

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1
SOBRE LA PROLIFERACION DE PEROXISOMAS
Y EL IMPORTE DE PROTEINAS DE LA MATRIZ
PEROXISOMAL A TIEMPOS DE EXPOSICION
BREVES EN *Candida boidinii*

POR:

Marta Graciela Ortega Martínez

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en Morfología

Septiembre 2002

Marta Graciela Ortega Martínez

TD
QH603
.P47
O7
c.1



1080089552

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE PEROXISOMAS Y EL IMPORTE DE PROTEINAS DE LA MATRIZ PEROXISOMAL A TIEMPOS DE EXPOSICIÓN BREVES EN *Candida boidinii*

Aprobación de la Tesis:



[Handwritten signature]

DR. JUAN MANUEL SOLÍS SOTO

[Handwritten signature]

DR. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ
Comisión de Tesis

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1
SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE PEROXISOMAS
Y EL IMPORTE DE PROTEINAS DE LA MATRIZ
PEROXISOMAL A TIEMPOS DE EXPOSICION
BREVES EN *Candida boidinii*

[Handwritten signature]

DR. JUAN MANUEL SOLÍS SOTO
Comisión de Tesis

POR:

Marta Graciela Ortega Martínez

[Handwritten signature]

DR. ROSBERTO VARGAS ZAPATA
Comisión de Tesis

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en Morfología

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector

de Investigación y Estudios de Posgrado

Septiembre 2002



PA 603

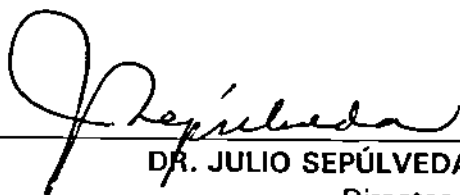
.P47

07



ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE PEROXISOMAS Y EL IMPORTE DE PROTEINAS DE LA MATRIZ PEROXISOMAL A TIEMPOS DE EXPOSICIÓN BREVES EN *Candida boidinii*

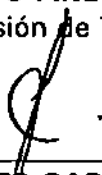
Aprobación de la Tesis:



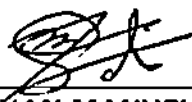
DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Director



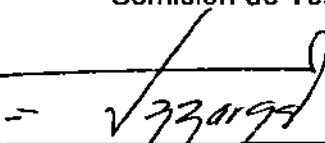
DR. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ
Comisión de Tesis



DRA. LOURDES GARZA OCAÑAS
Comisión de Tesis



DR. JUAN MANUEL SOLIS SOTO
Comisión de Tesis



DR. RIGOBERTO VARGAS ZAPATA
Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE LA
PROLIFERACIÓN DE PEROXISOMAS Y EL IMPORTE DE PROTEINAS
DE LA MATRIZ PEROXISOMAL A TIEMPOS DE EXPOSICION
BREVES EN *Candida boidinii***

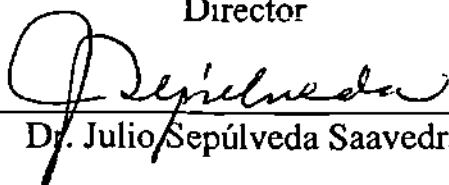
Presentado por:

Marta Graciela Ortega Martínez

Este trabajo se realizó en los Departamentos de Histología y de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y la codirección de la Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda.

FIRMAS

Director



Dr. Julio Sepúlveda Saavedra

Codirector



Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda

DEDICATORIA

A DIOS, por guiar mis pasos.

A mis queridos Padres: Ginés y Graciela, por trazarme con su ejemplo un camino de amor, honestidad y rectitud. Los amo.

A mis segundas Madres: Beatriz y mi inolvidable tía Alicia. Gracias por dedicarme cada día de sus vidas.

A mi hermana María Elena, por haberme dado el regalo más hermoso.

A mi regalo más hermoso: los pequeños Ginés y Ernesto, mi diaria motivación.

A Gil, por privilegiarme con su amor.

A la memoria de quienes amo.

Tita:

No te fuiste, porque permaneces en los corazones de los que te amamos. Este trabajo va por ti.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y a la Doctora Myrthala Moreno Sepúlveda, por haberme admitido en su grupo de trabajo. Gracias por sus invaluable enseñanzas.

Al Dr. Alfredo Piñeyro López por todo el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

A la Comisión de Tesis, por sus acertados comentarios.

Al Personal de los siguientes Departamentos, que contribuyeron de alguna manera en la realización de esta Tesis:

Depto. de Histología, Facultad de Medicina, U.A.N.L.

Depto. de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, U.A.N.L.

Depto. de Microbiología, Facultad de Medicina, U.A.N.L.

A la Subdirección de Estudios de Postgrado de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. por los apoyos recibidos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada.

EL EXITO NO ES CUESTION DE SABIDURIA O DE ASTUCIA
SINO DE HONRADEZ Y CONFIANZA
LA MORAL NO PUEDE SER SUBSTITUIDA POR EL ENTENDIMIENTO

Albert Einsten

TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo | Página |
|---|--------|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 El género <i>Karwinskia</i> y sus compuestos tóxicos. | 1 |
| 1.2 Actividad biológica de los compuestos tóxicos de <i>Karwinskia</i> | 2 |
| 1.3 Peroxisomas | 5 |
| 1.3.1. Generalidades | 5 |
| 1.3.2. Biogénesis peroxisomal | 6 |
| 1.3.3. Proliferación peroxisomal | 7 |
| 1.3.4. Importe de proteínas hacia los peroxisomas | 10 |
| 1.4 Las levaduras como modelo para el estudio de la función y biogénesis peroxisomal | 11 |
| 1.5 Estudios previos del efecto de la T514 sobre los peroxisomas de levaduras metilotróficas | 12 |
| 1.6 Estudios previos del efecto de la PA1 sobre la actividad de enzimas peroxisomales | 18 |
| 1.7 Justificación | 20 |
| 2. Hipótesis, Objetivo general y Objetivos específicos | 22 |
| 2.1 Hipótesis | 22 |
| 2.2 Objetivo general | 22 |
| 2.3 Objetivos específicos | 23 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3. | Material y Métodos | 25 |
| 3.1 | Material | 25 |
| 3.1.1. | Reactivos | 25 |
| 3.1.2. | Material biológico | 25 |
| 3.1.3. | Compuesto antracénico | 26 |
| 3.1.4. | Equipo | 27 |
| 3.2 | Métodos | 28 |
| 3.2.1 | Determinación del tiempo de generación de <i>C. boidinii</i> en medio con metanol en ausencia y presencia de PA1 | 28 |
| 3.2.2 | Determinación del tiempo de generación de <i>C. boidinii</i> en medio con metanol fresco | 31 |
| 3.2.3 | Evaluación de la proliferación y daño peroxisomal. | 32 |
| 3.2.4 | Análisis inmunocitoquímico de las proteínas de matriz peroxisomal DHAS y AOX | 34 |
| 3.2.5 | Análisis de la actividad enzimática de la AOX en las fracciones peroxisomal y citosólica | 36 |
| 4. | Resultados | 40 |
| 4.1 | Tiempo de generación de <i>C. boidinii</i> en medio con metanol en presencia y ausencia de PA1 | 40 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4.2 | Tiempo de generación de <i>C. boidinii</i> proveniente de los cultivos anteriores en medio con metanol fresco | 42 |
| 4.3 | Proliferación y daño peroxisomal | 43 |
| 4.4 | Análisis inmunocitoquímico de las proteínas de matriz peroxisomal DHAS y AOX | 49 |
| 4.5 | Actividad enzimática de AOX en las fracciones peroxisomal y citosólica | 51 |
| 5. | Discusión | 55 |
| 6. | Conclusiones y Perspectivas | 67 |
| 6.1 | Conclusiones | 67 |
| 6.2 | Perspectivas | 69 |
| | Bibliografía | 70 |
| | Apéndice | 82 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|--|---------------|
| 1. Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteínas totales | 99 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|---------------|
| 1. Modelo integrado de la biogénesis peroxisomal | 8 |
| 2. Inducción de la proliferación de peroxisomas en <i>C. boidinii</i> | 13 |
| 3. Efecto de la T514 sobre la membrana peroxisomal de levaduras metilotróficas | 15 |
| 4. Presencia de agregados citosólicos en levaduras metilotróficas tratadas con T514 | 16 |
| 5. Peroxisomicina A1 (PA1). | 17 |
| 6. Curvas de crecimiento de <i>C. boidinii</i> en medio con metanol en ausencia y presencia de PA1 | 41 |
| 7. Primera generación de <i>C. boidinii</i> cultivada en medio con metanol en presencia y ausencia de PA1 | 44 |
| 8. Tercera generación de <i>C. boidinii</i> cultivada en medio con metanol en presencia y ausencia de PA1 | 45 |
| 9. <i>C. boidinii</i> cultivada en medio con metanol fresco en presencia y ausencia de PA1 | 47 |

| | | |
|-----|---|----|
| 10. | Inmunocitoquímica de <i>C. boidinii</i> cultivada en medio fresco con metanol | 48 |
| 11. | Morfología de células de <i>C. boidinii</i> expuestas entre 5 y 30 min. a 2 µg/mL de PA1 | 50 |
| 12. | Demstración inmunocitoquímica de enzimas peroxisomales en <i>C. boidinii</i> expuestas entre 5 y 30 min. a 2 µg/mL de PA1 | 53 |
| 13. | Porcentajes de actividad específica de AOX de <i>C. boidinii</i> cultivada en presencia de 2 µg/mL de PA1 durante 15 min. | 54 |
| 14. | Degradación peroxisomal | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

| | |
|-----------------|--|
| ABTS | 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotioazolina-6-ácido sulfónico) |
| AOX | Alcohol oxidasa |
| ATCC | American Type Colection Culture |
| b | Espesor de cubeta |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| C. | <i>Candida</i> |
| C | Carboxilo terminal |
| cm | Centímetro |
| cm ² | Centímetro cuadrado |
| cm ³ | Centímetro cúbico |
| CoA | Coenzima A |
| Colo. | Colaboradores |
| D | Cociente de 1/ε |
| dest. | Destilada |
| DHAS | Dihidroxiacetona sintasa |
| DNA | Acido desoxiribonucléico |
| DO | Densidad óptica |
| DTE | Difioeritol |
| ec'n | Ecuación |
| F | Factor |
| Fig. | Figura |

| | |
|------|--|
| g | gramos |
| G | Tiempo de generación |
| x g | Veces la fuerza de gravedad |
| H. | <i>Hansenula</i> |
| HRP | Peroxidasa de castor |
| hrs. | Horas |
| K. | <i>Karwinskia</i> |
| L | Litro |
| Lo | Número de levaduras en el tiempo cero |
| If | Número de levaduras al final de un periodo |
| Log. | Logaritmo base 10 |
| M | Molar |
| MES | Acido 2-N morfolin etansulfónico |
| mesh | Número de cuadrantes |
| mg | Miligramo |
| min. | Minutos |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| MMM | Medjo minimo con metanol |
| n | Tamaño de la muestra |
| nm | Nanómetro |
| nt | Número de generaciones |
| PA1 | Peroxisomicina A1 |
| PBS | Amortiguador de fosfatos |

| | |
|--------------------|--|
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PMP | Proteína de membrana peroxisomal |
| PMSF | Fosfil-metil-sulfonil-fluoruro |
| PTS | Señal de dirección peroxisomal |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| seg. | Segundo |
| Sol. | Solución |
| t | Tiempo |
| T | Toxina |
| U | Unidades de actividad enzimática |
| YPD | Medio con extracto de levadura, peptona y dextrosa |
| ΔA | Cambio de absorbancia |
| ΔC | Cambio de concentración |
| ε | Coefficiente de absortividad molar |
| μg | Microgramo |
| μL | Microlitro |
| μm | Micrómetro |
| μmol | Micromol |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grados celsius |
| \leq | Menor que |
| % | Porcentaje |

RESUMEN

Marta Graciela Ortega Martínez

Fecha de Graduación: Septiembre del 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LOS PEROXISOMAS Y EL IMPORTE DE PROTEÍNAS DE MATRIZ PEROXISOMAL A TIEMPOS DE EXPOSICIÓN BREVES EN *Candida boidinii*.

Número de Páginas: 117

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Morfología

Area de estudio: Morfología

Propósito y Método de Estudio: Previamente se ha demostrado que la Peroxisomicina A1 (PA1) , una toxina aislada de las plantas del género *Karwinskia*, causa ruptura de la membrana peroxisomal en levaduras metilotróficas. El objetivo general de este trabajo fue analizar el efecto de la PA1 a una concentración no letal de 2 µg/mL sobre la proliferación de los peroxisomas y el importe de proteínas de matriz peroxisomal a tiempos de exposición breves en *Candida boidinii*. Para esto se realizaron cultivos de *C. boidinii* en presencia y ausencia de PA1. A partir de estos cultivos se determinó el tiempo de generación de la levadura, se evaluó su ultraestructura, la presencia y localización de las enzimas de matriz peroxisomal y la actividad de la alcohol oxidasa en las fracciones celulares aisladas de esta levadura.

Conclusiones y Contribuciones: La PA1 a una dosis no letal no afecta la proliferación peroxisomal en las generaciones analizadas de *C. boidinii* no expuestas a PA1 pero provenientes de un cultivo inicial expuesto a este compuesto. Sin embargo, estas células presentan daño peroxisomal. La PA1 a la concentración utilizada causa degradación peroxisomal tanto en células de *C. boidinii* directamente expuestas a este compuesto, como en las generaciones provenientes de estas células. La PA1 a la concentración utilizada no afecta el importe de proteínas de matriz peroxisomal a tiempos de exposición breves de *C. boidinii* a este compuesto. Los resultados de este trabajo contribuyen al aumento del conocimiento sobre el mecanismo de acción de PA1.

CAPITULO UNO

INTRODUCCION

1.1 El género *Karwinskia* y sus compuestos tóxicos.

El género *Karwinskia* pertenece a la familia Rhamnaceae. Está constituido básicamente por arbustos y árboles pequeños, los cuales se encuentran tanto en zonas tropicales como en áreas desérticas. Este género incluye cerca de 15 especies que se han encontrado desde Texas, E.U.A. hasta Colombia (1, 2). La especie más común en México es *Karwinskia humboldtiana*, cuyo fruto produce cuando se ingiere, una polineuropatía progresiva en animales y el hombre (3).

Dreyer y cols. aislaron y caracterizaron de las semillas de los frutos de esta planta cuatro antracenas diméricas responsables de sus propiedades tóxicas, las cuales, de acuerdo a su peso molecular, fueron denominadas T496, T514, T516 y T544. Estas toxinas son compuestos químicos cuya estructura consiste de dos monómeros,

cada uno constituido por tres anillos bencénicos fusionados (antraceno), con un grupo cetónico como sustituyente (4).

1.2 Actividad biológica de los compuestos tóxicos de *Karwinskia*.

Desde el año de 1981, en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se inició una línea de investigación con el propósito de estudiar la actividad biológica de los compuestos antracénicos aislados de las plantas del género *Karwinskia*. Inicialmente, el método de extracción de las toxinas a partir del fruto, descrito por Dreyer y cols., fue simplificado y optimizado por Guerrero y cols. (5).

Waskman y cols. realizaron un análisis químico y toxicológico de algunas especies del género *Karwinskia*. Los resultados de estos estudios demostraron que todas las plantas analizadas son tóxicas y su toxicidad recuerda cualitativamente a la intoxicación aguda con *K. humboldtiana*, aunque hay diferencias cuantitativas. Todas las

especies analizadas se caracterizaron por la presencia de compuestos antracénicos, los cuales son las sustancias responsables de la toxicidad en *K. humboldtiana* (6).

Bermúdez y cols. demostraron que la T544 es responsable del efecto neurológico observado en la intoxicación, mientras que la T514 causa daño severo al pulmón, riñón e hígado, induciendo en este último depósitos intracelulares de grasa y necrosis. La T496 solamente produce diarrea cuando se administra oralmente a animales (3).

Después de estos estudios, en los cuales se demostró la hepatotoxicidad de las toxinas *in vivo*, Garza y cols. evaluaron y compararon la citotoxicidad *in vitro* en cultivos primarios de hepatocitos de rata y queratinocitos. Respecto a la T514 los resultados coincidieron con lo observado *in vivo*, demostrándose además que la T514 causa mayor toxicidad hepática que la T544 *in vitro* (7).

Piñeyro y cols. demostraron por primera vez que la T514 exhibe toxicidad selectiva sobre líneas celulares de origen neoplásico, por lo que propusieron el uso de esta toxina como agente antineoplásico (8). Debido a lo anterior, se solicitó una patente para su uso, la cual fue otorgada primero por la Comunidad Económica Europea (9) y recientemente por los Estados Unidos de Norteamérica (10) y Japón (11).

Debido a que el mecanismo de acción de la toxicidad selectiva de la T514 aún se desconoce, en los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios bioquímicos y morfológicos con el propósito de obtener información acerca del mismo. Estudios morfológicos realizados por Sepúlveda y cols., demostraron que uno de los efectos observados durante la intoxicación experimental con T514 en monos y ratas es una marcada disminución en el número de peroxisomas presentes en hepatocitos (12). Estos resultados sugirieron que el peroxisoma es el organelo blanco de la T514.

1.3 Peroxisomas.

1.3.1 Generalidades.

Los peroxisomas son organelos presentes en todas las células eucarióticas. Se caracterizan por tener una morfología relativamente simple. Contienen una matriz proteínica rodeada por una sola membrana. Llevan a cabo diversas funciones metabólicas dependiendo del tipo celular. Entre las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo en los peroxisomas se encuentra el metabolismo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es degradado por la catalasa, considerada como una enzima marcadora peroxisomal (13).

La importancia del peroxisoma para el humano fue demostrada a principios de los años 70, cuando se describió por primera vez un nuevo grupo de enfermedades hereditarias de tipo neurológico de pronóstico letal, las cuales se caracterizan por una función peroxisomal deficiente, debido en algunos casos a la ausencia o

disminución del organelo mismo y en otros casos debido a la función deficiente de una o varias enzimas peroxisomales. A estos trastornos hereditarios se les ha llamado "Enfermedades peroxisomales" y entre ellas se incluyen el síndrome de Zellweger y la Adrenoleucodistrofia (14).

1.3.2 Biogénesis peroxisomal.

El primer modelo de biogénesis peroxisomal establecía que dichos organelos se originaban mediante gemación del retículo endoplásmico (15). Posteriormente, Lazarow y Fujiki después de extensos estudios, establecieron que las proteínas de membrana y de matriz del peroxisoma se sintetizan en los polirribosomas libres y son integradas postraduccionalmente a los peroxisomas preexistentes, los cuales crecen y por fisión forman nuevos peroxisomas (16).

El modelo actual que describe la biogénesis de los peroxisomas, integra en cierta forma los dos modelos anteriores. Ahora se acepta

que algunas proteínas peroxisomales, principalmente de membrana (peroxinas), son transportadas al peroxisoma a través de vesículas originadas del retículo endoplásmico. Otras proteínas de membrana y las de la matriz se importan postraduccionalmente al peroxisoma, o bien incorporándose en las vesículas provenientes del retículo endoplásmico. El último paso de este modelo integrado consiste en que los peroxisomas se originan de organelos preexistentes, tal como se propuso en el modelo de crecimiento y división de Lazarow y Fujiki (Fig. 1). La existencia de una vía mediada por vesículas del retículo endoplásmico a los peroxisomas, abre la posibilidad de que estos organelos puedan asimismo originarse *de novo* (17).

1.3.3 Proliferación peroxisomal.

Existe un modelo propuesto por Veenhuis y cols. (18) que describe la proliferación de los peroxisomas en *C. boidinii*.

La mayoría de las células de *C. boidinii* cultivadas en glucosa poseen de 2 a 5 peroxisomas, redondos o irregulares, de 0.1 a 0.2 μm

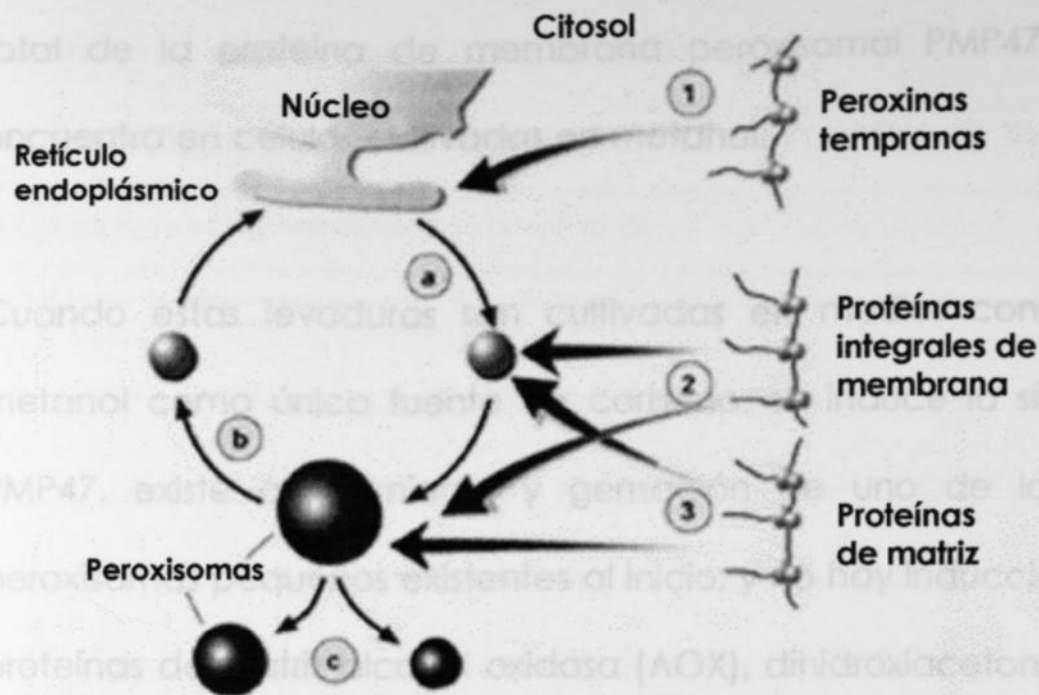


Figura 1. Modelo integrado de la biogénesis peroxisomal.

Además de las rutas de transporte del citosol a los peroxisomas de proteínas de membrana (2) y matriz (3) peroxisomales, una subclase de proteínas de membrana peroxisomal podrían ser dirigidas a los peroxisomas a través del retículo endoplásmico (1). El transporte anterogrado mediado por vesículas de "peroxinas tempranas" del retículo endoplásmico a los peroxisomas (a) y el transporte retrogrado mediado por vesículas de los peroxisomas al retículo endoplásmico (b), podrían ser características nuevas de la biogénesis peroxisomal que habría que agregar al modelo original de crecimiento y división. (Kunau, W-H. and Erdmann, R. 1998. *Curr Biol.* 8:R299-R302).

valor máximo, y posterior a este punto hay una disminución en el

de diámetro, los cuales carecen de inclusiones cristalinas y se encuentran distribuidos al azar en la célula. Existe sólo el 0.5% del total de la proteína de membrana peroxisomal PMP47 que se encuentra en células cultivadas en metanol.

Cuando estas levaduras son cultivadas en medios conteniendo metanol como única fuente de carbono, se induce la síntesis de PMP47, existe alargamiento y gemación de uno de los pocos peroxisomas pequeños existentes al inicio, y no hay inducción de las proteínas de matriz alcohol oxidasa (AOX), dihidroxiacetona sintasa (DHAS) o la proteína de membrana peroxisomal PMP20.

A las 2.5 horas de inducción con metanol se inicia la proliferación del organelo. El número de peroxisomas se incrementa y aumenta la concentración de PMP47. En el periodo de proliferación tardía se inducen bajos niveles de proteínas de matriz AOX, DHAS y la PMP20.

Después de 2.5 horas el número de peroxisomas ha alcanzado un valor máximo, y posterior a este punto hay una disminución en el

número de peroxisomas causado por el movimiento de estos hacia las yemas durante el proceso de gemación de las levaduras. El volumen de cada peroxisoma rápidamente se incrementa como resultado del importe de varias proteínas de matriz y de membrana o de la fusión de vesículas precursoras.

Estos datos indican que la proliferación peroxisomal en la primera etapa no es debida al importe de proteínas de matriz. Es probable que la expansión de la membrana peroxisomal, acompañada por el ensamble de proteínas de membrana como PMP47, es un evento primario en el desarrollo peroxisomal.

1.3.4 Importe de proteínas hacia los peroxisomas.

A diferencia de las mitocondrias, los peroxisomas carecen de DNA, por lo que las proteínas de membrana y matriz peroxisomal son codificadas por genes nucleares (19).

De acuerdo al modelo aceptado de la biogénesis peroxisomal, se predice la existencia de señales de dirección peroxisomal y de una maquinaria molecular que reconocería dichas señales. PTS-1 es un tripéptido C terminal conservado que se encuentra en numerosas proteínas de matriz peroxisomal. PTS-2 es una secuencia de once aminoácidos que sólo se ha identificado en la proteína de matriz peroxisomal 3-cetoacil CoA tiolasa (13, 20). A la fecha se han caracterizado los receptores Pex5p y Pex7p, los cuales reconocen PTS-1 o PTS-2, respectivamente. Por otra parte, se ha identificado una señal de dirección peroxisomal para proteínas de membrana, aunque no se ha caracterizado en detalle (17).

1.4 Las levaduras como modelo para el estudio de la función y biogénesis peroxisomal.

Las levaduras representan un modelo muy adecuado para el estudio de la función y biogénesis peroxisomal, ya que en ellas se puede inducir la proliferación de peroxisomas al manipular las condiciones de cultivo (21).

El cultivo en medio con metanol como única fuente de carbono da como resultado la inducción de la proliferación de los peroxisomas (Fig. 2). Estos organelos contienen en su matriz enzimas que catalizan las reacciones iniciales del metabolismo del metanol: la AOX, la DHAS y la catalasa. Tal es el caso de las levaduras metilotróficas como *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha* y *Pichia pastoris* (22-25).

1.5 Estudios previos del efecto de la T514 sobre los peroxisomas de levaduras metilotróficas.

Con el propósito de investigar si realmente el peroxisoma constituye el organelo blanco de la T514, Sepúlveda y cols. (26) realizaron estudios *in vivo* con las levaduras *H. polymorpha* y *C. boidinii* cultivadas en medio con metanol como única fuente de carbono y expuestas a diferentes concentraciones de la toxina. Los experimentos indicaron un efecto dosis-respuesta, a los 10 minutos a una dosis de 50 µg/mL se observó un daño generalizado a las células, lo que dio como resultado la muerte de las levaduras.

En presencia de una concentración no letal de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el desarrollo de los cultivos cesó inicialmente, pero se restableció en un periodo de 4 hrs.

membrana... fragmentación de la... del contenido... medio de... alcohol oxidasa... y proteína...

Asimismo... en donde se... detectó la... citocitoquímica

(Fig. 4). El daño peroxisomal fue irreversible, ya que los organelos afectados fueron degradados en la vacuola autofágica.

Figura 2. Inducción de la proliferación de peroxisomas en *C. boidinii*. El cultivo de las levaduras metilotróficas en medio con metanol como única fuente de carbono da como resultado la inducción de los peroxisomas. Estos organelos contienen en su matriz enzimas que catalizan las reacciones iniciales del metabolismo del metanol. (Veenhuis, M. and Harder, W. 1982. Annals New York Academy of Sciences. pp: 201-213).

En presencia de una concentración no letal de 2 µg/mL el desarrollo de los cultivos cesó inicialmente, pero se restableció en un periodo de 4 hrs. A nivel subcelular se observó fragmentación de la membrana peroxisomal, lo que condujo a la salida del contenido enzimático (Fig. 3). Esto se demostró por medio de inmunocitoquímica con anticuerpos específicos anti-alcohol oxidasa y proteína A marcada con oro coloidal.

Asimismo, se observaron agregados citosólicos, en donde se detectó la presencia de la AOX y la DHAS por inmunocitoquímica (Fig. 4). El daño peroxisomal fue irreversible, ya que los organelos afectados fueron degradados en la vacuola autofágica.

Debido a estos hallazgos que demostraron el efecto de la T514 sobre los peroxisomas de levaduras se ha renombrado a la T514 como Peroxisomicina A1 (PA1) (Fig. 5).

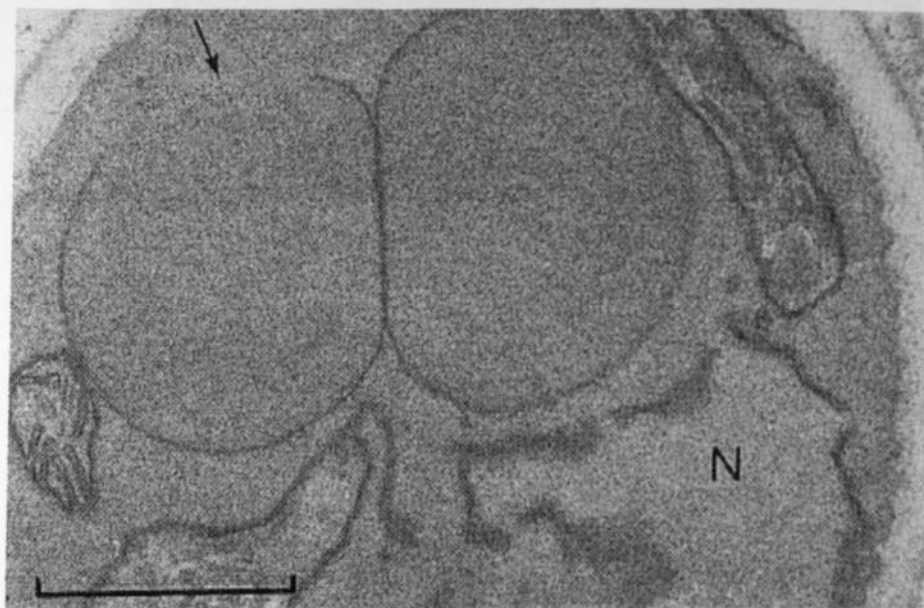


Figura 3. Efecto de la T514 sobre la membrana peroxisomal de levaduras metilotróficas. Cuando las levaduras metilotróficas son tratadas con una dosis no letal de T514, se observa a nivel subcelular fragmentación de la membrana peroxisomal (flecha). (Sepúlveda Saavedra, J., Van der Klei, I., Keizer, I., Piñeyro López, A., Harder, W. and Veenhuis, M. 1992. FEMS Microbiol Lett. 91:207-212).

cuales carecen de membrana (flechas). (Cortesía del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra)

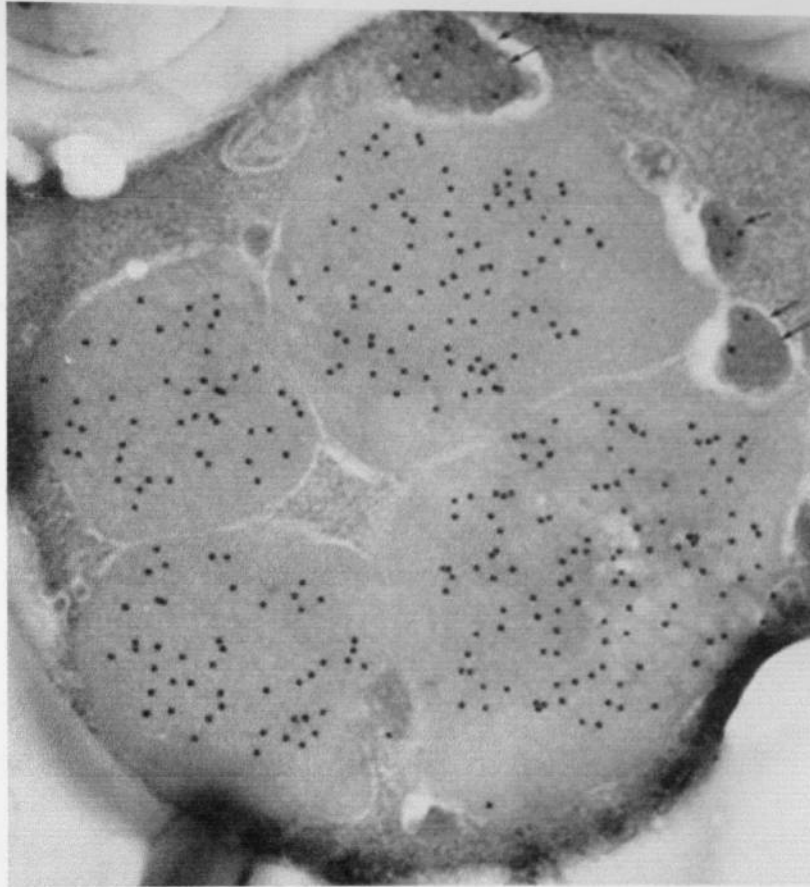


Figura 4. Presencia de agregados citosólicos en levaduras metilotróficas tratadas con T514. Cuando las levaduras metilotróficas son tratadas con una dosis no letal de T514, se observa la presencia de agregados citosólicos con una electrodensidad similar a la de la matriz peroxisomal, los cuales carecen de membrana (flechas). (Cortesía del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra)

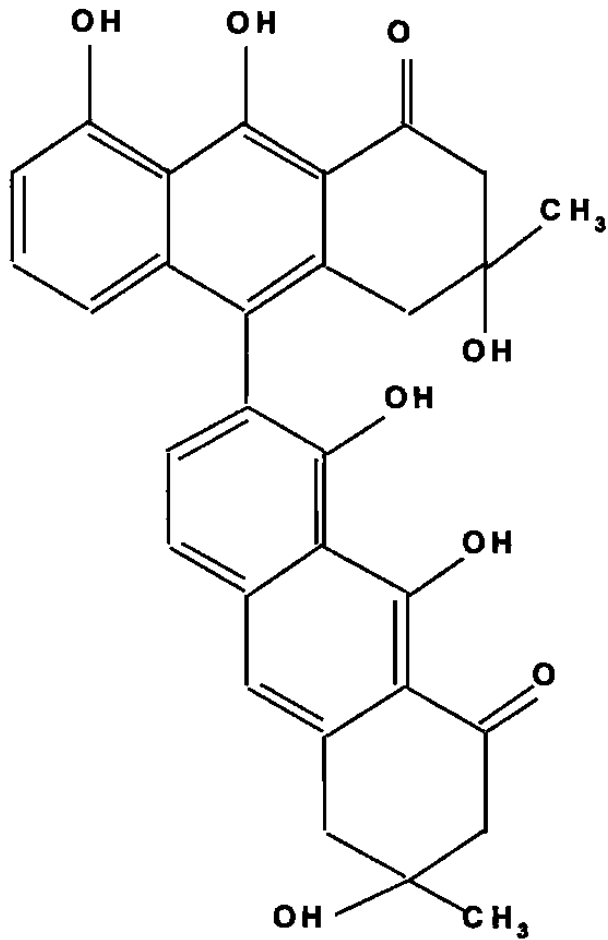


Figura 5. Peroxisomicina A1 (PA1). Químicamente la PA1 es una antracena dimérica. La estructura general de estos compuestos consiste en dos monómeros, cada uno constituido por tres anillos bencénicos fusionados (antraceno), con un grupo cetónico como sustituyente.

1.6 Estudios previos del efecto de la PA1 sobre la actividad de enzimas peroxisomales.

Sepúlveda y cols. (26) demostraron que la PA1 no afecta la actividad de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa en las levaduras metilotróficas *H. polymorpha* y *C. boidinii* *in vivo*.

Considerando el efecto de la PA1 sobre los peroxisomas de levaduras, Moreno y cols. (27) investigaron el efecto *in vitro* de este compuesto y de otras antracenonas diméricas de origen natural sobre la actividad de la catalasa hepática, con enzima purificada (obtenida comercialmente). Los resultados demostraron que la PA1 produce inhibición no competitiva, con respecto al peróxido de hidrógeno, de la catalasa hepática bovina, de perro y de ratón. Los otros compuestos antracénónicos inhiben la actividad de la catalasa bovina, estableciéndose una relación entre la estructura química y grado de inhibición de los compuestos analizados.

Posteriormente, se estudió el efecto de la PA1 sobre la actividad de la catalasa hepática de ratón albino, tanto en cortes de tejido hepático incubados con PA1 (*in situ*) como en cortes de tejido y fracciones hepáticas provenientes de ratones intoxicados con este compuesto (*in vivo*). Los resultados de los estudios bioquímicos e histoquímicos demostraron que la PA1 no inhibe la actividad de la catalasa *in situ* ni *in vivo* (28).

Estos hallazgos indican que la catalasa no parece estar involucrada en el mecanismo que conduce al daño peroxisomal y su actividad no resulta afectada como consecuencia de éste.

Salazar (29) investigó el efecto de la PA1, sus isómeros (isoperoxisomicina A1 y peroxisomicina A2) y la T544 sobre los peroxisomas de *C. boidinii*. Demostró que el daño peroxisomal no es exclusivo de la PA1, además que ninguno de los compuestos afecta la actividad de la catalasa *in vivo*.

1.7 Justificación.

Hasta ahora los estudios con levaduras en los cuales se ha evaluado el efecto de la PA1 sobre los peroxisomas se han realizado exponiendo a estas células a la toxina en la fase media exponencial de desarrollo en medio con metanol como sustrato inductor, donde ya hubo proliferación de peroxisomas. En este trabajo se evaluó por primera vez si la capacidad de proliferación de los peroxisomas es afectada por la toxina inmediatamente después de transferir las células a un medio inductor de la proliferación peroxisomal como el metanol.

Por otra parte, en células de *C. boidinii* expuestas a PA1, se ha observado la presencia de agregados citosólicos electrodensos donde se ha demostrado la presencia de enzimas de matriz peroxisomal. La duda principal que permanece es si estos acúmulos se deben a un bloqueo en el importe de estas proteínas hacia los peroxisomas o si la presencia de estas proteínas en el citosol corresponde a la salida de las mismas de los peroxisomas tras la

ruptura de la membrana peroxisomal. La respuesta a estas preguntas contribuirá con mayor información en relación al mecanismo de acción de la PA1.

CAPITULO 2

HIPOTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.1 HIPOTESIS

La Peroxisomicina A1 afecta la proliferación de los peroxisomas e impide el importe de proteínas de la matriz peroxisomal a tiempos de exposición breves en *Candida boidinii*.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la Peroxisomicina A1 a una concentración no letal de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre la proliferación de los peroxisomas y el importe de proteínas de la matriz peroxisomal a tiempos de exposición breves en *Candida boidinii* .

2.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Para evaluar el efecto de la Peroxisomicina A1 (PA1) sobre la proliferación de peroxisomas en *Candida boidinii* :

- 1) Determinar el tiempo de generación de la levadura metilotrónica *C. boidinii* en un medio con metanol en presencia y ausencia de PA1.

- 2) Determinar el tiempo de generación de la levadura metilotrónica *C. boidinii* proveniente de los cultivos anteriores en un medio con metanol fresco.

- 3) Observar si ocurre la proliferación de los peroxisomas y si existe o no daño peroxisomal.

Para evaluar el efecto de la PA1 sobre el importe de proteínas de la matriz peroxisomal a tiempos de exposición breves en *Candida boidinii*:

4) Analizar la presencia y localización de las proteínas de matriz peroxisomal dihidroxiacetona sintasa y alcohol oxidasa en *C. boidinii* cultivada en medio con metanol en presencia y ausencia de PA1.

5) Analizar la actividad enzimática de la alcohol oxidasa en las fracciones peroxisomal y citosólica aisladas de *C. boidinii* cultivada en medio con metanol en presencia y ausencia de PA1.

CAPITULO TRES

MATERIAL Y METODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reactivos.

Se utilizaron productos químicos obtenidos de las compañías comerciales Productos Químicos Monterrey, Merck, Sigma, Difco, Biorad, ICN y Pelco.

3.1.2 Material biológico.

Células de la levadura metilotrófica *Candida boidinii* cepa ATCC 32195.

Anticuerpos monoclonales de conejo anti-alcohol oxidasa y anti-dihidroxiacetona sintasa proporcionados por el Prof. Dr. Joel M. Goodman.

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

3.1.3 Compuesto antracénico.

La Peroxisomicina A1 (PA1), lote No. 74, se aisló y purificó en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La PA1 se sometió a todas las pruebas fisicoquímicas y biológicas de control de calidad. Se almacenó a -20°C , protegida de la luz y la humedad.

3.1.4 Equipo.

Incubadora estática Riossa.

Incubadora con agitador mecánico Lab-line.

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

Ultracentrífuga Beckman, modelo L8-M.

Ultramicrotomo RMC, modelo MTX.

Fotomicroscopio Carl-Zeiss.

Microscopio Electrónico de Transmisión Carl-Zeiss, modelo EM 109.

3.2 METODOS

3.2.1 Determinación del tiempo de generación de *C. boidinii* en medio con metanol en ausencia y presencia de PA1.

Se inoculó una colonia de *C. boidinii*, en un medio con glucosa al 2% (ver apéndice) como única fuente de carbono para llevar a cabo un precultivo durante 24 hrs. a 30°C.

Al termino del precultivo, se tomó una alícuota de este y se transfirió a un medio de cultivo con metanol (ver apéndice) como única fuente de carbono, el cual se inició con 0.1 DO/mL. Al mismo tiempo se añadió PA1 al cultivo a una concentración final de 2 µg/mL.

Se determinó el tiempo de generación basándonos en una metodología ya descrita en la literatura (30):

Se tomaron 100 µL de este cultivo a partir del tiempo cero y cada dos hrs., hasta llegar a las 22 hrs. Cada alícuota se colocó en un

tubo con 900 μL de solución salina (ver apéndice), a partir del cual se hicieron diluciones seriadas. De cada dilución se depositaron 0.1 mL en placas con medio con metanol y se extendió con ayuda de una varilla de vidrio estéril doblada en L, según la técnica de estría en agar de superficie, se dejó secar y se incubó a 37°C durante 24 a 48 hrs.

Posteriormente se seleccionaron de cada tiempo las placas que contenían entre 30 y 300 colonias, el número de colonias que se contaron por placa se multiplicó por la dilución de la muestra, obteniéndose de esta manera el número de levaduras/mL. Estos resultados se integraron en la siguiente fórmula para determinar el tiempo de generación:

$$G = t/nt \quad G = t/ 3.3\log (If/Lo)$$

donde:

Lo = número de levaduras sembradas en un medio o la cuenta de levaduras en el tiempo cero.

I_f = número de levaduras al final de un periodo

t = periodo o tiempo

G = tiempo de generación

nt = número de generaciones

\log = logaritmo de base 10

El mismo método se siguió para un cultivo en el cual no se agregó toxina (control).

El procedimiento se realizó por triplicado y los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente por la prueba de hipótesis de la diferencia entre las proporciones de dos poblaciones para muestras pequeñas.

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 ± 2.896 .

3.2.2 Determinación del tiempo de generación de *C. boidinii* en medio con metanol fresco.

Se inoculó una colonia de *C. boidinii*, en un medio con glucosa al 2% como única fuente de carbono para llevar a cabo un precultivo durante 24 hrs. a 30°C.

Se tomó una alícuota de este precultivo y se transfirió a un medio de cultivo con metanol como única fuente de carbono, el cual se inició con 0.1 DO/mL, al mismo tiempo que se agregó PA1 a una concentración final de 2 µg/mL. Al llegar al primer tiempo de generación se transfirieron las células a medio fresco con metanol sin la toxina y se determinó nuevamente el tiempo de generación de acuerdo al método ya descrito (30).

Se utilizó el mismo método para un cultivo al cual no se agregó toxina (control).

El procedimiento se realizó por triplicado y los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente por la prueba de hipótesis de la diferencia entre las proporciones de dos poblaciones para muestras pequeñas.

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 ± 2.896 .

3.2.3 Evaluación de la proliferación y daño peroxisomal.

Se obtuvo un paquete celular de cada generación de levaduras del medio fresco, el cual se fijó con KMnO_4 al 1.5%. Después se deshidrató en series graduales de etanol, para su posterior inclusión en epón mediante la técnica ya descrita (31) (ver apéndice). De estas muestras incluidas se realizaron cortes finos, se contrastaron con acetato de uranilo al 5% (ver apéndice) y se observaron al microscopio electrónico de transmisión para la obtención de micrografías electrónicas.

Para analizar la presencia y localización de la dihidroxiacetona sintasa (DHAS) y la alcohol oxidasa (AOX), se obtuvo un paquete celular de cada generación de levaduras del medio fresco, el cual se procesó con una técnica que permite una adecuada preservación de las células. Esta técnica incluye fijación suave con glutaraldehído a bajas concentraciones y una resina que polimeriza a bajas temperaturas, lo cual permite conservar la antigenicidad y demostrar las proteínas mediante inmunocitoquímica con anticuerpos específicos contra ellas y un anticuerpo secundario marcado con oro coloidal.

Los paquetes celulares se fijaron en glutaraldehído al 1.5 % en amortiguador de cacodilatos y se procesaron hasta su inclusión en resina Lowicryl (ver apéndice).

El inmunomarcaje se llevó a cabo en cortes finos con anticuerpos anti-alcohol oxidasa y anti-dihidroxiacetona sintasa e IgG conjugada con partículas de oro coloidal (ver apéndice). Los cortes finos se contrastaron con acetato de uranilo al 5% (ver apéndice).

Finalmente se realizó la observación bajo el microscopio electrónico de transmisión y se obtuvieron micrografías electrónicas.

3.2.4 Análisis inmunocitoquímico de las proteínas de matriz peroxisomal DHAS y AOX.

Se inoculó una colonia de *C. boidinii*, en un medio con glucosa al 2% como única fuente de carbono para llevar a cabo un precultivo durante 24 hrs. a 30°C. Se transfirió una alícuota de este precultivo a un medio de cultivo con metanol como única fuente de carbono, el cual se inició con 0.1 DO/mL. Se incubó a 30°C con agitación constante durante 14 hrs., tiempo en el cual se alcanzó la fase exponencial media. Al llegar a esta fase se adicionó al cultivo PA1 a una concentración final de 2 µg/mL, y a partir de este momento se tomaron muestras a intervalos de 5 min. hasta llegar a los 30 min. para obtener el paquete celular.

El mismo método se siguió para un cultivo en el cual no se agregó toxina (control).

El paquete celular obtenido de cada uno de los tiempos se dividió en dos partes. Una parte del paquete celular se fijó con KMnO_4 y se deshidrató en series graduales de etanol para su posterior inclusión en epón mediante la técnica ya descrita (31) (ver apéndice). Se realizaron cortes finos, se contrastaron con acetato de uranilo al 5% (ver apéndice) y se observaron al microscopio electrónico de transmisión para la obtención de micrografías electrónicas. Otra parte del paquete se fijó en glutaraldehído para su posterior inclusión en Lowicryl (ver apéndice). De las piezas incluidas se realizaron cortes finos.

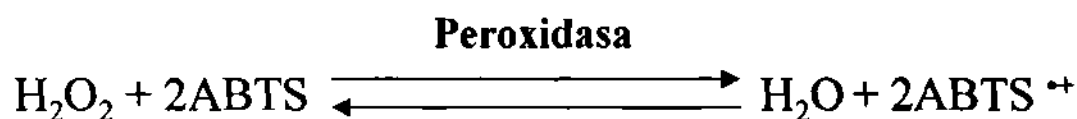
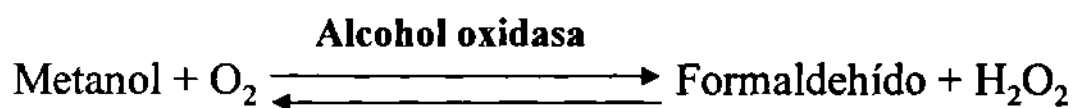
El inmunomarcaje de la DHAS y de la AOX se llevó a cabo sobre los cortes finos (ver apéndice), los cuales se contrastaron con acetato de uranilo al 5% (ver apéndice). Finalmente se realizó la observación bajo el microscopio electrónico de transmisión y se obtuvieron micrografías electrónicas.

3.2.5 Análisis de la actividad enzimática de la AOX en las fracciones peroxisomal y citosólica.

Se inoculó una colonia de *C. boidinii*, en un medio con glucosa al 2% como única fuente de carbono para llevar a cabo un precultivo durante 24 hrs. a 30°C. Se transfirió una alícuota de este precultivo a un medio de cultivo con metanol como única fuente de carbono, el que se inició con 0.15 DO/mL. Se incubó a 30°C con agitación constante durante 14 hrs., tiempo en el que se alcanzó la fase exponencial media. Al llegar a esta fase se adicionó al cultivo PA1 a una concentración final de 2 µg/mL. Después de la adición de PA1, los cultivos se incubaron durante 15 min.

Posteriormente se cosecharon las células y se obtuvo el paquete celular, separando las células del medio de cultivo mediante centrifugación a 5 000 x g, a 20°C durante 20 min. Del paquete celular obtenido se aislaron y purificaron las fracciones peroxisomal y citosólica, según un procedimiento descrito en la literatura (32) (ver apéndice).

Se procedió a la determinación de la actividad enzimática de la AOX en cada una de las cinco fracciones del gradiente, según el método de Tani y cols. (33). En este método espectrofotométrico acoplado, se mide la formación del radical catiónico ABTS a 420 nm, pH de 7.5 y 25°C, llevándose a cabo las siguientes reacciones (34):



La actividad de la AOX (U/mL) se obtuvo multiplicando el cambio de absorbancia/min. por el factor 0.2777 para las fracciones uno, dos y tres, y por el factor 2.777 para las fracciones cuatro y cinco (ver apéndice).

Por otra parte, se realizó la determinación de proteínas totales por el método de Bradford (35), 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.

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de albúmina sérica bovina de 2.5 a 20 μg de proteína. Cada uno de los estándares se preparó por triplicado a partir de una solución patrón de albúmina sérica bovina de 1mg/mL, como se describe en la Tabla 1 (ver apéndice). El volumen final en cada tubo fue de 200 μL . A cada estándar se le agregó 1mL 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 la absorbancia a 595 nm de cada estándar y se trazó la curva de calibración graficando el valor de la absorbancia en función de la cantidad de proteína en un volumen de 200 μL .

El mismo método se siguió para un cultivo en el cual no se agregó toxina (control).

El procedimiento se realizó por triplicado y los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente por la prueba de hipótesis de la diferencia entre las proporciones de dos poblaciones para muestras pequeñas.

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 ± 2.896 .

CAPITULO CUATRO

RESULTADOS

4.1 Tiempo de generación de *Candida boidinii* en medio con metanol en presencia y ausencia de Peroxisomicina A1 (PA1).

El tiempo de generación de *C. boidinii* en medio con metanol fue de 4.16 hrs., mientras que en presencia de PA1 fue de 4.21 hrs. No hubo diferencia significativa en el tiempo de generación entre ambos cultivos, como puede observarse al analizar el comportamiento de las curvas de crecimiento de *C. boidinii* tanto en los cultivos expuestos como en los no expuestos a PA1 (Fig. 6)

4.2 Tiempo de generación de *C. boidinii* proveniente de los cultivos anteriores en un medio con metanol fresco.

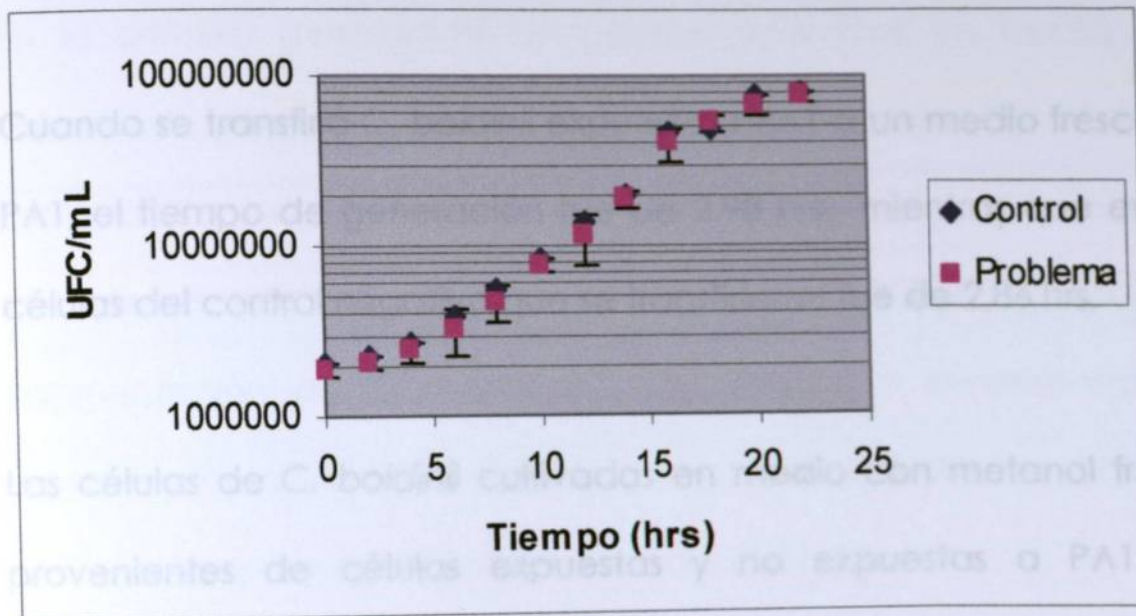


Figura 6. Curvas de crecimiento de *C. boidinii* en medio con metanol en ausencia y presencia de PA1. Las curvas de crecimiento de *C. boidinii* siguieron un comportamiento muy similar entre si en los cultivos expuestos y no expuestos a PA1 ($p \leq 0.005$).

En un medio con metanol y el de las células transferidas a medio con metanol fresco, si hubo diferencia significativa ($p \leq 0.005$).

4.2 Tiempo de generación de *C. boidinii* proveniente de los cultivos anteriores en un medio con metanol fresco.

Cuando se transfirió *C. boidinii* expuesta a PA1 a un medio fresco sin PA1, el tiempo de generación fue de 2.98 hrs., mientras que en las células del control negativo que se transfirieron fue de 2.86 hrs.

Las células de *C. boidinii* cultivadas en medio con metanol fresco provenientes de células expuestas y no expuestas a PA1, no mostraron diferencia significativa cuando se compararon sus tiempos de generación.

En cambio, entre el tiempo de generación de las células cultivadas en medio con metanol y el de las células transferidas a medio con metanol fresco, si hubo diferencia significativa ($p \leq 0.005$).

4.3 Proliferación y daño peroxisomal.

En la primera generación de células cultivadas en medio con metanol en presencia de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PA1, se observó (Fig. 7B) tanto proliferación de los peroxisomas como daño celular, el cual se caracterizó por el aspecto granular denso del citoplasma, fragmentación de la membrana peroxisomal y peroxisomas de aspecto aberrante. En el control negativo (Fig. 7A) se observó proliferación peroxisomal y peroxisomas íntegros.

En la tercera generación de estas mismas células el daño se acentuó. Además de la ruptura de la membrana peroxisomal previamente descrita, se observó la presencia de agregados citosólicos con una electrodensidad similar a la de la matriz peroxisomal y carentes de membrana (Fig. 8B). En el control negativo (Fig. 8A) se observó proliferación peroxisomal y peroxisomas íntegros.

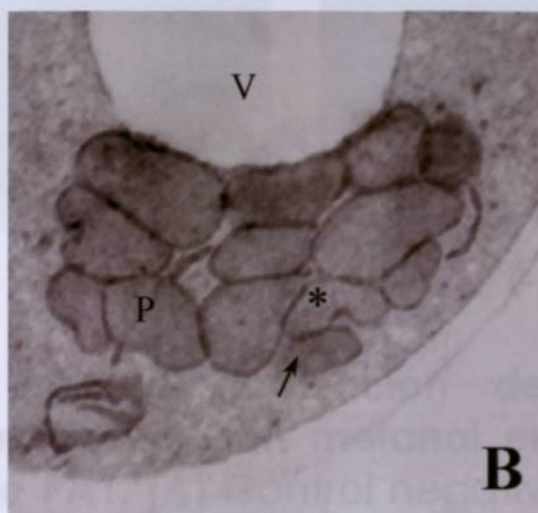
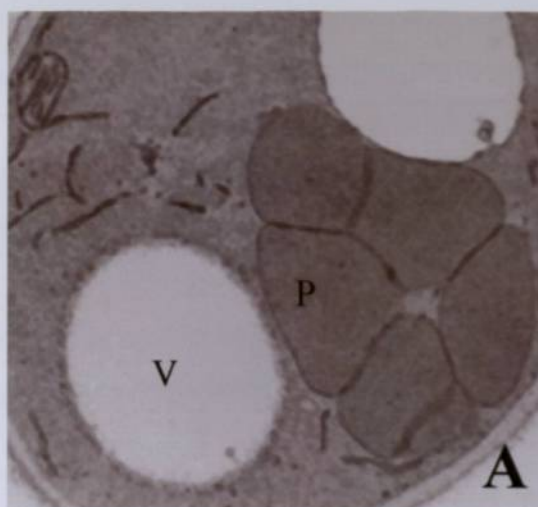


Figura 7. Primera generación de *C. boidinii* cultivada en medio con metanol en presencia y ausencia de PA1. (A) Control negativo. Se observa proliferación peroxisomal y peroxisomas íntegros (12,000 x). (B) Células expuestas a 2 µg/mL de PA1. Se observa proliferación peroxisomal y fragmentación de la membrana peroxisomal (flecha), además de peroxisomas de aspecto aberrante (asterisco) (12,000 x). V; vacuola, P; peroxisoma.

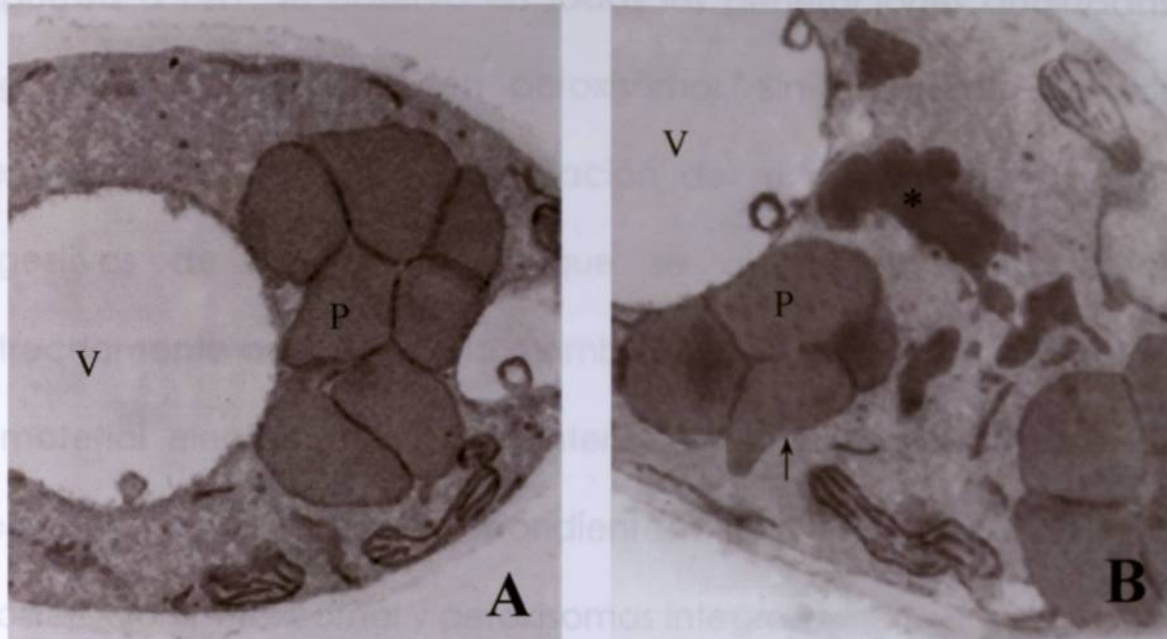


Figura 8. Tercera generación de *C. boidinii* cultivada en medio con metanol en presencia y ausencia de PA1. (A) Control negativo. Se observa proliferación peroxisomal y peroxisomas íntegros (12,000 x). (B) Células expuestas a 2 $\mu\text{g/mL}$. Se observa proliferación peroxisomal y fragmentación de la membrana peroxisomal (flecha), además la presencia de agregados citosólicos con una electrodensidad similar a la de la matriz peroxisomal y carentes de membrana (asterisco) (12,000 x). V; vacuola, P; peroxisoma.

En las células cultivadas en medio fresco provenientes de *C. boidinii* expuesta a PA1, se observó en todas las generaciones analizadas (Fig. 9B y 9C) proliferación peroxisomal. Sin embargo, algunos peroxisomas mostraron fragmentación de su membrana y signos sugestivos de autofagia, ya que se observaron peroxisomas estrechamente asociados a la membrana de la vacuola autofágica y material electrodensito en el interior de la misma. En todos los controles negativos correspondientes (Fig. 9A), se observó proliferación peroxisomal y peroxisomas íntegros.

Los hallazgos encontrados por inmunocitoquímica para las dos enzimas analizadas fueron muy semejantes entre sí. Se observó en todas las generaciones de *C. boidinii* cultivadas en medio fresco provenientes de células expuestas a PA1 (Fig. 10B) marcaje en la vacuola autofágica. Estos resultados confirmaron lo ya observado con la morfología. En los controles negativos (Fig. 10A) se observó la marca para la dihidroxiacetona sintasa (DHAS) y la alcohol oxidasa (AOX) dentro de los peroxisomas solamente.

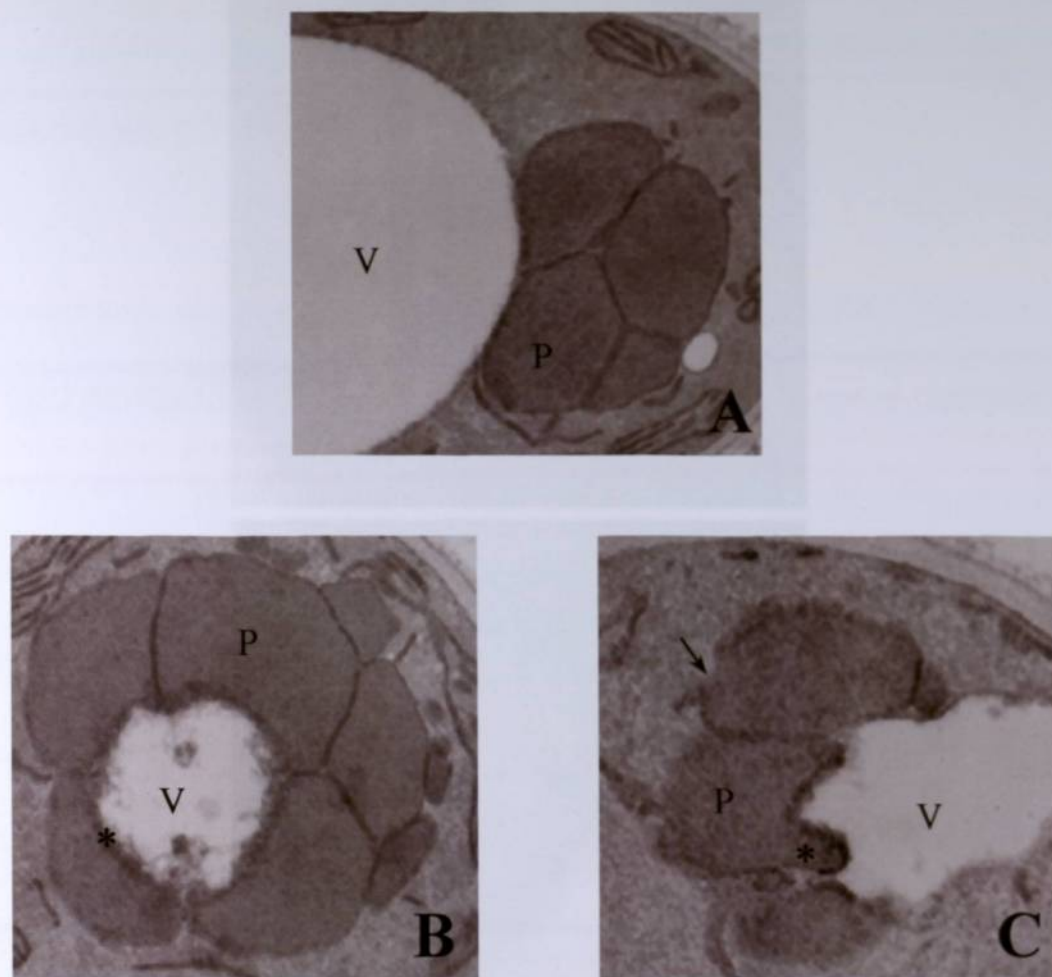


Figura 9. *C. boidinii* cultivada en medio con metanol fresco en presencia y ausencia de PA1. (A) Control negativo. Se observa proliferación peroxisomal y peroxisomas íntegros (12,000 x). (B,C) Dos generaciones diferentes de células expuestas a 2 $\mu\text{g/mL}$ de PA1. Se observa proliferación peroxisomal; algunos peroxisomas mostraron fragmentación de su membrana (flecha). Peroxisomas en proceso de degradación se encontraban estrechamente asociados a la vacuola autofágica (asterisco) (12,000 x). V; vacuola, P; peroxisoma.

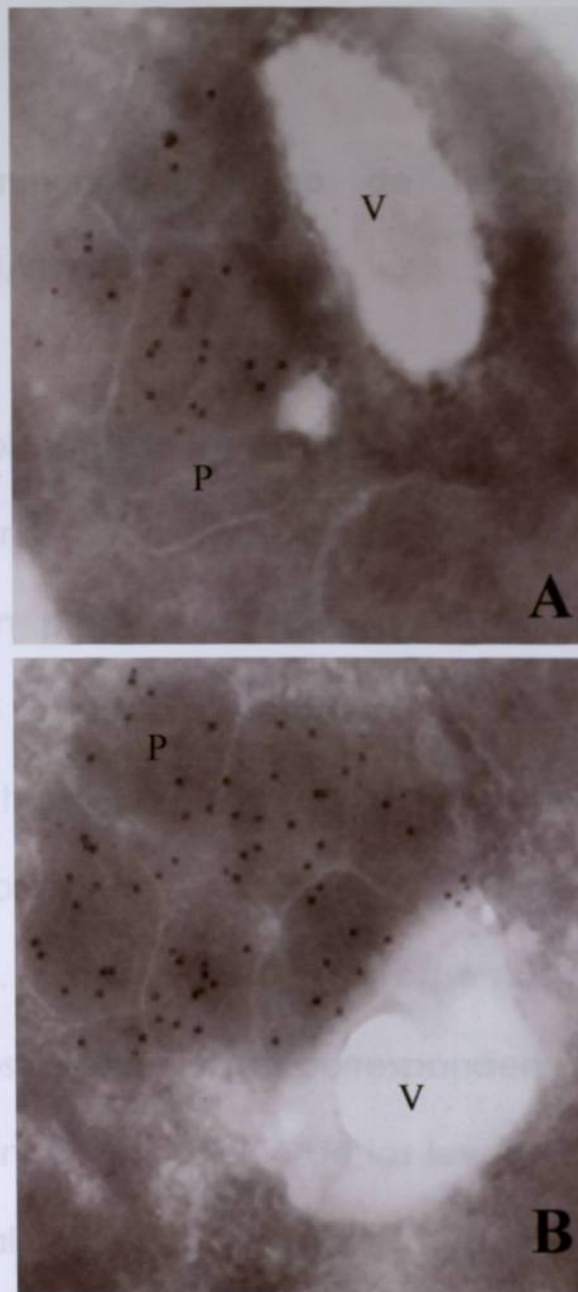


Figura 10. Inmunocitoquímica de *C. boidinii* cultivada en medio fresco con metanol. (A) Control negativo. Se observa la marca para la AOX en los peroxisomas solamente (20,000 x). (B) Generación proveniente de células expuestas a 2 µg/mL de PA1. Se observa marcaje para la AOX en la vacuola autofágica (20,000 x). V; vacuola, P; peroxisoma.

4.4 Análisis inmunocitoquímico de las proteínas de matriz peroxisomal DHAS y AOX.

El análisis morfológico de las células expuestas a PA1, mostró en un tiempo temprano (5 min.) pérdida de la membrana peroxisomal y peroxisomas en proceso de autofagia (Fig. 11B). En un tiempo intermedio (15 min.) la membrana preautofágica rodeó a los peroxisomas y hubo transferencia de la matriz de los peroxisomas hacia la vacuola autofágica (Fig. 11C). Finalmente en un tiempo tardío (25 min.), se observaron los peroxisomas dentro de la vacuola (Fig. 11D). Todos estos hallazgos corresponden al lapso de tiempo de entre 5 y 30 min. de exposición de las levaduras a la PA1. En todos los tiempos analizados se observó además de peroxisomas dañados, peroxisomas con morfología normal. A los tiempos de exposición analizados no se observó la presencia de agregados citosólicos electrodensos. En el cultivo control negativo se observó una ultraestructura normal en todos los tiempos analizados (Fig. 11A).

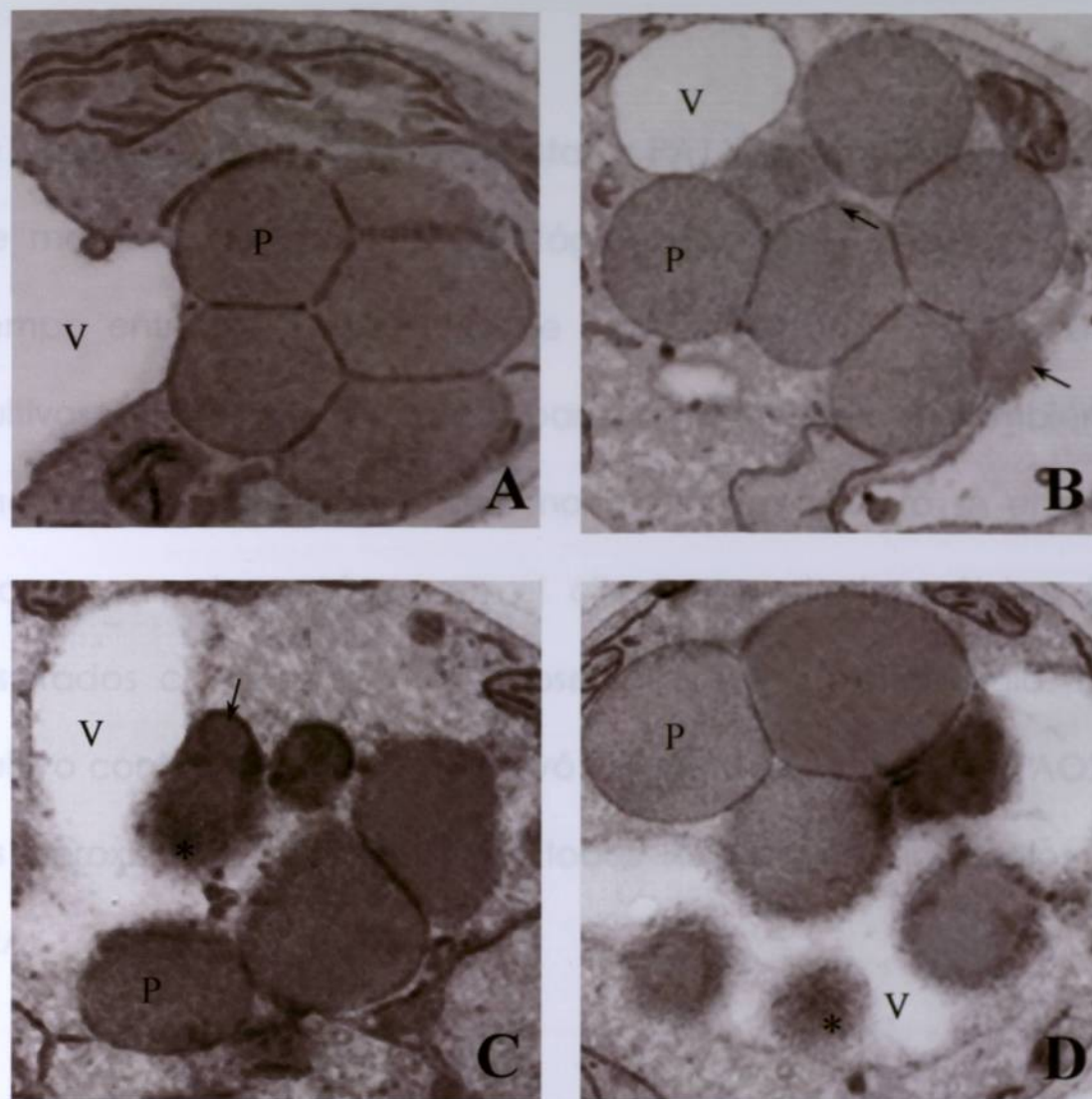


Figura 11. Morfología de células de *C. boidinii* expuestas entre 5 y 30 min. a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PA1. (A)

En el control negativo se observan peroxisomas con ultraestructura normal. (12,000 x). (B) A los 5 min. de exposición a la toxina se observaron algunos peroxisomas en proceso de autofagia (flecha) (12,000 x).

(C) A los 15 min. la membrana preautofágica rodeo a los peroxisomas (flecha) y hubo transferencia del material de los peroxisomas hacia la vacuola autofágica (asterisco) (12,000 x).

(D) A los 25 min. los peroxisomas se encontraron en la vacuola (asterisco) (12,000 x). V; vacuola, P; peroxisoma.

Se observó en las células expuestas a PA1, una cantidad creciente de marca en la vacuola autofágica conforme se avanzó en el tiempo entre los 5 y 30 min. de exposición (Fig. 12B-12D). En los cultivos expuestos la marca para ambas enzimas también se encontró en peroxisomas con morfología normal. No se encontró marca para las enzimas en el citoplasma de las células. Estos resultados confirmaron lo ya observado con la morfología. En el cultivo control negativo se observó la marca para la DHAS y AOX en los peroxisomas solamente, en todos los tiempos analizados (Fig. 12A).

4.5 Actividad enzimática de la AOX en las fracciones peroxisomal y citosólica.

El análisis bioquímico reveló que la PA1 a una concentración no letal de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuye la actividad de la AOX en *C. boidinii* al tiempo de exposición analizado, pero no de una manera significativa con respecto al control. La actividad enzimática de la

AOX se concentró en la fracción 5 del gradiente, la cual corresponde a la banda de los peroxisomas (Fig. 13).

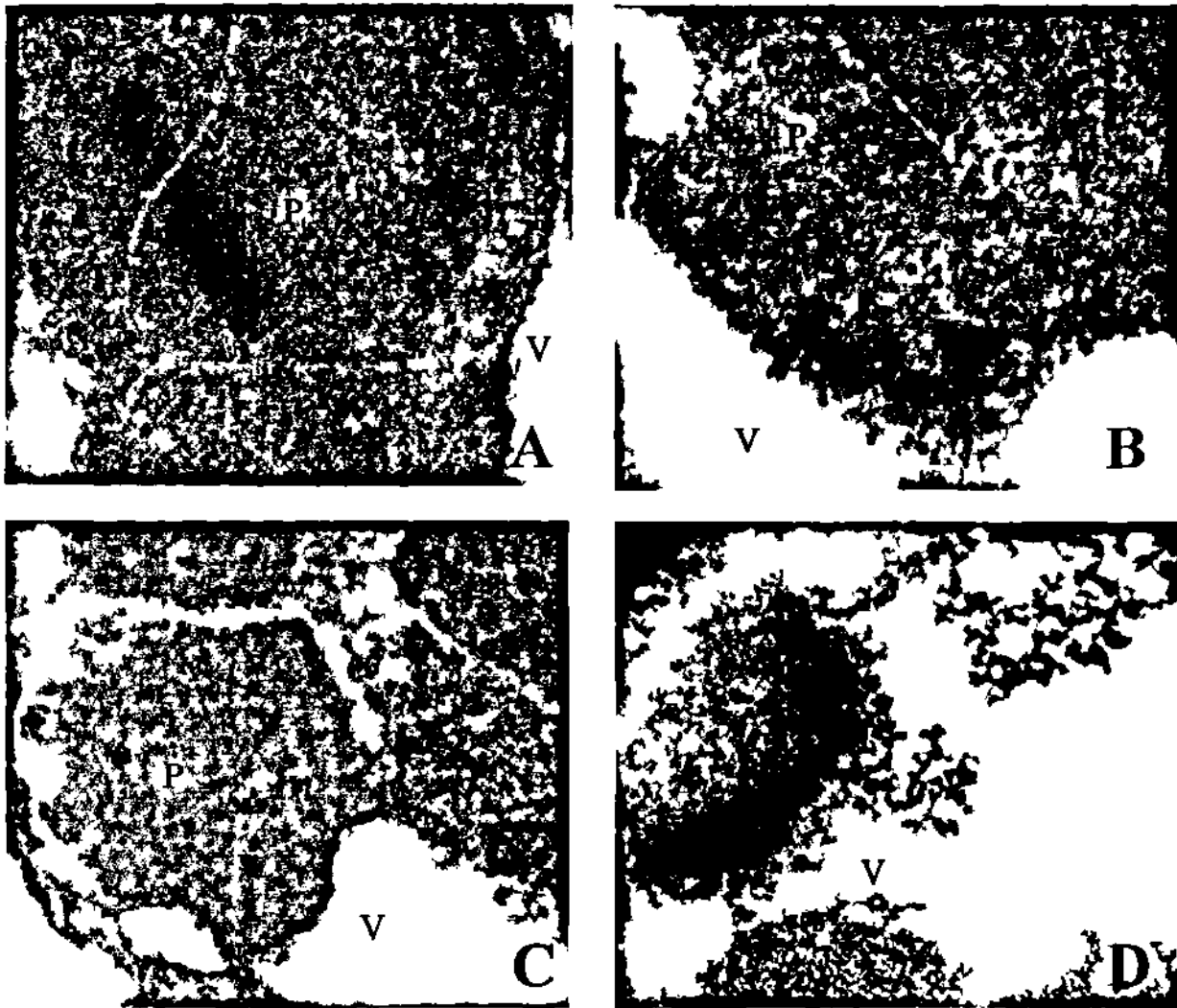


Figura 12. Demostración inmunocitoquímica de DHAS en *C. boidinii* expuestas entre 5 y 30 min. a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PA1. (A) En el control negativo se observó la marca para la enzima solamente en los peroxisomas (20,000 x). (B) En las células expuestas, se observó a los 5 min. la marca en peroxisomas en proceso de autofagia, mientras que a los 15 min. (C) aumentó la misma en la vacuola autofágica (20,000 x). (D) A los 25 min. los peroxisomas se encontraron en su totalidad dentro de la vacuola, como lo evidenció la marca para la DHAS (12,000 x). V; vacuola, P; peroxisoma.

CAPITULO CINCO

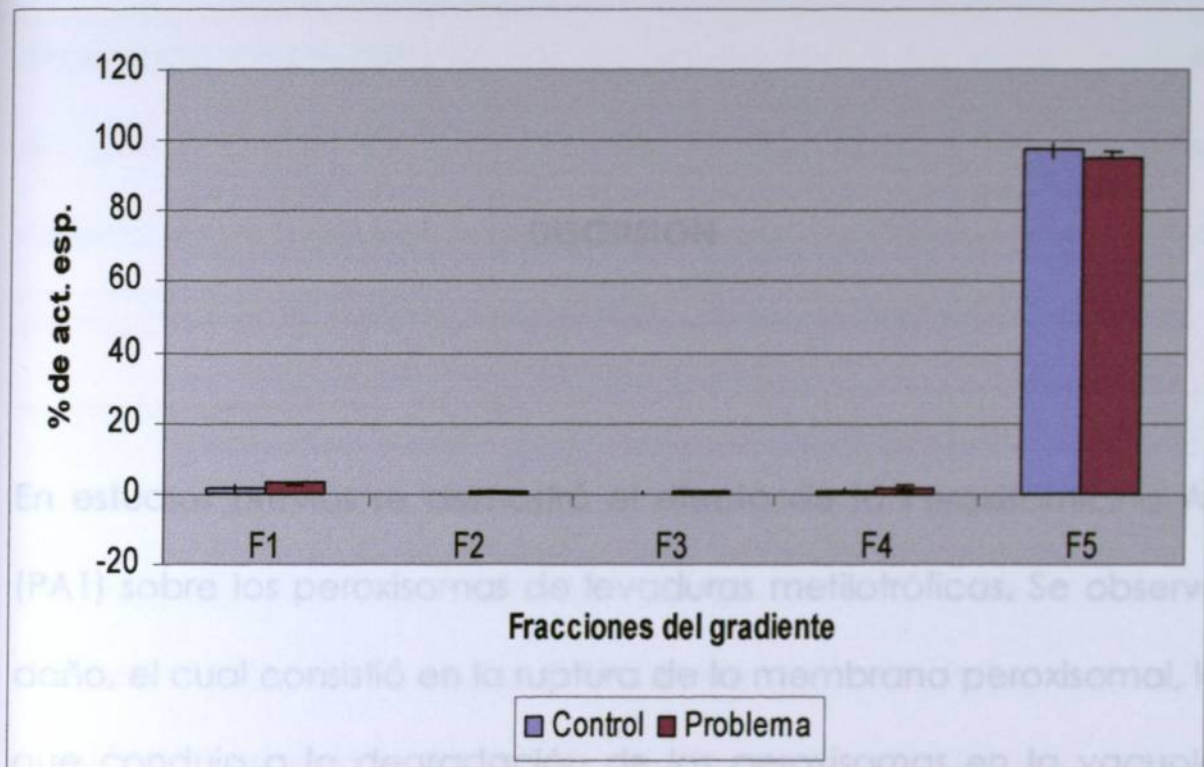


Figura 13. Porcentajes de actividad específica de la AOX de *C. boidinii* cultivada en presencia de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PA1 durante 15 minutos. La actividad enzimática de la AOX se concentró en la fracción cinco del gradiente, la cual corresponde a la banda de los peroxisomas. No se observó diferencia significativa ($p < 0.005$) entre los cultivos expuestos y no expuestos a PA1.

CAPITULO CINCO

DISCUSION

En estudios previos se demostró el efecto de la Peroxisomicina A1 (PA1) sobre los peroxisomas de levaduras metilotróficas. Se observó daño, el cual consistió en la ruptura de la membrana peroxisomal, lo que condujo a la degradación de los peroxisomas en la vacuola autofágica. En estos estudios las levaduras fueron expuestas a la PA1 en la fase exponencial media de desarrollo en un medio con un sustrato inductor, donde ya hubo proliferación de los peroxisomas (26,29).

El presente trabajo evaluó por primera vez, si la capacidad de proliferación de los peroxisomas se ve afectada en células expuestas a PA1 inmediatamente después de ser transferidas de un medio basal con glucosa, a un medio con metanol como inductor

de la proliferación peroxisomal. También se investigó si el efecto observado en los peroxisomas de células expuestas a PA1 persistía en generaciones sucesivas de levaduras provenientes de estas células, en un medio sin toxina. Se consideró como un parámetro de evaluación el tiempo de generación, y se llevó a cabo un análisis morfológico e inmunocitoquímico.

No hubo diferencia en el tiempo de generación entre las células expuestas y las no expuestas a PA1. Asimismo, las células cultivadas en medio con metanol fresco provenientes de células expuestas y no expuestas a PA1, no mostraron diferencia significativa cuando se compararon sus tiempos de generación. Aunque PA1 afecta peroxisomas individuales, es evidente que dicho compuesto no altera la proliferación de dichos organelos. Si eso hubiera sucedido, la viabilidad y por lo tanto el tiempo de generación de las levaduras expuestas hubiera sido menor en comparación a las células control. Las células de *Candida boidinii* cultivadas en un medio basal poseen de 2 a 5 peroxisomas (18). Es probable que la exposición a PA1 a la concentración utilizada no afecte a todos los peroxisomas

de dichas células al ser transferidas a un medio con un sustrato inductor de la proliferación peroxisomal, y los que queden íntegros son capaces de mantener el crecimiento de las células de una manera comparable a la de las células no expuestas, mientras ocurre la proliferación peroxisomal, como lo proponen Sepúlveda y cols. (26). Además de que no todas las células están afectadas como lo reportó Segoviano al realizar un estudio morfométrico donde se demostró que al menos el 50% de las células expuestas a 2 $\mu\text{g/mL}$ de PA1 no presentaron daño peroxisomal, mostrando una ultraestructura normal (36).

Por otra parte, entre el tiempo de generación de las células cultivadas en medio con metanol y el de las células transferidas a medio con metanol fresco, si hubo diferencia significativa, siendo menor en estas últimas. Brock y cols. reportan que si la fuente de energía y carbono del medio de cultivo nuevo son distintas de las del cultivo previo, la adaptación a las nuevas condiciones se halla a menudo ligada a una síntesis *de novo* de enzimas que no eran necesarias en el cultivo original y que por tanto no habían sido

sintetizadas. La formación de esas enzimas nuevas es inducida por el nuevo sustrato (37). En este caso, el medio al que fueron transferidas las levaduras es un medio de composición igual al original, y por lo tanto ya poseían las enzimas necesarias para metabolizar el metanol, por lo que la fase de latencia se reduce y por consiguiente el tiempo de generación, esto aunado a que la concentración de metanol en el medio fresco cuando las levaduras ya adaptadas fueron transferidas era mayor.

Los hallazgos anteriores coinciden con los reportado por Vargas y cols. donde solamente se detectó una colonia de células expuestas a PA1 que no crecieron eficientemente en metanol (38).

Los hallazgos morfológicos apoyaron los resultados obtenidos en la evaluación del tiempo de generación, ya que se observaron peroxisomas íntegros y peroxisomas afectados. Estos últimos mostraron fragmentación de su membrana o ausencia de la misma, y se observaron signos sugestivos de autofagia peroxisomal, ya que algunos peroxisomas se encontraron estrechamente asociados a la

membrana de la vacuola autofágica y presencia de material electrodensito en el interior de la misma. Dicho material se identificó por inmunocitoquímica como dihidroxiacetona sintasa (DHAS) y alcohol oxidasa (AOX).

La degradación de los peroxisomas o pexofagia se estudió por primera vez en levaduras metilotróficas (39). En estos organismos los peroxisomas proliferan cuando el metanol es la única fuente de carbono. Los peroxisomas son degradados selectivamente cuando se agrega glucosa o etanol al medio de cultivo. La pexofagia ocurre en dos formas: la micropexofagia en la cual varios peroxisomas son incorporados directamente por protusiones de la membrana de la vacuola autofágica y la macropexofagia donde peroxisomas individuales son envueltos por una membrana, la cual posteriormente se fusiona con la membrana de la vacuola autofágica (Fig. 14) (39-43). Los hallazgos observados en esta parte del presente trabajo de Tesis concuerdan con la micropexofagia.

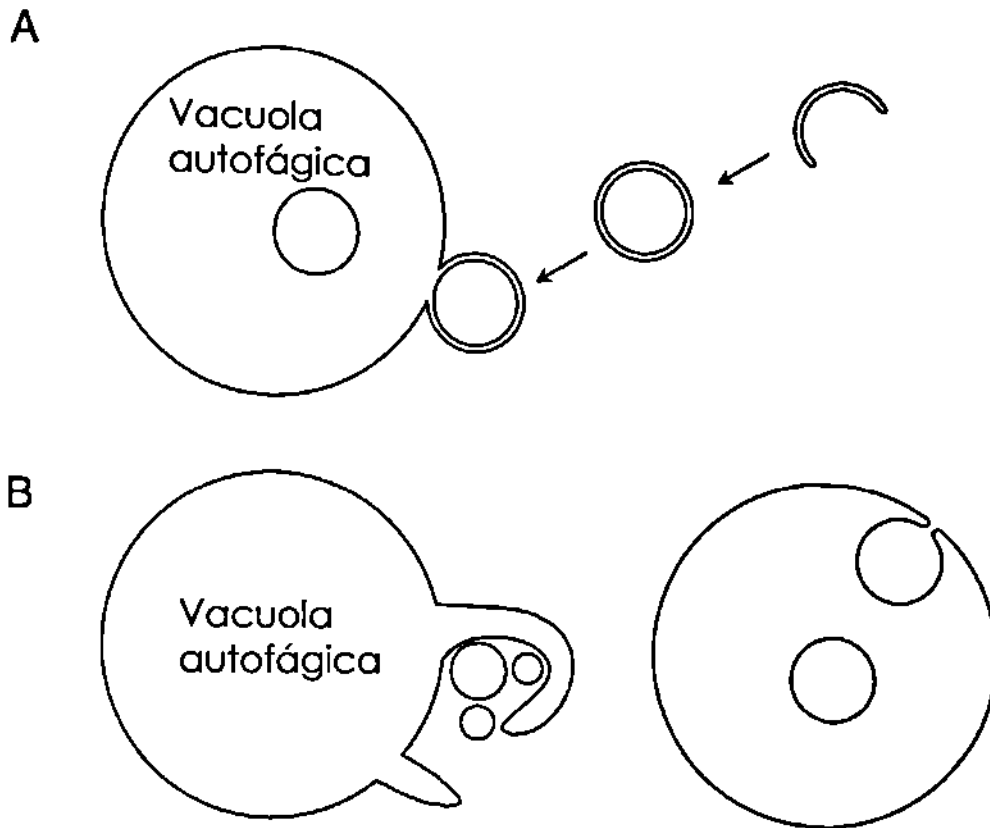


Figura 14. Degradación peroxisomal. A) Macropexofagia: peroxisomas individuales son envueltos por una membrana, la cual posteriormente se fusiona con la membrana de la vacuola autofágica. B) Micropexofagia: varios peroxisomas son incorporados directamente por protusiones de la vacuola autofágica. (Teter, S. and Klionsky, D. 2000. *Sem in Cell & Devel Biol.* 11:173-179).

Es interesante notar que aunque la proliferación peroxisomal no se vio afectada por la exposición a PA1, el daño peroxisomal ya descrito se observó en todas las generaciones de células provenientes de levaduras expuestas. Esto podría sugerir un efecto de PA1 sobre el genoma celular. Estudios realizados por Vargas y cols. (38) en *H. polymorpha* sugieren lo mismo, ya que se aislaron dos cepas de dicha levadura con disfunción peroxisomal inducida por PA1.

Por otra parte, los hallazgos reportados previamente corresponden a tiempos de exposición de las levaduras a la toxina a partir de los 30 minutos (26). En este trabajo se evaluaron los efectos de PA1 sobre los peroxisomas a tiempos más tempranos de exposición.

Se demostró que tiempos muy cortos de exposición de los peroxisomas a la PA1, incluso de 5 min., les provoca un daño irreversible. Al analizar la morfología, se observó pérdida de la membrana peroxisomal y peroxisomas en proceso de autofagia. Posteriormente, la membrana preautofágica rodeó a los

peroxisomas y hubo transferencia de los peroxisomas hacia la vacuola autofágica. Finalmente, se observaron los peroxisomas dentro de la vacuola. Todos estos hallazgos se comprobaron por inmunocitoquímica.

Estos hallazgos son semejantes a los descritos en la macropexofagia (39-43).

Es interesante notar, que cuando las levaduras se transfirieron de un medio con glucosa a uno con metanol como sustrato inductor de la proliferación peroxisomal e inmediatamente fueron expuestas a PA1, como ya se mencionó anteriormente, ocurrió la micropexofagia.

El que se presente uno u otro modo de pexofagia depende principalmente de la especie de levadura analizada y de los estímulos ambientales, como la fuente de carbono en el medio de cultivo. Por ejemplo, cuando *P. pastoris* se cultiva en medio con metanol y posteriormente se transfiere a etanol, se induce el proceso

de macropexofagia (39, 43). Cuando estas células son cultivadas en metanol y luego en glucosa se induce la micropexofagia (39, 43).

En nuestras condiciones experimentales, al parecer el factor determinante de que se presentara uno u otro modo de pexofagia fue el tiempo en que se agregó la PA1 al cultivo. Esto a su vez estaría relacionado con la adaptación de las levaduras al mismo, de tal manera que la micropexofagia se presentó en células no completamente adaptadas a las nuevas condiciones y la macropexofagia en las que ya lo estaban.

Los resultados morfológicos e inmunocitoquímicos coinciden con hallazgos reportados previamente de tiempos de exposición mayores (26, 29). De esta forma, es evidente que la PA1 no afecta por igual a todos los peroxisomas ni a todas las células (36), y esto permite al cultivo sobrevivir en un medio que contiene metanol como única fuente de carbono. En todos los estudios realizados hasta la fecha (26, 29) se han observado peroxisomas dañados y de

morfología normal coincidiendo en una misma muestra expuesta a la PA1.

El análisis bioquímico reveló que la PA1 afecta la actividad de la AOX en *C. boidinii* al tiempo de exposición analizado, pero no de una manera estadísticamente significativa con respecto al control. Es interesante notar que la actividad enzimática de la AOX se concentró en la fracción cinco del gradiente, la cual corresponde a la banda de los peroxisomas, estos hallazgos coinciden con lo reportado por Salazar (44).

Lo anterior indicaría que los peroxisomas se conservan íntegros, sin embargo se confirmó ultraestructuralmente que algunos de estos organelos presentaban daño y que posteriormente fueron degradados en la vacuola autofágica. Una explicación a lo antes mencionado, podría ser que el daño a ciertos peroxisomas fuera el responsable de esta disminución en la actividad, pero que los organelos íntegros mantienen la actividad remanente. Además, la AOX se concentra en la matriz cristalina de los peroxisomas. Esta

localización limita su desplazamiento, en comparación a la catalasa y a la DHAS, las cuales se encuentran en forma soluble (22). Este hecho podría ser una explicación del porque no se detecta actividad de la AOX en otras bandas del gradiente, aunque sí se detectó su presencia en la vacuola autofágica mediante inmunocitoquímica. La cantidad de esta proteína podría ser muy pequeña, pero suficiente para ser detectada por anticuerpos, mas no para detectar su actividad en esas bandas.

Los hallazgos obtenidos en este trabajo demuestran que el proceso de degradación de los peroxisomas provocado por la PA1 sobre *C. boidinii*, el cual inicia con la ruptura de la membrana peroxisomal y termina con la degradación de los peroxisomas en la vacuola autofágica, se presenta desde tiempos de exposición muy cortos (desde los 5 hasta los 30 min).

No se observó la presencia de agregados citosólicos electrodensos, ni marca para la AOX en el citoplasma de las células. Esto, aunado a que es difícil que la AOX salga de los peroxisomas porque se

encuentra en la matriz cristalina de los mismos, lo cual limita su desplazamiento, nos lleva a considerar que la presencia o la actividad de esta enzima en el citoplasma de las levaduras reflejaría un defecto en el importe de la misma. Este último hecho nunca sucedió, por lo que el transporte de la AOX hacia los peroxisomas a estos tiempos de exposición breves de *C. boidinii* a PA1 es normal.

CAPITULO SEIS

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSIONES

Efecto de la PA1 sobre la proliferación de los peroxisomas en *Candida boidinii*.

1.- No se afecta la proliferación peroxisomal bajo las condiciones experimentales en las generaciones analizadas de *C. boidinii* no expuestas a PA1, provenientes de un cultivo inicial expuesto a este compuesto. Sin embargo, estas células presentan daño peroxisomal.

2.- La PA1 a la concentración utilizada causa degradación peroxisomal tanto en células de *C. boidinii* directamente expuestas a este compuesto, como en las generaciones provenientes de éstas células.

Efecto de la PA1 sobre el importe de proteínas de matriz peroxisomal a tiempos de exposición breves en *Candida boidinii*.

3.- La PA1 a la concentración utilizada no afecta el importe de proteínas de matriz peroxisomal a tiempos de exposición breves de *C. boidinii* a este compuesto.

6.2 PERSPECTIVAS

Un estudio morfométrico complementaría los hallazgos descritos, para evaluar en forma definitiva si existe o no diferencia en las características de los peroxisomas entre los cultivos de *C. boidinii* expuestos y no expuestos a PA1.

La realización de estudios moleculares ayudaría a elucidar el probable efecto de la PA1 sobre el genoma de *C. boidinii*, con respecto al daño observado en los peroxisomas en generaciones no expuestas de esta levadura provenientes de células expuestas a PA1 (45).

Confirmar el efecto de la PA1 sobre el importe de proteínas de la matriz peroxisomal en células de *C. boidinii* expuestas, por ejemplo por medio de la técnica de Microinyección (46).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Clavijero, F.J. (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 T514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo león. Monterrey, N.L. México.

- 2) Fernández Nava, R. (1992). Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México. Anales. Instit. Biol. Univ. Nac. Autón. México. Ser. Bot. 63(1): 1-23. Citado en: Salazar, R. (2001). Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre dos especies de levaduras: *Candida boidinii* y *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. U.A.N.L.

- 3) 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: 1091-1097.

4) Dreyer, A.I., Bachman, C., Anderson, W., Smith, R. and Daves; D. (1975). Toxins causing non-inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am. chem. Soc.* 97: 4985-4990. Citado en: Piñeyro, A. (1990). Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. México.

5) Guerrero, M., Piñeyro, A. and Waksman, N. Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). (1987). *Toxicon*, 25: 565-568.

6) Waskman, N. and Martínez, L. (1989). Chemical and toxicological screening in genus *Karwiskia* (México). *Rev. Latinoamer. Quím.* 20/1: 27-29.

7) Garza-Ocañas, L., Gin C. Hsieh., Acosta, D., Torres-Alanis, O. and Piñeyro, A. Toxicity assessment of toxins T-514 and T-544 of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures. (1992). *Toxicology*, 73: 259-267.

8) Piñeyro-López, A., Martínez, L. and González-Alanis, R. (1994). *In vitro* selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology*. 92: 217-227.

9) Piñeyro, A. (1995). *Europaischen Patentblatt* 95/48 (29.11.95) Patentnummer: 0467407.

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

11) *Patente Japonesa* No. 2651758.

12) 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 on rats intoxicated with PA1. *Toxicology Lett.* 98: 71-75.

13) Subramani, S. (1992). Mechanisms of transport of proteins into microbodies. W. Neupert and R Lill (Eds). Elsevier Science Publishers B.V. Chapter 17: 221-229.

14) Wanders, R. J. A., Jansen, G., van Roermund, C.W.T., Denis, S., Schutgens, R.B.H., and Jakobs, B.S. (1996). Metabolic aspects of peroxisomal disorders. In: peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease. Janardan K. reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804: 427-441.

15) 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. Citado en: Salazar, R. (2001). Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre dos especies de levaduras: *Candida boidinii* y *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. U.A.N.L.

16) Lazarow, P.B. and Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Ann Rev. Cell Biol.* 1: 489-530.

17) Kunau, W-H. and Erdmann, R. Peroxisome biogenesis: Back to the endoplasmic reticulum? (1998). *Curr Biol.* 8: R299-R302.

18) Veenhuis, M. and Goodman, J.M. (1990). Peroxisomal assembly: membrane proliferation precedes the induction of the abundant matrix proteins in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Cell Sci.* 96: 583-590.

- 19) Subramani, S. (1993). Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9: 445-478.
- 20) Rachubinski, R. and Subramani, S. (1995). How proteins penetrate peroxisomes. *Cell.* 83: 525-528.
- 21) Sahm, H., Roggenkamp, R., Wagner, F. and Hinkelman, W. (1975). Microbodies in methanol grow *Candida boidinii*. *J. Gen. Microbiol.* 88: 218-222.
- 22) Veenhuis, M. and Harder, W. (1987). Metabolic significance and biogenesis of microbodies in yeast. *Peroxisomes in Biology and Medicine.* 436-458 pp.
- 23) Fukui, S., Kawamoto, S., Yasuhara, S., Tanaka, A., Osumi, M., and Imaizumi, F. (1975). Microbody of methanol-grow yeast. Localization of catalase and flavi-dependent alcohol oxidasa in the isolated microbody. *Eur. J. Biochem.* 59: 561-566.

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

25) 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.

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

27) Moreno-Sepúlveda, M., Vargas-Zapata, R., Esquivel-Escobedo, D., Waksman, N. and Pineyro-López, A. (1995). Effect of peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity. Planta med, 61, 297-392.

28) 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. *Toxicon*. 35 (5) 777-783.

29) Salazar, R. (1997). Efecto *in vivo* de diversas antracenas diméricas sobre peroxisomas de *Candida boidinii*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. U.A.N.L.

30) Pelczar, M., Reid, R. y Chan, E. (1977). *Microbiología*. E. Mc Graw Hill. pp: 105-107.

31) Veenhuis, M., Keizer, I. and Harder, W. (1979). Characterization of peroxisomes in glucose grown *Hansenula polymorpha* and their development after the transfer of cells into methanol containing media. *Arch. Microbiol.* 120, 165-175.

32) 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 common integral membrane proteins. *J. of Cell.Sci.* 97:193-204.

33) Tani. (1985). *Agric. Biol. Chem.* 49, 2699-2706. Citado en: Salazar, R. (2001). Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre dos especies de levaduras: *Candida boidinii* y *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. U.A.N.L.

34) Childs, R.E., and Bardsley, W.G. (1975). 3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid as chromogen. *Biochem. J.* 145: 93-103. Citado en: Salazar, R. (2001). Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre dos especies de levaduras: *Candida boidinii* y *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. U.A.N.L.

35) Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 249-255.

36) Segoviano Ramirez, Juan Carlos. (2001). Análisis morfométrico comparativo del efecto de la PA1, IsoPA1, PA2, y T-544 sobre peroxisomas de *C. boidinii*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. U.A.N.L.

37) Brock, T.D., Smith, D.W. Madigan, M.T. (1977). Microbiología. 4º ed. E. Prentice Hall. pp: 231-244.

38) Vargas Zapata, Rigoberto., Torres-González, V., Sepúlveda Saavedra, J., Piñeyro-López, A., Rechinger, K.B., Keizer Gunnink, I., Kiel, J.A. and Veenhuis, M. (1999). Peroxisomicine A1 (plant toxin-514) affects normal peroxisome assembly in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Toxicon*. 37(2): 385-398.

39) Scott, S. and Klionsky, D. (1998). Delivery of proteins and organelles to the vacuole from the cytoplasm. *Curr in Cell Biol*. 10: 523-529.

40) Teter, S. and Klionsky, D. (2000). Transport of proteins to the yeast vacuole: autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting, and role of the vacuole in degradation. *Sem in Cell & Devel Biol.* 11: 173-179.

41) Hutchins, M., Veenhuis, M. and Klionsky, D. (1999). Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J. of Cell.Sci.* 112: 4079-4087.

42) Baba, M., Osumi, M., Sidney, S., Klionsky, D. and Ohsumi Y. (1997). Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J. of Cell Biol.* 139(7): 1687-1695.

43) 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.

44) Salazar, R. (2001). Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre dos especies de levaduras: *Candida boidinii* y *Saccharomyces cerevisiae* Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. U.A.N.L.

45) Bellu, A.R., Kram, A.M., Kiel, A.K.W.J., Veenhuis, M. and van der Klei, I.J. (2001). Glucose-induced and nitrogen-starvation-induced peroxisome degradation are distinct processes in *Hansenula polymorpha* that involve both common and unique genes. FEMS Yeast Research. 1: 23-31.

46) Walton, P., Gould, S., Rachubinski, R., Subramani, S. and Feramisco, J. (1992). Transport of microinjected alcohol oxidase from *Pichia pastoris* into vesicles in mammalian cells: involvement of the peroxisomal targeting signal. J. of Cell Biol. 118 (3), 499-508.

APENDICE

METODOS DE CULTIVO

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

Los cultivos líquidos de *C. boidinii* se efectúan de la forma siguiente: se toma una colonia de la levadura y se inocula en un medio enriquecido con glucosa al 2% (YPD), después se incuba por 24 hrs. a 30°C bajo agitación constante (250 rpm). Las células cultivadas en YPD se transfieren a medios mínimos conteniendo glucosa o metanol como única fuente de carbono. Estos cultivos de *C. boidinii* se inician en la mayoría de los casos con una turbidez del medio de 0.1 DO/mL. Posteriormente todos los cultivos se incuban a 30°C bajo agitación constante (250 rpm). Los cultivos se revisan periódicamente bajo el microscopio de luz para evaluar su pureza y descartar su contaminación.

MEDICION DE LA TURBIDEZ DEL MEDIO DE CULTIVO

La turbidez del medio de cultivo se determina a través del valor de su densidad óptica (DO/mL).

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

MEDIOS DE CULTIVO

PREPARACION DE MEDIOS LIQUIDOS

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 |

K_2HPO_4 0.7 g

Disolver en un litro de agua destilada.

Ajustar a un pH de 6.0 con H_2SO_4 ó $NaOH$.

Agregar:

Trazas Minerales 10.0 mL

Extracto de levadura 0.5 g

Esterilizar a $121^\circ C$ por 30 min. Dejar enfriar.

Adicionar:

Vitaminas 1.0 mL

Metanol (100%) 5.0 mL

PREPARACION DE PLACAS DE AGAR

Placas de agar YPD (2%)

Pesar:

Extracto de levadura 10.0 g

Peptona 20.0 g

Glucosa 2.0 g

Agar 20.0 g

Disolver en un litro de agua destilada.

Esterilizar a 121°C por 30 min. Dejar enfriar hasta 40-45°C.

Vaciar a cajas de petri estériles.

Placas de agar YPM

Pesar:

| | |
|----------------------|--------|
| Extracto de levadura | 10.0 g |
|----------------------|--------|

| | |
|---------|--------|
| Peptona | 20.0 g |
|---------|--------|

| | |
|------|--------|
| Agar | 20.0 g |
|------|--------|

Disolver en un litro de agua destilada.

Esterilizar a 121°C por 30 min. Dejar enfriar hasta 40-45°C.

Agregar:

| | |
|----------------|--------|
| Metanol (100%) | 5.0 mL |
|----------------|--------|

Vaciar a cajas de petri estériles.

PREPARACION DE SOLUCIONES

Solución de trazas minerales

Pesar:

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

Disolver en un litro de agua desionizada.

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

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 .

Solución salina al 0.85%

Pesar 0.85 g de NaCl y aforar a 100 mL con agua destilada. Esterilizar y agregar a tubos eppendorf estériles.

AISLAMIENTO DE ORGANELOS CELULARES

PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE ORGANELOS

El paquete celular obtenido se lavó con agua destilada y se resuspendió en amortiguador Tris-H₂SO₄ 0.1M pH 9.3 con 10 mM de DTE y se incubó durante 15 min. a 30°C y 250 rpm. Después de esto, se centrifugó a 5 000 x g, a 20°C durante 20 min. y el paquete celular obtenido se lavó con sorbitol 1M.

Se obtuvieron los esferoplastos por digestión enzimática de la pared celular, como se describe a continuación: se agregó a las células una solución de sorbitol 1 M, amortiguador de fosfatos 1M pH 7.4 y 25 mg de liticasa de *Arthrobacter luteus* con actividad de 81 000. Las células se resuspendieron en esta solución y se incubaron por 65 min. a 30°C y 250 rpm.

Una vez realizado lo anterior, se evaluó la formación de esferoplastos mediante observación al microscopio de luz,

colocando una gota de la suspensión entre porta y cubreobjetos. Los esferoplastos se identificaron por su periferia refringente. Posteriormente, y para comprobar la identificación, se adicionó una gota de agua destilada a la preparación y se observó al microscopio de luz; al contacto con el agua se produce la lisis de los esferoplastos y se liberan los organelos.

Se centrifugó la suspensión a 5 000 x g, a 4°C por 10 min. En el paquete celular obtenido se llevó a cabo la lisis de esferoplastos por choque osmótico, utilizando una solución de sorbitol a diferentes concentraciones, MES-NaOH 5 mM pH 5.5 y PMSF 1mM.

Primero, se resuspendieron los esferoplastos en sorbitol 1M (solución uno) y posteriormente se agregó sorbitol 0.25M (solución dos). Esta mezcla se agitó vigorosamente para hacer posible la lisis de los esferoplastos. Se confirmó la lisis al microscopio de luz y posteriormente se agregó a la suspensión sorbitol 1.75M (solución tres) y se sometió a centrifugación diferencial a 1 000 x g, a 4°C durante 20 min.

El sobrenadante obtenido se centrifugó a 15 000 x g durante 20 min. y se obtuvo un sedimento enriquecido con citosol, mitocondrias y peroxisomas. Este sedimento se colocó en un gradiente de densidad de sacarosa (30–60%) donde la solución más concentrada se encuentra en el fondo del tubo.

Posteriormente el gradiente se sometió a ultracentrifugación a 140 000 x g, a 4°C durante 5.5 hrs. Los organelos celulares sedimentaron en forma de cinco bandas en la fase del gradiente que corresponde a su propia densidad. En la fracción número uno sedimentaron las macromoléculas, en la dos el citosol, en la tres las mitocondrias ligeras, en la cuatro las mitocondrias pesadas y los peroxisomas ligeros y los peroxisomas pesados sedimentaron en la fracción cinco.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN CADA UNA DE LAS FRACCIONES DEL GRADIENTE

Se preparó la solución de ensayo para AOX mezclando:

1.5 mL de amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5, a su vez preparado de una solución madre 1M; 0.16 mL de peroxidasa de castor (HRP) 2U/mL a partir de una solución a 380 U/mL; 16.46 mg de ABTS 1mM y 28.34 mL de agua destilada. Esta mezcla se preparó siempre inmediatamente antes de su uso.

En una cubeta de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico se colocaron: 895 μ L de la solución de ensayo y 100 μ L de la muestra para las fracciones uno, dos y tres, y 985 μ L de la solución de ensayo y 10 μ L de la muestra para las fracciones cuatro y cinco (esta última fracción en dilución 1:20). Después de mezclar se tomó el valor de la absorbancia a 340 nm. Este valor correspondía al blanco.

Posteriormente se agregaron 5 μL de metanol, se mezcló y se inició la cinética enzimática por seis minutos.

CALCULO DE FACTORES PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La actividad enzimática se expresa en unidades internacionales (U) definiéndose una Unidad como la transformación de 1 μmol de sustrato o la formación de 1 μmol de producto durante la reacción enzimática. Matemáticamente se expresa con la siguiente ecuación:

$$U = \Delta C / t \quad \text{ec}^{\text{a}} \text{ n} (1)$$

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

$$\Delta C = (U/mL) (t) \quad \text{ec}^{\text{a}} \text{ n} (1.a)$$

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:

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

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

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

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 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

ΔA = Cambio de absorbancia del compuesto

ϵ = Absortividad molar del compuesto ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$)

b = Espesor de la cubeta (cm)

t = Tiempo (min.)

ΔC = Cambio de concentración del compuesto (μmol)

Entonces:

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

$$U/\text{mL} = \Delta A / \epsilon (\text{cm}^3/\mu\text{mol}) (1\text{min.})$$

$$U/\text{mL} = \Delta A (\mu\text{mol}/1\text{min. mL}) / \epsilon$$

$$U/\text{mL} = \Delta A (U/\text{mL}) / \epsilon \quad \text{ec}^{\text{\'n}} (4)$$

Al sustituir el valor del coeficiente de absorptividad molar del compuesto en la ec^{\'n} (4) se obtendran ecuaciones diferentes para cada compuesto. De forma general la ecuación se expresaria así:

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

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

| Enzima | Compuesto | (ϵ) | (D) |
|--------|--------------|-----------------------------|------------|
| AOX | Radical ABTS | 36.00 cm ² /μmol | 0.0278 |

Para el cálculo de la actividad enzimática se toman 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 (4a) quedaría de la siguiente forma:

$$U/mL = (\Delta A) (D U/mL) (\text{volumen en cubeta}) (\text{dilución en cubeta})$$

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) (volumen en cubeta) (dilución en cubeta)**

| Enzima | (D) | Volumen | Dilución | (F) |
|--------|--------|---------|----------|------|
| AOX | 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 la dilución previa de ésta.

Cuando 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).

CURVA DE CALIBRACION PARA LA DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS TOTALES

Tabla 1. Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteínas totales.

| Tubo | Proteína (μg) | Sol. Patrón (μL) | Agua dest. (μL) |
|------|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 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 |

PREPARACION DE REACTIVOS

En el proceso de la formación de esferoplastos se utilizó como amortiguador una solución de Tris-H₂SO₄ 0.1 M pH 9.3, conteniendo DTE 10mM. El DTE se agregó inmediatamente antes de su uso.

Amortiguador Tris-H₂SO₄ pH 9.3

Pesar 121.1 g y aforar a un litro de agua destilada, ajustar el pH con Tris-H₂SO₄. De esta solución se hace una dilución para tener finalmente Tris 0.1M:

50 mL aforados a 500 mL con agua destilada.

DTE 10mM

Pesar 92.52 mg de DTE y disolver en 60 mL de Tris-0.1M.

Para llevar a cabo la formación de los esferoplastos se utilizó una solución de Sorbitol 1M, conteniendo liticasa (25mg) y buffer fosfatos (20mM).

Sorbitol 2M

Pesar 364.4 g de sorbitol y aforar a un litro con agua destilada.

Sorbitol 1M

Preparar a partir de una solución de sorbitol 2M, aforando 500 mL de sorbitol 2M a un litro con agua destilada.

Amortiguador de fosfatos 1M pH 7.4

| | |
|---------------------|---|
| Solución 1 | 100 mL de KH_2PO_4 1M |
| Solución 2 | 100 mL de K_2HPO_4 1M |
| 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. |

Agregar 1.2 mL de amortiguador de fosfatos 1M pH 7.4 a 60 mL de la solución de sorbitol 1M.

Liticasa

Pesar 25 mg de liticasa y agregar a 60 mL de la solución de sorbitol.

Solución para la lisis de esferoplastos

Para llevar a cabo la lisis de los esferoplastos se utilizó una solución de sorbitol a diferentes concentraciones (1M, 0.25M y 0.75M), MES-NaOH 5 mM pH 5.5 a partir de una solución de 500mM y PMSF 1mM a partir de una solución de 100mM, para preparar las tres soluciones que se utilizan.

Sorbitol 0.25M

12.5 mL de sorbitol 1M aforados a 50 mL con agua destilada.

Sorbitol 1.75M

43.75 mL de sorbitol 2M aforados a 50 mL con agua destilada.

MES-NaOH 500mM

Pesar 48.8 g de MES y aforar a 500 mL con agua destilada.

PMSF 100mM

Preparar una solución de un stock de 100mM de PMSF en una solución de etanol al 2% calentada en baño maría y diluir hasta 1mM en sorbitol.

Gradientes de densidad discontinuos de sacarosa

Preparación de las soluciones de sacarosa de diferentes concentraciones (%p/p):

| Concentración (%p/p) | Sacarosa (g) | Agua (g) |
|----------------------|--------------|----------|
| 60 | 36 | 24 |
| 50 | 30 | 30 |
| 45 | 27 | 33 |
| 40 | 24 | 36 |
| 35 | 21 | 39 |
| 30 | 18 | 42 |

Preparación del gradiente de densidad de sacarosa discontinuo:

| Solución | 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 más concentrada se encuentra en el fondo del tubo.

INMUNOMARCAJE

Para realizar la técnica inmunocitoquímica se realizaron cortes finos de los bloques de Lowicryl y se colocaron en rejillas de níquel (200 mesh) con soporte. Las rejillas con los cortes se colocaron sobre una gota de albúmina sérica bovina al 0.5% por 5 min. Luego se incubaron en presencia del anticuerpo específico anti-alcohol oxidasa o anti-dihidroxiacetona sintasa de conejo diluido 1:5000 y 1:3000 respectivamente, en amortiguador PBS-glicina durante 12 a 16 hrs a 4°C en cámara húmeda.

Después se lavaron las rejillas con amortiguador PBS-glicina tres veces por 20 min. De nuevo se lavaron las rejillas, ahora con agua ultrapura tres veces por 20 min. y se incubaron con un segundo anticuerpo (anti-conejo de cabra) conjugado con partículas de oro coloidal (dilución 1:80) por 60 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente las rejillas se lavaron con amortiguador PBS-glicina tres veces por 20 min. y luego con agua ultrapura tres veces por 20 min.

PREPARACION DE SOLUCIONES

Albúmina sérica bovina (BSA) al 0.5%

Pesar 0.5 g de BSA y aforar a 100 mL con buffer PBS-glicina.

Amortiguador PBS-glicina

Pesar:

NaCl 4g

KCl 0.1g

Na₂HPO₄ 0.57g

KH₂PO₄ 0.12g

Glicina 0.37g

aforar a 500 mL con agua ultrapura.

MICROSCOPIA ELECTRONICA

PROCEDIMIENTO DE FIJACION EN PERMANGANATO DE POTASIO E INCLUSION EN RESINA EPOXICA

Cada uno de los paquetes celulares se fijaron en KMnO_4 al 1.5% durante 20 min. a temperatura ambiente. Después se hicieron dos lavados con agua ultrapura y se centrifugó para recuperar el paquete celular. A este paquete se agregó acetato de uranilo al 1% durante 1 hora, se agitó y se centrifugó durante 1 minuto.

Posteriormente se deshidrató en una serie gradual de etanol, como sigue: 50% 15 min., 70% 15 min., 96% por 15 min., 100% por 15 min. y 100% por 60 min. Después de la deshidratación se hizo una preinclusión e inclusión en resinas epóxicas como sigue: oxido de propileno 2 veces por 15 min., epón-oxido de propileno 1:1 una hora a temperatura ambiente, epón-oxido de propileno 3:1 una hora a temperatura ambiente 3 veces, y epón puro 30 min. 2 veces. Finalmente las células se dejaron una hora en epón puro a

temperatura ambiente y se incluyeron definitivamente en cápsulas de plástico o en plantillas en la estufa por toda la noche a 60°C, de acuerdo a un procedimiento descrito anteriormente (31).

PROCEDIMIENTO DE FIJACION EN GLUTARALDEHIDO E INCLUSION EN RESINA LOWICRYL

Los paquetes celulares se lavaron dos veces con agua destilada, centrifugando por 3 min. en una microcentrífuga. Se fijaron en glutaraldehido al 3% en amortiguador de cacodilatos durante una hora a 4°C. Se lavaron 2 veces con agua destilada. Las muestras se mantuvieron en amortiguador de cacodilatos hasta continuar el procedimiento.

Posteriormente se lavaron 2 veces con agua ultrapura, se dejaron 10 min. en peryodato de sodio al 0.1% y se lavaron como se describió anteriormente. Se agregó cloruro de amonio al 1% por 10 min. Después se realizó la deshidratación de la siguiente forma: 15 min. en etanol al 50 %; 10 min. en dimetilformamida al 50 % en etanol al

50%; 10 min. en dimetilformamida al 75% en etanol al 50%. Posteriormente se agregó dimetilformamida al 100% por 10 min. para proceder con la preinclusión.

En ésta, las células se trataron de la siguiente manera: 10 min. en dimetilformamida:Lowicryl 2:1; 15 min. en dimetilformamida:Lowicryl 1:1; 20 min. en Lowicryl puro y otro paso en Lowicryl puro de 25 min. Finalmente se incluyeron en Lowicryl puro y la polimerización se efectuó en cápsulas de plástico secas, bajo luz ultravioleta y sobre hielo. Después de 2 hrs. se obtuvieron las muestras incluidas en bloques de Lowicryl.

PREPARACION DE REACTIVOS**Fijadores****Glutaraldehído 3% en buffer de cacodilatos 0.1M pH 7.4**

Mezclar:

Glutaraldehído 25% 12 mL

Buffer de cacodilatos 0.1M 88mL

KMnO₄ 1.5%

Pesar 1.5g de KMnO₄ y aforar a 100 mL con agua ultrapura.

Amortiguadores

Amortiguador de cacodilatos 0.1M pH 7.4

Solución A 0.2M

| | |
|---------------------|--------|
| Cacodilato de sodio | 4.28 g |
| Agua destilada | 100 mL |

Solución B 0.2M

| | |
|-------------------|--------|
| Acido clorhídrico | 0.5 mL |
| Agua destilada | 25 mL |

Solución de trabajo

| | |
|------------|--------|
| Solución A | 100 mL |
| Solución B | 5.4 mL |

Aforar a 200 mL con agua destilada.

Resinas

Resina Lowicryl

Solución A: 2 g ó 1.83 mL densidad 1.09 g/mL

Solución B: 13 g ó 1.83 mL densidad 1.07 g/mL

Catalizador 75 mg

Se puede guardar en el congelador.

Resina Epóxica

| | suave | media | dura |
|--------|--------|-------|-------|
| Resina | 27.0 g | 29.0g | 31.4g |
| DDSA | 21.5g | 16.0g | 9.3g |
| NMA | 8.5g | 14.3g | 20.5g |

| | | | |
|------|------|------|------|
| BDMA | 1.7g | 1.7g | 1.7g |
|------|------|------|------|

(acelerador)

Otras soluciones

Acetato de uranilo 1%

Pesar 1g de acetato de uranilo y aforar a 100 mL con agua ultrapura.

Peryodato de sodio 0.1%

Pesar 0.1g de peryodato de sodio y aforar a 100 mL con agua ultrapura.

Cloruro de amonio 1%

Pesar 1g de cloruro de amonio y aforar a 100 mL con agua ultrapura.

Acetato de uranilo 5%

Pesar 0.5g de acetato de uranilo y aforar a 10 mL con alcohol etílico 50% preparado con agua ultrapura.

Se guarda en el refrigerador cubierto con papel aluminio.

Soporte para rejillas

Se calienta agua en una placa de petri a 40°C y se deja caer una gota de colodión. Al formarse una película sobre el agua se van colocando las rejillas con el lado opaco hacia abajo. Para sacar las rejillas se coloca un papel parafilm sobre toda la superficie y se levanta, las rejillas se pegan en el papel. Se dejan secar y se pueden utilizar un día después.

CONTRASTACION DE CORTES ULTRAFINOS

En una placa petri bien limpia se coloca un papel parafilm con gotas de acetato de uranilo y sobre las gotas se colocan las rejillas

con los cortes cuidando de ponerlas con estos hacia abajo para que estén en contacto con la solución contrastante. Se dejan por 5 minutos. Se lavan las rejillas por un minuto con agua ultrapura y se secan. Por último se lavan con agua ultrapura por 1 minuto y se dejan secar sobre un papel filtro en una caja de petri cerrada.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Marta Graciela Ortega Martínez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Morfología

Título de la Tesis: Estudio del efecto de la Peroxisomicina A1 sobre la proliferación de los peroxisomas y el importe de proteínas de matriz peroxisomal a tiempos de exposición breves en *Candida boidinii*.

Area de Estudio: Morfología

Biografía:

Datos personales. Lugar y Fecha de Nacimiento: 8 de noviembre de 1969, en la Cd. Nueva Rosita, Coahuila, México. Padres: Ginés Ortega Garza y Graciela Martínez Sanmiguel. Estado civil: Casada.

Escolaridad. Químico Bacteriólogo Parasitólogo por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 1996. Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 1997.

Experiencia Profesional. Presentación de trabajos de investigación en 7 Congresos Nacionales e Internacionales desde 1996 a la fecha. Primer Lugar de aprovechamiento en la Generación 1988-1993 de la Carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Reconocimiento al Mejor Estudiante de la Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León durante el ciclo escolar 1995-1996. Reconocimiento al Mejor Estudiante del Doctorado en Ciencias con Especialidad en Morfología por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León durante el ciclo escolar 1997-1998. Participación como Maestra de Histología con el tema "Téjidos básicos" en el Curso de Preparación para el Examen Nacional de Residencias Médicas en los años 2000 y 2001, realizado en la Facultad de Medicina de U.A.N.L. Maestra del Curso Teórico-Práctico de Histología desde 1998 a la fecha, que se imparte a los estudiantes de la Carrera de Médico Cirujano Partero en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Participación como Maestra de Histología a los estudiantes del Postgrado en Morfología en la Facultad de Medicina de U.A.N.L. Síntesis de oligonucleótidos y análisis de diversas sustancias en el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, en el Laboratorio de Química Biomolecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. en 1997. Publicación de la Tesis de Licenciatura: *Aedes albopictus* in Muzquiz City, Coahuila, México en 1994 en el Journal of American Mosquito Control Association, 10(4):587.



