduras metilotróficas a nivel morfológico, podrían atribuirse a las diferencias estructurales que existen entre estos dos compuestos antracénicos.

Con el propósito de analizar a nivel bioquímico el efecto de PA1 sobre *C. boidinii*, se efectuó el análisis de actividades de enzimas marcadoras de citosol, mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplasmico, con respecto al núcleo celular se determinó el contenido de RNA, DNA y proteínas.

La obtención de las diferentes fracciones de organelos celulares de *C. boidinii* se efectuó por medio de ultracentrifugación en gradiente de

densidad de sacarosa. Las fracciones de citosol, mitocondrias y peroxisomas se obtuvieron a través de un procedimiento descrito por Goodman y cols.<sup>60</sup> en el cual se utiliza un gradiente de densidad discontinuo de sacarosa. La localización de los organelos celulares en las diferentes bandas de densidad del gradiente, se efectuó a través de las determinaciones de la actividad de enzimas marcadoras de cada compartimento celular. Los resultados coincidieron con lo reportado por estos autores: la fracción citosólica se localizó en la banda de densidad número 2, la mitocondrial en la número 3 y la peroxisomal en la banda de densidad número 5 (Tabla I, Figura 8).

En el gradiente de densidad de sacarosa los organelos celulares sedimentan en la banda de densidad del gradiente correspondiente a su propia densidad (separación isopícnica). Si el organelo sufre daño sobre su integridad y libera su contenido, sedimentaría a una densidad distinta a la establecida para un organelo íntegro. Para evaluar el efecto de PA1 sobre la distribución de los organelos celulares en el gradiente de densidad de sacarosa (es decir, sobre la integridad de estos organelos) se analizó la actividad específica de enzimas marcadoras de los diferentes compartimentos celulares de *C. boidinii* y se comparó con el control (sin tratamiento).

Los resultados de este trabajo demostraron que el citosol, las mitocondrias y los peroxisomas sedimentan en su banda de densidad correspondiente, a todos los tiempos de exposición analizados (Tablas II, III y IV, Figuras 9, 10, 11 y 12). Estos hallazgos sugieren que la PA1 no causa efecto sobre la integridad de los organelos celulares de *C. boidinii*. En contraste, los resultados de microscopía electrónica de transmisión confirmaron el daño sobre la membrana peroxisomal ya descrito anteriormente<sup>41, 43, 44</sup>.

En levaduras metilotróficas se ha descrito que los peroxisomas dañados por la PA1 son degradados rápidamente en la vacuola autofágica<sup>52</sup>. Debido a este fenómeno es difícil establecer la presencia de peroxisomas en una banda de densidad diferente a la número cinco (fracción peroxisomal). En el proceso de autofagia peroxisomal el organelo afectado es rodeado por una membrana y secuestrado hasta la vacuola donde su contenido es degradado<sup>41</sup>. Estos eventos coinciden con los que se han descrito para el proceso de pexofagia en diferentes especies de levaduras<sup>80</sup>.

En el presente trabajo se investigó el efecto de PA1 sobre la función metabólica de los organelos celulares de *C. boidinii* a través de la determinación de la actividad específica total de enzimas marcadoras. A los 30 min de exposición a la PA1 (2 µg/mL) se demostró que la actividad de LDH y fumarasa aumentó 191% y 22%, respectivamente; la actividad de NADPH citocromo c reductasa disminuyó 45%. Después de 60 min de incubación con PA1 ocurrió un aumento de la actividad de LDH del 90%. Al máximo tiempo de exposición analizado (120 min) se demostró un aumento de la actividad de LDH de 41% mientras que la actividad de fumarasa y NADPH citocromo c reductasa disminuyó 17% y 63%, respectivamente (Tabla V, Figura 13).

En general, los resultados de este trabajo indican que PA1, a una dosis no letal de 2 µg/mL, afecta la actividad de LDH, fumarasa y NADPH citocromo c reductasa. La actividad de estas enzimas tiende a alcanzar los valores correspondientes a los del control en tiempos de exposición más prolongados. El efecto de PA1 sobre la actividad de las enzimas fue considerablemente menor a los 120 min de exposición.

Estudios sobre las propiedades fisicoquímicas de PA1 han demostrado el efecto de factores como luz, temperatura, pH y solvente sobre la degradación de PA1. La degradación de PA1 es proporcional al aumento de la temperatura, del pH y de la intensidad de luz<sup>77</sup>. El medio acuoso es otro factor que promueve la degradación de este compuesto<sup>78</sup>. La disminución del efecto de PA1 sobre la actividad de las enzimas a tiempos prolongados podría deberse a una disminución de la concentración de PA1 como consecuencia de su degradación, ya que los cultivos se realizaron en medios acuosos a pH 6.0, a 30 °C y en presencia de luz. La reunión de todos estos factores podría causar el acortamiento de la vida media de PA1 y esto explicaría la disminución de su efecto sobre la actividad enzimática. Por otra parte la toxina podría haber sido degradada por el metabolismo propio de la levadura.

En este trabajo se demostró que PA1 produce cambios en la actividad de LDH, fumarasa y NADPH citocromo c reductasa. El cambio de la actividad enzimática puede ser una consecuencia de cambios en la síntesis o degradación de la proteína, o bien puede ser debido a un efecto directo

sobre la actividad de la enzima: inhibición o estimulación de la actividad catalítica.

Las enzimas LDH, fumarasa y NADPH citocromo c reductasa participan respectivamente en la Glucólisis anaeróbica, Ciclo de Krebs y Destoxificación de drogas en todos los organismos eucarióticos, incluyendo levaduras. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que PA1 afecta ya sea en forma directa o indirecta las tres vías metabólicas antes mencionadas, sin descartar la posibilidad del efecto de PA1 sobre otras funciones metabólicas no analizadas en este trabajo.

Respecto al efecto de PA1 sobre las enzimas peroxisomales de levaduras y mamíferos se ha reportado lo siguiente:

1. PA1 a una dosis no letal de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no afecta la actividad de alcohol oxidasa y catalasa de levaduras metilotróficas en las primeras dos horas de exposición<sup>41</sup>.
2. PA1 inhibe la actividad de catalasa hepática de mamíferos únicamente cuando se utiliza enzima purificada (*in vitro*)<sup>33</sup>.
3. Bajo condiciones *in vivo* PA1 no es capaz de inhibir la actividad de catalasa<sup>34</sup>.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que en *C. boidinii*, PA1 no afecta la actividad de las enzimas peroxisomales alcohol oxidasa y catalasa bajo condiciones *in vivo*.

El núcleo es un organelo celular el cual está limitado por una envoltura nuclear semipermeable. En su interior se encuentran RNA, DNA y proteínas dispersas y no condensadas. Debido a que la envoltura nuclear contiene poros facilita la entrada de sustancias de bajo peso molecular (proteínas hasta de 60 kDa)<sup>79</sup>.

Para evaluar el efecto de PA1 sobre el núcleo celular de *C. boidinii*, se analizó el contenido de RNA, DNA y proteínas, así como la proporción entre estos componentes en la fracción nuclear aislada de *C. boidinii*, a partir de cultivos control y cultivos expuestos a PA1 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante diferentes tiempos.

Para este propósito se escogió el procedimiento descrito por Rozjin y cols.<sup>68</sup> en el cual se describe el análisis simultáneo de RNA, DNA y proteínas a partir del núcleo celular aislado de levaduras. Los resultados de las muestras control (sin tratamiento) del presente trabajo coinciden con lo reportado por estos autores.

Los resultados de la determinación del contenido de los principales componentes del núcleo en las muestras tratadas demostró que la PA1 no causa efecto sobre dichos componentes (Tabla VI, Figura 14). Sin embargo el análisis de la proporción proteínas/DNA de las células expuestas durante 30 min a PA1 demostró diferencia significativa con respecto al control (Tabla VII, Figura 15). Este hallazgo es interesante ya que refleja un aumento de la cantidad de proteínas o una disminución en el contenido de DNA en las muestras problema (Tabla VII).

Estudios realizados por Vargas y cols.<sup>44</sup> en *H. polymorpha* sugieren un efecto de la PA1 sobre el genoma de levaduras metilotróficas ya que lograron aislar dos cepas de *H. polymorpha* con disfunción peroxisomal. En este trabajo se confirmó el efecto de PA1 sobre la membrana peroxisomal en *H. polymorpha*. En las cepas con disfunción peroxisomal se observaron peroxisomas anormales en morfología y número, además la actividad de AO disminuyó en un 50 % y la utilización de metanol por estas cepas fue deficiente. Debido a que solo se aislaron dos cepas, podría ser interpretado como un evento que representa mutaciones espontáneas. El genoma de esta especie de levadura se caracteriza por ser muy estable y la probabilidad de que se presenten mutaciones es muy baja. En ese trabajo los autores no descartan la posibilidad de un efecto directo de PA1 sobre la membrana peroxisomal, sin embargo sus resultados sugieren fuertemente un efecto sobre el genoma celular<sup>44</sup>.

En el presente trabajo la morfología del núcleo de células expuestas a PA1 no mostró indicios de daño sobre este organelo. (Figuras 5 y 6). Por otro lado los resultados del análisis de la proporción proteínas/DNA a los 30 min de exposición de PA1 sugieren un efecto en la función de este organelo.

Cada una de las fracciones celulares aisladas de *C. boidinii* se sometieron a análisis por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con el propósito de determinar la presencia o ausencia

de PA1. Los resultados de este análisis demostraron la presencia de PA1 en la fracción 1 del gradiente de densidad de sacarosa (Fracción más ligera) a los 30 min de exposición a PA1 (Figura 18). Además en los cromatogramas obtenidos de las fracciones nucleares de *C. boidinii* se detectó un pico con un tiempo de retención semejante al del estándar de PA1 a los 30 y 60 min de incubación con el compuesto (Figuras 18 y 19). El procedimiento utilizado en CLAR se estandarizó utilizando extractos celulares de *C. boidinii* en los cuales se demostró la presencia de PA1 (datos no mostrados).

La fracción 1 del gradiente de densidad de sacarosa (30 % de sacarosa) corresponde a la fracción más ligera y su contenido es inespecífico. Este contenido consiste en su mayor parte de proteínas y enzimas solubles que se liberan durante el procedimiento de separación de organelos celulares.

La presencia de PA1 en la fracción nuclear de *C. boidinii* aunada al aumento de la proporción proteínas/DNA y aumento de la actividad de LDH y fumarasa a los 30 min de exposición a PA1, sugieren fuertemente que PA1 causa efecto sobre la función nuclear de *C. boidinii*. De esta forma el aumento de la actividad de las enzimas podría ser el resultado de la inducción de la expresión de los genes nucleares correspondientes.

El hecho de no haber encontrado PA1 en el resto de los compartimentos celulares en este análisis puede deberse a varios factores:

A.- La concentración de PA1 en las fracciones celulares podría encontrarse por debajo del límite de detección. Sin embargo, el límite de detección de PA1 en CLAR por el método desarrollado en el presente trabajo es de 10.5 ng de masa inyectada; la concentración de PA1 que se utilizó en dos litros de cultivo fue de 2 µg/mL, la cantidad en masa fue de 4 mg de PA1; con estos datos se supuso que la PA1 pudiera ser detectada por CLAR.

B.- Que PA1 no esté presente en los compartimentos celulares de *C. boidinii*. Sin embargo, en experimentos previos se demostró la presencia de PA1 dentro de las células de levadura. En estos experimentos se utilizaron extractos celulares de *C. boidinii* expuesta a 2 µg/mL de PA1.

C.- Que la PA1 se pierda durante el proceso de separación de los organelos celulares. En el proceso de obtención de organelos celulares existe un paso experimental en el cual las células se incuban con amortiguador Tris-HCl a pH 9.3. Es muy probable que a este pH la PA1 se encuentre totalmente ionizada, debido a que el pK de este compuesto es de 7.4<sup>77, 78</sup>. Esto resulta en el aumento de la solubilidad de PA1 en el medio acuoso, lo cual puede causar la pérdida de PA1 hacia el medio. Por otra parte, se ha demostrado que la PA1 es poco estable a pH alcalino. Estos dos factores pueden producir, durante el proceso de separación de organelos, que la PA1 en parte se solubilice en medio acuoso y en parte se degrade, ocasionando que este compuesto se pierda y no se detecte por CLAR.

A través de los estudios ultraestructurales realizados en el presente trabajo se confirmó el hallazgo descrito por otros autores<sup>41, 43, 44</sup>: en *C. boidinii*, PA1 a una dosis no letal, causa daño sobre la membrana peroxisomal sin afectar otros organelos celulares. A nivel bioquímico se demostró que la toxina no afecta la actividad de las enzimas peroxisomales alcohol oxidasa y catalasa, esto sugiere que el daño de la membrana peroxisomal ocurre a través del efecto de PA1 sobre uno o varios componentes de la membrana peroxisomal, ya sea en forma directa o indirecta con la probable participación de algún factor desconocido de otro compartimento celular.

A nivel bioquímico se demostró efecto de PA1 sobre la actividad de las enzimas marcadores de citosol, mitocondrias y microsomas, así como sobre la proporción de proteínas/DNA en la fracción nuclear. En contraste con los hallazgos demostrados a nivel ultraestructural, estos resultados sugieren fuertemente que el efecto de PA1 en *C. boidinii* no es selectivo sobre peroxisomas.

En *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura no metilotrófica, se evaluó el efecto de PA1 sobre la viabilidad celular utilizando medios de cultivo con dos fuentes de carbono; con glucosa (condiciones basales) y con ácido oleico (sustrato inductor de proliferación peroxisomal). En los cultivos líquidos con glucosa se demostró disminución de la viabilidad en forma proporcional a la concentración de PA1 utilizada. A la máxima concentración: 50 µg/mL se obtuvieron los menores porcentajes de supervivencia celular: 78.1% en placas de agar con glucosa y 70.3% en placas de agar con ácido oleico. En este estudio se demostró diferencia



significativa con respecto al control desde la concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$  de PA1: a esta dosis se determinaron altos porcentajes de supervivencia celular: 93.0% en placas de agar con glucosa y 91.3% en placas de agar con ácido oleico (Tabla VIII, Figura 21). En el caso de los cultivos líquidos con ácido oleico se obtuvieron resultados semejantes a las condiciones basales. A la concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  de PA1 se determinaron los menores porcentajes de supervivencia celular: 53.8% en placas de agar con glucosa y 56.6% en placas de agar con ácido oleico. En esta fuente de carbono se determinó la dosis no letal de PA1 a los 2  $\mu\text{g/mL}$ , en la cual se obtuvo diferencia con respecto al control y altos porcentajes de supervivencia celular: 89.8% en placas de agar con glucosa y 88.9% en placas de agar con ácido oleico (Tabla IX, Figura 22).

Los resultados arriba mencionados coinciden con lo descrito por Sepúlveda y cols.<sup>41</sup> sobre la viabilidad de las levaduras metilotróficas *C. boidinii* y *H. polymorpha* cultivadas en medios con metanol como única fuente de carbono y como sustrato inductor de la proliferación peroxisomal. En ambos casos se estableció la dosis no letal de PA1 a los 2  $\mu\text{g/mL}$ .

En el presente trabajo se demostró que PA1 produce mayor efecto sobre la viabilidad de *S. cerevisiae* cuando se cultiva en medio líquido con ácido oleico. Este hallazgo sugiere que las células de levadura cultivadas en medio de cultivo con sustrato inductor de la proliferación son más susceptibles a la PA1, aunque en ambas fuentes de carbono PA1 produce disminución de la viabilidad de esta levadura. La disminución de la viabilidad en ambas fuentes de carbono indica que el efecto causado por PA1 no es selectivo sobre peroxisomas, ya que la utilización de estas dos fuentes de carbono se realiza en compartimentos celulares diferentes.

Los estudios ultraestructurales de células de *S. cerevisiae* expuestas a 2  $\mu\text{g/mL}$  de PA1 mostraron daño selectivo sobre los peroxisomas. El daño fue semejante al observado en *C. boidinii*. Desde los 30 min de incubación se observó ruptura y pérdida completa de la membrana peroxisomal, además se observaron membranas preautofágicas alrededor de los peroxisomas afectados. Así como en *C. boidinii*, en *S. cerevisiae* no se observó efecto de PA1 sobre otros compartimentos celulares bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente (Figura 23).

Los resultados del análisis ultraestructural de *S. cerevisiae* coinciden totalmente con lo demostrado por Sepúlveda y cols.<sup>52</sup> en las dos levaduras metilotróficas *C. boidinii* y *H. polymorpha* y además con lo reportado en este trabajo en *C. boidinii*. La PA1 a una dosis no letal de 2 µg/mL produce un daño selectivo e irreversible sobre los peroxisomas de *H. polymorpha*, *C. boidinii* y *S. cerevisiae* cultivadas en medios específicos, inductores de la proliferación peroxisomal.

Los resultados del presente trabajo sugieren que la especie y la actividad metabólica de la levadura son factores no involucrados en el efecto selectivo e irreversible de PA1 sobre peroxisomas. Al parecer el efecto de PA1 sobre la membrana peroxisomal ocurre a través de un componente común de los peroxisomas, independiente de la especie, de la actividad metabólica de la levadura y posiblemente de la función metabólica del peroxisoma en estos microorganismos.

El proceso de la degradación selectiva de peroxisomas dañados en la vacuola autofágica se conoce como pexofagia. Este proceso de degradación peroxisomal ha sido descrito por diversos autores en las levaduras *P. pastoris*, *H. polymorpha* y *S. cerevisiae*<sup>80</sup>. En estas levaduras la pexofagia se ha estudiado induciendo la proliferación peroxisomal y posteriormente transfiriendo las células de levadura a un medio de cultivo basal tal como el medio con glucosa. En este medio se induce la degradación de los peroxisomas porque bajo estas condiciones metabólicas las células no necesitan peroxisomas. Durante este proceso se han observado bajo el microscopio electrónico de transmisión, estructuras membranosas rodeando los peroxisomas cerca de la vacuola, estas estructuras secuestran al peroxisoma y lo conducen a la vacuola para su posterior degradación<sup>81, 82, 83</sup>.

En *S. cerevisiae* se han descrito dos tipos de pexofagia: micropexofagia y macropexofagia, de acuerdo a los eventos morfológicos que suceden. En esta levadura los mecanismos de micro y macropexofagia se han demostrado en medios de cultivo con glucosa o ác. oleico, respectivamente<sup>84</sup>.

En la macropexofagia el pexofagosoma, una estructura de doble membrana cuyo origen es desconocido, envuelve a los peroxisomas en el citosol y los secuestra hasta la vacuola. La membrana externa del pexofagosoma se funde con la vacuola y libera al peroxisoma rodeado de la

membrana interna del pexofagosoma en la matriz vacuolar (Figura 25 A). Por otra parte en la micropexofagia los peroxisomas son englobados directamente en la superficie vacuolar (Figura 25 B). En ambos casos las hidrolasas vacuolares degradan al peroxisoma hasta sus componentes macromoleculares.

Hasta la fecha se han propuesto diferentes modelos para describir la biogénesis peroxisomal. El modelo inicial de biogénesis peroxisomal establecía que los peroxisomas se originaban a partir del retículo endoplásmico por medio de gemación. De acuerdo a este modelo la membrana peroxisomal deriva del retículo endoplásmico<sup>85</sup>.

Posteriormente, después de extensos estudios se aceptó el modelo de crecimiento y división peroxisomal propuesto por Lazarow y Fujiki<sup>86</sup>. De acuerdo a este modelo los peroxisomas se originan de peroxisomas preexistentes por medio de crecimiento y división de estos organelos; las proteínas de matriz y membrana peroxisomal se sintetizan y se importan a los peroxisomas existentes.

Tal como lo establecía el primer modelo de biogénesis peroxisomal, recientemente se ha demostrado que el paso dependiente del retículo endoplásmico es esencial para la biogénesis de la membrana peroxisomal y por lo menos dos vías dependen del retículo endoplásmico: un transporte anterógrado de algunas proteínas peroxisomales desde el retículo endoplásmico hasta los peroxisomas y un transporte retrógrado de algunas proteínas del peroxisoma hacia el retículo endoplásmico (Figura 26). En este modelo algunas proteínas peroxisomales (principalmente de membrana) son transportadas al organelo a través de vesículas cuyo origen es el retículo endoplásmico. En el último paso los peroxisomas se originan por fisión de organelos preexistentes, tal como se propuso en el segundo modelo<sup>87</sup>.

El conjunto de eventos que se observan a nivel ultraestructural como consecuencia del daño inducido por PA1, tales como: fragmentación o ruptura de la membrana peroxisomal, la presencia de membranas preautofágicas que conducen a los peroxisomas afectados hacia la vacuola para su posterior degradación y además la presencia de peroxisomas pequeños indicando la formación o biogénesis del organelo, representan un

modelo de gran interés y aplicación para el estudio de la función, autofagia y biogénesis peroxisomal.

Respecto al mecanismo de acción de PA1, hacia el inicio del presente trabajo se había demostrado el efecto de PA1 únicamente sobre peroxisomas de levaduras metilotróficas. Los resultados de este trabajo contribuyen al aumento del conocimiento sobre el mecanismo de acción de PA1. Se demostró que PA1 afecta a otros compartimentos celulares de la levadura metilotrófica: *Candida boidinii*, por lo tanto el efecto de PA1 no es selectivo sobre peroxisomas en esta levadura. Por otro lado, el daño peroxisomal causado por PA1 no es exclusivo para levaduras metilotróficas, pues también fue demostrado en *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura no metilotrófica.

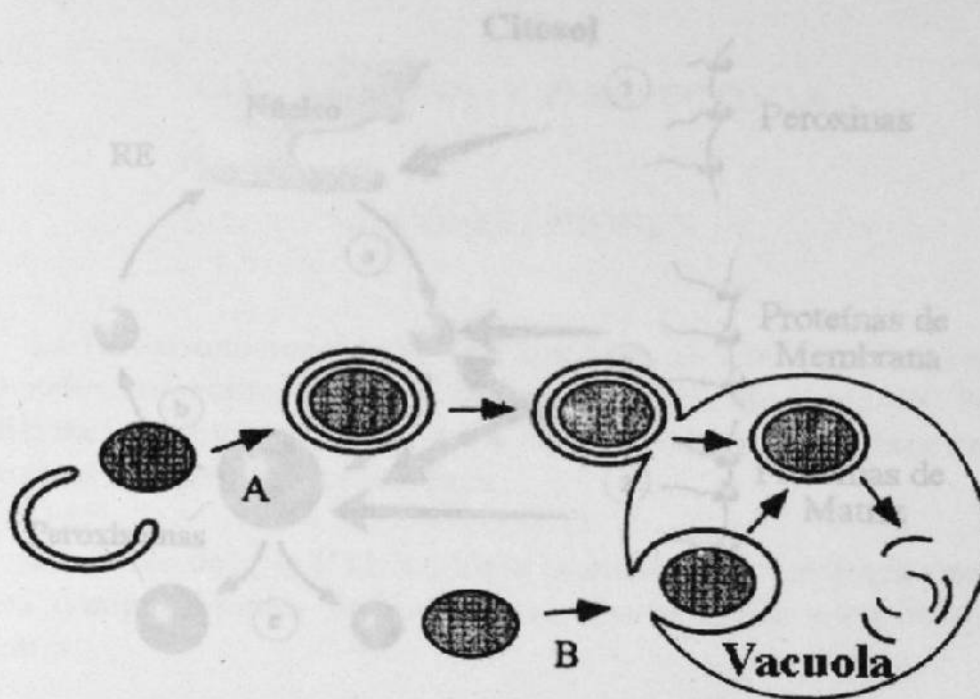


Figura 26. Modelo integral de biogénesis peroxisomal. Las proteínas de peroxisomal se importan

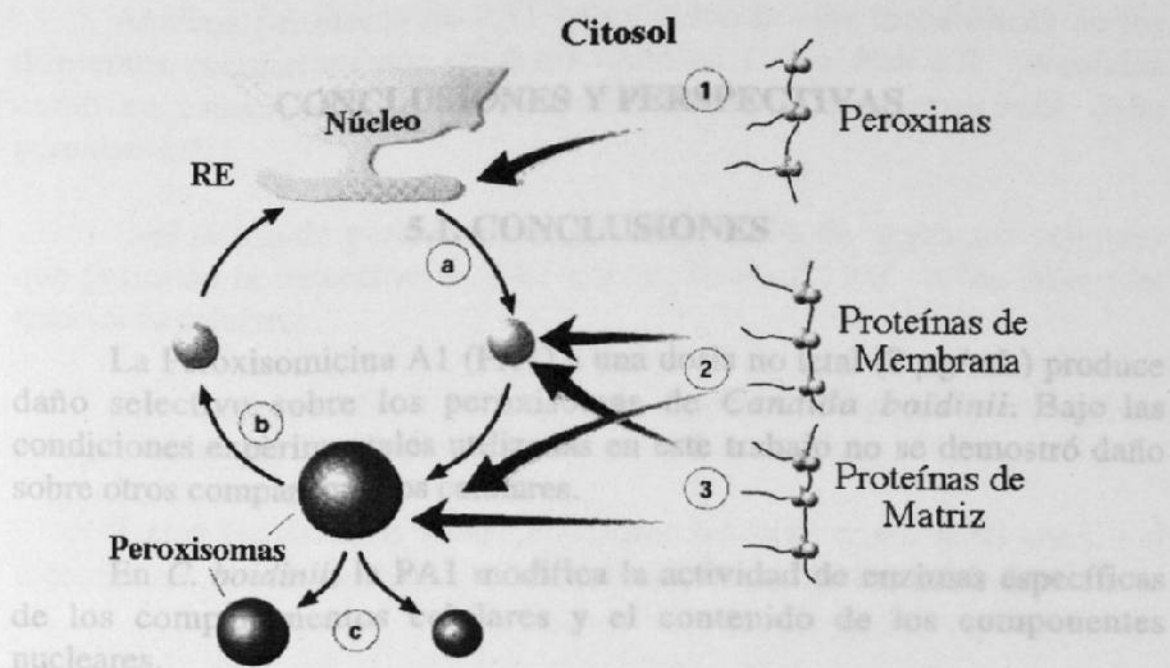
**Figura 25. Degradación peroxisomal.**

A.- Macropexofagia: una estructura membranosa envuelve a los peroxisomas y los dirige hasta la vacuola. Algunas proteínas

B.- Micropexofagia: Los peroxisomas son englobados directamente en la superficie de la vacuola.

En ambos mecanismos se produce una vesícula intravacuolar que es digerida por las hidrolasas vacuolares.

El primer paso de este modelo integral consiste en el modelo de crecimiento y división, c) los peroxisomas se originan de organelos preexistentes.



Los resultados obtenidos después de 30 min. de exposición a PA1 sugieren inducción de las síntesis de proteínas en *Candida boidinii*.

**Figura 26.** Modelo integral de biogénesis peroxisomal. Las proteínas de membrana y matriz peroxisomal se importan postraduccionalmente al peroxisoma (ruta 3) o bien, a través de un mecanismo anterogrado (ruta 2). Algunas proteínas peroxisomales (peroxinas) pueden ser dirigidas al peroxisoma vía el retículo endoplásmico (ruta 1). Las vías de las peroxinas son: a) por un mecanismo anterogrado las peroxinas son transportadas en vesículas del retículo endoplásmico al peroxisoma; b) por un mecanismo retrógrado, del peroxisoma al retículo endoplásmico. El último paso de este modelo integral consiste en el modelo de crecimiento y división, c) los peroxisomas se originan de organelos preexistentes.

Se acepta la hipótesis de este trabajo: La peroxisomícina A1, a una dosis no letal produce daño selectivo sobre los peroxisomas de *C. boidinii* y *S. cerevisiae*.

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1. CONCLUSIONES

La Peroxisomicina A1 (PA1) a una dosis no letal (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) produce daño selectivo sobre los peroxisomas de *Candida boidinii*. Bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo no se demostró daño sobre otros compartimentos celulares.

En *C. boidinii*, la PA1 modifica la actividad de enzimas específicas de los compartimentos celulares y el contenido de los componentes nucleares.

Los resultados obtenidos después de 30 min. de exposición a PA1 sugieren inducción de las síntesis de proteínas en *Candida boidinii*.

La PA1 fue detectada por medio de CLAR en la fracción nuclear de *C. boidinii* en los primeros tiempos de exposición.

En *Saccharomyces cerevisiae*, levadura no metilotrófica, la PA1 a una dosis no letal (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), causa daño selectivo sobre peroxisomas. Así como en *C. boidinii*, este daño consiste en la ruptura de la membrana peroxisomal.

El efecto de PA1 sobre peroxisomas es independiente de la especie y actividad metabólica de las levaduras.

Se acepta la hipótesis de este trabajo: La peroxisomicina A1, a una dosis no letal produce daño selectivo sobre los peroxisomas de *C. boidinii* y *S. cerevisiae*.

## 5.2. PERSPECTIVAS

Análisis del efecto de PA1 sobre diversas vías metabólicas de los diferentes compartimentos celulares tanto en *C. boidinii* y *S. cerevisiae* como en especies de mamíferos en los que se ha demostrado daño peroxisomal.

Evaluación de procedimientos de separación de organelos celulares que permitan la detección de PA1 por medio de CLAR en las diferentes fracciones celulares.

Estudio del efecto de PA1 sobre la expresión de genes que codifican para proteínas peroxisomales

Todos los estudios antes propuestos tendrían como meta común el incrementar el conocimiento acerca del mecanismo de acción de PA1.



## APENDICE

### Preparación de medios de cultivo

#### Medio líquido enriquecido con glucosa al 2% (YPD)

Pesar:

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

Disolver en 100 mL de agua destilada

Esterilizar a 121 °C por 30 min.

#### Medio mínimo con metanol al 0,5% (MMM)

Pesar:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,0 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,7 g

Disolver en un litro de agua destilada

Ajustar a un pH de 6,0 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ó  $\text{NaOH}$ .

Agregar:

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

Esterilizar a 121 °C por 30 min. Dejar enfriar

Adicionar:

Vitaminas	1,0 mL
Metanol	5,0 mL

### Solución de trazas minerales

#### Pesar

H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	50 mg
CuSO <sub>4</sub>	4 mg
KI	10 mg
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	20 mg
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	40 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	40 mg
NH <sub>4</sub> Mo <sub>7</sub>	20 mg

Disolver en un litro de agua destilada.

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

### Solución de vitaminas

#### Pesar:

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

Disolver en un litro de agua desionizada.

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

**Medio líquido enriquecido con glucosa al 0,1% (YPGG)****Pesar:**

Extracto de levadura	1,0 g
Peptona	2,0 g
Glucosa	0,1 g
Glicerol	3,0 mL

Disolver en 100 mL de agua destilada.

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

**Medio líquido enriquecido con ácido oleico al 0,1 % (YPGOT)****Pesar**

Extracto de levadura	1,0 g
Peptona	2,0 g
Glicerol	3,0 mL

Disolver en 100 mL de agua destilada.

Esterilizar a 121 °C por 30 min.

**Adicionar:**

Acido oleico	0,1mL
Tween 20	0,026 mL

**Placas de agar****Placas de agar YPD (2%)****Pesar**

Extracto de levadura	1,0 g
Peptona	2,0 g
Dextrosa	2,0 g
Agar	2,0 g

Disolver en 100 mL de agua destilada.

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

Vaciar en cajas de petri estériles.

### Placas de agar YPGG

Pesar:

Extracto de levadura	1,0 g
Peptona	2,0 g
Glucosa	0,1 g
Agar	2,0 g
Glicerol	3,0 mL

Disolver en 100 mL de agua destilada.

Esterilizar a 121 °C por 30 min.

Dejar enfriar. Vaciar en cajas de petri estériles.

### Placas de agar YPGOT

Pesar

Extracto de levadura	1,0 g
Peptona	2,0 g
Agar	2,0 g
Glicerol	3,0 mL

Disolver en 100 mL de agua destilada.

Esterilizar a 121 °C por 30 min.

Adicionar:

Acido oleico	0,1 mL
Tween 20	0,026 mL

Vaciar en cajas de petri estériles.

### Aislamiento de organelos celulares

#### Preparación de Amortiguador Tris- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

En el proceso de la formación de esferoplastos se utilizó como amortiguador una solución de Tris- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 M) pH 9,3 conteniendo DTE (10 mM). El DTE se agregó inmediatamente antes de su uso.

## Preparación de gradientes de densidad discontinuos de sacarosa

### Aislamiento de organelos celulares

Se prepararon soluciones de sacarosa de diferentes concentraciones (% p/p). Se preparó un gradiente de densidad de sacarosa discontinuo:

	Volumen (mL)	Concentración (% p/p)
1	4,5	60
2	6,0	50
3	6,0	45
4	6,0	40
5	6,0	35
6	3,0	30

La solución de sacarosa mas concentrada se encuentra en el fondo del tubo.

### Aislamiento del núcleo celular

Se prepararon soluciones de sacarosa de diferentes concentraciones (M). Se preparó un gradiente de densidad de sacarosa discontinuo:

	Volumen (mL)	Concentración (M)
1	4,5	2,0
2	9,0	1,8
3	9,0	1,5
4	9,0	1,2

La solución de sacarosa mas concentrada se encuentra en el fondo del tubo.

## Determinación de Actividad Enzimática

### Lactato Deshidrogenasa

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

Amortiguador fosfato de potasio 100 mM; pH 7,0	800 $\mu$ L
Solución de piruvato (1.65 mg/mL)	50 $\mu$ L
Muestra	100 $\mu$ L

Mezclar y tomar el valor de la absorbancia a 340 nm.

Este valor corresponde al blanco de reactivos.

Agregar:

NADH (3.3 mg/mL)	50 $\mu$ L
Mezclar e iniciar la cinética enzimática por seis minutos.	

El procedimiento determina la desaparición de NADH por minuto. La actividad de LDH (U/mL) se obtuvo multiplicando el cambio de absorbancia/min por el factor 1,61 (ver adelante).

El coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) de NADH a 340 nm es 6,22  $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$

### Fumarasa

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

Amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,4	880 $\mu$ L
Muestra	100 $\mu$ L

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

Este valor corresponde al blanco de reactivos.

Agregar:

Malato (0,2 M)	20 $\mu$ L
Mezclar e iniciar la cinética enzimática por seis minutos.	

Este procedimiento mide la aparición de fumarato a partir de malato. La actividad de Fumarasa (U/mL) se obtuvo multiplicando el cambio de absorbancia/min por el factor 4,09 (ver adelante).

El coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) de fumarato a 240 nm es  $2,44 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

### NADPH citocromo c reductasa

Utilizar dos cubetas de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico:

	Blanco	Problema
Mezcla de ensayo	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$
Agua	374 $\mu\text{L}$	-----
NADPH (1.29 mM)	-----	374 $\mu\text{L}$

Mezclar y tomar el valor de la absorbancia del blanco a 550 nm.

Agregar:

Muestra	26 $\mu\text{L}$	26 $\mu\text{L}$
Mezclar e iniciar la cinética enzimática por seis minutos.		

Este procedimiento mide la aparición de citocromo c reducido a partir del oxidado. La actividad de NADPH citocromo c reductasa (U/mL) se obtuvo multiplicando el cambio de absorbancia/min por el factor 1,08 (ver adelante).

El coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) de citocromo c reducido a 550 nm es  $22,85 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ .

### Preparación de la mezcla de ensayo para NADPH cit. c reductasa

Mezclar

Amortiguador de fosfatos pH 7,4 1 M	955 $\mu\text{L}$
KCN	4,63 mg
Citocromo c	35,00 mg

Aforar a 35 mL con agua desionizada.

### Solución de NADPH (1,29 mM)

El coeficiente de extinción molar de NADPH a 340 nm es de  $6,22 \times 10^3$  L/mol-cm. Por lo tanto una solución 1 mM de NADPH debe ser 6,22 y una 2 mM entonces será 12,4. Preparar una solución 2 mM de NADPH, obtener una dilución 1:100 y medir su absorbancia a 340 nm. Relacionar la absorbancia obtenida con la calculada y determinar la concentración de NADPH en la solución preparada. Diluir la solución hasta una concentración de 1,29 mM.

### Catalasa

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

Amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,4	950 $\mu$ L
Muestra	40 $\mu$ L

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

Este valor corresponde al blanco de reactivos.

Agregar:

Peróxido de hidrógeno (6% en amortiguador)	50 $\mu$ L
Mezclar e iniciar la cinética enzimática por seis minutos.	

El procedimiento descrito mide la desaparición de peróxido de hidrógeno. La actividad de catalasa (U/mL) se obtuvo multiplicando el cambio de absorbancia/min por el factor 692,5 (ver adelante).

El coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) de peróxido de hidrógeno a 240 nm es  $0,036 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ .



### Preparación de amortiguador de fosfato de potasio 1 M

Solución 1	100 mL de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1 M
Solución 2	100 mL de $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1 M
Solución Madre	Ajustar el pH de la solución 2 a un pH determinado, utilizando la solución 1. Almacenar a 4 °C.
Solución de Trabajo	Diluir la solución madre en agua destilada hasta la concentración final necesaria.

### Alcohol oxidasa

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

Mezcla de ensayo	895 $\mu\text{L}$
Muestra	100 $\mu\text{L}$

Mezclar y tomar el valor de la absorbancia a 340 nm.

Este valor corresponde al blanco de reactivos.

Agregar:

Metanol (120 mM)	5 $\mu\text{L}$
Mezclar e iniciar la cinética enzimática por seis minutos.	

El procedimiento descrito mide la formación del radical catiónico ABTS. La actividad de Alcohol oxidasa (U/mL) se obtuvo multiplicando el cambio de absorbancia/min por el factor 0,2777 (ver adelante).

El coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) del radical catiónico ABTS a 420 nm es 36  $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ .

## Preparación de la Mezcla de Ensayo para AO

Mezclar:

Amortiguador de fosfato de potasio 50 mM; pH 7,5	1,50 mL a partir de 1M
Peroxidasa (HRP) 2U/mL	0,16 mL a partir de 380 U/mL
ABTS 1 mM	16.46 mg
Agua destilada	28,34 mL

Preparar inmediatamente antes de su uso.

## Cálculo de factores para la determinación de actividad enzimática.

La actividad enzimática se expresa en unidades internacionales U definiéndose una Unidad como la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato o la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto durante la reacción enzimática. Matemáticamente se expresa con la siguiente ecuación:

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

En general la actividad enzimática se expresa por unidad de volumen, esto es, en U/mL. Al despejar  $\Delta C$  se tendrá entonces:

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

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

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

Al sustituir la ec<sup>\'n</sup> (1.a) en la ec<sup>\'n</sup> (2) resultará:

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

Al despejar para U/ML se obtendrá:

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

Donde

- U = Unidades de actividad ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
- $\Delta A$  = Cambio de absorbancia del compuesto
- $\epsilon$  = Absortividad molar del compuesto ( $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ )
- b = Espesor de la cubeta (cm)
- t = Tiempo (min)
- $\Delta C$  = Cambio de concentración del compuesto ( $\mu\text{mol}$ )

Entonces:

$$\begin{aligned} U/mL &= \Delta A / \epsilon (\text{cm}^2/\mu\text{mol}) (1\text{cm}) (1\text{min}) \\ U/mL &= \Delta A / \epsilon (\text{cm}^2 \text{min}/\mu\text{mol}) \\ U/mL &= \Delta A (\mu\text{mol}/\text{min mL}) / \epsilon \\ U/mL &= \Delta A (U/mL) / \epsilon \end{aligned} \quad \text{ec'n (4)}$$

Al sustituir el valor del coeficiente de absortividad molar del compuesto en la ec'n (4) se obtendrán ecuaciones diferentes para cada compuesto. De forma general la ecuación se expresaría así:

$$U/mL = \Delta A (D U/mL) \quad \text{ec'n (4.a)}$$

Donde **D** es el cociente de  $1/\epsilon$ :

Enzima	Compuesto	( $\epsilon$ )	( <b>D</b> )
LDH	NADH	6,22 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$	0,1608
Fumarasa	Fumarato	2,44 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$	0,4098
Cit. c red.	cit. c red.	22,85 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$	0,0438
Catalasa	$\text{H}_2\text{O}_2$	0,036 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$	27,700
AO	Radical ABTS	36,00 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$	0,0278

Para el cálculo de la actividad enzimática se toman además en cuenta otros parámetros tales como: el volumen total del ensayo en la cubeta y la dilución de la muestra en la cubeta. Integrando estos nuevos parámetros, la ec'n (4.a) quedaría del siguiente forma:

$$U/mL = (\Delta A)(D U/mL)(\text{vol en cubeta})(\text{dil. en cubeta})$$

Al realizar los cálculos con los datos conocidos se obtendrá una ecuación general que se expresaría de la siguiente forma:

$$U/mL = (\Delta A) (F U/mL)$$

Donde **F** es un factor obtenido de la multiplicación de los datos conocidos:  $(D U/mL)(\text{vol. en cubeta})(\text{dil. en cubeta})$

Enzima	(D)	Volumen	Dilución	(F)
LDH	0,1608	1,0 mL	10	1,61
Fumarasa	0,4098	1,0 mL	10	4,09
Cit. c red.	0,0438	0,8 mL	31	1,08
Catalasa	27,700	1,0 mL	25	692,50
AO	0,0278	1,0 mL	10	0,28

Cada uno de estos factores se utilizó en la determinación de actividad enzimática, como se menciona al final de cada procedimiento. La actividad enzimática en una muestra biológica se calcula considerando además de los factores mencionados anteriormente, la dilución previa de ésta.

Quando se desea conocer la proporción de una enzima con respecto a la cantidad de proteínas de la muestra, se determina la actividad específica de la enzima (U/mg). La actividad específica se calculó dividiendo la actividad enzimática (U/mL) entre la concentración de proteínas (mg/mL).

$$\frac{U/mL}{mg/mL} = U/mg$$

### Curva de calibración de proteínas

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de albúmina sérica bovina conteniendo 2,5 a 20  $\mu$ g de proteína. Cada uno de los estándares se preparó por triplicado a partir de una solución

patrón de albúmina sérica bovina (1 mg/mL) como se describe en la Tabla X. El volumen final de cada tubo fue de 200  $\mu$ L. A cada uno de estos se les agregó 1 mL del reactivo de Bradford (diluido 1:5 en agua destilada). Se agitaron en el vortex y se dejaron reposar por 30 min a temperatura ambiente. Se determinó el valor de absorbancia a 595 nm de cada estándar y se trazó la curva de calibración graficando el valor de absorbancia en función de la cantidad de proteína en un volumen de 200  $\mu$ L.

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

**Tabla X.** Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteínas totales.

Tubo	Proteína ( $\mu$ g)	Sol. patrón ( $\mu$ L)	Agua dest ( $\mu$ L)
1	0,0	0,0	200,0
2	2,5	2,5	197,5
3	5,0	5,0	195,0
4	7,5	7,5	192,5
5	10,0	10,0	190,0
6	12,5	12,5	187,5
7	15,0	15,0	185,0
8	20,0	20,0	180,0

### **Microscopía electrónica de transmisión**

#### **Técnica de fijación con permanganato de potasio**

Las muestras se lavaron 2 veces con agua destilada (6000 rpm, 3 min). Se fijaron en permanganato de potasio (1,5 % en agua desionizada) durante 20 min (45 min). Se lavaron 2 ó mas veces hasta que el color fue transparente (6000 rpm, 3 min). Posteriormente se contrastaron con acetato de uranilo (1 % en agua ultrapura) por lo menos 1 hr (2 hrs) y se deshidrataron de la siguiente forma:

Etanol ( 50 %)	15 min	(25 min)
Etanol ( 70 %)	15 min	(25 min)
Etanol ( 96 %)	15 min	(25 min)
Etanol (100 %)	15 min	(25 min)
Etanol (100 %)	60 min	(60 min)

Se aclararon con óxido de propileno, dos veces durante 15 min (30 min). Se incluyeron en resina epóxica:

Epón-óxido de propileno (1:1)	60 min	(2 hrs)
Epón-óxido de propileno (3:1)	60 min	(2 hrs)
Epón-óxido de propileno (3:1)	60 min	(2 hrs)
Epón-óxido de propileno (3:1)	60 min	(2 hrs)
Epón puro	30 min	(1 hrs)
Epón puro	30 min	(1 hrs)
Epón puro	60 min	(2 hrs)

La polimerización se realizó en tubos endorff a 60°C durante toda la noche. A partir de los bloques resultantes se prepararon cortes finos utilizando el ultramicrotomo Ultratome LKB V. Los cortes finos se contrastaron con acetato de uranilo al 0,5 % en solución alcohólica al 50 % durante 5 min. Se lavaron por 1 minuto con agua ultrapura y se secaron. Se realizó la observación bajo el microscopio electrónico de transmisión Carl-Zeiss EM 109.

Este procedimiento se utilizó tanto para la levadura *Candida boidinii* como para *Saccharomyces cerevisiae*. La pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es mas difícil de penetrar, por lo cual se emplearon tiempos mas prolongados para el procesamiento de estas muestras (tiempos escritos entre paréntesis).

### **Técnica de fijación con glutaraldehído y postfijación con tetraóxido de osmio**

Las muestras se lavaron 3 veces con agua destilada (6000 rpm, 3 min). Se fijaron en glutaraldehído (2,5 % en agua desionizada) durante 60 min. Para *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó glutaraldehído al 3,0 %

durante 60 min. Se lavaron 3 veces con amortiguador de cacodilatos 0,1 M (ver Apéndice) pH 7,4 (6000 rpm, 3 min). Se posfijaron con tetraóxido de osmio (2 % en agua ultrapura) por 30 min (1 hr). Las muestras se lavaron 3 veces con amortiguador de cacodilatos (6000 rpm, 3 min) y posteriormente se trataron con nitrato de uranilo (1 %) durante 30 min. Las muestras se lavaron 3 veces con amortiguador de cacodilatos (6000 rpm, 3 min) y se deshidrataron de la siguiente forma:

Acetona ( 30 %)	5 min	(3 min, 3 veces)
Acetona ( 50 %)	5 min	(3 min, 3 veces)
Acetona ( 70 %)	5 min	(3 min, 3 veces)
Acetona ( 90 %)	5 min	(3 min, 3 veces)
Acetona (100 %)	5 min	(3 min, 3 veces)

Las muestras se incluyeron en resina epóxica:

Epón-acetona (1:1)	3 hrs	(Toda la noche)
Evaporar a T amb.	3 hrs	(Toda la mañana)
Epón puro	1 hr	(Toda la tarde)

La polimerización se realizó en tubos ependorff a 60 °C durante toda la noche. A partir de los bloques resultantes se prepararon cortes finos utilizando el ultramicrotomo Ultratome LKB V. Los cortes finos de *C. boidinii* se contrastaron con acetato de uranilo al 0,5 % en solución alcohólica al 50 % durante 5 min. Se lavaron con agua ultrapura y se secaron. Se realizó la observación bajo el microscopio electrónico de transmisión Carl-Zeiss, EM 109.

En este procedimiento los tiempos mas prolongados se emplearon para el procesamiento de las muestras obtenidas de los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*.

### Resina epóxica

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

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

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

### **Amortiguador de cacodilatos**

Preparar:

#### **Solución A**

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

#### **Solución B**

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

#### **Solución de trabajo**

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



**BIBLIOGRAFIA.**

- 1.- Conrad M. W. (1958). *Poisonous Plants of the United States*. The Macmillan Company. New York, USA.
- 2.- Dreyer, D. L., Arai, I., Bachmann, C. D., Anderson, W. R., Jr., Smith, R. G., and Daves, G. D., Jr. (1975). Toxins causing noninflammatory paralytic neuronopathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am. Chem. Soc.* 97:4895-4990.
- 3.- Guerrero, M., Piñeyro, A., and Waksman, N. (1987). Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). *Toxicon.* 25:265-268.
- 4.- Waksman, N., and Martínez, L. (1989). Chemical and toxicological screening in genus *Karwinskia* (México). *Rev. Latinoamer. Quim.* 20/1:27-29.
- 5.- Rivas, V., Torres, R., and Waksman, N. (1990). Dimeric anthracenoces from *Karwinskia sp.* *Planta Médica.* 56:562.
- 6.- Waksman de Torres, N., and Ramírez Durón, R. (1992). Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. *Rev. Latinoamer. Quim.* 23/1 and 22/4:25-27.
- 7.- Rivas, V., Waksman, N. (2001). Cytotoxic hydroxyanthracenones from fruits of *Karwinskia parvifolia*. *Natural product letters*. En prensa.
- 8.- Fernández, Nava R. (1992). Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México. *Anales Inst. Biol. UNAM, Ser. Bot.* 63:1-23.
- 9.- Segovia A. y Zermeño F. (1972). Polirradiculitis tóxica por *Karwinskia humboldtiana*. A propósito de un caso. *Med. Hosp. Infant. Méx.* 29:87.

- 10.- Montoya M., López G. y Hernández A. (1982). Intoxicación por *Karwinskia humboldtiana*. Conceptos actuales. Rev. Med. IMSS Méx. 6:707-709.
- 11.- Padrón-Puyou F. (1951). Estudio clínico experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) en niños. Gac. Méd. Méx. 81:299-311.
- 12.- Bermúdez de Rocha, M. V., Lozano Meléndez, F. E., Salazar Leal, M. E., Waksman de Torres, N. y Piñeyro López, A. (1995). Intoxicación de una familia por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) Gac. Méd. Méx. (Casos Clínicos) 131:100-106.
- 13.- Bermúdez de Rocha, M. V., Lozano-Meléndez, F. E., Támez-Rodríguez, V. A., Díaz-Cuello, G. y Piñeyro-López, A. (1995). Frecuencia de intoxicación con *Karwinskia humboldtiana* en México. Salud Pública Méx. 37:57-62.
- 14.- Puertolas, M., Nava, O., Medina, H., López, F., Oyervides, J. (1984). Polirradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*. Rev. Med. IMSS Mex. 22:22-27.
- 15.- Clavijero F.X. (1982). Plantas nocivas y extravagantes. "Historia de la Antigua o Baja California". Editorial Porrúa, 3era edición pp 31-33. Citado en: Piñeyro, A. (1990). Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T 514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L. México.
- 16.- Ruiz-Ordoñez, J., Torres, C. T. y Piñeyro López A. (1991). Aspectos morfológicos relevantes en el fruto de *Karwinskia humboldtiana* Zucc. (Coyotillo). Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica (Trabajo mural). Facultad de Medicina, UANL.
- 17.- Padrón, Francisco. (1956). El Médico y el Folklore. Talleres Gráficos de la Editorial Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., Méx. pp 140-141.

- 18.- Lisková, D., Ruiz, J., Lux, A., and Piñeyro, A. (1994). Tissue culture of *Karwinskia humboldtiana* –a plant producing toxins with antitumoral effects. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 36:339-343.
- 19.- 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.* 24:1096.
- 20.- Bermúdez, M.V., Martínez, F.J., Salazar, M.E., Waksman, N., and Piñeyro, A. (1992). Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) in rat guinea-pig, hamster, and dog. *Toxicon.* 30:1493-1496.
- 21.- Sepúlveda-Saavedra, J., González-Corona, B., Támez-Rodríguez, V.A., Bermúdez de Rocha, M.V., and Piñeyro-López, A. (1992). Ultrastructure of the lesion induced by toxin T-514 isolated from *K. humboldtiana* in the alveolar region of the lung. *Proc. 50<sup>th</sup> Ann. Meet. EMSA.* Bailey G.W., Bentley J., Small J.A. (Editors). Published by San Francisco Press, Inc. pp. 640-641.
- 22.- Támez Rodríguez, V.A., Sepúlveda Saavedra, J., Bermúdez de Rocha, M.V., y Piñeyro López, A. (1991). Autofagia de peroxisomas en el hígado del *Macaco fascicularis* intoxicado con peroxisomicina A1 (T 514). *Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica (Trabajo mural).* Facultad de Medicina, UANL.
- 23.- Piñeyro López, A., González Guerrero, J.F. Vidal Gutiérrez, O., Lozano Meléndez, F., Ancer Rodríguez, J., Marfil Rivero, J., González Alanis, R. y Piñeyro Garza, E. (1992). Estudio Fase I de la T 514 (peroxisomicina): Resultados clínicos. *Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica.* Facultad de Medicina, UANL.
- 24.- Garza-Ocañas, L., Hsieh, G. C., Acosta, D., Torres, O., and Piñeyro, A. (1992). Toxicity assessment of toxins T 514 and T 544 of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures. *Toxicology.* 73:259-267.

- 25.- Garza-Ocañas, L., Jiang, T., Acosta, D., Torres, O., Waksman, N., and Piñeyro, A. (1994). Comparison of the hepatotoxicity of toxin T 514 of *Karwinskia humboldtiana* and its diastereoisomer in primary liver cell cultures. *Toxicon*. 32/10:1287-1291.
- 26.- Martínez, F. J., Ramírez, R., Waksman, N., and Piñeyro, A. (1997). Experimental evidence for toxic damage induced by a dimeric anthracenone: diast. T 514 (peroxisomicine A2). *Toxicology Letters*. 90:155-162.
- 27.- Piñeyro, A., Martínez de Villarreal, L., and González, R. (1994). *In vitro* selective toxicity of toxin T 514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on varios human tumor cell lines. *Toxicology*. 92:217-227.
- 28.- Piñeyro López, A., González Alanis, R., y Martínez Villarreal, L. E. (1993). Potencial efecto antineoplásico de las toxinas extraídas del género *Karwinskia*. En: *La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana*. Secretaría de Salud, México. Edición conmemorativa. pp 209-232.
- 29.- Loomis, T. (1978). Numbers in Toxicology. In: T. Loomis (Ed.), *Essentials of Toxicology*. Lea and Febiger, Philadelphia. 2:13-28.
- 30.- Piñeyro, A. (1995). *Europaischen Patentblatt* 95/48 (29.11.95) Patent nummer: 0467407.
- 31.- Piñeyro, A. (1996). Bioscience patent "Pharmaceutically acceptable anthracene compounds" number 5578646.
- 32.- Patente Japonesa número 2651758.
- 33.- Moreno-Sepúlveda, M., Vargas-Zapata, R., Esquivel-Escobedo, D., Waksman de Torres, N., and Piñeyro-López, A. (1995). Effect of peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity. *Planta Med*. 61:337-340.

- 34.- Moreno-Sepúlveda, M., Vargas-Zapata, R., Ballesteros-Elizondo, R., Piñeyro-López, A., and Sepúlveda-Saavedra, J. (1997). Studies on the effect of peroxisomicine on catalase activity in albino mice. *Toxicol.* 35:777-783.
- 35.- Sepúlveda-Saavedra, J., Bermúdez de Rocha, M. V., Tamez-Rodríguez, V. A., Ballesteros-Elizondo, R. G., Moreno-Sepúlveda, M., and Piñeyro-López, A. (1998). Quantitative analysis of liver peroxisomes in rats intoxicated with peroxisomicine A1. *Toxicol. Lett.* 98: 71-75.
- 36.- Moreno Martínez, Ma. Leticia. (2000). Efecto de la peroxisomicina A1 sobre la autofagia de peroxisomas en el hígado de *Macacca fascicularis* en un modelo *in vitro*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, UANL.
- 37.- Sahm, H., Roggenkamp, R., Wagner, F., and Hinkelman, W. (1975). Microbodies in methanol grown *Candida boidinii*. *J. Gen. Microbiol.* 88:218-222.
- 38.- Fukui, S., Kawamoto, S., Yasuhara, S., Tanaka, A., Osumi, M., Imaizumi, F. (1975). Microbody of methanol-grown yeast. Localization of catalase and flavi-dependent alcoholoxidasa in the isolated microbody. *Eur. J. Biochem.* 59:561-566.
- 39.- Goodman, J. M. (1985). Dihydroxyacetone synthase is an abundant constituent of the methanol-induced peroxisome of *Candida boidinii*. *J. Biol. Chem.* 260: 7108-7113.
- 40.- Van Dijken, J. P., Veenhuis, M., Vermeulen, C. A., and Harder, W. (1975). Cytochemical localization of catalase activity in methanol-grown *Hansenula polymorpha*. *Arch. Microbiol.* 105:261-655.
- 41.- Sepúlveda, J., Van der Klei, I., Keizer, I., Piñeyro, A., Harder, W., and Veenhuis, J. (1992). Studies on the effect of toxin T 514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiology Letter.* 91:207-212.

- 42.- Gill, M., Steglich, W. (1987). Pigments of fungi. Prog. Chem. Org. Nat. Prod., pp 151-163.
- 43.- Salazar-Aranda, Ricardo. (1997). Efecto de diversas antracenas diméricas sobre peroxisomas de *Candida boidinii*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UANL.
- 44.- Vargas Zapata, Rigoberto. (1998). Obtención y caracterización de células de levadura con disfunción peroxisomal inducida por la peroxisomicina A1. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, UANL.
- 45.- Microbiología (1977). Pelczar, M., Reid, R. y Chan, E. Mc Graw-Hill. pp. 271-287.
- 46.- Classification of Yeasts (1987). En Yeasts, Vol. 1, 2<sup>nd</sup> edition. Kreger-van Rij, N. J. W. Academic Press Inc. (London). pp. 5-61.
- 47.- De Duve, C., and Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). Physiol. Rev. 46:323-357.
- 48.- Kunau, W. H., Kionka, C., Ledebur, A. Mateblowski, M., Moreno de la Garza, M., Schultz-Borchard, U., Thieringer, R., and Veenhuis, M. (1987).  $\beta$ -oxidation systems in eukaryotic microorganisms. In Fahimi, H. D. and Sies, H. (Eds). Peroxisomes in Biology and Medicine. (pp. 128-140). Springer-Verlag. Berlin.
- 49.- The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Pringle, J., Broach, J. and Jones, E.
- 50.- Beevers (1982). In Pringle, J. R., Broach, J. R., and Jones, E. W. (Eds). The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. (pp. 548-551). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- 51.- Opperdoes, F. R., and Michels, P. A. (1993). The glycosomes of the kinetoplastida. Biochemie. 75 (3-4) 231-4.

- 52.- Sommer, J. M., and Wang, C. C., (1994). Targeting proteins to the glycosomes of African trypanosomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:105-38.
- 53.- Lazarow, P.B., and de Duve, C., (1976). A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hipolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73(6)2043-6.
- 54.- Reddy, M. K., Hollenberg, P. F., Reddy, J. K. (1980). Partial purification and immunoreactivity of an 80 000-molecular weight polypeptide associated with peroxisome proliferation in rat liver. *Biochem. J.* 188(3):731-40.
- 55.- Hazeu, W., De Bruijn, J. C., and Bos, P. (1972). Methanol assimilation by yeast. *Arch. Microbiol.* 87:185-188.
- 56.- Oki, T., Kouno, K., Kitai, A., and Ozaki, A. (1972). New yeasts capable of assimilating methanol. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18:295-305.
- 57.- Ogata, K., Nishikawa, H. , and Ohsugi, M. (1969). A yeast capable of utilizing methanol. *Agric. Biol. Chem.* 33:1519-1520.
- 58.- Roggenkamp, R., Sahn H., and Wagner, F. (1974). Microbial assimilation of methanol, induction and function of catalase in *Candida boidinii*. *FEBS Lett.* 41:283-286.
- 59.- 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.
- 60.- Goodman, J. M., Trapp, S., Hwang, H., and Veenhuis, M. (1990). Peroxisomes induced in *Candida boidinii* by methanol, oleic acid and D-alanine vary in metabolic function but share commun integral membrane proteins. *J. of Cell. Sci.* 97:193-204.

- 61.- Van Dijken, J. P., Veenhuis, M. and Harder, W. (1982). Peroxisomes of methanol-grown yeasts. *Annals New York Academy of Sciences*. 0077 8933/82/0386 0200 pp 200-216.
- 62.- Veenhuis, M., Keizer, I., and Harder, W. (1979). *Arch. Microbiol.* 120:167-175.
- 63.- Zwart, K. B., Overmars, E. H., and Harder, W. (1983). The role of peroxisomes in the metabolism of D-alanine in the yeast *Candida utilis*. *FEMS microbiol. Lett.* 19:225-231.
- 64.- Veenhuis, M., Mateblowski, M., Kunau, W-H., and Harder, W. (1987). Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 3:77-84.
- 65.- Kunau, W-H., Bühne, A., Moreno de la Garza, M., Kionka, C., Mateblowski, M., Schultz-Borchard, U., and Thieringer, R. (1988). Comparative enzymology of  $\beta$ -oxidation. *Biochem. Soc. Transact.* 16:418-420.
- 66.- Acosta, Ricardo. (1990). Efecto de la T-514 sobre tubulos contorneados proximales de conejo. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UANL.
- 67.- Segoviano Ramírez, Juan Carlos. Comunicación personal.
- 68.- Rozijn, Th. H., and Tonino, G. J. M. (1964). Studies on the yeast nucleus. I. The isolation of nuclei. *Biochim. Biophys. Acta.* 91:105-112.
- 69.- Citado en: H. U. Bergmeyer (ed), *Methoden der enzymatischen Analyse*, 3<sup>rd</sup>. ed., Weinheim.
- 70.- Schatz, G., and Klima, J. (1964). Triphosphopyridine nucleotide: citochrome c reductase of *S. cerevisiae*: A microsomal enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta.* 81:448-461.
- 71.- Aebi, H. (1974). En H. U. Bergmeyer (ed), *Methoden der enzymatischen Analyse*, 3<sup>rd</sup>. ed., Weinheim. 713-718.



- 72.- Tani, (1985). *Agric. Biol. Chem.* 49:2699-2706.
- 73.- Childs, R. E., and Bardsley, W. G. (1975). *Biochem. J.* 145:93-103.
- 74.- Hutchinson, W. C., and Munro, H. N. (1961). The determination of nucleic acids in biological materials. *Analyst.* 86:768-813.
- 75.- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72:249-255.
- 76.- Bozzola, J. J., Russell, L. D. (1992). *Electron Microscopy, Principles and techniques for biologists.* Jones and Bartlett publishers, pp 16-18, 25.
- 77.- Martínez, L. (1990). Estudio de las propiedades fisicoquímicas de toxinas aisladas de *K. humboldtiana*. Tesis de Maestría, Fac. de Med. UANL.
- 78.- Osorio, A. (2001). Obtención de la ecuación de velocidad de la descomposición de PA1 en presencia de IsoPA1. Tesis Doctoral, Fac. de Med. UANL.
- 79.- Darnell, J. Lodish, H. Baltimore, D. (1990). *Molecular Cell Biology*, 2<sup>nd</sup> ed. Scientific American Books, N. Y., USA.
- 80.- Klionsky, D. J. (1997). Protein transport from the cytoplasm into the vacuole. *J. Membr. Biol.* 157:105-115.
- 81.- Tuttle, D. L., and Dunn, W. A. Jr. (1995). Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Cell Sci.* 108:25-35.
- 82.- Yuan, W., Tuttle, D. L., Shi, Y. J. Ralph, G. S. and Dunn, W. A. Jr. (1997). Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the  $\alpha$ -subunit of phosphofructokinase. *J. Cell Sci.* 110:1935-1945.

- 83.- Titorenko, W. I., Keizer, I., Harder, W., and Veenhuis, M. (1995). Isolation and characterization of mutants impaired in the selective degradation of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Bacteriol.* 177:357-363.
- 84.- Hutchins, M. U., Veenhuis, M., and Kliensky, D. J. (1999). Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J. Cell Sci.* 112:4079-4087.
- 85.- Novikoff, A., Shin, W. Y., (1964). The Endoplasmatic Reticulum in the Golgi zone and its relation to microbodies, Golgi apparatus and autophagic Vacuoles in rat liver cells. *J. Microsc.* 3;187-206.
- 86.- Lazarow, P. B., and Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1: 489-530.
- 87.- Titorenko, V.I., Ogrydziak, D.M., Rachubinski, R.A., (1997). Four distinct secretory pathways serve protein secretion, cell surface growth, and peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Cell. Biol.* 17:5210-5226.

## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

**Ricardo Salazar Aranda**

**Candidato para el Grado de**

**Doctor en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica**

**Título de la Tesis:** Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre dos especies de levaduras: *Candida boidinii* y *Saccharomyces cerevisiae*.

**Area de Estudio:** Química Biomédica

### **Biografía:**

**Datos Personales.** Lugar y Fecha de Nacimiento: 6 de Septiembre de 1968 en Montemorelos, N. L., México. Padres: Lucio Salazar Urbina y Emma Aranda Rangel. Estado civil: Soltero.

**Escolaridad.** Químico Clínico Biólogo por la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad de Montemorelos en 1993. Maestría en Ciencias con Especialidad en Química Analítica Biomédica por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 1997.

**Experiencia Profesional.** Químico del Laboratorio Clínico del Hospital Montemorelos "La Carlota", Montemorelos, N. L. (1988 a 1992). Químico del Laboratorio Clínico del Hospital General de Galeana, Galeana N. L. (1992 a 1993). Químico del área de Microbiología del Centro de Calidad Sanitaria, San Nicolás de los Garza, N. L. (1993 a 1994). Químico del Banco de Sangre del Hospital San Vicente, Monterrey, N. L. (1993 a 1995). Maestría en Ciencias con Especialidad en Química Analítica Biomédica con la Tesis "Efecto *in vivo* de diversas antracenonas diméricas sobre los peroxisomas de *C. boidinii*", Facultad de Medicina de la UANL (1994 a 1997). Asistencia y presentación de trabajos de investigación en 13 congresos nacionales e internacionales desde 1998 a la fecha. Premio como segundo lugar en el XV Congreso Nacional de Investigación Biomédica en el área básica organizado por la Facultad de Medicina, UANL en 1997. Premio a la Mejor Tesis de Maestría en el área de la Salud otorgado por la Universidad Autónoma de Nuevo León en 1997. Reconocimiento al Mejor Estudiante del Doctorado en Ciencias con especialidad en Química Biomédica por la Facultad de Medicina, UANL en 1999. Miembro de la Sociedad Química de México sección Nuevo León desde 1996. Personal Profesional No Docente del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina, UANL desde el año 2000, con funciones de docencia en la materia de Análisis Instrumental y de investigación en la línea de estudios sobre el mecanismo de acción de peroxisomicina A1 en levaduras.



