

Las acetogeninas, ¿más que inhibidores del transporte electrónico?

Domínguez-Martínez, Verónica¹, Andrade Domínguez, Andrés², Trejo Hernández, Abigail², Coria Gil, Norma³ y Martínez Vázquez, Mariano⁴

¹Facultad de Biología de la Universidad Veracruzana, Campus Xalapa
Circuito Aguirre Beltrán s/n, Xalapa, Ver. vdominguez@uv.mx

²Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Av. Chamilpa s/n, Cuernavaca, Mor.

³Facultad de Agronomía de la Universidad Veracruzana.
Camino a Peñuela s/n, Orizaba, Ver.

⁴Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México
Circuito Interior s/n, Ciudad Universitaria, México. D. F.

Resumen

Las acetogeninas se reportan como potentes inhibidores del Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (González-Coloma *et al.*, 2001). Habiendo demostrado que su toxicidad se presenta por simple contacto con los organismos blanco (Martínez Navarro, 2008) se ha ensayado su efecto frente a levaduras mutantes. Tenemos evidencia de que las acetogeninas presentes en un extracto metanólico de semillas de *Annona muricata* afectan la morfogénesis y estructuras

externas de insectos como *Blatella periplaneta* (Martínez Navarro, 2008) y *Anastrepha ludens* (Domínguez Martínez *et al.*, 2009). Nos proponemos analizar el daño causado por extractos ricos en acetogeninas, a cepas de levadura mutadas en los genes *CHS1*, *CHS2*, involucrados en la biosíntesis de quitina durante la formación del septo entre células madre y yemas de levadura, como un primer abordaje para demostrar la acción “pleiotrópica” de la anona. En los bioensayos utilizamos cepas “knock-outs” de *Saccharomyces cerevisiae* (YKO MATa Strain Collection, Open Biosystems), las cuales se cultivaron en medio líquido YPD con o sin extracto rico en acetogeninas. Realizamos cinéticas de crecimiento para evaluar el efecto de estas moléculas en el tiempo de duplicación de cada cepa. Mediante microscopía óptica evaluamos cambios como elongación celular, formación no apical de yemas y células hijas unidas a la célula madre (con septos notables), se tomaron como anomalías relacionadas con la morfogénesis. El crecimiento de las cepas *chs1Δ* y *chs2Δ* no se vio afectado por el extracto, aunque se observaron alteraciones en la formación de septos, lo que causó la formación de agregados y alta frecuencia de células madre unidas a la yema. Esta morfología es atribuible a alteraciones en la formación de la pared celular. A diferencia de las células *yrr1Δ* expuestas (Domínguez Martínez *et al.*, 2009), las células *chs1Δ* y *chs2Δ* no forman pseudohifas, lo que sugiere que las vías de afectación son diferentes entre la cepa *yrr1Δ* y las mutantes *chs1Δ* y *chs2Δ*. Las acetogeninas no sólo afectan el transporte electrónico mitocondrial, sino también algunos genes de la síntesis de quitina, lo que se demuestra por el impacto causado en la gemación y morfogénesis de *S. cerevisiae*, principalmente en mutantes *CHS* y *CHD*. Esto explica el daño previamente observado a pupas de *Aedes aegypti*, y adultos de *Blatella periplaneta* y *Anastrepha ludens*.

Introducción

Conocidas por su alta toxicidad, las acetogeninas son policétidos formados a partir del acetyl-CoA a través de la ruta del acetato-malonato (Luna Cazáres *et al.*, 2003), y se han caracterizado solamente en el género *Persea* y en la familia Annonaceae. Se han propuesto como productos

bioactivos para múltiples fines, pero es precisamente esa alta toxicidad lo que limita su uso biomédico.

Las acetogeninas están formados por una cadena alifática de entre 32 y 34 C, y se caracterizan por tener un anillo γ -lactona (saturado o insaturado,) producto de la modificación del carboxilo terminal. La cadena carbonada puede tener entre uno y tres anillos tetrahidrofuranos (THF)(Alali *et al.*, 1999) o tetrahidropirano (Bermejo *et al.*, 2005), y radicales oxigenados (hidroxilos, cetonas y epóxidos, figura 1) con dobles o triples enlaces.

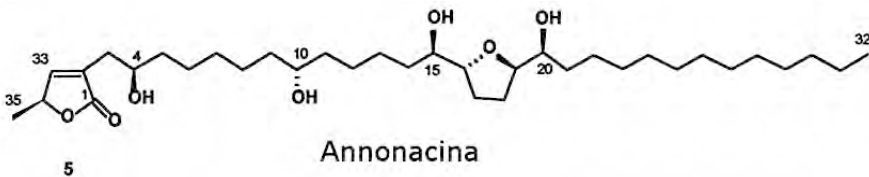


Figura 1. Estructura de una acetogenina (annonacina) mono THF

Por su bioactividad, destacan algunas acetogeninas como potentes inhibidores de células cancerosas, a una dosis eficaz media (DE_{50}) menor a 10^{-12} mg/mL (menor que la del taxol, un diterpeno de *Taxus brevifolia*) aun para células resistentes a adriamicina, cuya dosis letal es de hasta 10^9 μ g/mL (Alali *et al.*, 1999), y en consecuencia, unas 1,000 veces menos potente que la acetogenina.

Varias ACG como asimicina, parviflorina, silvaticina, bullatacina, anomontacina y gigantetrocina-A son notables agentes insecticidas, mejores que el piretroide sipermetrina, o que el clorpirifos (compuesto fosforado), la hidrametilnona (derivada de amidinohidrazaona), o los carbamatos proporxur y bendiocarb (Alali, *op. cit.*). Las ACG con dos anillos THF y con grupos OH adyacentes son agentes tóxicos por contacto (más que antialimentarios) para el mosquito de la fiebre amarilla (He *et al.*, 1997). La escuamocina es tóxica para los coleópteros y homópteros (*Leptinotarsa decemlineata* y *Myzus persicae*). Como antialimentarios de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) se han reportado nueve ACG de *A. cherimola*, destacando entre ellas la escuamocina, que es letal para el

100% de las larvas a una dosis de 50 µg/g de dieta (González Coloma *et al.*, 2002). Para larvas de *Aedes aegypti*, se reporta una mortalidad del 65% con 20 µg/mL de rolliniastatina (Londerhausen *et al.*, 1991). La toxicidad de las ACG se debe a su capacidad para inhibir el transporte de electrones de la membrana interna mitocondrial, a nivel de la NADH deshidrogenasa (ubiquinona oxido reductasa, Complejo I o NADH deshidrogenasa (figura 2) (Degli Esposti *et al.*, 1994). Este es el punto de acción de la rotenona, la piericidina A y capsaicina (Londershausen *op. cit.*; Guadaño *et al.*, 2000) y del 1-metil-4-fenil piridinium (MPP).

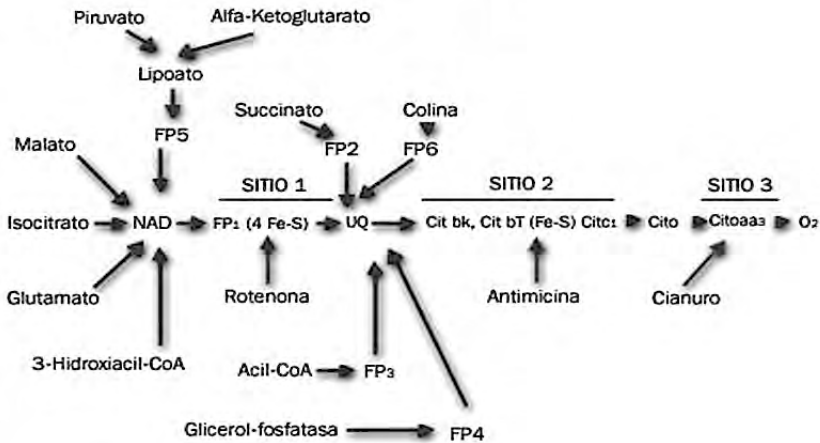


Figura 2. Sitios de acción propuestos para las acetogeninas y otros inhibidores de la enzima NADH-ubiquinona oxidoreductasa

Por su alta toxicidad, la annonacina, se ha probado en diferentes modelos biológicos, incluyendo el tumor de agallas de plantas, mitocondria de rata, líneas celulares cancerosa y líneas murinas, neuronas de embrión de rata, partículas sub mitocondriales (PSM) de bovino, larvas de *Spodoptera sp* y *L. decemlineata* (Luna Cázares *et al.*, 2003), y en todos ellos se corroboró que la acción es a nivel del Complejo I. Al inhibir la NADH oxidasa mitocondrial de células cancerosas, las acetogeninas, y en especial la annonacina inducen apoptosis por la vía de caspasa 3 y Bax- Bad, estancando tales células en la fase G1 (Yuan *et al.*, 2003).

Dado el amplio espectro de toxicidad las acetogeninas resultan de gran importancia económica, tanto para el sector agrícola, pecuario y aun biomédico, ya que pueden dañar insectos tales como los mosquitos de los géneros *Aedes* y *Anopheles*, *Pediculus humanus*, *Pulex irritans*, *Cimex lectularius* y *Blattella germanica* (Alali *et al.*, 1998; Bobadilla *et al.*, 2002), entre otros. La toxicidad se atribuye a un efecto antialimentario, comparable al mostrado por la rotenona, y superior al causado por extractos del árbol del Nim (*Azadirachta indica*). Pero hay evidencias recientes (Domínguez-Martínez *et al.*, 2003) de que basta el contacto externo para afectar, por ejemplo, a las pupas de *Aedes aegypti* (figura 3), cuya morfogénesis resulta severamente alterada:

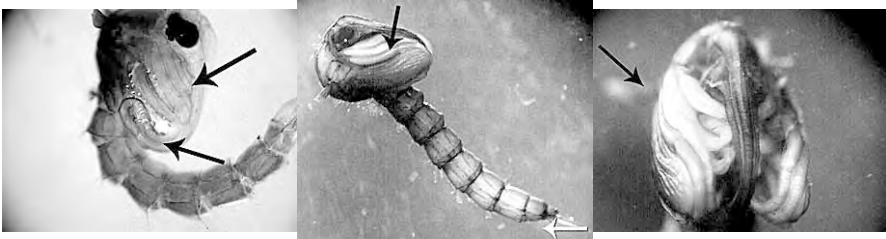


Figura 3. Pupas de *A. aegypti*. Se muestra la morfología normal (izquierda): un cuerpo curvado, los primordios de las alas (flecha superior), y debajo de ellas las patas. Comparando (en medio), una pupa expuesta a extractos de acetogeninas. Se observa el cuerpo recto, paletas natatorias incompletas (flecha blanca), desarrollo defectuoso de las patas (flecha superior) y alas, lo que es más notable en el acercamiento ventral (imagen a la derecha), en que se hacen evidente además, la exposición anómala de la futura trompa por separación de las estructuras (tomado de Domínguez Martínez *et al.*, 2003)

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que los extractos de semilla de *A. muricata*, ricos en acetogeninas, causan la destrucción de estructuras quitinosas de adultos de *Blattella periplaneta* (Martínez Navarro, 2008), como el protolabio, el exoesqueleto y las patas, cuando se les mantiene en frascos impregnados con acetogeninas (figura 4).

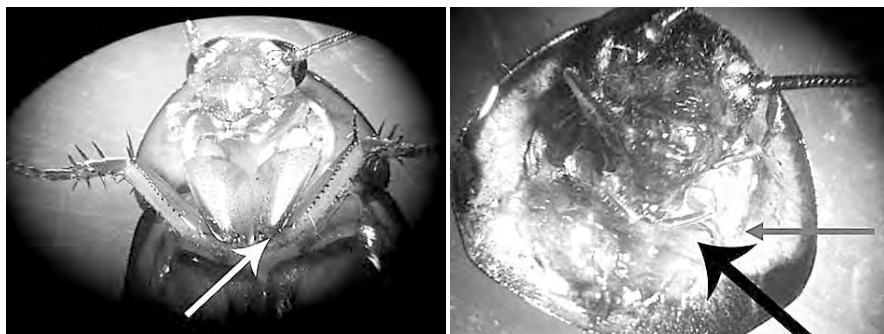


Figura 4. Daños observados en un individuo adulto de *Blatella sp.* A la izquierda se muestra el organismo intacto (la flecha señala el protolabio, y las patas son claramente visibles). A la derecha el mismo individuo, luego de exposición al extracto. Ha perdido las patas y el protolabio ya no presenta su estructura original (flecha); tampoco conserva las antenas (Tomado de Martínez Navarro *et al.*, 2008)

Varios autores proponen una estrecha correlación entre la toxicidad de una acetognina y la longitud del espaciador entre la lactona y el (o los) anillos THF, siendo el óptimo un total de 13 átomos de C entre estos elementos (figura 1). La inserción de un anillo no afecta la actividad mientras no reduzca la longitud del espaciador. Esto puede deberse a que la cadena principal de metilenos se pliega alrededor del THF, principalmente en las ACG bis-THF, generándose una alta polaridad alrededor del anillo THF (Takada *et al.*, 2000). Se requiere la presencia de la lactona para la acción conjunta con el THF sobre el Complejo I (Hamada *et al.*, 2004). En orden decreciente, las acetogeninas con anillos bis-THF adyacentes son más potentes que las que no los tienen, pero éstas superan a las mono THF.

Según el modelo propuesto por Abe *et al.* (2008), el anillo THF hidroxilado y la lactona se unen simultáneamente a dos sitios del Complejo I, modelo que explica el requerimiento del espaciador de 13C para que la ACG alcance tales sitios. Dado que los THF forman puentes de hidrógeno, actúan como anclas hidrofílicas que sostienen el espaciador sobre los lípidos del lado interno de la membrana, mientras la lactona interactúa con un sitio de la misma membrana interna. Esto explica la bioactividad de las ACG, y que la exposición de animales de laboratorio

o seres humanos a dichas ACG puede causar enfermedades neurodegenerativas, como algunas formas del mal de Alzheimer y de Parkinson.

Si el mecanismo de daño causado por acetogeninas consiste en la inhibición del Complejo I mitocondrial, resulta importante ensayar su efecto en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), pues sus mitocondrias (como las de algunas plantas y hongos) carecen del Complejo I, pero a cambio poseen enzimas NADH-deshidrogenasa alternas, llamadas NADH-ubiquinona-6-oxidorreductasas de tipo II, o NADH deshidrogenasas insensibles a rotenona (NDH-2). En las levaduras, el NADH reducido en el citosol y dentro de la mitocondria se utiliza por dos NADH deshidrogenasas externas (NDE1 y NDE2) y una NADH deshidrogenasa interna (NDII) (Rivera Pérez *et al.*, 2005). Esta última reacciona específicamente con el NADH, pero puede emplear *in vitro* diferentes aceptores de electrones, como la ubiquinona-2, la ubiquinona-6 (que es el aceptor de electrones endógeno o natural) el 2,6-diclorofenolindofenol y el ferricianuro.

Aunque catalizan la misma reacción que el Complejo I de la cadena respiratoria clásica mitocondrial, las NADH oxidorreductasas tipo II no contribuyen a la generación de gradientes protónicos transmembranales.

En las levaduras también hay transhidrogenasas de NADH (Rivera Pérez *et al.*, 2005) y una lanzadera de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, por la cual el NADH es oxidado a NAD, y los electrones sirven para reducir el fosfato de dihidroxicetona a glicerol-3-fosfato por la enzima Gpd1p del citosol. Tal es la eficacia de las NADH ubiquinona oxidorreductasas de levadura, que se usan para recuperar la oxidación de NADH en células de mamífero cuyo Complejo I mitocondrial es defectuoso (debido a mutación en el gen mitocondrial que codifica para NDH4 (Seo *et al.*, 2000).

Estas enzimas alternas se encuentran en las cadenas respiratorias de bacterias como *Escherichia coli* y arqueas (ej. *Acidianus ambivalens*), así como en organismos eucariontes (hongos) y plantas (Rivera Pérez, *op. cit.*). Su función es crucial, ya que dan versatilidad al metabolismo celular y adaptabilidad a las condiciones ambientales del organismo al que pertenecen.

Al exponer cepas mutantes de levadura a extractos de semilla ricos en acetogeninas hemos observado alteraciones en la morfología celular, notables principalmente durante la gemación, proceso en el que es muy importante la síntesis de quitina, de manera que esta vía metabólica pudiera estar involucrada en un efecto pleiotrópico de las acetogeninas.

Entre los genes involucrados en la síntesis de quitina, está la familia CHS, formada al menos por 7 miembros, cuyo producto es la enzima quitin-sintetasa, de la cual hay al menos 3 miembros (sintetasas I, II y III), que catalizan la transferencia de N-acetilglucosamina (GlcNAc) a la quitina, principalmente durante la reparación (CHS1) o formación (CHS2) del septo primario durante citocinesis. La enzima Chs3p cataliza la síntesis de la mayor parte de quitina de la pared celular, y une la quitina al extremo no reductor de 1,3-b glucano formando los enlaces β -1,4 (Ono *et al.*, 2000).

La transcripción del gen CHS1 es activada por el factor de apareamiento (*mating factor*), y se sabe que el producto de Chs1p se encarga de reparar la quitina dañada balanceando la actividad quitinasa. La enzima del gen CHS2 es regulada por Cdk1p durante la mitosis. La enzima III es requerida para la síntesis de la mayor parte de la quitina de la pared celular y del anillo de quitina durante la emergencia de la yema, así como para la formación de quitosanas de la pared de esporas. La enzima III es reclutada hacia el cuello de las yemas por CHS4. Durante el crecimiento vegetativo se ha reportado la participación de varios activadores de Chs3p, como Bni4p, Shc1p y Skt5p.

El nivel de expresión de Chs2p está regulado durante el ciclo celular, y la proteína producida se localiza en el cuello de la yema al final de la mitosis, momento en que se degrada. La proteína de Chs3p es estable y forma un anillo en la superficie de la yema emergente, acumulándose entonces en la célula madre. Se requieren varios factores celulares, incluyendo los productos de los genes *CHS4*, *CHS5*, *CHS6*, *MYO2* y *TIG1* (Ono *et al.*, 2000)

Relacionados con el metabolismo de quitina, están los genes para la enzima quitin-desacetilasa (CDA1 y CDA2, o YLR308W). CDA2, junto con Cda 1p está involucrado en la biosíntesis del quitosano (variante desacetilada de la quitina), componente de la pared de la ascospora,

mismo que le da rigidez a tal pared. La mutación de ambos genes permite la formación de células viables, ya que su función es redundante. El fenotipo distintivo es la falta de fluorescencia de las esporas, debido a defectos en los residuos de di-tirosina en la pared externa de la ascospora. Las esporas mutantes son sensibles a enzimas hidrolíticas, éter y choque térmico (Christodoulidou *et al.*, 1996).

La levadura resulta así un organismo de estudio excepcional para evaluar el efecto de las acetogeninas, particularmente por las alteraciones que estas causan en la metamorfosis de pupas de *A. aegypti* y en ninfas y adultos de *B. periplaneta*, puesto que se involucran alteraciones en el metabolismo de quitina, al igual que en levaduras. En el caso de los insectos estudiados, los daños observados corresponden a estados metamórficos no susceptibles a los antialimentarios como el Abate (insecticida organofosforado usado para el control por los Servicios de Salud oficiales), y durante los cuales la síntesis de quitina es esencial, por lo que consideramos posible que estén involucrados mecanismos diferentes (aunque posiblemente relacionados) al bloqueo de transporte electrónico. Para estudiar esta posibilidad, se seleccionaron mutantes en los genes *CDA* (*CDA1* y *CDA2*, variantes que codifica la enzima quitin-desacetilasa no funcional) y, simultáneamente con la cepa BY4741 Mat a (“silvestre”), se expusieron a las acetogeninas, para analizar alteraciones durante el crecimiento de las cepas en medio de cultivo líquido.

Método

Los extractos de semilla ricos en acetogeninas se prepararon según la metodología descrita en Domínguez-Martínez *et al.* (2003).

Las cepas “knock-outs” de *S. cerevisiae* (YKO MATa Strain Collection, Open Biosystems) y la cepa silvestre BY4741 Mat a se cultivaron en medio YPD (extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y dextrosa al 2%). Los cultivos se colocaron en matraces (o tubos de ensayo para determinaciones de absorbancia), adicionando 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de extracto rico en acetogeninas. Se incluyeron cultivos control sin tal extracto. En cada matraz se inocularon volúmenes adecuados (20-50 μL) de cultivos de 18 h, suficientes para alcanzar una absorbancia (540 nm) inicial

de 0.05. Los matraces y tubos se incubaron en un baño a 32°C con agitación constante.

Para analizar posibles alteraciones en la replicación, se siguió el incremento de la población a diferentes tiempos, usando dos parámetros: el registro de la absorbancia a 540 nm, y el peso seco celular, para lo cual se tomaron alícuotas de 3 mL del mismo medio, a cada tiempo, se centrifugación a 4°C y 8,000 rpm, se eliminó el sobrenadante, y los tubos se secaron a 40°C luego de lo cual los tubos se pesaron en una balanza analítica (hasta 1 décima de mg).

De cada tiempo de muestreo se prepararon frotis que se tiñeron con azul de metileno al 0.1% en agua, a fin de detectar células muertas, considerando que sólo aquellas levaduras cuya membrana estuviera dañada, son susceptibles de tinción. Los frotis se observaron al microscopio compuesto (40X), en busca de alteraciones en la morfología celular. Los cambios como elongación celular, formación no apical de yemas, células hijas unidas a la célula madre, células unidas por septo visible o formación de estructuras precursoras de formas invasivas (células madre con más de una yema alargada que permanece unida a la madre, ver figuras 6 y 7), se tomaron como anomalías morfológicas. Se analizaron 5 campos por preparación. Se muestran los más representativos.

La confiabilidad de los resultados se evaluó mediante determinación de la media y desviación estándar para 3 repeticiones de cada cultivo (tomando células originales, dado que la levadura tiene alta capacidad de regeneración y salteo de las mutaciones) de las correspondientes mutantes y la cepa control, en referencia a cultivos idénticos sin extracto.

Resultados y discusión

En la figura 5 se muestra la morfología normal (a) de la cepa silvestre BY4741 Mat a y la mutante *cdal*Δ (b), luego de 3 h de incubación a 32°C en medio YPD. Hay células solas, ovoides, de tamaño constante. La mayoría presentan una yema apical, que es el fenotipo normal.

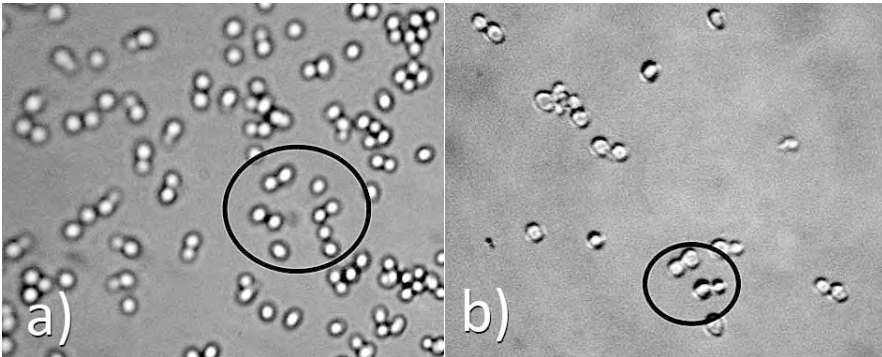


Figura 5a. Morfología de la cepa silvestre BY4741 Mat a no expuestas a acetogeninas. A la derecha (figura 5b) se muestra la mutante *cda1Δ* en medio YPD (mismo tiempo de cultivo que BY4741). Es notable la menor densidad celular en esta última. En círculos se destacan células en gemación

En presencia del extracto y a las 5 h de cultivo, la cepa BY4741 presenta gemación y aumento de la densidad poblacional, lo que indica que la sustancia no impide la replicación ni alteraciones al ciclo celular, que se reflejan en el crecimiento del cultivo (figura 6).

Sin embargo se encuentran numerosas células madre con más de una yema unida, lo que demuestra alteraciones en la gemación (figura 6, círculos oscuros). Esta anomalía confirma que los septos (notables entre algunas yemas y su célula madre, destacados con flechas en la figura 6) no se forman correctamente (lo que impide la liberación), o bien que hay deficiencias en la formación de la pared. En ambas estructuras se requiere la síntesis de quitina (Ono, *op. cit.*), para cuya síntesis esta cepa no debería tener dificultad alguna (ver más adelante).

Hay varios agregados, que reiteran anomalías (cuadros). Algunas células hijas emergen lejos del ápice, y son ligeramente alargadas (círculos blancos), como si se fuera a proseguir con desarrollo invasivo, que no llega a formar pseudohifas (las que si se observaron en la cepa *yrr1Δ*; Domínguez-Martínez *et al.*, 2009) típicas de etapas invasivas de levaduras y hongos del ambiente.

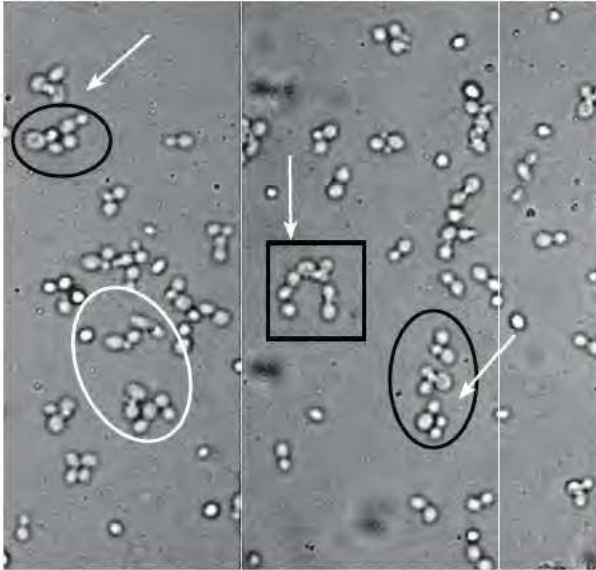


Figura 6. Cepa silvestre expuesta por 5 h al extracto

La cepa *cdalΔ* bajo las mismas condiciones, presenta una ligera disminución en la densidad celular (figura 7), aunque no hay células muertas, pero sí un número mayor de células unidas en todos los tiempos de observación. Hay muchas células en gemación, pero en mayor proporción las que tienen yemas múltiples (2 o 3) unidas a la madre (círculos oscuros). Se distinguen claramente algunos septos entre madre y yema (flecha). Algunas de las yemas son muy alargadas (círculos blancos) y/o en posición no apical, semejando nuevamente el inicio de procesos de invasión. El tamaño celular es muy variable.

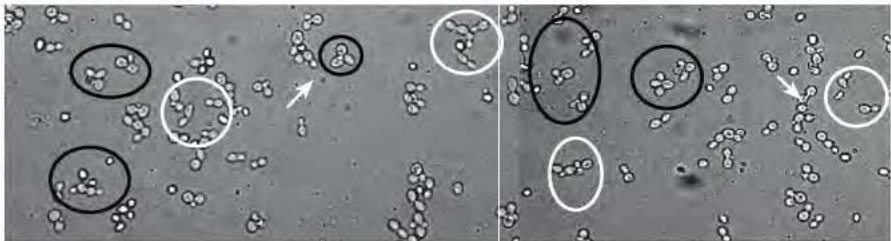


Figura 7. Mutante *cdalΔ* expuesta por 5 h a la anonacina

Conviene resaltar que si la exposición es a mayor proporción del extracto respecto al medio de cultivo (75, y 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$), o se mantienen por tiempos mayores a 18 h, se observan daños más severos, aun en la cepa silvestre (figura 8): las madres con más de una hija, (círculos oscuros) y con yemas no apicales (cuadro) son frecuentes, así como los agregados. Las hijas son alargadas (círculos claros). También hay células en gemación de gran tamaño (flecha), pero si bien las alteraciones morfológicas se acentúan, no se detecta ningún incremento en la mortandad (la densidad celular es grande y no hay células azules), lo que habla de la capacidad de adaptación de las células, aun a costa de impacto en la morfología.

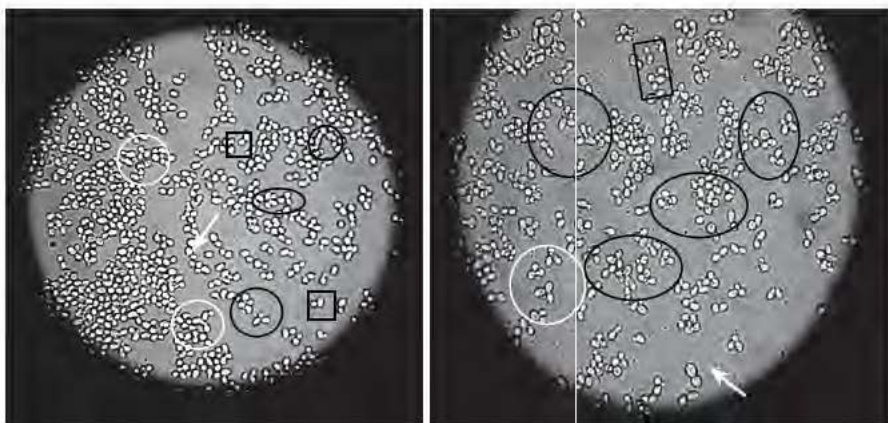


Figura 8. Células silvestres expuestas por 18 h a 75 μL (izquierda) y 150 μL (derecha) de anonacina por mililitro de cultivo

Todos los fenotipos encontrados, son clara confirmación de alteraciones de la gemación, en la cual participan tanto los genes de formación de pared, como los que codifican para la quitina sintetasa y quitina desacetilasa. Los defectos en la formación y resolución del septo (observable como células madre con más de una hija, y los agregados) involucran a la enzima quitina sintetasa, principalmente la producida por *Chsp2* y su regulador, *Chsp3* (Ono *op. cit.*) así como los productos de los genes de quitina desacetilasa (Christodoulidou *op. cit.*), cuya función es relevante en la libración de la yema, la cual requiere tanto la formación de septos

funcionales, como de la síntesis de la nueva pared, cuyo componente principal es la quitina. Sin embargo, la regulación involucra a genes como *FLO8*, lo que explica la formación de células madre con múltiples yemas unidas, aun en la cepa no mutada (figuras 6 y 8). Este fenotipo es inesperado en las cepas YKO Mat a, las cuales son isogénicas de la cepa BY4741-Mat-a. Está reportado que esta cepa no puede formar pseudohifas y que no presenta crecimiento invasivo debido, precisamente, a una mutación en el gene *FLO8* (Liu H. *et al.*, 1996), de modo que las anomalías son evidencia de que las acetogeninas tienen efectos pleiotrópicos, no necesariamente causados por déficit de ATP.

Tras el mecanismo de adaptación descrito (alteraciones morfológicas y de gemación, más que muerte celular) subyacen procesos moleculares a estudiar, como la regulación transcripcional de los genes mencionados, y cascadas de transducción de señales involucradas al menos, en el ciclo celular (como MAPK, vía a la que pertenece *FLO8*).

Las alteraciones morfológicas observadas de ninguna manera se pueden atribuir a daños relacionados con la presencia de deshidrogenasas alternativas, puesto que las levaduras no deben ser sensibles a las acetogeninas. Esto constituye un argumento más a favor de que las acetogeninas no son únicamente agentes desacoplantes.

Conclusiones

Los extractos de acetogeninas provenientes de guanábana dañan las vías de diferenciación y metamorfosis, no sólo en culícidos y otros insectos (cucaracha doméstica), sino en organismos como la levadura, que requieren la biosíntesis de quitina para su desarrollo.

Las acetogeninas alteran la morfogénesis de *S. cerevisiae* de la cepa de levadura BY4741 MAT a, afectando genes de la síntesis de quitina, lo que constituye una evidencia de que el daño previamente observado a *Aedes aegypti*, *Blatella periplaneta* y *Anastrepha ludens* no sólo se debe a bloqueo del transporte de electrones y al consecuente déficit en los niveles de ATP.

El uso de cepas mutantes de levadura (BY4741 MAT a) como “organismos modelo” es adecuado, ya que en este trabajo resultó útil para demostrar que las acetogeninas:

1. No solamente bloquean el transporte electrónico mitocondrial (a nivel del Complejo I, como la rotenona), sino que
2. Afectan vías relacionadas con la biosíntesis de quitina, dado que mutantes relacionadas con esta vía desarrollan fenotipos anormales, lo que demuestra que el gen alterado está afectado por las acetogeninas.
3. Dado que las cepas usadas son haploides y no deben formar pseudohifas ni hacer crecimiento invasivo, las alteraciones morfológicas mostradas sugieren que están implicados genes como *FLO8*, que a su vez es miembro de la cascada de transducción de MAPK, relacionada con el ciclo celular (y con la gemación normal).

Agradecimientos

Las cepas usadas en este trabajo fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Sergio Encarnación del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. El Dr. Mariano Martínez Vázquez del Instituto de Química, UNAM, realizó la determinación de acetogeninas de los extractos bioactivos. El trabajo es parte del proyecto del UVERCAEC022, financiado por PROMEP/SESI.

Referencias

- Abe, M., Kenmochi, A., Ichimaru, N., Hamada, T., Nishioka, T. and Miyoshi, T. 2004. Essential structural features of acetogenins: role of hydroxy groups adjacent to the bis-THF rings. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (3): 779-782.
- Alali, F.Q., Liu, X.X. and McLaughlin, J.L. 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J. Nat. Prod.* 62: 504-540.
- Bermejo, A., Figadère, B., Zafra-Polo, M.C., Barrachina, I., Estornell, E. and Cortes, D. 2005. Acetogenins from annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep.* 22 (3): 269-303.
- Bobadilla, A.M., Zavaleta, E.G., Gil, F.F. y Pollak, V.L. 2002. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller (chirimoya) y *A. muricata*, Linnaeus (guanábana), sobre larvas del IV estadio de *Anopheles sp.* *Rev. Peru Biol.* 9 (2): 64-73.
- Christodoulidou, A., Bouriotis, V. and Thireos, G. 1996. Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271 (49): 31420-31425.
- de Vries, S., Van Witzenburg, R., Grivell, L.A. and Marres, C.A.M. 1992. Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive

- NADH-ubiquinone oxidoreductasa of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 203: 587-592.
- Degli Esposti, M.A., Ghelli Ratta, M., Cortes, D. and Estornell, E.E. 1994. Natural substances (acetogenins) from the family *Annonaceae* are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochem J.* 301: 161-167.
- Domínguez Martínez, Verónica G., Andrade Domínguez, A., Trejo Hernández, A., Ortega Jiménez, R. 2009. Estudio del mecanismo de daño por acetogeninas usando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucarionte. XVI Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Boca del Río, Veracruz. México. Pp 11-17. <http://www.smb.org.mx/>
- Domínguez-Martínez, V.G., Collar Gómez, E., Atzín García, J. and Chimalpopoca, F.L. 2003. Pupicidal activity of annonacin for *Aedes aegypti* (L.) (Díptera, Culicidae). *Folia Entomológica Mexicana.* 42 (3): 349-358.
- González-Coloma, A., Guadaño, A., de Inés, C., Martínez-Díaz, R. and Cortes, D. 2002. Selective action of acetogenin mitochondrial Complex I inhibitors. *Z Naturforsch.* 57c: 2018-1034.
- Guadaño, A., Gutiérrez, C., de la Peña, E., Cortes, D. and González-Coloma, A. 2000. Insecticidal and mutagenic evaluation for two annonaceous acetogenins. *J. Nat. Products.* 63: 773-776.
- Hamada, T., Ichimaru, N., Abe, M., Fujita, D., Kenmochi, A., Nishioka, T., Zwischer, K., Brandt, U. and Miyoshi, H. 2004. Synthesis and inhibitory action of novel acetogenin mimics with bovine heart mitochondrial complex I. *Biochemistry.* 43: 3651-3658.
- He, K., Zhao, G.X., Shi, G., Zeng, L., Chao, J.F. and McLaughlin, J.L. 1997. Additional bioactive annonaceous acetogenins from *Asimina triloba* (Annonaceae). *Bioorg Med Chem.* 5 (3): 501-506.

- Liu, H., Styles, C.A. and Fink, G.R. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics*. 144 (3): 967-978.
- Londerhausen, L., Leicht, M.W., Lieb, F., Moeschler, H. and Weiss, H. 1991. Molecular mode of action of annonacines. *Journal of Pest Sciences*. 33 (4): 427-433.
- Luna Cázares, L.M., González E., A.R. y de la Cruz C., I. 2003. Actividad insecticida de *Annona diversifolia* sobre *Culex pipiens quinquefasciatus*. Memorias del V Congreso Mexicano de Etnobiología. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. Pp. 99.
- Martínez Navarro, A.C. 2008. Estudio del mecanismo de acción de una acetogenina de *Annona muricata* en cucaracha (*Blattella periplaneta*). Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana.
- Ono, N.T., Yabe, M., Sudoh, T., Nakajima, Yamada-Okabe, T., Arisawa, M. and Yamada-Okabe, H. 2000. The yeast Chs4 protein stimulates the trypsin sensitive activity of chitin synthase 3 through an apparent protein-protein interaction. *Microbiology*. 146: 385-391.
- Rivera Pérez, R.E., Juárez, O., Matus Ortega, M.G. y Pardo, J.P. 2005. Efecto de las quinonas sobre la NADH deshidrogenasa interna mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. Oaxaca, Oaxaca, México. Pp. 1-7.
- Seo, B.B., Wang, J., Flotte, T.R., Yagi T. and Matsuno-Yagi, A. 2000. Use of the NADH-quinone oxidoreductase (NDII) gene of *Saccharomyces cerevisiae* as a possible cure for complex I defects in human cells. *J Biol Chem*. 275: 37774 -37778.

- Takada, M., Kuwabara, H., Nakato, A., Tanaka, H., Iwamura, Y. and Miyoshi, H. 2000. Definition of crucial structural factors of acetogenines, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1460: 302-310.
- Yuan, S.S., Chang, H.L., Chen, H.W., Yeh, Y.T., Kao, Y., Lin, K.H. and Wu, J. 2003. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrest cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax and caspase-3 related pathway. *Life Sciences*. 72: 2853-2861.
- Abe, M., Kenmochi, A., Ichimaru, N., Hamada, T., Nishioka, T. and Miyoshi, T. 2004. Essential structural features of acetogenins: role of hydroxy groups adjacent to the bis-THF rings. *Bioorg. Med.Chem. Lett.* 14 (3): 779-782.
- Rivera Pérez, R.E., Juárez, O., Matus Ortega, M.G. y Pardo, J.P. 2005. Efecto de las quinonas sobre la NADH deshidrogenasa interna mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. Oaxaca, Oaxaca, México. Pp. 1-7.
- Seo, B.B., Wang, J., Flotte, T.R., Yagi T. and Matsuno-Yagi, A. 2000. Use of the NADH-quinone oxidoreductase (NDII) gene of *Saccharomyces cerevisiae* as a possible cure for complex I defects in human cells. *J Biol Chem*. 275: 37774 –37778.
- de Vries, S., Van Witzenburg, R., Grivell, L.A. and Marres, C.A.M. 1992. Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductasa of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem*. 203: 587-592.
- Ono, N.T., Yabe, M., Sudoh, T., Nakajima, Yamada-Okabe, T., Arisawa, M. and Yamada-Okabe, H. 2000. The yeast Chs4 protein stimulates the trypsin sensitive activity of chitin synthase 3 through an apparent protein-protein interaction. *Microbiology*. 146: 385-391.

- Christodoulidou, A., Bouriotis, V. and Thireos, G. 1996. Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271 (49): 31420-31425.
- Liu, H., Styles, C.A. and Fink, G.R. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics.* 144 (3): 967-978.

